

Ursachen der unterschiedlichen Oligomerisierung von Lichtsammelproteinen

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Dominik Corbet
geboren am 12.01.1976 in Landau i. d. Pfalz, Deutschland

Mainz, 2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2008

meiner lieben Familie

INHALT

A	EINLEITUNG	1
1	Oxygene Photosynthese und Aufbau der Thylakoidmembran.....	1
2	Struktur des Photosystem I	2
2.1	Aufbau des LHCI.....	3
3	Struktur des Photosystem II.....	4
3.1	Aufbau und Dynamik der PSII-Antenne	5
4	Struktur eines monomeren LHCs.....	5
5	Eigenschaften monomerer, dimerer und trimerer LHCs	6
5.1	Das Heterodimer LHCI-730.....	7
5.2	Das Trimer LHCII	8
5.3	Das Monomer CP29.....	11
6	Proteinfaltung und Assemblierung	12
7	Fragestellung	15
B	MATERIAL.....	16
1	Chemikalien und Reagenzien	16
2	Geräte	16
3	Datenbanken und Software	18
4	Molekularbiologische und proteinbiochemische Arbeitmaterialien....	18
4.1	Expressionsvektoren.....	18
4.2	Bakterienstämme	20
4.3	DNA-Standards.....	20
4.4	Proteinmarker	21
4.5	Klone.....	22
C	METHODE.....	23
1	Mikro- und molekularbiologische Methoden	23
1.1	Bakterienanzucht	23
1.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	24
1.3	Herstellung von <i>E. coli</i> -Dauerkulturen.....	24
1.4	Agarose-Gelelektrophorese	25
1.5	Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> -Zellen	26
1.5.1	Plasmid-Mini-Präparationen bis 20 µg DNA-Ausbeute.....	26

1.5.1.1	Isolation mittels "Wizzard™ Plus DNA Purification System"	26
1.5.1.2	Isolation mittels "GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit"	27
1.5.2	Plasmid-Midi-Präparation bis 100 µg DNA-Ausbeute	27
1.6	DNA-Quantifizierung	28
1.6.1	Photometrische Quantifizierung doppelsträngiger DNA	28
1.6.2	Grobe DNA-Schätzung via Agarose-Gelelektrophorese-Standards	28
1.7	Polymerase-Kettenreaktion zur Herstellung der verwendeten Mutanten	29
1.7.1	Identifikation und Umklonierung von <i>lhc</i> -Genen aus einer cDNA-Plasmidbank	29
1.7.2	Herstellung von Einzel-, Bereichs-, und Wiederherstellungsmutanten des Lhca4 durch ortsgerichtete Mutagenese	30
1.7.3	Herstellung von Einzeldomänenmutanten mit substituiertem N-Terminus durch multiple Ligation PCR-gefertigter "blunt-end" Fragmente	33
1.7.4	Herstellung chimärer Proteine durch mehrstufige PCR-Techniken mittels Überhangprimer	33
1.7.4.1	Herstellung von Einzeldomänenmutanten mit substituiertem N- und C-Terminus durch eine zweistufige PCR	35
1.7.4.2	Austausch innen gelegener <i>lhc</i> -Domänen über 3- oder 4-stufige PCR	35
1.7.5	Herstellung chimärer Proteine mittels "Quikchange® II Site-directed Mutagenesis Kit"	35
1.7.6	Kolonie-PCR zur Identifikation positiver Klone	37
1.8	Methoden zur DNA-Aufreinigung	38
1.8.1	DNA-Aufreinigung durch Isopropanolfällung zur Primerabtrennung	38
1.8.2	Quantitative DNA-Fällung mittels Ethanol zur Reinigung kleiner Fragmente	39
1.8.3	DNA-Extraktion aus Agarosegelen zur Abtrennung unerwünschter PCR-Nebenprodukte	39
1.9	Restriktionsendonucleasereaktionen	39
1.9.1	Restriktionsverdau der Plasmid-, Vektor-, und Insert-DNA zur Herstellung neuer Mutanten	41
1.9.2	Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA zur Identifikation positiver Klone	41
1.10	Ligation von Insert- und Vektor-DNA	42
1.11	Transformation verschiedener <i>E.coli</i> Zelllinien	43
1.12	DNA-Sequenzierung zur Überprüfung eingefügter Mutationen	43
2	Biochemische und biophysikalische Methoden	45
2.1	Überexpression und Isolierung von Einschlusskörperproteinen	45
2.2	Proteinquantifizierung mittels Bio-Rad-Assay nach Bradford	46
2.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
2.3.1	Voll denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
2.3.2	Schwach denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
2.4	Isolation von Totalpigmentextrakt aus Tomatenpflanzen	49
2.4.1	Tomatenanzucht	49
2.4.2	Thylakoidisolierung aus frischen Pflanzen	50
2.4.3	Extraktion des Totalpigmentextrakts aus Tomatenthylakoiden	50
2.5	Bestimmung der Chlorophyllkonzentration nach Porra	51
2.6	Rekonstitution von rekombinanten Lichtsammelkomplexen	51

2.6.1	Monomer- und Heterodimerrekonstitutionen	52
2.6.2	Trimerrekonstitution über eine Nickel-Chelating-Sepharose-Säule.....	52
2.7	Densitometrische Quantifizierung zur Auswertung der Rekonstitutionen.....	54
2.8	Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation	55
2.9	Solubilisierung von isolierten Thylakoiden	55
2.10	TCA-Fällung der Apoproteine aus rekonstituierten Lichtsammelkomplexen ...	55
2.11	High Pressure Liquid Chromatography	56
2.12	77 K Fluoreszenzemissionsspektroskopie	57
3	Bioinformatische Methoden	58
3.1	Datenbanksuche und Erstellung multipler Sequenzalignments	58
3.2	Abstandsmessungen in Modellen der Lichtsammelkomplexe.....	59
D	ERGEBNISSE	60
1	Ermittlung von Consensussequenzen der Lhc-Proteine	
	durch Sequenzalignments	61
1.1	Identifikation von Lhc-Proteindomänen mit niedriger Sequenzidentität.....	61
1.2	Betrachtung einzelner Lhc-Proteinabschnitte.....	63
1.3	Abstandsmessungen in LHCII- und PSI-Kristallstrukturen zum Vergleich	
	der Schleifenregionen unterschiedlicher LHCs	65
2	Einfluss von Proteindomänen mit niedriger Sequenzidentität	
	auf das Oligomerisierungsverhalten von Lichtsammelproteinen	66
2.1	Betrachtung des Oligomerisierungsverhaltens von Lhca4, Lhcb1 und Lhcb4....	
	nach Austausch einer einzelnen Proteindomäne	67
2.1.1	Beitrag aminoterminaler Domänen am Oligomerisierungsverhalten	68
2.1.1.1	Nachweis der Bildung von Doppelheterodimeren nach Auftrennung	
	der Lhca4-Mutante mit getauschtem N-Terminus	70
2.1.1.2	Identifizierung einer hochmolekularen Bande bei Dimerisierungsexperimenten	
	als Doppeldimere.....	71
2.1.2	Bedeutung der carboxyterminalen Domäne für das Oligomerisierungsverhalten	72
2.1.3	Einfluss der luminalen Schleifenregion auf die LHC-Oligomerisierung	74
2.1.3.1	Identifikation des luminalen Lhca4-Interaktionspunkts zum Lhca1	
	durch Punktmutationen.....	77
2.1.3.2	Einfluss der Lhca-Spezies, des Lhca1-His-tags und der Länge des Lhca1 C-Terminus.....	
	auf die Dimerausbeuten des LHCI-730.....	78
2.1.4	Einfluss der stromalen Schleife auf das Oligomerisierungsverhalten.....	80
2.1.4.1	Eingrenzung der mit dem Lhca1 interagierenden Lhca4-Aminosäuren	
	durch Erzeugung von Doppel- und Bereichsmutanten	83
2.1.5	Bedeutung der Helix 2 für das Oligomerisierungsverhalten von Lhc-Proteinen	85
2.1.5.1	Untersuchung von 3 Aminosäure-Bereichen der Helix 2 des Lhca4	
	auf Interaktion mit Lhca1	89
2.1.5.2	Mutationsanalysen zur Identifikation einzelner für die Dimerisierung wichtiger	
	Aminosäuren der 2. Helix	91

2.1.5.3	Kombinationsmutante und Wiederherstellung der Dimerisierungsfähigkeit der Lhca4-H2a3-Mutante durch Reintegration von original Lhca4-Wildtyp Aminosäuren.....	93
2.1.5.4	Rekonstitutionsversuche zur Identifikation eines möglichen Interaktionspunkts zwischen dem C-Terminus des Lhca1 und der 2. Helix des Lhca4	96
2.1.6	Charakterisierungen der rekonstituierten LHCs von Einzeldomänenmutanten und Punktmutanten	97
2.1.6.1	Effekte der getauschten Proteindomänen und Punktmutationen auf die Pigmentbindung der LHCs.....	97
2.1.6.1.1	Auswirkungen der Punktmutationen an Chlorophyll-bindenden AS der 2. Helix des Lhca4 auf die Pigmentbindung monomerer und dimerer LHCs.....	98
2.1.6.1.2	Auswirkungen des Austauschs und der Punktmutation luminaler und stromaler Schleifendomänen auf die Pigmentbindung monomerer und dimerer LHCs	100
2.1.6.1.3	Auswirkungen des Austauschs der N- und C-terminalen Domäne auf die Pigmentbindung monomerer, dimerer und trimerer LHCs	104
2.1.6.2	Einfluss der getauschten Domänen und Punktmutationen auf den Energietransfer in LHCs.....	108
2.1.6.2.1	Auswirkungen der Punktmutationen an Chlorophyll-bindenden AS der 2. Helix des Lhca4 auf den Energietransfer in monomeren und dimeren LHCs.....	109
2.1.6.2.2	Auswirkungen des Austauschs und der Punktmutation luminaler und stromaler Schleifendomänen auf den Energietransfer in monomeren und dimeren LHCs.....	110
2.1.6.2.3	Auswirkungen des Austauschs der N- und C-terminalen Domäne auf den Energietransfer in monomeren, dimeren und trimeren LHCs.....	115
2.2	Transfer der Dimerisierungs- oder Trimerisierungseigenschaften durch simultanen Austausch von zwei Proteindomänen.....	119
2.3	Übertragung der Oligomerisierungseigenschaften durch umfangreichen Domänentausch.....	122
2.3.1	Erzeugung einer Lhca1-Mutante mit Lhca4-Bestandteilen mit dem Ziel multimere LHCs zu rekonstituieren	122
2.3.2	Herstellung von Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit allen für eine Trimerisierung essentiellen Lhcb1-Bestandteilen.....	124
2.3.3	Erzeugung von Lhcb1- und Lhcb4-Mutanten mit allen für eine Heterodimerisierung .. essentiellen Lhca4-Bestandteilen.....	126
2.3.3.1	Spektroskopische Eigenschaften und Pigmentbindung der heterodimerisierenden Lhcb1 und Lhcb4-Mutanten	127

E DISKUSSION.....130

1	Bedeutung schwach konservierter Domänen für die unterschiedlichen Oligomerisierungszustände	131
1.1	Einfluss der N-terminalen Domäne auf das Oligomerisierungsverhalten	131
1.1.1	N-Terminus ist unbedeutend für die Heterodimerisierung des Lhca4 mit Lhca1....	132
1.1.1.1	Der N-Terminus des Lhca4 verhindert die Bildung von Doppelheterodimeren.....	135
1.1.1.2	Bildung unspezifischer Doppelheterodimere nach Gelelektrophorese.....	135
1.1.2	Bestätigung der Wichtigkeit des Lhcb1-N-Terminus für die Trimerisierung	136
1.2	Einfluss der C-terminalen Domäne auf Oligomerisierungsverhalten.....	138
1.2.1	Die Übertragung des C-Terminus von Lhcb4 auf Lhca4 und Lhcb1 führt zu einer Beeinträchtigung der Monomerbildung.....	138
1.2.2	Der C-Terminus beeinflusst weder die Heterodimerisierung noch die Trimerisierung.....	139

1.3	Der Einfluss der Schleifenregionen auf Monomerstabilität und die Oligomerisierung	140
1.3.1	Der Austausch der luminalen Domäne führt zur Bildung instabiler Monomere	140
1.3.2	Der Austausch der stromalen Domäne führt zur Bildung instabiler Monomere.....	142
1.3.3	Die Heterodimerisierung und die Trimerisierung werden durch die Schleifendomänen stark beeinflusst.....	144
1.3.4	Die Existenz einer Helix 5 in der luminalen Schleife des Lhca1 ist wahrscheinlich	146
1.4	Die 2. Helix beeinflusst die Monomer-, Heterodimer- und Trimerbildung	146
2	Übertragung von Oligomerisierungseigenschaften auf andere Lhc-Proteine	148
2.1	Für den Transfer des Oligomerisierungsverhaltens sind mehr als zwei essentielle Domänen nötig	148
2.2	Die Fähigkeit zur Trimerbildung war trotz umfangreichem Domänenaustausch nicht transferierbar?	148
2.3	Lhcb4- und Lhcb1-Chimären dimerisieren mit dem Lhca1	150
2.4	Kann eine Lhca1-Mutante multimere LHCs bilden	151
3	Lhca1-Lhca4-Interaktion im LHCI-730	153
3.1	Identifikation der mit dem Lhca1 interagierenden Aminosäuren der 2. Helix des Lhca4	153
3.2	Einfluss von Chlorophyllen und Lipiden auf die Heterodimerisierung	156
3.3	Identifikation des Interaktionspartners von Tryptophan 185 im Lhca1	158
3.4	Lhca1-Species beeinflusst Dimerausbeute: Arabidopsis versus Tomate.....	158
3.5	Die Bedeutung der stromalen Lhca4-Schleife für die Heterodimerisierung...	159
4	Ausblick	161
F	ZUSAMMENFASSUNG.....	163
G	LITERATUR.....	166
	ANHANG	180
A1	Hergestellte Mutanten mit Primersequenzen	180
A2	Proteinsequenzalignments mehrerer Arten	183
A3	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Arabidopsisproteinen..	194

ABKÜRZUNGEN

Å	Angström
Abb.	Abbildung
Ala, A	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Arg, R	Arginin
AS	Aminosäure
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Chl	Chlorophyll
Chlamydomonas	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CP	chlorophyll protein
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiotreithol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELIP	early-light-inducible-protein
EM	Elektronenmikroskopie
EST	expressed sequence tag
Gln, Q	Glutamin
Gly, G	Glycin
Glu, E	Glutamat
H	Helix
His, H	Histidin
His-tag	Hexahistidylrest
HLIP	high-light-inducible-protein
HPLC	high-pressure-liquid-chromatography
IB	inclusion bodies
Ile, I	Isoleucin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
Kac	Kaliumacetat
kDa	kilo-Dalton
lac i	lac-Repressor
LB-Medium	Luria-Bertrani-Medium
LDS	Lithiumdodecylsulfat
Leu, L	Leucin
LHC	light-harvesting complex
Lhc	light-harvesting chlorophyll <i>a/b</i> -binding protein
<i>lhc</i>	Gen des light-harvesting chlorophyll <i>a/b</i> -binding proteins
Lys, K	Lysin
NADP	Nicotinamid-Adenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OEE	oxygen evolving enhancer
OHP	one helix protein

OG	Octylglucosid
ori	origin of replication
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PG	Phosphatidylglycerin
Phe, F	Phenylalanin
P _{N25}	Promotor aus T5-Phage
PS	Photosystem
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RC	Reaktionszentrum
RE	Restriktionsendonucleasen
SDG	Saccharosedichtegradient
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEP	stress enhanced protein
Ser, S	Serin
SV	Säulenvolumen
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylendiamin
TM	transmembran
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>
Trp, W	Tryptophan
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr, Y	Tyrosin
U	Units
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifugation
WT	Wildtyp
Val, V	Valin
V	Volt

Lichtreaktion werden die LHC-gebundenen Chlorophylle (Chl) durch Photonen angeregt. Durch excitonische Kopplung erfolgt die Weiterleitung der Energie zum Reaktionszentrum P 680 (Absorptionsmaximum bei 680 nm), das aus zwei Chl a-Molekülen besteht. Mittels Ladungstrennung wird ein Elektron über mehrere Zwischenmoleküle mit abnehmendem Redoxpotential auf Plastochinon, einem Zwei-Elektronen-Carrier übertragen. Die Elektronenlücke im resultierenden $(\text{Chl } a)_2^{+\cdot}$ -Radikal wird durch dessen hohes Redoxpotential (+1,1 V) wieder mit Elektronen aufgefüllt, die ursprünglich aus der Wasserspaltung stammen (Heldt, 2003).

Der Cytochrom $b_6 f$ -Komplex übernimmt Elektronen vom Plastohydrochinon und reduziert damit den Ein-Elektronen-Carrier Plastocyanin. Dabei werden Protonen in das Lumen der Thylakoidmembran freigesetzt, deren Menge durch den postulierten Q-Zyklus verdoppelt werden kann. Das hauptsächlich in den Stromathylakoiden lokalisierte Photosystem I (PSI) mit seinen peripheren Lichtsammelantennen LHCI-680 und LHCI-730 leitet Excitonen zum RC des Kernkomplexes (Core) weiter. Am P 700, einem Chl a-Dimer mit einem Absorptionsmaximum bei 700 nm erfolgt die Ladungstrennung. Die Elektronenlücke wird durch Elektronen vom reduzierten Plastocyanin wieder geschlossen. Das Elektron aus dem P 700 wird über verschiedene hintereinander liegende Redoxkomponenten auf Ferredoxin übertragen. Bei hohem ATP-Bedarf wird im zyklischen Elektronentransport das reduzierte Ferredoxin sein Elektron über Zwischenschritte auf das Plastochinon übertragen. Unter normalen Bedingungen reduziert Ferredoxin das NADP^+ , welches zwecks CO_2 -Fixierung in den Calvin-Zyklus einfließt. Außerdem wird durch einen in den Stromathylakoiden lokalisierten vierten multimeren Komplex (ATP-Synthase), die protonenmotorische Kraft des erzeugten Protonengradienten genutzt, um die Energie in Form von ATP zu speichern (Heldt, 2003; Taiz und Zeiger, 2006).

2 Struktur des Photosystem I

Am Aufbau des PSI höherer Pflanzen sind mindestens 15 Kern-Untereinheiten (UE) beteiligt, wovon lediglich 5 chloroplastencodiert sind (Jensen et al., 2007). Neuere Untersuchungen an PSI-Kristallen (Abb. 2) ließen die eindeutige Identifikation von 11 Kern-UE und vier mengenmäßig dominierenden Lichtsammelproteinen zu, die insgesamt 168 Chl binden (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007). Im Gegensatz zum monomeren PSI höherer Pflanzen liegt das PSI der Cyanobakterien als Trimer vor, wobei pro Komplex nur 12 UE mit 96 daran gebundenen Chl und 22 β -Carotinene nachgewiesen werden konnten (Jordan et al., 2001; Fromme et al., 2001). Im PSI höherer Pflanzen konnten die cyanobakteriellen UE PsaM und PsaX und daran gebundene Chl nicht nachgewiesen werden. Dafür existieren sowohl die PsaH-, als auch die PsaG-UE nur im PSI höherer Pflanzen, in welchem neben den 56 LHC-gebundenen Chl auch 19 zusätzliche Chl identifiziert wurden, die als „gap“- und „linker“-Chl zwischen LHC und Kern fungieren und eventuell auch am PsaK zur LHCI-Anlagerung während der „state-transition“ benötigt werden (Ben-shem et al., 2003; Amunts et al., 2007).

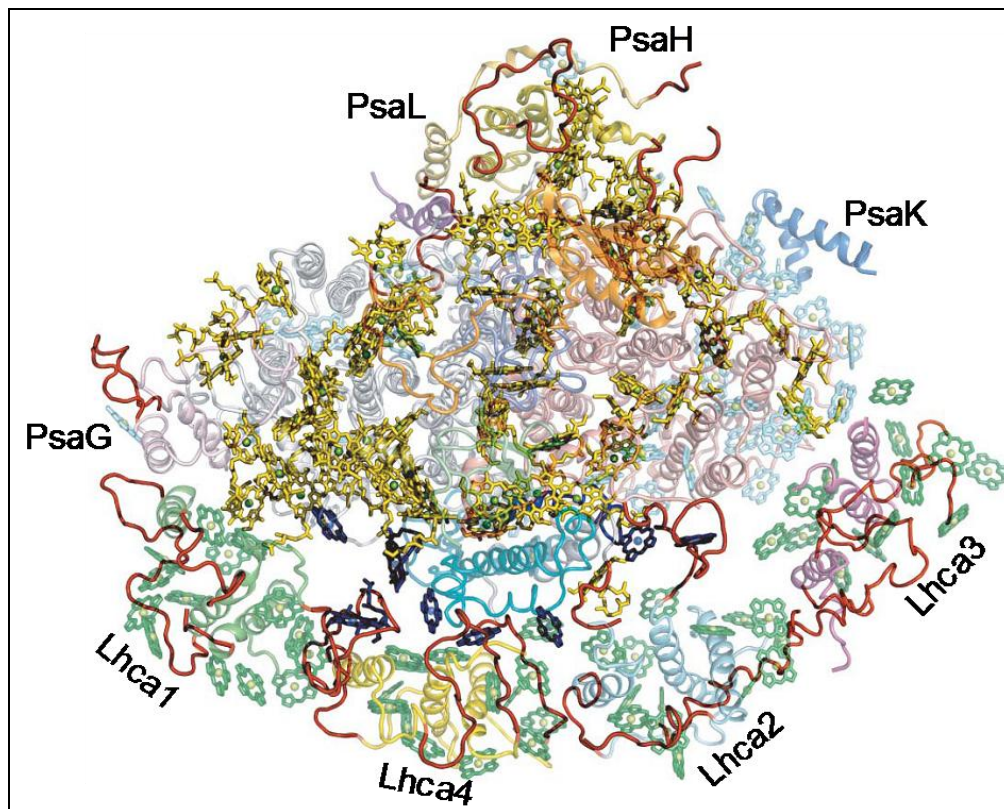


Abb. 2: Strukturmodell des PSI (nach Amunts et al., 2007). Darstellung des C α -Rückgrats und aller Cofaktoren bei 3,4 Å. Der LHCI-Gürtel (Lhca1 bis Lhca4) befindet sich im unteren Bildteil. Es handelt sich um eine Aufsicht auf die Thylakoidmembran von der stromalen Seite aus. Chl mit detektiertem Phytolrest (gelb); restliche RC-Chl (cyan); LHCI-Chl (grün); „gap“-Chl (dunkelblau).

Dem Kernkomplex werden neben dem Reaktionszentrum alle UE außer den LHCs zugeordnet. Die Untereinheiten PsaA und PsaB bilden das Reaktionszentrum und dienen der Ladungstrennung (P 700) sowie dem Elektronentransport (A_0 , A_1 , F_x). Die kleinen Untereinheiten des Kernkomplexes haben unterschiedliche Funktionen. So scheinen das PsaE, PsaC und PsaD aufgrund ihrer Oberflächenladungen eine Bindung des Ferredoxins auf der stromalen Seite zu ermöglichen (Fromme et al., 2003). Als Andockstelle des Plastocyanins auf der luminalen Seite werden die Untereinheiten PSI-F und PSI-N vermutet (Haldrup et al., 1999, 2000). Andere Untereinheiten (PsaI, PsaJ, PsaL) dienen nach bisherigem Kenntnisstand der Stabilität des PSI. Während PsaG mit dem Lhca1 und PsaF mit dem Lhca4 wechselwirkt, erfolgt die Fixierung des Lhca3 über PsaK, um die LHCs an den Kernkomplex zu koppeln (Abb. 2; Jensen et al., 2000). Modellierungen der verfügbaren Kristallstruktur bestätigten die „Docking“-Mechanismen der LHCs an die kleinen UE (Ben-Shem et al., 2004). Die PsaH-Untereinheit ist für die Bindung des LHCII während der „state transition“ erforderlich (Lunde et al., 2000). EM-Aufnahmen des PSI-LHCII Superkomplex von *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) bei 15 Å zeigen, dass der LHCII im Bereich des PsaH am PSI gebunden wird (Kouril et al., 2005).

2.1 Aufbau des LHCI

Die periphere Lichtsammelantenne des PSI wird als LHCI bezeichnet und besteht aus 4 unterschiedlichen Chl *a/b*-bindenden Proteinen, deren Molekularmassen zwischen 21 kDa und 24 kDa liegen (Haworth et al., 1983). Diese vier Proteine bilden vermutlich zwei heterodimere LHCs. Beide Komplexe wurden durch Lam et al. (1984) mittels Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation (SDG-UZ) entdeckt. Es traten 2

Subfraktionen auf, die sich in ihrem charakteristischen Fluoreszenzmaximum (730 nm und 680 nm) bei 77 K unterschieden, woraus die Bezeichnungen LHCI-730 und LHCI-680 resultierten (Bassi und Simpson, 1987). Die Lhca1-Lhca4-Subfraktion wies eine charakteristische Fluoreszenz bei 730 nm auf (Ikeuchi et al., 1991). Während Knoetzel et al. (1992) noch von der Existenz eines LHCI-680a und LHCI-680b überzeugt waren, die Lhca2- und Lhca3-Homodimeren entsprechen sollten, geht man heute aufgrund verfügbarer Kristallstrukturen von einem Lhca2-Lhca3-Heterodimer aus (Ben-Shem et al., 2003), das durch harsche Auftrennung in seine monomeren Bestandteile zerfällt, da die stabilisierenden „gap“-Chl verloren gehen und es nicht so kompakt organisiert ist wie der LHCI-730. Schonende LHCI-Isolationen zeigten, dass 2 Fraktionen mit einem 77 K-Fluoreszenzemissionsmaximum von entweder 730 nm (Lhca1+Lhca4) oder 702 nm (Lhca2+Lhca3) vorliegen (Ihalainen et al., 2000; Croce et al., 2002).

Schon Jansson et al. (1996) gingen davon aus, dass die Dimere des LHCI unabhängig voneinander an den PSI-Kern binden, jedoch konnten Experimente an Lhca-„knock out“ Pflanzen von *Arabidopsis* zeigen, dass ein LHCI ohne Lhca4, den gesamten Lichtsammelapparat destabilisieren konnte (Klimmek et al., 2005). Während *in vitro*-Rekonstitutionsexperimente belegen, dass die Lhca1- und Lhca4-UE ein Heterodimer bilden (Schmid et al., 1997; Ihalainen et al., 2000), konnten biochemische Analysen keine direkte Lhca2-Lhca3-Interaktion nachweisen (Schmid et al., 2002b). Neben den 4 häufigsten Lhc-Proteinen (Lhca1-4) existieren noch zwei weitere Lhca-Proteine mit sehr geringem Vorkommen. Der Lhca5 kann *in vitro* Heterodimere mit dem Lhca1 bilden (Storf et al., 2005). Es liegen aber auch *in vivo*-Untersuchungen vor, die darauf hinweisen, dass der Lhca5 entweder als Homodimer in der Lhca1-Lhca4-Position oder als Monomer in der Lhca2- oder Lhca3-Position vorliegt (Lucinski et al., 2006). Analysen der mRNA-Level zeigten, dass der Lhca6, wie der Lhca5 ein selten transkribiertes Lhc-Gen ist (Klimmek et al., 2006). Proteom-Analysen verschiedener Spezies erbrachten keinen Nachweis für ein *lhca6*-Genprodukt (Zolla et al., 2007).

3 Struktur des Photosystem II

Das PSII (Abb. 3) höherer Pflanzen liegt als Dimer vor und besteht aus mindestens 24 bis dato identifizierten Kernproteinen. Jüngst wurde ein aus Cyanobakterien bekanntes Psb27-Analogon in *Arabidopsis* identifiziert (Chen et al., 2006), das wie der OEE extrinsisch vorliegt und für die PSII-Reparatur nach Lichtschädigung benötigt wird (Roose et al., 2007). In cyanobakteriellem PSII existieren neben PsbG und PsbW auch Psb27-30, die zumeist in substöchiometrischen Mengen vorliegen (Kashino et al., 2002; Keren et al., 2005; Oudot-LeSecq et al., 2007).

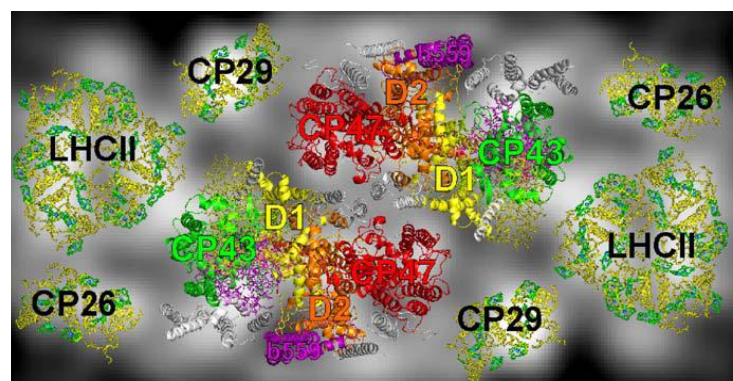


Abb. 3: Struktur des dimeren PSII höherer Pflanzen bei 17 Å Auflösung aus Nield und Barber (2006). Auf Basis der Strukturdaten eines cyanobakteriellen PSII-Kerns und einer neuen EM-Struktur des PSII-LHCII von Spinat, wurden die Kern-UE und Lichtsammelkomplexe (schwarz) darüber modelliert. (gelb): D1; (orange): D2; (grün): CP43; (violett): Cyt b_{559} .

Das D1 (PsbA) und D2-Protein (PsbD) bilden das Reaktionszentrum und sind von den inneren Antennen CP43 (**Chlorophyll-Protein**) (PsbC) und CP47 (PsbB) umgeben (Abb. 3). Zusammen binden diese Untereinheiten 36 Chl. Elektronenmikroskopische (EM) Analysen von dimerem PSII aus *Arabidopsis* zeigten, dass mit jedem Kernkomplex 3 monomere LHCs und 2 trimere LHCs unterschiedlicher Bindungsaffinität assoziiert ist und sich das CP26 unmittelbar beim CP43 befindet (Yakushevskaya et al., 2003). Ältere EM-Aufnahmen von Boekema et al. (1999) zeigten, dass mit einem PSII bis zu drei LHCII-Trimere assoziiert sein können. Bei Cyanobakterien konnten die Kernkomplexe bereits mit viel besserer Auflösung als bei höheren Pflanzen untersucht werden, die Aufnahmen enthielten aber auch keine OEE-UE.

3.1 Aufbau und Dynamik der PSII-Antenne

Die PSII-Antenne wird zur Vergrößerung des Absorptionsquerschnitts benötigt. Anders als im PSI sind die Chl *a*-bindenden inneren Antennen CP43 und CP47 nicht Bestandteil der RC-Proteine. Die äußere Antenne des PSII besteht aus monomeren und trimeren LHCs, die sowohl Chl *a*, als auch Chl *b* binden können. Hauptlichtsammler im PSII ist der trimere LHCII, der an S- (strong) und M-Position (moderate) gebunden vorliegt (Yakushevskaya et al., 2003). Zusätzlich existiert eine L-Bindungsstelle für den LHCII (loose), die aufgrund der niedrigen Bindungsaffinität aber selten besetzt ist (Boekema et al., 1999). Die minoren Antennen CP24, CP26, und CP29 liegen als Monomere vor und befinden sich näher an den inneren Antennen als der majore LHCII. Bei Überanregung des PSII liegt der Plastochinon-Pool der Thylakoidmembran durchreduziert vor. In Folge dessen wird eine Kinase aktiviert, die den LHCII phosphoryliert (Gal et al., 1990), der dadurch vom PSII dissoziiert und an das PSI binden kann, was als „state transition“ bezeichnet wird (Forsberg and Allen, 2001). Bei *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydomonas*) konnte beobachtet werden, dass das ebenfalls phosphorylierte CP29 mit dem LHCII co-migriert und als „Dockingstelle“ zwischen PSI-Kernkomplex und dem LHCII dient (Takahashi et al., 2006; Turkina et al., 2006).

4 Struktur eines monomeren LHCs

Pflanzliche Lichtsammelproteine gehören zur Super-Gen-Familie der kerncodierten Chl *a/b*-bindenden Proteine. Hierzu zählen nicht nur die Lhc-Proteine der majoren LHCs aus PSI (Lhca1, Lhca2, Lhca3, Lhca4) und PSII (Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3), sondern auch die der minoren Antennen des PSII (Lhcb4, Lhcb5, Lhcb6). Aus *Arabidopsis* sind bisher mehr als 30 Apoproteine dieser Genfamilie beschrieben und über 1000 EST-Klone (expressed sequence tag) bekannt (Jansson, 1999). Die Sequenzidentität dieser *lhc*-Gene liegt bei mehr als 35% (Pichersky und Jansson, 1994) und bestätigte bereits früher angefertigte Hydropathie-Plots (Green et al., 1991), die eine gemeinsame Struktur von drei Transmembranhelices (TM) voraussagen, wobei die erste und dritte Helix (H) in allen LHCs weitestgehend konserviert ist.

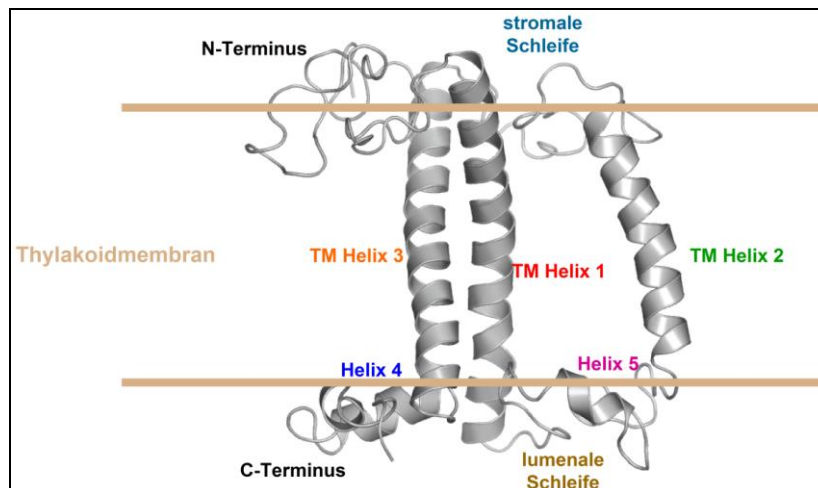


Abb. 4: Proteinstruktur des monomeren Lhcb1 aus einer LHCII-Struktur bei 2,5 Å Auflösung von Standfuss et al. (2005). Neben 3 transmembranen (TM) Helices und einer C-terminal gelegenen amphiphilen Helix 4, konnte im Lhcb1 auch eine 10 Aminosäuren umfassende Helix 5 in der luminalen Schleife lokalisiert werden.

Innerhalb der 1. und 3. Helix existiert ein so genanntes LHC-Motiv von 22 Aminosäuren (AS), das die stark konservierten geladenen AS Glutamat (Glu, E) und Arginin (Arg, R) und auch hoch konservierte Glycin (Gly, G)-Reste beinhaltet. Die Struktur wurde erstmals durch Kryo-EM an 2D-Kristallen des LHCII nachgewiesen (Kühlbrandt et al., 1994). Aktuelle LHCII-Modelle (Abb. 4) mit höherer Auflösung zeigen neben den erwarteten drei TM-Helices eine C-terminal gelegene kürzere Helix, die der Thylakoidmembran angelagert ist und eine 10 AS umfassende Helix 5 in der luminalen Schleife (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005). Die Superhelix, bestehend aus Helix 1 und Helix 3 wird im LHCII über 2 Ionenbindungen stabilisiert (Kühlbrandt et al., 1994). Da die beteiligten AS auch streng konservierte Chl-Bindungsstellen sind (Jansson, 1999), dürften die Salzbrücken in allen Lhc-Proteinen zu finden sein.

Neben LHCs mit drei Transmembranhelices gibt es noch andere Vertreter aus der Super-Gen-Familie mit einer, zwei, drei oder vier Helices. Das PsbS, ein 22 kDa intrinsisches Membranprotein des PSII hat vier TM-Helices. Dahingegen zählen die in Arabidopsis nachgewiesenen ELIPs (early light induced proteins) zu den 3-Helix-Proteinen (Heddad und Adamska, 2000), SEPs (stress enhanced proteins) zu den 2-Helix-Proteinen (Jansson et al., 2000) und HLIPs (high light induced proteins) zu den OHPs (one helix proteins) (Andersson et al., 2003a), die vor allem bei Lichtstress exprimiert werden. Es wird aufgrund vorliegender Sequenzalignments vermutet, dass die 4-Helix- und die 3-Helix-Proteine einen gemeinsamen bisher wenig untersuchten 2-Helix Vorfahren haben, der durch Genduplikation die Bildung der 4-Helix-Proteine hervorrief. Durch eine anschließende Deletion einer Helix könnten die LHCs mit 3 TM-Helices entstanden sein (Green und Pichersky, 1994; Pichersky und Jansson, 1996).

5 Eigenschaften monomerer, dimerer und trimerer LHCs

Die Aufklärung der LHCII-Struktur durch Kühlbrandt et al. (1994) ermöglichte es erstmals Sequenzalignments zu erstellen, um Vorhersagen über die gemeinsame Struktur der Lhc-Proteine zu treffen (Pichersky und Jansson, 1996; Jansson, 1999). Hohe Sequenzhomologien in der 1. und 3. TM-Helix und viele konservierte Chl-Bindungsstellen deuten auf eine ähnliche Monomerstruktur aller LHCs höherer Pflanzen hin. Dies gilt auch für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Proteine Lhca1, Lhca4, Lhcb1 und Lhcb4, deren unterschiedliches Oligomerisierungsverhalten detailliert untersucht wurde. So bilden zum Beispiel die minoren Lichtsammler des PSII nur

Monomere (CP24, CP26, CP29), der LHCI-730 liegt als Dimer vor (Lhca1 und Lhca4) und der majore LHCI stellt ein Trimer aus Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 dar. Da die gemeinsame Struktur von LHCs auf Regionen mit hoher Sequenzübereinstimmung zurückzuführen ist, sind die Interaktionspunkte zwischen den dimeren bzw. trimeren LHCs in Sequenzbereichen mit einer hohen AS-Variabilität zu suchen. Diese finden sich vor allem in den N- und C-terminalen Bereichen, den Schleifenregionen und der 2. Transmembranhelix. Unterschiede in der Pigmentbindung manifestieren sich in den spektralen Eigenschaften der LHCs und partizipieren, wie die für die Komplexbildung notwendigen Lipide, auch an der Oligomerisierung.

5.1 Das Heterodimer LHCI-730

In vitro Rekonstitutionsexperimente mit rekombinantem LHCI-730 aus Lhca1 und Lhca4 zeigen, dass die Fluoreszenzemissionsspektren der rekonstituierten Heterodimere große Ähnlichkeiten mit denen der nativen Komplexe aufweisen (Schmid et al., 1997). In Abhängigkeit vom Isolierungsverfahren liegen Lhca2 und Lhca3 als Dimere mit einem 77 K-Fluoreszenzemissionsmaximum bei 702 nm vor (Ihalainen et al., 2000; Croce et al., 2002) oder als Monomere mit einem 77 K-Fluoreszenzemissionsmaximum, was zu der Bezeichnung LHCI-680 führte. Bisher gelang es nicht, Heterodimere des Lhca2 und Lhca3 durch *in vitro* Rekonstitution zu erhalten (Bergauer, 2000; Schmid et al., 2002b; Castelletti et al., 2003).

Aus Tomatenthylakoiden isolierte native LHCI-730-Komplexe weisen pro Apoprotein ca. 8,6 Chl *a*- und 2,9 Chl *b*-Moleküle auf (Schmid et al., 2002b). Zudem konnte ermittelt werden, dass in einem Apoprotein ungefähr 2 Carotinoidbindungsstellen (1 Lutein, 0,4 β -Carotin, 0,5 Violaxanthin) enthalten sind. Rekonstitutionsexperimente mit *in vitro* gefalteten Lhca-Proteinen von Tomate zeigen, dass pro Monomerkomplex (bezogen auf 2 Carotinoide pro Apoprotein) im Lhca1 9,3 Chl *a* und 2,7 Chl *b* sowie im Lhca4 8,7 Chl *a* und 3,3 Chl *b* gebunden sind (Schmid et al., 2002b). In rekombinanten Arabidopsis-LHCs konnten beim Lhca1 8 Chl *a* und 2 Chl *b* und im Lhca4 7 Chl *a* und 3 Chl *b* identifiziert werden (Croce et al., 2002). Die Pigmentanalysen deuten außerdem darauf hin, dass im Lhca1 zusätzlich zur L1- und L2-Carotinoid-Bindungsstelle, die beide im Lhca4 besetzt sind, ein weiteres Carotinoid (Violaxanthin) an N1-Position gebunden werden kann. Die aktuelle PSI-Kristallstruktur von Erbse (*Pisum sativum*) zeigt jedoch, dass jeder LHC (Lhca1-4) 14 Chl bindet (Amunts et al., 2007), was ein Indiz für den Verlust von Pigmenten durch die LHCI-Isolierung ist.

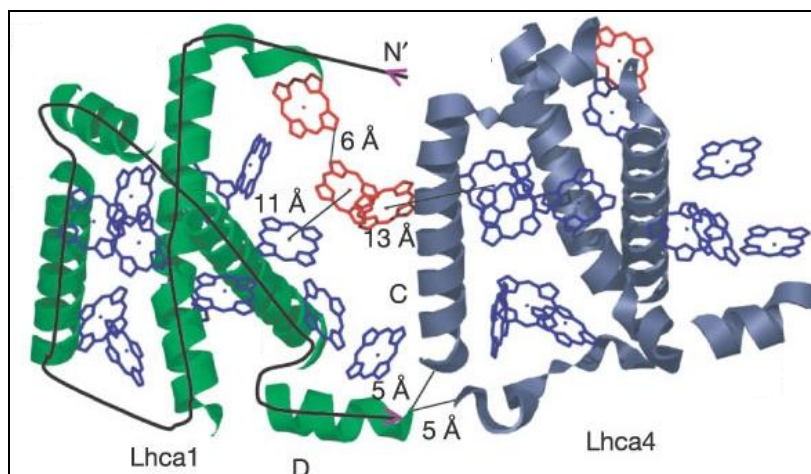


Abb. 5: Struktur des aus Lhca1- und Lhca4-Untereinheit bestehenden LHCI-730 nach Ben-Shem et al. (2003). Interaktionen finden voraussichtlich zwischen den N- und C-terminalen Regionen des Lhca1 mit der 2. Helix (C) oder der luminalen Schleife von Lhca4 statt.

Der LHCI hat in seinem Fluoreszenzemissionsspektrum eine deutliche langwellige Komponente bei 730 nm, die bei den LHCs des PSII nicht nachzuweisen ist (Schmid et al., 2001). Untersuchungen an rekombinantem LHCI-730 zeigen, dass vor allem die Lhca4-Untereinheit, die bei ca. 730 nm ein Maximum aufweist, für die langwellige Emission verantwortlich ist (Schmid et al., 1997). Bestätigt wurde dies durch Ihalaenen et al. (2000), die eine Gruppe von Chlorophyllen identifizierten, welche bei 711 nm absorbieren und bei einer Wellenlänge von 733 nm emittieren. Bei Untersuchungen am Lhca4, der nur mit Chl *a* rekonstituiert wurde, konnte eine Abnahme der langwelligen Fluoreszenz beobachtet werden, die auf das fehlende Chl *b* zurückgeführt wurde (Schmid et al., 2001). In beiden Veröffentlichungen wird vermutet, dass die langwellige Fluoreszenz auf untereinander stark excitonisch gekoppelte Chlorophyll-Dimere zurückzuführen ist (Keuchel, 2003; Morosinotto et al., 2003), die über Asparagin (Asn, N) 47 (Chl *a*5, Nomenklatur nach Kühlbrandt) in Helix 1 und E102 (Chl *b*5) in Helix 2 koordiniert sind. Mutationsanalysen weiterer Chl-Bindungsstellen des Lhca4 zeigten, dass die Chl *b*6- und Chl *a*4-Bindungsstelle ebenfalls einen Beitrag zur langwelligen Fluoreszenz liefern (Morosinotto et al., 2005). Auch im Lhca1 gibt es Hinweise auf eine langwellig fluoreszierende Komponente, was unter anderem durch eine Rekonstitution ohne Chl *b* bekräftigt wird, wobei sich das 77 K-Emissionsmaximum von 685 nm auf 682 nm verschiebt (Croce et al., 2002).

Bei Untersuchungen an N-terminalen Deletionsmutanten des Lhca1 stellte sich bereits nach Deletion der 4. AS heraus, dass ein an dieser Position lokalisiertes Tryptophan (Trp, W) essentiell für die Dimerisierung ist (Schmid et al., 2002a; Rupprecht 2002). Während Substitutionen gegen Glycin, Alanin (Ala, A) und Histidin (His, H) eine Dimerisierung verhinderten, konnte eine Mutante mit Phenylalanin (Phe, F) anstatt Trp unvermindert mit dem Lhca4 dimerisieren. Die gleichfalls durchgeführten Deletionsexperimente am C-Terminus des Lhca1, offenbarten, dass bei zunehmender Deletion eine periodische Ab- und Zunahme der Dimerisierungsfähigkeit eintrat. Ab der Deletion eines Tryptophans, der vom C-terminalen Ende her betrachteten 17. AS, waren keine Dimere mehr zu beobachten. Punktmutationen am W185 zeigten, dass die Fähigkeit zur Dimerisierung je nach eingesetzter AS stärker vermindert wurde (F>A>G>H), aber kein vollständiger Ausfall der Dimerisierung eintrat. Bei parallelen Untersuchungen an den N- und C-Termini von Lhca4 ließen sich keine AS identifizieren, die für eine Dimerisierung mit dem Lhca1 essentiell sind. Ein Domänentausch der Helix 2 des Lhca1 gegen die entsprechende Lhca3-Helix führte zu keiner Beeinträchtigung der Dimerisierung. Im Lhca4 wurde durch äquivalentes Vorgehen die Wichtigkeit der 2. Helix bei der Interaktion mit dem Lhca1 belegt (Corbet, 2004). Inzwischen verfügbare PSI-Kristalle weisen auf eine Interaktion der Lhca1 N-Terminus mit der stromalen Lhca4-Schleife hin (Abb. 5), während der C-Terminus mit dem luminalen Ende der Helix 2 vom Lhca4 oder direkt mit dessen luminaler Schleife wechselwirken könnte (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007). PSI-Modellierungen legen den Schluss nahe, dass das N-terminale W4 des Lhca1 mit dem W106 der Helix 2 des Lhca4 über die π -Elektronensysteme der aromatischen Seitenketten in Verbindung stehen könnten (Jolley et al., 2005). Anhand des gleichen Modells wird eine Interaktion des W185 am C-Terminus von Lhca1 mit einer hydrophoben Tasche im luminalen Bereich des Lhca4 vermutet.

5.2 Das Trimer LHCII

Der LHCII des PSII ist die in der Natur am häufigsten vorkommende Lichtsammelantenne und setzt sich als Trimer (Abb. 6) aus drei Apoproteinen mit einer hohen Sequenzidentität zusammen (Jansson, 1994). Der Lhcb1 ist im Stande

Homotrimere zu bilden (Burke et al., 1978; Kühlbrandt et al., 1983; Hobe et al., 1994). Der LHCII von Gefäßpflanzen liegt aber meist in einer Mischform aus Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 vor (Spangfort und Andersson, 1989; Jackowski und Pielucha, 2001). *In vitro* Trimerisierungen zeigten, dass Lhcb1 und Lhcb2 Homo- oder Heterotrimere bilden können und Lhcb3 nur mit Lhcb1, Lhcb2, oder beiden Proteinen als Mischtrimer vorliegen kann (Standfuss und Kühlbrandt, 2004).

Elektronenkristallografische Messungen an 2D-Kristallen von Kühlbrandt et al. erlaubten bereits 1994 eine weitestgehende Klärung der LHCII-Struktur bei 3,4 Å Auflösung. Durch neuere röntgenkristallografische Untersuchungen an 3D-Kristallen konnten beinahe 97% der Proteinstruktur bei 2,72 (Liu et al., 2004) bzw. 2,5 Å (Abb. 6; Standfuss et al., 2005) Auflösung geklärt werden. Im LHCII-Monomer konnte neben der Existenz dreier TM-Helices und zweier amphiphiler Helices in der luminalen Schleife und am C-Terminus, auch eine 32°-Neigung der Helices 1 und 3 gegenüber der Membranebene ermittelt werden.

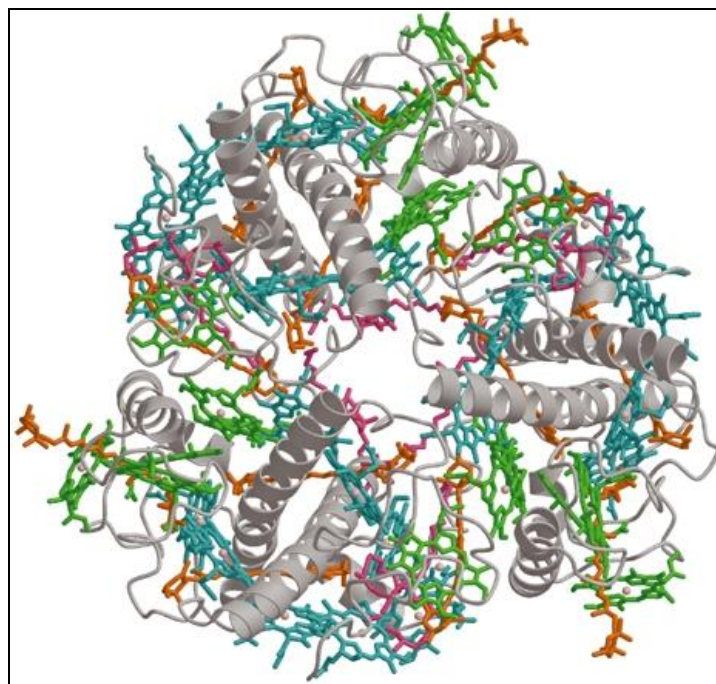


Abb. 6: Das LHCII-Trimer von Erbse bei einer Auflösung von 2,5 Å in der stromalen Seitenaufsicht, entnommen aus Standfuss et al. (2005). (grau): Polypeptide; (cyan): Chl a; (grün): Chl b; (orange): Carotinoide; (pink): Lipide.

Ionenpaare zwischen dem Glu 65 und dem Arg 185, sowie zwischen Arg 70 und Glu 180 sollen die Struktur festigen (Kühlbrandt et al., 1994). Eine zusätzliche Stabilität sollen auch die über Kreuz angeordneten Lutein-Moleküle erzeugen. Die Koordination der Chlorophylle (Tabelle 1) soll dabei über ihr zentrales Magnesiumatom erfolgen, wobei sie entweder an polare AS-Seitenketten, oder in hydrophoben Proteinregionen an den Carbonylsauerstoff des C α -Rückgrats gebunden werden. Obwohl in der Struktur 8 Chl a, 6 Chl b, 2 Luteine in L1- und L2-Position, ein Neoxanthin in N1-Position und ein Violaxanthin in V1-Position zu erkennen sind, konnten am rekonstituierten LHCII pro Apoprotein nur ca. 7 Chl a-, 5 Chl b-Moleküle und 3 Xanthophylle (2 Lutein und etwa 1 Neoxanthin) gefunden werden (Remelli et al., 1999, Croce et al., 1999a und 1999b). Durch Mutationsanalysen konnten nur 9 der 14 Chl-Bindungsstellen nachgewiesen werden (Remelli et al., 1999; Rogl et al., 1999; Yang et al., 1999).

Durch Sequenzvergleiche (Jansson und Pichersky, 1996; Jansson, 1999) wurden von 12 in der Kühlbrandt-Struktur gefundenen Chlorophyllen 8 hoch konservierte

Bindungsstellen identifiziert, die aufgrund der hohen Sequenzidentitäten auch in anderen LHCs konserviert sind und Chlorophylle koordinieren können. Allerdings sind bei den diversen LHCs diese potentiellen Bindungsstellen nicht immer mit der gleichen Chlorophyllspezies besetzt. *In vitro* Rekonstitutionen bestätigten, dass manche Bindungsstellen in einem LHC keine Präferenz für Chl *a* oder Chl *b* besitzen (Yang et al., 1999; Rogl und Kühlbrandt, 1999).

Tabelle 1: Bezeichnungen der Chlorophylle in den drei verfügbaren Kristallstrukturen und deren Koordinierung im Apoprotein. Tabelle ist entnommen aus Standfuss et al. (2005). Chlorophylle werden entweder direkt über AS-Seitenketten oder indirekt über H₂O und andere Chlorophylle im Komplex koordiniert: N-Terminus, Helix 1, luminale Schleife, Helix 2, stromale Schleife, Helix 3 und C-Terminus.

Chl in Kühlbrandt et al., 1994	Chl in Liu et al., 2004	Chl in Standfuss et al., 2005	Mg ²⁺ -Ligand	H-Brücke mit Chl <i>b</i> Formyl- gruppe
Chlorophyll <i>a</i>				
<i>a</i> 1	610	Chl 1	Glu180 Oε2	
<i>a</i> 2	612	Chl 2	Asn183 Oδ1	
<i>a</i> 3	613	Chl 3	Gln197 Oε1	
<i>a</i> 4	602	Chl 4	Glu65 Oε2	
<i>a</i> 5	603	Chl 5	His68 Nε2	
<i>a</i> 6	604	Chl 6	H ₂ O-Gly78-O	
<i>b</i> 2	611	Chl 7	Phosphatidylglycerin O4	
<i>b</i> 3	614	Chl 8	His212 Nε2	
Chlorophyll <i>b</i>				
—	601	Chl 9	Tyr24 O	—
<i>a</i> 7	607	Chl 10	H ₂ O-Chl 13 OMC	Gln131 Nε1
<i>b</i> 1	608	Chl 11	H ₂ O-Val138 O	Leu148 N
<i>b</i> 5	609	Chl 12	Glu139 Oε2	Gln131 Nε1
<i>b</i> 6	606	Chl 13	H ₂ O-Gln131 Oε2	H ₂ O-Chl 10 Mg
—	605	Chl 14	Val119 O	Ser123 N

Die Strukturdaten deuten darauf hin, dass das Lutein in L1-Position mit seinen Kopfgruppen zwischen Glutamin (Gln, Q) 197, das in der Übergangsregion zwischen Helix 3 und C-Terminus liegt, und Serin (Ser, S)160–Leucin (Leu, L) 164 in der stromalen Schleife koordiniert ist. Das Lutein in L2-Position wird zwischen den N-terminalen AS Aspartat (Asp, D) 47–A49 und den AS W97–A100 der luminalen Schleife fixiert. Das Violaxanthin ist peripher in der luminalen Umgebung der Helix 3 lokalisiert und wird vermutlich via Phosphatidylglycerin (PG) und Chl *b*7 koordiniert (Standfuss et al., 2005). Dadurch geht das Violaxanthin je nach Aufreinigungsmethode leicht verloren (Ruban et al., 1999). Die N1-Bindungsstelle konnte durch Mutationsanalysen und spektroskopische Untersuchungen zwischen Superhelix und Helix 2 lokalisiert werden (Croce et al., 1999a). Vermutlich erfolgt die Koordination der Neoxanthin-Kopfgruppe direkt mit dem in der luminalen Schleife lokalisierten Tyrosin (Tyr, Y) 111 (Liu et al., 2004).

Durch die Kristallstrukturen konnten Seitenketten und Cofaktoren identifiziert werden, die sich im LHCII-Trimer an den Monomer-Monomer-Kontaktflächen befinden. Am N-Terminus ragt das Y24 in den Zwischenraum. W128 und Valin (Val, V) 132 der 2. Helix sind an der Trimerisierung beteiligt. Auch die C-terminal gelegene Seitenkette des W222, dessen Bedeutung für die Trimerstabilisierung bereits von Kuttkat et al. (1996) entdeckt wurde, weist in den Raum zwischen die LHC-UE. Darüber hinaus können Chl eines Monomers (Tabelle 1: Chl 4 und 9, Terminologie nach Standfuss) mit Chl des benachbarten Monomers (Tabelle 1: Chl 5, 10 und 12) interagieren. Chl 4 und 5 sind Zentrum des Trimers anzutreffen sind. Beim Lhcb1 können Mutationen an Chl-

bindenden AS (Chl 5 am H68) auch zu einem Verlust der Trimerisierungs-Fähigkeit führen (Yang et al., 1999).

Keine der Kristallstrukturen konnte jedoch die 13 N-terminalen AS auflösen, deren Bedeutung in Hinblick auf die Trimerisierung bereits in früheren Arbeiten herausgestellt wurde. Mutationen am N-Terminus des Lhcb1 identifizierten W16, Y17 und R21 als für die Trimerisierung essentielle Aminosäuren (Hobe et al., 1995), die entweder direkt mit dem benachbarten Monomer in Verbindung treten, oder indirekt über ein an dieses Motiv gebundenes PG-Molekül gekoppelt sind. Bereits Nußberger et al. (1993) zeigten, dass das PG-Molekül durch Detergensbehandlung nicht vollständig aus LHCII-Trimeren entfernt werden konnte, und eine Behandlung der Trimere mit Phospholipase A in einem Zerfall der Trimere in Monomere resultierte. Laut der Kristallstruktur von Liu et al. (2004) liegt das PG an der Grenzfläche zwischen zwei Monomeren und wird zwischen Y44 am N-Terminus und Lysin (Lys, K) 182 in Helix 3 koordiniert. Wie im cyanobakteriellen PSI bereits beobachtet (Jordan et al., 2001), ist das PG im Stande über eine Phosphodiesterbindung das Chl 7 zu binden.

Das von Hobe et al. (1995) identifizierte N-terminale Trimerisierungsmotiv ist nicht nur im Lhcb1-3 enthalten, sondern findet sich Sequenzalignments zur Folge auch im Lhcb5 (CP26) an entsprechender Position. Bei Untersuchungen an Lhcb1/Lhcb2-Antisense Arabidopsis-Pflanzen (Andersson et al., 2003b), die keinen LHCII mehr synthetisieren konnten, wurden trotzdem Trimere gefunden. Eine Analyse der Proteinzusammensetzung erbrachte den Beleg, dass auch das CP26 als Homotrimer den LHCII ersetzen und als Mischtrimer mit dem Lhcb3 vorliegen kann (Ruban et al., 2003, 2006).

Eine regulierte Monomerisierung oder Trimerisierung des LHCII erfolgt eventuell bei dem als „state transition“ bekannten reversiblen Vorgang, der zur gleichmäßigen Verteilung der Anregungsenergie auf die beiden Photosysteme dient. Dabei wird der N-Terminus des Lhcb1 durch eine Kinase phosphoryliert (Allen, 1992). Die LHCII-Monomere diffundieren daraufhin lateral vom PSII zum PSI, um dort die Antenne zu vergrößern (Allen und Forsberg, 2001; Kruse, 2001). Nachdem neuere Untersuchungen (Zhang und Scheller, 2004; Kouril et al., 2005) zeigen, dass trimere LHCII an das PSI bindet, ist es wahrscheinlich, dass dieser wandert.

5.3 Das Monomer CP29

Das CP29 ist ein „Linker“-LHC zwischen PSII-Kernkomplex und LHCII. Das dem CP29 zugrunde liegende Lhcb4-Apoprotein zeichnet sich durch einen sehr langen N-Terminus von ca. 100 AS aus. Da die restliche Sequenz eine vergleichbare Größe gegenüber den übrigen Lhc-Proteinen aufweist (Jansson, 1999), beläuft sich die Molekularmasse auf ungefähr 29 kDa. Native CP29-Präparationen aus Spinat zeigten, dass das 77 K-Fluoreszenzemissionsmaximum bei 679 nm liegt (Henrysson et al., 1989) und damit identisch mit rekombinanten Lhcb4-Monomeren (Pascal et al., 1999) oder LHCII-Komplexen ist (Hemelrijk et al., 1992). Während nach Isolation nativer Komplexe 10-12 Chlorophylle nachgewiesen werden konnten (Henrysson et al., 1989), sind am rekombinanten Lhcb4 mit 6 Chl *a* und 2 Chl *b* insgesamt nur 8 Chl gebunden (Bassi et al., 1999), die durch hoch konservierte Chl-Bindungsstellen koordiniert werden (Jansson, 1999). Entgegen bisheriger Annahmen, dass in L1- und L2- Position 3 verschiedene Xanthophylle gebunden werden (Bassi et al., 1999; Gastaldelli et al., 2003), zeigen neuere Analysen, dass im Lhcb4 eine zusätzliche Neoxanthin-Bindungsstelle existieren könnte, da alle Lhcb-Proteine – bis auf den Lhcb6 – ein Äquivalent zum Y111 aufweisen, das in der luminalen Schleife des Lhcb1 die Neoxanthin-Bindung in N1-Position unterstützt (Caffarri et al., 2007).

6 Proteinfaltung und Assemblierung

Entwicklung des Proteinfaltungsmodells

Gemäß dem „two stage“ Modell von Popot und Engelman (1990, 2000) kann die Proteinfaltung in zwei aufeinander folgende Prozesse unterteilt werden. Zunächst bilden sich die Sekundärstrukturen aus, bevor eine Assemblierung zur höheren Tertiärstruktur erfolgt. Dieses zweistufige Modell entspricht unter anderem dem Faltungsvorgang von Bakteriorhodopsin, das nach Ausbildung der Helices auch ohne oder mit getrennten Schleifen falten kann (Liao et al., 1983; Popot et al., 1987; Kahn und Engelman, 1992; Marti, 1998). Andere α -helicale Transmembranproteine, wie das Rhodopsin (Yu et al., 1995), der α -Faktor Transporter von Hefe (Berkower und Michaelis, 1991) oder die Lactose-Permease (Zen et al., 1994) benötigten zur Faltung nur die helicalen Bereiche. Die Schleifenregionen mussten nicht vollständig sein, um ähnlich der nativen Form assemblieren zu können.

Andererseits zeigten Untersuchungen am Bakteriorhodopsin, dessen Schleifendomänen entweder tryptisch verdaut (Kahn et al., 1992), deletiert (Gilles-Gonzales et al., 1991), teilweise substituiert (Teufel et al., 1993), oder durch synthetische „GGS-Peptid-Linker“ ersetzt worden waren (Allen et al., 2001; Kim et al., 2001), dass zwar eine Faltung/Assemblierung stattfindet, jedoch die Stabilität nicht so hoch wie bei der Wildtypform war. Außerdem zeigten Versuche mit solitären Schleifendomänen, dass auch diese Polypeptide ohne das restliche Apoprotein in der Lage sind Tertiärstrukturen auszubilden (Yeagle et al., 1997; Katragadda et al., 2000; Piserchio et al., 2000; Bennett et al., 2004; Giragossian et al., 2004). Kurze Schleifen können sogar durch Ausbildung so genannter „Haarnadelstrukturen“ die Faltung und Stabilität zweier interagierender Helices eines Proteins beeinflussen (Wehbi et al., 2007). Untersuchungen an der luminalen und stromalen LHCII-Schleife zeigten (Heinemann und Paulsen, 1999; Mick et al., 2004a), dass im Falle von LHCs ein zweistufiges Faltungsmodell ebenfalls unzureichend ist, da sowohl die Faltung der Schleifendomänen, als auch beteiligte Cofaktoren berücksichtigt werden müssen.

Das „three stage“ Modell beschreibt deshalb die Proteinfaltung unter Berücksichtigung der Ligandenbindung, der Faltung von Schleifendomänen, der Insertion peripherer Domänen und der Ausbildung einer Quartärstruktur (Engelman et al., 2003). Zeitaufgelöste Messungen am LHCII zeigten, dass dort die Faltung durch zwei unterschiedlich schnelle Phasen der Pigmentbindung begleitet wird. In einem schnellen Prozess wird zunächst Chl *a* und Carotinoide gebunden und in einem langsameren zweiten Schritt wird zusätzliches Chl *a* und Chl *b* an den vorgefalteten Komplex koordiniert (Horn et al., 2007).

Interaktionsmodi und Häufigkeit von Aminosäuren an Proteinoberflächen

Die Ausbildung einer tertiären oder quartären Proteinstruktur ist abhängig von der Verteilung und den Eigenschaften der involvierten AS. Die Größe einer AS ist ein entscheidendes Merkmal beim Erreichen einer bestimmten Packungsdichte, weswegen im Proteininnern eher AS mit kleinen Seitenketten lokalisiert sind. Die Ladung basischer oder saurer AS wird zur Ausbildung von Salzbrücken oder Ionenpaaren benötigt. Polare AS können H-Brücken ausbilden und aromatische AS sind im Stande Verbindungen über „ π - π -stacking“ ihrer delokalisierten Elektronensysteme herzustellen (Berg et al., 2003).

Diese rein theoretischen Eigenschaften der AS bezüglich Protein-Protein-Wechselwirkung wurden mit den verfügbaren Proteinstrukturdaten abgeglichen, um Vorhersagen über Protein-Protein-Interaktionen treffen zu können (Zhou und Qin,

2007). Es stellte sich heraus, dass AS an Schnittstellen einen höheren Konservierungsgrad aufweisen, als nicht interagierende AS (Zhou und Shan, 2001), was entweder funktionelle oder strukturelle Gründe haben könnte (Lichtarge et al., 1996). In Protein-Protein-Kontaktflächen kommen vor allem hydrophobe, aromatische und Arginin-Seitenketten vor, während andere geladene AS sehr selten sind (Conte et al., 1999; Zhou und Shan, 2001). Das π -Elektronensystem eines Arginins kann außerdem mit beteiligten Kationen wechselwirken (Crowley and Golovin, 2005). Eine β -Faltblattstruktur ist im Interaktionsbereich häufiger anzutreffen als eine α -Helix. Zudem sind Schleifenregionen, die mit anderen Proteinen interagieren, länger als nicht interagierende (Neuvirth et al., 2004).

Die meisten AS an Kontaktflächen haben keinen direkten Interaktionspartner, sondern erhöhen die Zugänglichkeit bzw. die Löslichkeit im umgebenden Medium (Chen and Zhou, 2005; Jones und Thornton, 1997). Bioinformatische Analysen zeigen, dass Cystein und Methionin vor allem mit hydrophilen Seitenketten in Kontakt treten können (de Vries und Bonvin, 2006). Andere Untersuchungen konnten zeigen, dass Tryptophan, Methionin und Phenylalanin häufig an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Ma und Nussinov, 2007). Tryptophan ist eine in Grenzbereichen von Membranproteinen häufig vorkommende AS und dient vermutlich auch als eine Art „Anker“ in der Membranübergangsregion (Schiffer et al., 1992). Tryptophan ist auch in Lhc-Proteinen an entsprechenden Regionen stark konserviert (Jansson, 1999) und ist sowohl an der Lhca1-Lhca4-Interaktion im LHCI (Schmid et al., 2002a), als auch an der Trimerisierung des LHCII beteiligt (Hobe et al., 1995).

Oligomerisierungszustände und dafür verantwortliche Assemblierungsmotive

Statistische Auswertungen aller bis 2004 verfügbaren Protein-Kristallstrukturen belegen, dass ca. 15% der Proteine als Oligomere organisiert sind (Mei et al., 2005). Die häufigste Assemblierungsform ist das Dimer, aus welchem mehr als 50% der Oligomere zusammengesetzt sind. Aber nur $\frac{1}{5}$ davon liegt wie der LHCI-730 des PSI als Heterodimer vor. Obwohl der trimere LHCII die am häufigsten vorkommende Lichtsammelantenne ist, sind trimere Proteine im Allgemeinen seltener (10%) anzutreffen.

Da Oligomerisierungsformen evolutionär gesehen mit einer gewissen Regelmäßigkeit in Erscheinung treten, konnten inzwischen viele konservierte AS-Motive identifiziert werden, die eine Protein-Protein-Interaktion ermöglichen. Bei Proteinen, die über ihre Transmembranhelices miteinander wechselwirken, sind bisher einige Assemblierungsmotive bekannt. Dazu gehören neben dem aus Glycophorin A bekannten GxxxG-Motiv (GG4), das den van der Waals Kontakt zwischen Helices bewirkt (Russ und Engelman, 2000; Curran and Engelman, 2003), auch das verwandte GxxxGxxxG-Motiv der Rezeptor-ähnlichen Tyrosin-Phosphatase (Cin et al, 2005). G4- und GxxxxxxG-Motive (GG7) sind auch aus den Transmembrandomänen der Pfam-A-Familie bekannt (Liu et al., 2002). Interessanterweise zeigte die Genomanalyse der Pfam-A-Familie, dass auch Motive darunter waren, in welchen die Glycine bei MsbA von *Escherichia coli*, einem der ATP-bindenden Kasette homologen Transporter, durch Serine (SS4, SS7) oder Alanine (AA4, AA7) ersetzt waren. Die charakteristischen Seitenketten der erwähnten Motive weisen in die gleiche Richtung, da in einer α -Helix durchschnittlich 3,6 AS-Reste für eine Windung benötigt werden (Branden und Tooze, 1991), weshalb ihnen eine hohe Bedeutung bei der Transmembranhelix-Packung zweier Untereinheiten zukommt (Senes et al., 2000, 2001). Ein dem Leucin-Zipper-Motiv ähnliches Alacoil-Motiv (Gernert et al., 1995) setzt sich aus einem 66 AS

umfassenden Abschnitt zusammen, in welchem alle 7 Positionen ein Alanin oder Serin positioniert ist.

Ein weiteres Beispiel für eine Assemblierung bieten die α - und β -Untereinheiten des LH1 und LH2, Lichtsammelproteine aus Purpurbakterien. Beide Antennenpolypeptide interagieren über ein AxxxH-Motiv ihrer Transmembranhelices miteinander, wobei das Motiv in der α -Untereinheit einmal und in der β -Untereinheit zweimal zu finden ist (Zuber, 1986). Dabei kommt vor allem dem Bakteriochlorophyll *a* eine stabilisierende Rolle zu, da die Koordination der Pigmente über die Histidine der Helices beider Untereinheiten erfolgt (Zuber und Cogdell, 1995).

Assemblierungsmotive, die sich auf Schleifenregionen ausdehnen, sind komplex und umfangreich. TPR (tetratricopeptide repeat) Proteine, die bei Proteinfaltung, Transkriptionskontrolle und Zellzyklussteuerung beteiligt sind, wirken durch ein 34 AS umfassendes Motiv, das auf zwei durch eine Schleife verbundenen Helices verteilt ist (D'Andrea und Regan, 2003). Das Ycf3, das als eine Art Chaperon während der PSI-Assemblierung mit PsaA und PsaD wechselwirkt (Naver et al., 2001) verfügt über dieses Motiv.

Das 33 AS umfassende Ankyrin-Motiv ist eines der am häufigsten vorkommenden Strukturmodule, wobei die Anzahl der Module je Protein zwischen 1 und 33 stark variieren kann (Sedgwick und Smerdon, 1999; Mosavi et al., 2004). Das chloroplastidäre Signalerkennungspartikel (cpSRP) 43 verfügt über vier solcher Ankyrin-„repeats“ (Jonas-Straube et al., 2001), wobei Motiv 3 und 4 zur Homodimerisierung mit einem zweiten cpSRP benötigt werden, und der erste „repeat“ mit der L18-Domäne in der stromalen Schleife der Lhc-Proteine wechselwirkt. Zusammen mit dem cpSRP 54 bilden sie einen postrationalen Transitkomplex, der die Translokation/Insertion der Lhc-Proteine in die Thylakoidmembran ermöglicht (Schünemann, 2004).

Die FCPs (Fucoxanthin bindende Proteine) der Diatomeen gehören wie die LHCs ebenfalls zur Supergenfamilie der Chl *a/b*-bindenden Proteine, da sie neben 3 Transmembrandomänen auch eine stark konservierte Struktur in Helix 1 und Helix 3 aufweisen (Durnford et al., 1996). Präparationen nativer FCPs zeigten, dass ein 18 kDa- und ein 19 kDa-Protein existiert, die beide Trimere Komplexe bilden. Drei trimere 19 kDa-FCPs können sogar zu höheren Oligomeren assemblieren (Büchel, 2003).

7 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, ein detailliertes Bild über die Ursachen für das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten der untersuchten Lichtsammelproteine Lhcb4, Lhca4 und Lhcb1 zu erarbeiten, wobei bereits gesicherte Daten darüber vorlagen, dass ein N-terminales AS-Motiv für die Trimerisierung des Lhcb1 essentiell ist, und eine Substitution der Helix 2 des Lhca4 gegen äquivalente Lhca3-AS eine Heterodimerisierung verhindert.

Sequenzalignments von Lhc-Proteinen deuten auf einen hohen Konservierungsgrad der 1. und 3. Transmembranhelix hin. Durch die Anfertigung eines Proteinalignments aus Lhc-Protein-Sequenzen vieler Arten, sollten die Consensussequenzen ermittelt und damit alle variablen Domänen genauer erfasst werden.

Unter Verwendung des monomerisierenden Lhcb4, des mit dem Lhca1 dimerisierenden Lhca4 und des Trimere bildenden Lhcb1, sollten die schwach konservierten Domänen untersucht werden. Durch Substitution einer Domäne gegen die entsprechende Region der zwei anderen Proteine, sollte geprüft werden, ob die Fähigkeit zur Ausbildung einer bestimmten Oligomerisierungsform beeinträchtigt wird oder sogar verloren geht und ob eventuell ein Transfer der Assemblierungseigenschaft durch den eingebauten Proteinteil übertragen werden kann.

Die für die Dimerisierung bzw. Trimerisierung benötigten Domänen sollten anschließend in die anderen Proteine übertragen werden, um einen Transfer des Oligomerisierungsverhaltens durchzuführen. Analog dazu sollten alle für eine Dimerisierung essentiellen Lhca4-Bestandteile in den Lhca1 transferiert werden, um eine mit sich selbst assemblierende Mutante zur Herstellung multimerer LHCs zu generieren.

In einem zweiten Versuchsteil sollten durch Mutationsanalysen die an der LHCI-730-Bildung beteiligte AS in der luminalen und stromalen Schleife, sowie die in der Helix 2 des Lhca4 lokalisierten relevanten AS identifiziert werden. Im Falle der Helix 2 wurden über Bereichsmutationen zunächst die für eine Interaktion in Frage kommenden Regionen eingegrenzt und bei Beeinträchtigung der Heterodimerisierung näher untersucht.

Im Zuge der Experimente zur Bedeutung der Helix 2 vom Lhca4 sollte der Einfluss der an dieser Domäne gebundenen Chlorophylle auf die Dimerisierung untersucht werden. Für vergleichende Analysen konnte auf bereits existierende Mutanten zurückgegriffen werden, die drei Chlorophyllbindungsstellen abdecken.

Die Herstellung chimärer und punktmutierter Proteine erfolgte auf Genebene unter Verwendung verschiedener PCR-Techniken. Das in Bakterien heterolog exprimierte Apoprotein wurde durch Monomerrekonstitutionen hinsichtlich seiner Stabilität/Faltungsfähigkeit überprüft, die Voraussetzung für die nachfolgende Untersuchung der Dimerisierungs- bzw. Trimerisierungsfähigkeit war. Die rekombinanten LHCs wurden entweder per schwach denaturierender Gelelektrophorese aufgetrennt und densitometrisch quantifiziert, oder via SDG-UZ aufgereinigt, um einerseits die Komplexstabilität zu prüfen und andererseits um die Pigmentzusammensetzung und den Energietransfer der gebildeten LHCs zu untersuchen.

B MATERIAL

1 Chemikalien und Reagenzien

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

Zur Plasmidpräparation wurden Kits der Firmen Macherei-Nagel (Düren), Fermentas (St. Leon-Roth) und Promega (Mannheim) verwendet. Das Kit zur DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen lieferte die Firma Peqlab (Erlangen). Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert (siehe Anhang A1). Zur Substitution großer Abschnitte in *lhc*-Genen wurde ein Mutagenese-Kit von Stratagene (Amsterdam, NL) verwendet.

2 Geräte

Allgemeine Geräte:

Magnetrührer	Ikamag® RCT, JKA-Labortechnik (Staufen) Heidolph® MR 3001 K8, Heidolph Elektro (Kehlheim)
Mischer für Reaktionsgefäße	Vortex-Genie 2 (G-560E), Scientific Industries (New York, USA)
Photometer	U-2000 Spektrophotometer, Hitachi (Tokyo, Japan) Bio-Photometer, Eppendorf (Hamburg) MPS-2000 Photometer (Shimadzu, Japan)
Spannungsquellen	Biometra® Standard Power Pack P25, Biometra (Göttingen) Power Pack 300, Bio-Rad (Herkules, USA)
Ultraschallbad	T 460, Elma® Transsonic (Singen/Hohentwiel)
Ultraturrax	Ultraturrax T500, IKA-Labortechnik (Staufen)
Waagen	Analysenwaage A200S, Sartorius (Göttingen) Präzisionswaage GS-3200-2, Gottl. Kern & Sohn® (Albstadt)
Zentrifugen	
Kühlzentrifugen	BR4i, Jouan (Unterhaching); Rotoren: AB 1.14, AB 50.10 J2HS, Beckmann (München); Rotor: JLA 10.500 Avanti™ 3-25, Beckmann (München); Rotor: JA 25.50, JA 25.15
Tischzentrifugen	Micro 24-48 (Typ 1001), Hettich (Tuttlingen) Microliter (Typ 2020), Hettich (Tuttlingen) Mikro 22 (Hettich, Tuttlingen)
Ultrazentrifugen	Centrikon T-1065, Kontron (Neufahrn); Rotor: TST41.14 Optima XL-80K, Beckmann (München); Rotor: SW41Ti Optima XL-100K, Beckmann (München); Rotor: SW40

Geräte für mikrobiologische Arbeiten:

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

Geräte für molekularbiologische Arbeiten:

Geldokumentationsanlage	GelDoc™ 1000 Single Wavelength Mini Transilluminator, Bio-Rad (München); <u>Software:</u> Molecular Analyst; Bio-Rad (München) Quantity One 4.1; Bio-Rad (München)
Heizblock	Techne Dri-Block® DB-2D, Techne (Cambridge, UK)
Speed-Vac (Vakuumzentrifuge)	Vacuum Concentrator Mini-30, Bachofer (Reutlingen)
Thermocycler	Genius-02 T, Techne (Cambridge, UK) Primus 25/96, MWG-Biotech (Ebersberg)
UV-Lampe	Handlampe mit 254 nm und 312 nm Einstellung, Helmut Saur, Laborbedarf (Reutlingen)

Geräte für biochemische und biophysikalische Arbeiten:

Digitalkamera	C-3040 Zoom, Olympus Optical Co. GmbH (Hamburg)
Durchflussthermostat	Ministat compatibel control, Huber (Offenburg)
Elektrophoresekammer	Hoefer® Mighty Small®, Hoefer Pharmacia (San Francisco, CA, USA) Perfect Blue™ Mini Ex (Peqlab, Erlangen)
Fluoreszenzspektrometer	Fluoromax-3, ISA Jobin Yvon-Spex (Grasbrunn); Software: Datamax, Version 2.20, AISN, Jobin Yvon-Spex (Grasbrunn)
Gelgießapparatur	Hoefer® Multiple Cell Caster, Hoefer Pharmacia (San Francisco, CA, USA)
Gelschüttler	Rotamax 120, Heidolph (Kehlheim)
Kocher	HB4 basic Heizbad, IKA-Labortechnik (Staufen)

HPLC (analytisch)	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt)	
	Degasser	Gastorr 154
	Gradientenmischer	LG-1580-04
	Pumpe	PU-1580
	Detektor	Diode Array Detector MD-1515
	Säule	Chromolith Speed-Rod, RP 18E, Nr.1.51450.0001 l=50 mm; d=4,6 mm, Merck (Darmstadt)
	Software	Borwin-PDA, Ver. 1.50

3 Datenbanken und Software

NCBI-Datenbank:

Datenbank zur BLAST-Suche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLASTAlignments>) von Protein- (BLASTP) und EST-Sequenzen (TBLASTN).

Alignment-Software:

ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)

BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA)

Demoversion DS Gene (Accelrys Cambridge, UK)

Software für DNA-Protein-Übersetzung:

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

Software für densitometrische Auswertung:

Quantity One 4.1 (Bio-Rad, München)

4 Molekularbiologische und proteinbiochemische Arbeitmaterialien

4.1 Expressionsvektoren

Um Lhc-Proteine zu exprimieren (Kap. C2.1) wurden zwei für eine Überexpression geeignete Plasmide verwendet.

Zur Überexpression der *lhca1*- und *lhca4*-Gene von Tomate in verschiedene *Escherichia coli*- (*E. coli*) Zelllinien wurde der Expressionsvektor pDS12/RBS II (Bujard et al., 1987) verwendet, wie er in Abb. 7 gezeigt ist. Dieses ringförmig geschlossene Plasmid wurde in kompetente JM101-Bakterien transformiert (Kap. C1.11).

Der Vektor enthält neben dem starken synthetischen T₅-Promotor P_{N25} einen Operator, der dem Lac-Operon entnommen und daher durch den nicht metabolisierbaren Induktor Isopropyl-, β , D-thiogalactosepyranosid (IPTG) induzierbar ist. Dabei bindet IPTG an das Repressormolekül lacI, welches konstitutiv exprimiert wird und fest an den Operator gebunden ist. Durch die IPTG-Bindung verliert der Repressor wegen der induzierten Konformationsänderung seine DNA-Affinität und dissoziiert vom Operator ab, wodurch die RNA-Polymerase an den Promotor binden und ein in die Polylinkerregion einkloniertes Gen transkribieren kann. Zwischen dem Operator und dem zu exprimierenden Strukturgen befindet sich die synthetische, ribosomale Bindungsstelle vom Typ II, die eine Verstärkung der Translationsrate bewirkt. Durch die ebenfalls konstitutive Expression der β -Lactamase, besteht die Möglichkeit, Plasmid-tragende Bakterien in Ampicillin-haltigen Medien, aufgrund ihrer Antibiotikaresistenz, zu selektionieren.

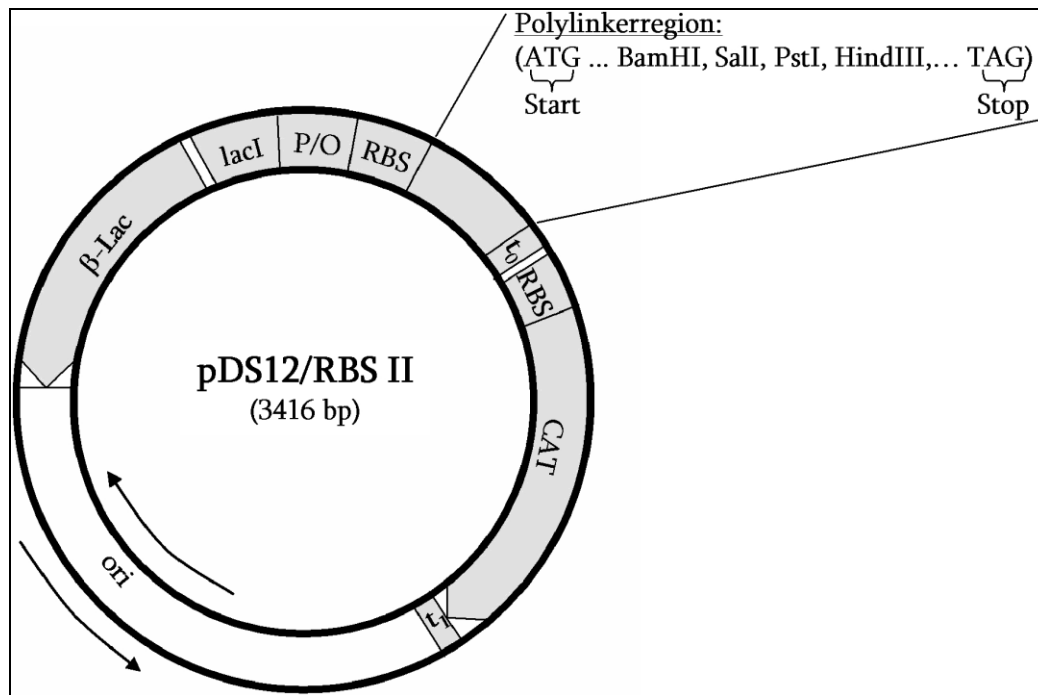


Abb. 7: Darstellung des pDS12/RBS II-Vektors. (β -Lac): β -Lactamase; (lacI): lac-Repressor; P/O: T₅-Promotor (P_{N25}) und Lac-Operon; t₀, t₁: Terminationsregionen; RBS: Ribosomenbindungsstelle; CAT: Chloramphenicol-Transferase; ori: Replikationsursprung.

Da die verwendeten Arabidopsis-Proteine alle einen C-terminalen Hexahistidylrest (His-tag) tragen sollten und bei Verwendung des pDS12-Vektors oftmals eine starke Verunreinigung der Einschlusskörperpräparationen mit bakteriellen Proteinen zu beobachten war, wurden die *lhca1*-, *lhca4*-, *lhcb1* und *lhcb4*-Gene in den pET-44a(+)-Vektor (Merck, Darmstadt) kloniert.

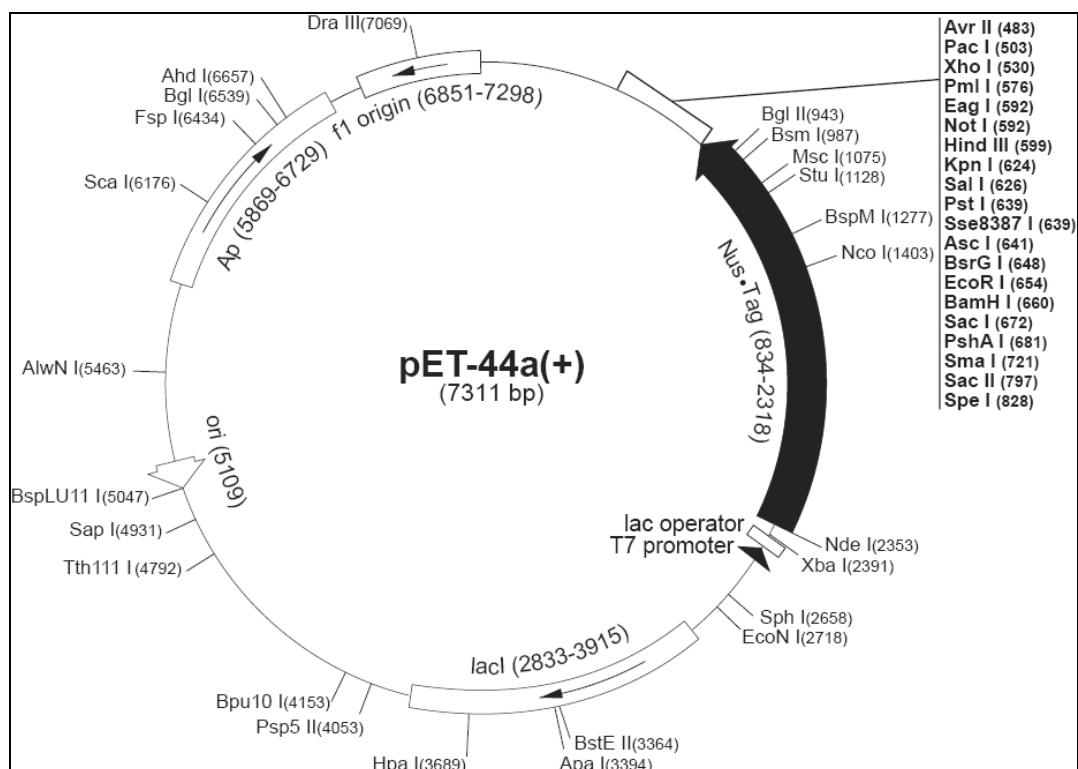


Abb. 8: pET-44a(+)-Vektorkarte mit eingezeichneten Positionen der Restriktionsenzyme. Arabidopsis-Gene wurden zwischen NdeI und XhoI kloniert (TB330 Rev. A 0502, Novagen-Merck)

Der in Abb. 8 dargestellte pET-Vektor funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip wie der obige pDS12-Vektor. Die Gene werden zwischen die NdeI- (N-Terminus) und die XhoI-Schnittstelle (C-Terminus) kloniert. Das Startcodon ist bereits Teil der NdeI-Erkennungssequenz, wodurch das heterolog exprimierte Protein keine zusätzlichen AS enthält. Der His-tag liegt hinter der XhoI-Schnittstelle und ist wie das Stoppcodon ein Teil des Vektors. Die Transkription erfolgt durch die T7-RNA-Polymerase, die in Bakterienstämmen für reine Klonierungsarbeiten nicht enthalten ist, wodurch eine basale Proteinexpression verhindert wird. Nur zur Überexpression geeignete Zellen (BL21) besitzen eine chromosomale Kopie des Polymerase-Gens, dessen Transkription, wie der lac-Operator des Vektors, durch IPTG induziert werden kann.

4.2 Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden *E. coli*-Zelllinien der Firmen Stratagene (Heidelberg) und NEB (Frankfurt) verwendet:

JM 101:	supE, thi-1, Δ (lac-proAB)[F' traD36, proAB, lacI ^q , Δ M15]
DH5α:	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), phoA, supE44, λ^- , thi-1, gyrA96, relA1
BL21 (DE3):	F ⁻ ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) dcm ⁺ Tetr gal (DE3) endA Hte
XL1-Blue:	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq Δ M15 Tn10 (Tetr)]

4.3 DNA-Standards

Um die DNA-Fragmentgrößen in Agarosegelen zu ermitteln, wurden zwei unterschiedliche Marker verwendet, die in Abb. 9 dargestellt sind. Zur Bestimmung von Fragmentgrößen zwischen 100 Basenpaaren (bp) und 1000 bp, wurde der 100 bp-Standard von Fermentas (St. Leon-Roth) benutzt, für die Definition größerer Fragmente war der Einsatz des 1 kbp-Standards der selben Firma erforderlich.

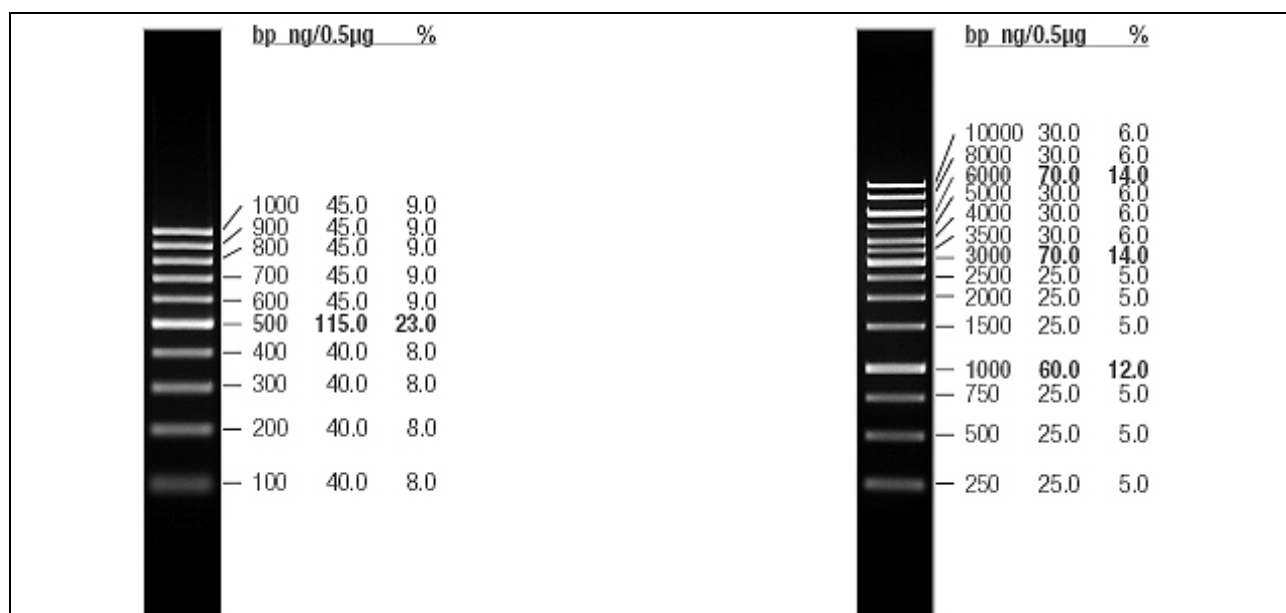


Abb. 9: Marker zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen in Agarosegelen. Gezeigt sind der 100 bp- (links) und der 1kbp-Standard von Fermentas (rechts) nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel. Eine zusätzliche Bestimmung der DNA-Konzentrationen war bei beiden Standards über die Bandenintensitäten möglich (siehe Tabellen neben Beschriftung).

Die DNA-Standards wurden stets in einer Konzentration von 100 ng/μl verwendet, wobei pro Bahn eines Agarosegels insgesamt 500 ng aufgetragen wurden. Die in den Tabellen in Abb. 9 aufgeführten DNA-Mengen einzelner Banden dienten zur Schätzung der DNA-Mengen der mit aufgetragenen Proben.

4.4 Proteinmarker

Isolierte und aufgereinigte Einschlusskörperproteine (Inclusion Bodies) aus der bakteriellen Überexpression (Kap. C2.1) wurden zur Untersuchung der Anreicherung des überexprimierten Proteins und zur Bestimmung ihrer Molekularmasse, zusammen mit dem SDS- (Na-Dodecylsulfat) 7-Marker von Sigma-Aldrich (München) in einem voll-denaturierenden SDS-Gel elektrophoretisch (Kap. C2.3.1) aufgetrennt. Die Zusammensetzung des SDS-7 Markers ist in Tab. 2.3.2 aufgelistet. Er wurde in 0,0625 M Tris/HCl (pH 6,8), 2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin und 0,001% Bromphenolblau gelöst.

Tabelle 2: Bestandteile des SDS 7-Markers von Sigma-Aldrich und deren Molekularmassen. Er wurde zur Molekularmassenbestimmung denaturierter Proteine mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) verwendet.

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

Zur Molekulargewichtsbestimmung von oligomerisierenden Lhc-Proteinen in schwach denaturierenden Gelen wurde der in Abb. 10 dargestellte Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad, München) verwendet.

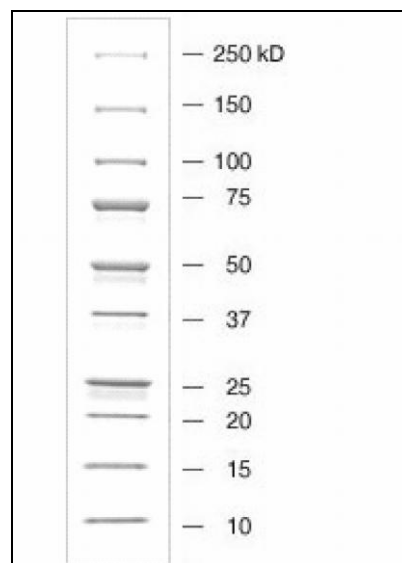


Abb. 10: Precision Plus Protein Standard von Bio-Rad zur Identifikation des Molekulargewichts von höhermolekularen LHC-Banden in schwach denaturierenden Gelen.

4.5 Klone

Als Ausgangsmaterial für die in dieser Arbeit hergestellten Mutanten aus *Solanum lycopersicum* (Tomate), wurden drei bereits vorhandene pDS12/RBS II-Vektor-Konstrukte mit in die Polylinkerregion inserierten *lhca1*-WT (Wildtyp), *lhca4*-WT und *lhca4-H2a3*-Genen (Corbet, 2004) genutzt. Die Lhca1- und Lhca4-WT exprimierenden *E. coli*-Klone, sowie die Einschlusskörperproteine der vier genutzten Lhca1-W185-Punktmutanten, wurden freundlicherweise von J. Rupprecht (2000) zur Verfügung gestellt. Die Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der Lhca1- und Lhca4-WT-Gene bzw. -Proteine von Tomate befinden sich im Anhang.

Des Weiteren wurden für die Untersuchungen an Chlorophyll-bindenden AS in der 2. Helix des Lhca4 Punktmutanten verwendet, die von E. Lago Places (2000: Lhca4-E94S, Lhca4-E102S), P. Thomé (2000: E94L, E102L) und D. Rautenberg (2002: Lhca4-E94Q) dankenswerterweise zur Verfügung gestellt wurden.

Die cDNA der gewünschten *lhca1*-, *lhca4*-, *lhcb1.1*- und *lhcb4.1*-Gene von Arabidopsis wurde zunächst via TAIR-Homepage (The Arabidopsis Information Resource: <http://www.arabidopsis.org/>) identifiziert und anschließend über das ABRC DNA Stock center (Arabidopsis Biological Resource Center, USA) geordert (<http://www.biosci.ohio-state.edu/pcmb/Facilities/abrc/abrchome.htm>). Alternativ war auch ein Bezug über das Kazusa DNA Research Institute (<http://www.kazusa.or.jp/>, Japan) möglich. Folgende Klone wurden geliefert:

Lhca1:		ABRC: U09017
Lhca4:	Kazusa: SQL02b09, APD29f02	ABRC: 114b11, 180P10
Lhcb1:	Kazusa: APZ18d04	ABRC: 180D13, 191C22, 194O9
Lhcb4:	Kazusa: APZ14b08, RZ15f09	ABRC: 13O22, 123A24

Nach der Sequenzierung aller cDNAs wurde ein Klon von jedem Lhc-Gen ausgewählt (fett markiert). Die Sequenzen der verwendeten Arabidopsis-Gene und deren entsprechende Proteinsequenzen befinden sich im Anhang (A3).

C METHODE

1 Mikro- und molekularbiologische Methoden

Der Umgang mit Bakterien erforderte neben einer aseptischen Umgebung (Sterilbank) auch die Verwendung steriler Arbeitsmaterialien. Nährböden, Gebrauchslösungen Glas- und Plastikgefäße mussten vor der Benutzung sterilisiert werden, um Keime, Sporen und vegetative Zellen von Mikroorganismen abzutöten. Dies wurde durch Dampfdrucksterilisation im Autoklaven bei 121 °C für mindestens 20 min bewirkt.

1.1 Bakterienanzucht

Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene *E. coli*-Stämme (Kap. B4.2) verwendet, die für unterschiedliche Zwecke eingesetzt wurden, aber identische Anzuchtbedingungen benötigten. Für die verwendeten Gene aus Tomate und *Arabidopsis* wurden 2 unterschiedliche Expressionssysteme verwendet, welchen neben verschiedenen Vektoren auch dazu passende Bakterienstämme nutzten. Zur Überexpression (Kap. C2.1) von Lhca-Proteinen aus Tomate mussten die Gen-tragenden pDS12/RBS II-Plasmide in JM 101-Zellen transformiert (Kap. C1.11) werden. Je nach Anwendung wurden zuerst DH5 α - oder XL1-Blue-Zellen mit pet44a-Plasmiden, die *Arabidopsis*-Gene enthielten, transformiert, da diese Stämme eine recht hohe Transformationseffizienz besitzen. Eine erfolgreiche Proteinexpression konnte allerdings nur in BL21-Zellen erfolgen.

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in einem komplexen Nährmedium nach Luria Bertrani (Sambrook und Russel, 2001). Das LB-Flüssigmedium (1% (w/v) Trypton, 1% (w/v) NaCl, und 0,5% (w/v) Hefeextrakt) wurde mittels NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Zur notwendigen Selektion Plasmid-tragender *E. coli*-Klone wurde das Medium mit dem Antibiotikum Ampicillin angereichert (Endkonzentration: 100 μ g/ml). Dabei wuchsen nur Bakterien mit dem pDS12/RBS II-Plasmid, da jenes die β -Lactamase codiert, welche das Ampicillin spaltet.

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde Ampicillin-freies LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar-Agar, einem aus einer Rotalge gewonnenen Polysaccharid, versetzt, autoklaviert und in sterile Petrischalen gegossen. Zur späteren Selektion von Bakterienklonen wurde auch dem LB-Agar, nach Abkühlung auf eine Temperatur von ungefähr 50 °C, Ampicillin (Endkonzentration: 100 μ g/ml) zugesetzt. Nach Abkühlung des Nährbodens unter der Sterilbank, konnten die Petrischalen mehrere Wochen im Kühlschrank bei 4-8 °C aufbewahrt werden.

Zum Ausplattieren frisch transformierter Bakterien wurden 200 μ l des Transformationsansatzes mit einem sterilen Drigalski-Spatel (mit Ethanol abgeflammt) auf der Agarplatte verteilt. Alternativ wurde in einigen Fällen mittels Impföse ein Verdünnungsausstrich einer bei -80 °C gelagerten Dauerkultur oder Stichkultur mit neuen EST-Klonen auf die Agarplatten vorgenommen. Die Petrischalen wurden im Anschluss mit dem Deckel nach unten (vermeidet Austrocknung) bei 37 °C für nicht länger als 18 h (Vermeidung überwuchernder Kolonien und Satellitenbildung) in einen Wärmeschrank gestellt. Nach Ablauf der Zeitspanne mussten die Plattenkulturen im Kühlschrank gelagert und mit Parafilm abgedichtet werden, um ein weiteres unerwünschtes Wachstum zu unterbinden und die Austrocknung der Platten zu verhindern.

Um weitere Versuche mit den Bakterienklonen durchführen zu können, mussten die entsprechenden Kolonien in Flüssigkulturen überführt werden. Zu deren Herstellung

wurde mit einer Pipettenspitze eine Kolonie von der Agarplatte gepickt und in eine 5 ml Übernachtskultur (ÜN-Kultur) (LB-Medium mit einer Ampicillin-Endkonzentration von 100 µg/ml) überführt. Nach einer Wachstumsphase bei 37 °C im Kulturrad wurden die Klone entweder im größeren Maßstab weiter vermehrt (für Plasmid-Präparationen, Kap. C1.5), oder für die Herstellung von Dauerkulturen im Kühlschrank zwischengelagert (Kap. C1.3). Vor jeder weiteren Nutzung der Flüssigkulturen mussten die Bakteriensuspensionen gut geschüttelt werden.

1.2 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Um Bakterien mit Plasmiden transformieren zu können, mussten zunächst chemokompetente *E. coli*-Zellen hergestellt werden. Da die DNA-Aufnahme nicht wie bei einer natürlichen Kompetenz über DNA-bindende Proteine gesteuert wird, musste die Zellwand für den Transfer ringförmiger DNA in die Zelle permeabel gemacht werden. Außerdem ist der zu transformierende pet44a-Vektor mit bis zu 7 kbp sehr groß und ringförmig, wohingegen bei einer natürlichen Transformation die DNA meist linearisiert und als Einzelstrangmolekül in die Zelle eingeschleust, und dort durch homologe Rekombination integriert wird. Anders als bei vielen gram-positiven Bakterien ist die erreichbare Effizienz der Kompetenz bei gram-negativen *E. coli*-Stämmen recht niedrig (Madigan et al., 2000).

Um die größtmögliche Effizienz zu erreichen, wurden Plasmid-freie JM 101-Zellen auf einer LB-Agarplatte (10 mM MgCl₂, ohne Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Mit einer Pipettenspitze wurde am nächsten Tag eine Kolonie gepickt und in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml TYM BROTH (2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,1 M NaCl, auf pH 7,5 mit NaOH eingestellt) überführt. Nach weiteren 4-5 Stunden Wachstum im Schüttelinkubator bei 37 °C und Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,8 bis 0,9 wurden die Bakterien bei 1000 g (4 °C; 12 min) pelletiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das Pellet auf Eis in 35 ml Tfb I (30 mM KOAc, 100 mM CaCl₂, 15% (w/v) Glycerin, 50 mM MnCl₂) resuspendiert. Nach weiteren 20 min auf Eis wurden die Bakterienzellen erneut abzentrifugiert (1000 g, 4 °C, 10 min) und nach Abgießen des Überstandes mit 4 ml Tfb II (75 mM CaCl₂, 10 mM Na-MOPS (pH 7,0), 10 mM KCl, 15% (w/v) Glycerin) auf Eis resuspendiert. Zur Konservierung der kompetenten Eigenschaften wurden je 50 µl der Bakteriensuspension zügig in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei –80 °C (Sambrook und Russel, 2001; Kosemund, 1999).

1.3 Herstellung von *E. coli*-Dauerkulturen

Klone aus einem erfolgreichen bzw. abgeschlossenen Telexperiment wurden dauerhaft bei –80 °C konserviert, um gegebenenfalls schnell wieder darauf zurückgreifen zu können. Dazu wurden aus einer bewährten Flüssigkultur des Klons frische 5 ml Übernachtskulturen (LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin) herangezogen und am nächsten Tag 1 ml davon mit 221 µl sterilem 80%igem Glycerin versetzt. Eine Vermischung erfolgte durch vorsichtiges Invertieren des Eppendorf-Gefäßes. Das Glycerin verhinderte die Entstehung von Eiskristallen, die beim Einfrieren der Kulturen bei –80 °C die Zellen beschädigen würden.

1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele dienen der Auftrennung von Nucleinsäuren in einem elektrischen Feld. Die Agarose ist ein aus Algen stammendes Zuckerpolymer aus Galactoseeinheiten, die sich beim Aushärten des Gels bündeln und so eine geordnete Matrix definierter Porengröße ausbilden. Da Nucleinsäuren negativ geladen sind, wandern sie im Agarosegel gemäß ihrer Größe zur positiven Anode. Kleine DNA-Moleküle laufen bei konstant angelegter Stromspannung schneller als große DNA-Moleküle, weil der Laufwiderstand durch die Agarosematrix für kleine Fragmente niedriger ist. Lediglich nicht linearisierte Fragmente (ringförmige Plasmide) zeigen aufgrund ihrer kompakten Struktur und dem daraus resultierenden geringeren Widerstand verlängerte Laufstrecken. Auf die Laufgeschwindigkeit wirkt sich neben der Pufferzusammensetzung (pH 5 oder höher) auch die angelegte Stromspannung aus. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente muss die Agarosekonzentration im Gel variiert werden, da Gele mit definierter Agarosekonzentration nur einen bestimmten Größenbereich an Nucleinsäurefragmenten gut auftrennen können. Im Rahmen der durchgeführten Versuche wurden nur Gele mit drei unterschiedlichen Anteilen von Agarose benötigt. So wurden neben den 1,5%igen Gelen zur Auftrennung von DNA-Fragmenten bis ca. 600 bp auch 0,6 bzw. 0,8%ige Gele für geschnittene Plasmidfragmente und DNA-Präparationen mit anschließender Gelextraktion verwendet.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde immer dann verwendet, wenn entweder Kontrollen eines Arbeitsschrittes notwendig waren (PCR, Kap. C1.7), oder um die gesamte DNA aus einem Arbeitsschritt aufzureinigen (DNA-Aufreinigung, Kap. C1.8). Als Marker (Menge pro Gelbahn: 0,5 µg) dienten bei kleinen Genfragmenten ein 100 bp-Standard und bei großen Fragmenten ein 1 kbp-Standard, die mit auf die Gele aufgetragen wurden (Kap. B4.3).

Um einen 200 ml-Vorrat an 1,5%igem Agarosegel herzustellen, wurden 3 g Agarose mit 4 ml 50-fach TAE-Puffer (2 M Tris-Acetat, 0,1 M EDTA, mit Eisessig auf pH 8,5 eingestellt) und 96 ml dH₂O im Schraubdeckelglas vermischt und in der Mikrowelle unter Erhitzen gelöst. Danach wurden 100 ml dH₂O zugegeben. Die Lösung wurde heruntergekühlt, um den Geltrog nicht zu beschädigen. Der Geltrog wurde – falls keine Gelgießvorrichtung existierte - vor dem Guss mit Klebeband abgedichtet und mit dem gewünschten Kamm versehen, bevor die Agaroselösung ungefähr 1 cm hoch eingegossen wurde. Die restliche Agaroselösung konnte für den späteren Gebrauch im Glas aufbewahrt werden. Nach Aushärtung des Gels konnten das Klebeband und der Kamm entfernt, und das Gel mit dem Geltrog in die Elektrophoresekammer überführt werden. Die Kammer wurde bis knapp oberhalb des Gels mit einfach konzentriertem TAE-Puffer gefüllt. Die DNA-Proben wurden mit 10% (v/v) Probenpuffer (20% (w/v) Ficoll 400; 0,1 M EDTA/NaOH (pH 8,0); 1% (w/v) SDS; 0,25% (w/v) Bromphenolblau) versetzt, aufgetragen und bei einer angelegten Stromspannung von 100-120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach ungefähr einer Stunde wurde das Gel für 5 min in einem Färbegrad mit 1 µg Ethidiumbromid/ml dH₂O auf dem Schüttler inkubiert, um die DNA anzufärben. Ungebundenes Ethidiumbromid wurde im Anschluss durch 10minütige Inkubation im Wasserbad entfernt. In einer Dokumentationsanlage konnte bei einer Anregungswellenlänge von 312 nm (UV-Licht) die Ethidiumbromid-Fluoreszenz bei 590 nm beobachtet werden, wobei die Fluoreszenz proportional zur Nucleinsäuremenge im Agarosegel war. Die qualitative Auswertung erfolgte über die mitgelieferte Software und über den mit aufgetragenen Standard (Kap. B4.3). Eine grobe DNA-Quantifizierung konnte entweder ebenfalls via Standards, oder über eine Referenz-DNA bekannter Konzentration (sinnvoll für geschnittene Plasmide) erfolgen.

1.5 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli*-Zellen

Zur Isolierung ringförmiger Plasmid-DNA aus Bakterien wurden je nach Anforderung verschiedene Systeme unterschiedlicher Firmen benutzt. Bei Bedarf kleinerer DNA-Mengen für den Nachweis positiver Klone durch Restriktionsverdau (Kap. C1.9) oder um Plasmide in andere *E. coli*-Stämme zu transformieren (Kap. C1.11), wurde die Mini-Präparation bevorzugt. Wenn größere DNA-Mengen erforderlich waren, um entweder DNA zu sequenzieren (Kap. C1.12), oder um sie in größeren Mengen für den späteren Gebrauch zu konservieren, wurden Midi-Präparationen durchgeführt. Später wurde ein Mini-Plasmidaufreinigungssystem verwendet, mit welchem aus wenig Bakteriensuspension viel Plasmid-DNA isoliert werden konnte, wodurch der Einsatz des Midi-DNA-Isolationskits hinfällig wurde. Ergänzend muss erwähnt werden, dass aus DH5 α - und XL1-Blue-Kulturen mehr DNA isoliert werden konnte, als aus JM101- oder BL21-Zellen. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde vor weiteren Analysen oder einer Lagerung bei -20 °C photometrisch quantifiziert (Kap. C1.6.1).

1.5.1 Plasmid-Mini-Präparationen bis 20 μ g DNA-Ausbeute

Die zwei verwendeten Plasmidaufreinigungskits unterschieden sich nicht nur durch den Hersteller, sondern vor allem in der Menge der isolierten DNA. Während das Promega-Kit zu Beginn der Arbeit verwendet wurde und nur zur Anreicherung von 1-2 μ g DNA aus einer 3 ml ÜN-Kultur in der Lage war, wurden mit dem äquivalenten Fermentas-Kit bis zu zehnmal mehr Nucleinsäuren aus dem gleichen Suspensionsvolumen isoliert.

1.5.1.1 Isolation mittels “Wizzard™ Plus DNA Purification System“

Die DNA-Isolierung im kleinen Maßstab wurde mittels Wizzard™ Plus DNA Purification Systems (Promega, Mannheim) durchgeführt. Dabei wurden aus einer 5 ml Übernachtskultur zwei mal 1,5 ml entnommen, in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und für 2 min (15000 g) zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 200 μ l Merlin I-Lösung (50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 10 mM Na-EDTA (pH 7,5); 100 μ g/ml RNase A) resuspendiert, um bakterielle RNA abzubauen und um mittels EDTA Zellwand-stabilisierende Kationen abzufangen. Die anschließende Zugabe von 200 μ l Merlin II-Lösung (0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS) bewirkte die Zellwandlyse und denaturierte die chromosomale DNA sowie die bakteriellen Proteine. Zur Neutralisation der Lösung wurde 200 μ l Merlin III-Lösung (2,55 M KAc (pH 4,8)) zugegeben, um chromosomale DNA und Proteine auszufällen. Die Plasmid-DNA renaturierte hingegen und blieb aufgrund ihrer geringen Größe in Lösung. Die gefällten Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (15000 g, 10 min) abgetrennt und der Überstand mit der Plasmid-DNA in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, in welchem sich 1 ml Merlin IV-Lösung (0,85 M KAc (pH 5,5); 7 M Guanidiniumhydrochlorid; 0,015 g/ml Celite 545) befand. Das Gemisch aus Kieselgursuspension und Überstand wurde in eine Säule mit Fritte pipettiert, welche sich auf einem Vakuumsaugständer befand. Nach Absaugen der flüssigen Komponente wurde zweimal mit je 2 ml Merlin V-Lösung (200 mM NaCl; 20 mM Tris/HCl (pH 7,5); 5 mM Na-EDTA (pH 7,5); 50% (v/v) Ethanol) gewaschen und die Säule getrocknet. Anschließend wurden die Säulen in leere Eppendorf-Gefäße gestellt, für 20-30 Sekunden trocken zentrifugiert (15000 g) und auf neue Reaktionsgefäße transferiert, um die Plasmid-DNA zügig mit 35 μ l 60 °C warmem dH₂O, durch erneute Zentrifugation (15000 g), zu eluieren. Die DNA-Ausbeute konnte durch kurze (1-2 min) Inkubation des Wassers auf dem Harz in der Säule erhöht werden.

1.5.1.2 Isolation mittels “GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit“

Alternativ zum oben beschriebenen Plasmid Miniprep Kit von Promega wurde im späteren Abschnitt der Arbeit das “GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit“ von Fermentas (St. Leon-Roth) verwendet. Methodisch gesehen erfolgte die DNA-Isolation bei beiden Systemen nach einem ähnlichen Prinzip, jedoch war eine Aufreinigung mittel Fermentas-Kit bezüglich der DNA-Ausbeute um bis zu zehnfach effizienter. Außerdem lag die DNA nach Elution mit einem höheren Reinheitsgrad vor, wodurch auch die nachfolgenden Applikationen, wie zum Beispiel die Sequenzierung (Kap. C1.12), problemlos durchgeführt werden konnten.

Die pelletierten Zellen (2 x 1,5 ml) wurden mit 250 µl ‘Resuspension Solution’, zu welcher zuvor die der Packung beiliegende RNase A beigemischt worden war, durch vortexen vermischt. Nach Zugabe von 250 µl ‘Lysis Solution’ und mehrmaliger Inversion der Reaktionsgefäße bis die Lösung aufklarte, wurde der Ansatz für nicht länger als 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 350 µl ‘Neutralization Solution’ mit anschließendem 4-6maligem Invertieren der Gefäße, zum stoppen der Lyse dazupipettiert wurden. Ein 5minütiger Zentrifugationsschritt (14000 g) pelletierte die Zellreste und die chromosomale DNA. Der Überstand wurde auf die mitgelieferten Zentrifugensäulchen transferiert, für 1 min zentrifugiert (14000 g) und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss folgten 2 Waschschrte durch Zentrifugation mit je 500 µl ‘Wash Solution’, die zuvor mit Ethanol komplementiert wurde (1 min, 14000 g). Danach wurden die Säulchen auf frisch autoklavierte 1,5 ml Reaktionsgefäße gesteckt, mit 30 µl ‘Elution Buffer’ versetzt und abzentrifugiert (2 min, 14000 g).

1.5.2 Plasmid-Midi-Präparation bis 100 µg DNA-Ausbeute

Um größere Mengen Plasmid-DNA (20-50 µg) zu isolieren, war die Anwendung des NUCLEOBOND® AX 100-Systems (Macherey & Nagel, Düren) erforderlich. Um genügend Bakterien zur Verfügung zu haben, musste eine 100 ml Übernachtskultur angezogen werden, da es sich beim pDS12/RBS II- und dem pet44a-Vektor um ‘low-copy’ Plasmide handelt (10-50 Kopien pro Bakterienzelle).

Nach Pellettierung (9000 g; 4 °C; 5 min) der Zellen wurden diese in 4 ml S1-Lösung (50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und mit weiteren 4 ml S2-Lösung (200 mM NaOH; 1% (v/v) SDS) lysiert. Nach mehrmaligem vorsichtigem Mischen und einer Inkubation (bei Raumtemperatur (RT)) für maximal 5 min, wurden zur Fällung der bakteriellen Proteine 4 ml S3-Lösung (2,8 M KAc (pH 5,1)) hinzu pipettiert und der Ansatz für erneut 5 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden NUCLEOBOND® AX 100-Säulen mit 2 ml N2-Lösung (100 mM Tris; 15% (w/v) Ethanol; 900 mM KCl; mit H₃PO₄ auf pH 6,3) äquilibriert und darauf Trichter mit einem angefeuchteten Faltenfilter positioniert. Die Lösung wurde anschließend durch den Trichter filtriert und der Durchfluss unter der Säule verworfen. Danach wurde die Säule zweimal mit 5 ml N3-Lösung (100 mM Tris; 15% (w/v) Ethanol; 1150 mM KCl; mit H₃PO₄ auf pH 6,3) gewaschen und die DNA mit 4 ml N5-Lösung (100 mM Tris; 15% (w/v) Ethanol; 1000 mM KCl; mit H₃PO₄ auf pH 8,5) in ein Corex-Röhrchen eluiert.

Durch Zugabe von 3,6 ml Isopropanol (bei RT) zum Eluat, wurde die DNA gefällt und für 30 min abzentrifugiert (4 °C; 16000 g). Der Überstand wurde dekantiert und das (nicht sichtbare) Pellet wurde mit 2,5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und diesmal für 15 min zentrifugiert (RT; 16000 g). Nach erneuter Verwerfung des Überstandes wurde das Pellet bei Raumtemperatur für ca. 5 min bei 50 °C im Wärmeschrank aufgeheizt, anschließend unter N₂-Strom eingetrocknet und in 100 µl dH₂O aufgenommen.

1.6 DNA-Quantifizierung

Je nach vorgeschalteter oder nachgeschalteter Anwendung gab es zwei verschiedene Methoden um DNA-Konzentrationen zu bestimmen. Dabei war die Quantifizierung über einen DNA-Standard im Agarosegel eher eine grobe Schätzung, die vor allem dann den Vorzug erhielt, wenn wenig DNA (z.B. Insert-Quantifizierung) für die Analyse zur Verfügung stand bzw. sehr niedrige DNA-Konzentrationen vorlagen, die von einem Photometer nicht genau detektiert wurden.

Die photometrische DNA-Quantifizierung wurde im Verlauf der experimentellen Phase mehrheitlich im Bio-Photometer (Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt, da dort auch kleine Volumina und geringe DNA-Konzentrationen genau ermittelt werden konnten.

1.6.1 Photometrische Quantifizierung doppelsträngiger DNA

Eine präzise photometrische DNA-Bestimmung erfolgt immer gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz. Das Absorptionsmaximum (A_{Max}) von DNA-Molekülen liegt im UV-Bereich bei 260 nm. Da die Lichtabsorption der Probe in der Quarzküvette proportional zur Konzentration der DNA-Menge ist, lässt sich über einen Nullabgleich bei 260 nm, eine Referenzküvette mit dH₂O und eine zusätzliche Messung bei 320 nm (allgemeine Verunreinigungen), über eine Formel die tatsächliche DNA-Konzentration ermitteln:

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

Die erhaltenen Werte mussten zum einen mit 50 multipliziert werden (Doppelstrangfaktor), und zum anderen musste der Verdünnungsfaktor in der Küvette (x160) in die Rechnung mit einbezogen werden, da zu 795 μl dH₂O 5 μl der unbekannten DNA-Probe pipettiert wurden.

Die Verwendung des Bio-Photometers (Eppendorf AG, Hamburg) erlaubte die Nutzung eines viel kleineren Küvetten- und damit Messvolumens, wodurch die Signalstärke beträchtlich erhöht wurde. Bei Eingabe des Verdünnungsfaktors berechnete das Photometer unter Berücksichtigung der obigen Formeln die DNA-Konzentration und den Reinheitsgrad der DNA.

Der Reinheitsgrad der DNA konnte über den so genannten A_{260}/A_{280} -Quotienten bestimmt werden, der im Normalfall bei 1,8 bis 1,9 lag. Bei einem kleineren Quotienten bzw. einer Zunahme der Absorption bei 280 nm, die vor allem zur Quantifizierung aromatischer Aminosäuren verwendet wird, war von einer Proteinverunreinigung der DNA auszugehen.

1.6.2 Grobe DNA-Schätzung via Agarose-Gelelektrophorese-Standards

Eine weitere Möglichkeit der DNA-Quantifizierung war die Schätzung der DNA-Menge über einen mit aufgetragenen 100 bp- oder 1 kbp-Standard im Agarosegel (Kap. B4.3). Diese Methode wurde vor allem eingesetzt, wenn eine präzise Konzentrationsbestimmung nicht notwendig war und zeitgleich eine Größenbestimmung der zu quantifizierenden DNA-Fragmente durchgeführt werden musste, wie es nach Isopropanolfällungen von PCR-Ansätzen (Kap. C1.8.1) oder der Gelextraktion aus Agarosegelen (Kap. C1.8.3) üblich war.

Zur Quantifizierung war es ausreichend 3 μl DNA-Lösung in einem Agarosegel aufzutrennen und die Standard-Bande im Gel zu identifizieren, welche die gleiche Bandenintensität aufwies wie die zu quantifizierende Bande. Anhand der mitgelieferten Tabelle im Anhang des jeweiligen Standards konnte die DNA-Konzentration (in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ermittelt werden, wobei die Ergebnisse zunächst durch den Faktor dividiert werden mussten, die dem DNA-Auftragsvolumen entsprachen (in diesem Fall 3).

1.7 Polymerase-Kettenreaktion zur Herstellung der verwendeten Mutanten

Zur Herstellung von genetisch veränderten Lhc-Proteinen wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR = **p**olymerase **c**hain **r**eaction) Mutationen in die *lhca*-Gene eingeführt und *in vitro* vermehrt. Um die Bedeutung der 2. Helix des Lhca4 aufzuklären, wurde als Ausgangsmaterial pDS12/RBS II-Vektoren (Kap. B4.1) mit inseriertem *lhca4*-Wildtyp- und *lhca4-H2a3*-Genen der Tomate verwendet, die als Matrizen für die DNA-Amplifikation dienten. Alle 'domain swapping' Mutanten wurden auf Basis von Arabidopsis-cDNA-Klonen (Kap. B4.5) generiert, wobei das *lhca1*-, *lhca4*-, *lhcb1.1*- und *lhcb4.1*-Gen zunächst vom pBluescript II SK- bzw. pZL 1-Vektor in den pet44a-Vektor umkloniert werden musste, bevor mit den Mutagenesearbeiten gestartet werden konnte.

Neben der Matrizen-DNA wurden zusätzlich freie Nukleotide (dNTPs), DNA-Polymerase mit passendem Puffer und ein für jedes Gen spezifisches Primerpaar benötigt, das für die Synthese des Sense-Stranges (forward (+) -Primer) und für die Synthese des Antisense-Stranges (reverse (-) -Primer) verantwortlich ist. Es wurden drei *Pfu*-Polymerasen (Stratagene, Amsterdam, NL; Fermentas, St. Leon-Roth; Peqlab, Erlangen) verwendet, die neben einer gewöhnlichen DNA-Polymerase-Aktivität in 5' $\Rightarrow$ 3'-Richtung auch eine Exonucleaseaktivität in 3' $\Rightarrow$ 5'-Richtung aufweisen. Durch diese Reparaturfunktion können fehlerhaft eingebaute Nukleotide erkannt, und durch die entsprechenden richtigen Nukleotide ersetzt werden, womit die Rate der ungewollten Mutationen merklich herabgesetzt wird. Die hitzestabilen DNA-Polymerasen *Pfu*- und *Pfu*-Ultra stammen aus dem hyperthermophilen Bakterium *Pyrococcus furiosus*, wodurch die DNA-Amplifikation im Thermocycler bei bis zu 100 °C erst möglich wird. Die *Pfu*-Ultra-Polymerase ist durch spezielle Enhancer in ihrer DNA-Affinität erhöht, wodurch die Reparaturlesefähigkeit gegenüber der herkömmlichen *Pfu*-Polymerase, leicht verbessert wurde.

Es wurden je nach Aufgabenstellung unterschiedliche PCR-Methoden verwendet. Neben einfachen Umklonierungen ganzer Gene oder der Identifikation positiver Klone via Kolonie-PCR, wurden vor allem 2-stufige PCR-Reaktionen genutzt, um eine, mehrere oder ganze Bereiche von AS eines Gens zu substituieren. Um größere Fragmente bzw. Proteindomänen, wie z. Bsp. Schleifenregionen oder Helices auszutauschen, mussten 3 bis 4-stufige PCR-Techniken angewendet werden. Darüber hinaus wurde auch das "Quikchange® II Site-Directed Mutagenesis Kit" von Stratagene (Amsterdam, NL) benutzt, das vor allem beim Tausch großer Genabschnitte, aufgrund seiner Effizienz und Zeitersparnis, zum Einsatz kam.

Primerlisten zur Herstellung aller Mutanten befinden sich im Anhang (A1).

1.7.1 Identifikation und Umklonierung von *lhca*-Genen aus einer cDNA-Plasmidbank

Um Experimente an Lhc-Proteinen von Arabidopsis durchführen zu können, mussten, anders als bei den Tomatengenen, die alle bereits im pDS12/RBSII-Vektor vorlagen, zunächst cDNA-Klone bezogen werden. Neben 7 cDNA Klonen des ABRC DNA Stock Center (USA) wurden 6 weitere cDNA Klone vom Kazusa DNA Research Institute (Japan) bezogen (Kap. B4.5), wobei letztere zwecks Plasmid-Anreicherung zuerst in DH5 α -Zellen vermehrt werden mussten (Kap. C1.11). Nach Sequenzierung (Kap. C1.12) mit den Plasmid-spezifischen T3- (pBluescript) bzw. T7-Primern (pZL 1, pBluescript) wurde ein Vertreter jedes *lhca*-Gens (*lhca1*, *lhca4*, *lhcb1.1* und *lhcb4.1*) ausgesucht, dessen Sequenz in Übereinstimmung mit den Genen aus der Veröffentlichung von Jansson (1999) war.

Die angelieferten *Arabidopsis*-Gene mussten aus 2 Gründen in den pet44a-Vektor (Abb. B4.1) umklontiert werden. Zum einen waren die vorliegenden Plasmide nicht für eine Überexpression der Genprodukte geeignet, zum anderen sollte ein His-tag an den C-Terminus des Proteins angefügt werden, der im schließlich verwendeten pet44a-Vektor standardmäßig hinter der XhoI-Schnittstelle lokalisiert ist und von einem Stopp-Codon terminiert wird. Da das Translations-initiierende ATG teil der NdeI-Erkennungssequenz ist, wurden alle *Arabidopsis*-Lichtsammelgene zwischen die NdeI- und die XhoI-Schnittstelle kloniert.

Die Amplifikation der 600 bis 800 bp umfassenden Volllängengene (Anhang A3) erfolgte wie in Kap. C1.7.2 beschrieben, aber mittels WT-vorwärts- und WT-rückwärts-Primer (Anhang A1), wobei die cDNA-Plasmide als Matrizen-DNA fungierten. Die daraus resultierenden Amplifikate wurden mittels NdeI und XhoI restringiert (Kap. C1.9.1) und in den pet44a-Vektor einligiert (Kap. C1.10) und damit kompetente DH5 α -Zellen transformiert (Kap. C1.11).

1.7.2 Herstellung von Einzel-, Bereichs-, und Wiederherstellungsmutanten des Lhca4 durch ortsgerichtete Mutagenese

Durch die Verwendung eines Mutageneseprimers, der eine modifizierte Nukleotidsequenz bezüglich einer oder mehrerer Basen gegenüber der Matrize aufweist, ist es möglich spezifische ortsgerichtete Mutationen (Abb. 11) in ein Gen einzufügen, wodurch die Mutante eine veränderte Aminosäuresequenz aufweist (Chen und Przybyla, 1994).

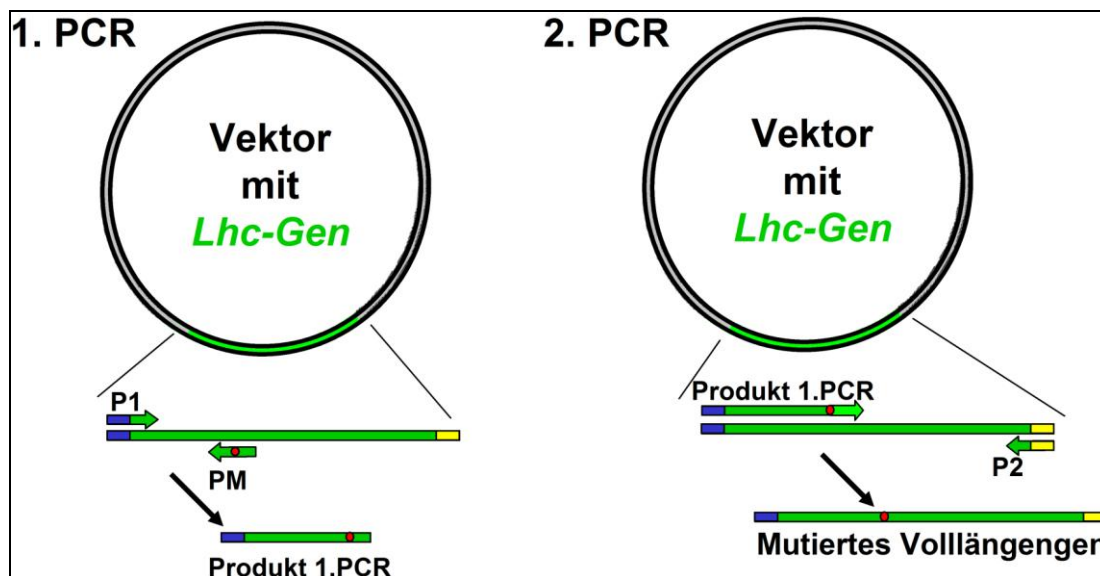


Abb. 11: Schematische Darstellung einer ortsgerichteten PCR-Mutagenese eines *Lhc*-Gens (nach Chen und Przybyla, 1994). P1, P2: Wildtyp-Primer; PM: Mutageneseprimer; rot: Mutation; blau: *Bam*HI- (pDS12) oder *Nde*I- (pET44a) Erkennungssequenz; gelb: *Hind*III- (pDS12) oder *Xho*I- (pET44a) Erkennungssequenz. Das aus der 1. PCR gewonnene mutierte Produkt dient als Mutageneseprimer in der 2. PCR.

Durch diese Technik konnten im Rahmen der Arbeit Einzel-, Bereichs- und Wiederherstellungsmutanten des Lhca4 mit einer oder mehreren substituierten Aminosäuren hergestellt werden. Zum Erhalt eines Volllängengens mit veränderter Sequenz im Gen-innern waren bis auf Umklonierungsarbeiten, die einen Wechsel des Plasmids zum Ziel hatten, immer zwei aufeinander folgende PCR-Reaktionen notwendig, wobei sich beide PCR-Läufe im Thermocycler in 3 Phasen unterteilten (Tabelle 3).

Tabelle 3: Thermocyclerprotokolle der 1. und 2. PCR, um eine ortsgerichtete Mutation in ein *lhc*-Gen einzufügen oder zur Umklonierung eines Volllängengens in ein neues Plasmid (nur 1. PCR).

Schritte	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1. PCR			
Denaturierung	1	95	3
Denaturierung	30	95	1
Annealing		50-56	0,5
Amplifikation		72	1
Amplifikation	1	72	3
Kühlung	1	4	∞
2. PCR			
Denaturierung	1	95	3
Denaturierung	35	95	1
Annealing		54-68	0,5-1
Amplifikation		72	1-2
Amplifikation	1	72	7
Kühlung	1	4	∞

Zuerst wurde die Matrizen-DNA (Plasmid mit *lhc*-Gen) bei 92 °C aufgeschmolzen, um die Doppelstränge voneinander zu lösen. Im zweiten Schritt wurde die Temperatur soweit erniedrigt (1. PCR: 50-56 °C; 2. PCR: 54-68 °C), dass sich die Primer an die Matrizen-DNA anlagern konnten, wobei die Annealing-Temperatur von Größe und Zusammensetzung der Primer abhing und in der Regel 5 °C unter der Primer-Schmelztemperatur liegen sollte. Hohe Annealing-Temperaturen führten zwar zu einer spezifischen Anlagerung der Primer, wodurch allerdings die Produkt-Ausbeute reduziert wurde. Im umgekehrten Fall erreichte die Primer-Anlagerung bei niedrigeren Temperaturen keine hohe Spezifität. Dadurch wurde zwar die Ausbeute erhöht, aber es entstanden oft auch unerwünschte Amplifikate. In Phase 3 erfolgte die DNA-Synthese durch die Polymerase an beiden DNA-Strängen in 5' ⇒ 3'-Richtung. Durch mehrmaliges Durchlaufen dieser drei Phasen konnte für die nachfolgenden Schritte ausreichend PCR-Produkt amplifiziert werden (Verdopplung der Produktmenge in jedem Zyklus). Die Dauer der Amplifikations-Zeit ist neben der Leistungsfähigkeit der Pfu-Polymerase (ca. 500 bp/min) natürlich abhängig von der Länge des Produkts.

Tabelle 4: Beispiel für die Zusammensetzung des 1. PCR-Ansatzes zur Erzeugung einer Punktmutation oder zur Umklonierung eines Volllängengens zur Erzeugung der flankierenden Restriktionsschnittstellen.

Reagenzien	Endkonzentration	50 µl-Ansatz [µl]
Matrizen-DNA: [1 ng/µl]	2 ng	2
Pfu-Polymerase-Puffer (10x)	1x	5
dNTP-Mix (je 10 mM)	Je 0,2 mM	1
Vorwärts-Primer (+) [100 ng/µl] Mutagenese- oder WT-Primer	250 ng	2,5
Rückwärts-Primer (-) [100 ng/µl] Mutagenese- oder WT-Primer	250 ng	2,5
Pfu-Polymerase [2,5 U/µl]	1,25 U	0,5
ddH ₂ O	ad 50 µl	36,5

Die 1. PCR (Tabelle 4) diente zur Amplifikation eines Teilgens mittels Mutageneseprimer und dem entsprechenden WT-Primer. Das resultierende PCR-Produkt enthielt die mutierten Basen und war entweder am 5'- oder am 3'-Ende des Gens vollständig. Die Mutageneseprimer wurden so konstruiert, dass wenn die zu mutierende Stelle im Gen näher dem 3'-Ende lag ein Vorwärts-Primer entworfen wurde, und wenn die Mutation nahe dem 5'-Ende lag ein Rückwärts-Mutageneseprimer

entworfen wurde. Durch Kombination eines Rückwärts-Mutageneseprimers mit einem WT-vorwärts-Primer (bzw. Vorwärts-Mutageneseprimer mit WT-rückwärts-Primer) konnten recht kleine Genfragmente amplifiziert werden. Der Grund dafür, dass die Produkte der 1. PCR möglichst klein werden sollten lag darin, dass sie in der 2. PCR selbst als Primer fungierten.

Üblicherweise wurde die 2. PCR zunächst als 10 µl-Testansatz bei 10 unterschiedlichen Annealing-Temperaturen im Gradientencycler durchgeführt und das Ergebnis in einem 1,5%igen Agarosegel (Kap. C1.4) überprüft, um die am besten geeignete Annealing-Temperatur zu wählen. Wenn die Amplifikate aus der 1. PCR als Vorwärts-Primer dienten, wurden mittels WT-rückwärts-Primer während der 2. PCR (300 µl-Ansatz) die Volllängengene amplifiziert und umgekehrt. Ein beispielhaftes Pipettierschema der 2. PCR ist in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Beispiel für die Zusammensetzung des 2. PCR-Ansatzes zur Erzeugung einer Punktmutation.

Reagenzien	Endkonzentration	300 µl-Ansatz [µl]
Matrizen-DNA: [5 ng/µl]	150 ng	30
Pfu-Polymerase-Puffer (10x)	1x	30
dNTP-Mix (je 10 mM)	Je 0,2 mM	6
Vorwärts-Primer (+) [100 ng/µl] Produkt der 1. PCR oder WT-Primer	1500 ng	15
Rückwärts-Primer (-)[100 ng/µl] Produkt der 1. PCR oder WT-Primer	1500 ng	15
Pfu-Polymerase [2,5 U/µl]	7,5 U	3
ddH ₂ O	ad 300 µl	199

Die Produkte aus der 2. PCR wurden anschließend mittels Isopropanolfällung gefällt, via Agarosegel quantifiziert, mittels Restriktionsenzymen (*Bam*HI, *Hind*III) geschnitten und entweder in den mit *Bam*HI und *Hind*III geschnittenen pDS12/RBS II-Vektor, oder den mit *Nde*I und *Xho*I geschnittenen pET44a-Vektor ligiert (C1.9). Der Einbau über die genannten Restriktionsenzyme war deshalb möglich, weil die verwendeten WT-Primer auch deren Erkennungssequenzen enthielten.

Aufgrund der Herstellung unterschiedlicher Mutantentypen wurden nachfolgend verschiedene Terminologien verwendet. Punktmutanten mit einfachen AS-Substitutionen beginnen mit der Bezeichnung des Apoproteins (Bsp.: Lhca4) und werden mit dem Buchstaben der ursprünglichen AS, der Position im Protein und dem Buchstaben der neuen AS vervollständigt (Bsp.: Lhca4-H99G bedeutet, dass das Histidin an Position 99 des Lhca4-WT durch ein Glycin ersetzt wurde).

Bei Wiederherstellungsmutanten war nicht der WT die Matrize für eine Mutation, sondern eine bereits existierende Mutante. Im Lhca4-H2a3-G99H wurde das Glycin in der Lhca4-Mutante mit der 2. Helix des Lhca3 (Lhca4-H2a3) an Position 99 durch ein Histidin ersetzt. Die Terminologie der Domänentauschmutanten (z.B. Lhca4-H2b1) wird in Kap. C1.7.4 näher erläutert.

Doppelmutanten wurden in der Regel wie Einzelmутanten beschrieben, nur dass beide veränderten Aminosäuren im Namen der Mutante auftauchen (Lhca4-K80T+E81Y).

Bei Mutationen mehrerer AS in Folge können aufgrund der Übersichtlichkeit nicht mehr alle substituierten AS der Bereichsmutante erwähnt werden. Hierbei wird nur die Position der getauschten Aminosäuren angegeben und diese Information mit dem Kürzel der ersten ersetzten und der letzten eingeführten AS flankiert (Bsp.: Lhca4-P119-122G).

1.7.3 Herstellung von Einzeldomänenmutanten mit substituiertem N-Terminus durch multiple Ligation PCR-gefertigter "blunt-end" Fragmente

Zur Aufklärung der Bedeutung des N-Terminus für das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten von Lhcb4-, Lhca4- und Lhcb1-Proteinen von Arabidopsis, wurde zur Herstellung chimärer LHCs der N-Terminus eines Proteins in die jeweils anderen Proteine transferiert, wo sie den originalen N-Terminus ersetzen.

In einem frühen Ansatz, diesen Austausch zu bewerkstelligen, wurden zunächst kleine DNA-Fragmente per PCR vervielfältigt, die nur aus den Genbestandteilen der 3 Lhc-Proteine bestanden, die den N-Terminus codieren. Die PCR-Reaktion verlief analog zur 1. PCR für die Erzeugung einer Punktmutation (Kap. C1.7.2). Neben den im pET44a-Vektor vorliegenden WT-Genen (*lhca4*, *lhcb4* und *lhcb1*) und den entsprechenden WT-vorwärts-Primern, wurden dazu Rückwärts-Primer verwendet, die genau bis zum Übergang des N-Terminus in die Helix 1 codierten. Nach einem Restriktionsverdau dieser Fragmente mit NdeI (Kap. C1.9.1) entstand ein Fragment (Fragment A), das gerichtet in den pET44a-Vektor ligiert werden konnte und am anderen Ende frei für eine beliebige 'blunt end' Ligation mit einem anderen Lhc-Genfragment (Fragment B) war. Diese Genfragmente, die die restliche Information für ein Volllängigen enthielt, wurde ebenfalls analog zur 1. PCR generiert, wobei hier der WT-reverse-Primer mit einem entsprechenden forward-Primer kombiniert wurde, der genau bis zum Übergang der Helix 1 zum N-Terminus codierte.

Nachdem auch Fragment B mit XhoI geschnitten worden war und auch pET44a-Vektor mit geschnittener Polylinkerregion restringiert (NdeI und XhoI) vorlag (Kap. C1.9.1), wurden alle Fragmente via Gel aufgereinigt (Kap. C1.8.3) und einer DNA-Quantifizierung (Kap. C1.6) unterzogen. Wie in Kap. C1.10 beschrieben wurden jeweils 2 Inserts (Fragment A und Fragment B) und der Vektor im molaren Verhältnis 3:3:1 in einer Reaktion miteinander ligiert und damit kompetente DH5α-Zellen transformiert (Kap. C1.11).

Durch diese Herangehensweise sollten 6 verschiedene chimäre Mutanten der oben erwähnten Lhc-Proteine Lhca4 (Lhca4-Nb1, Lhca4-Nb4), Lhcb1 (Lhcb1-Na4, Lhcb1-Nb4) und Lhcb4 (Lhcb4-Na4, Lhcb4-Nb1) mit getauschtem N-Terminus entstehen. Allerdings stellte sich diese Methode der multiplen gleichzeitigen Ligation auch nach Variation der Insertmengen als äußerst ineffizient heraus, sodass lediglich die Lhca4-Mutanten auf diese Weise generiert werden konnten. Die restlichen Mutanten wurden mit der Überhangprimer-Methode (Kap. C1.7.4) hergestellt, die aufgrund der damit erzielten Erfolge für diese Zwecke praktikabler und vor allem zeitsparender war.

1.7.4 Herstellung chimärer Proteine durch mehrstufige PCR-Techniken mittels Überhangprimer

Eine sehr effektive, aber arbeitsintensive Methode, um Domänen eines Lhc-Proteins durch äquivalente Bereiche aus einem anderen zu ersetzen, war die Herstellung dieser chimären Konstrukte über eine mehrstufige PCR (Abb. 12). Dabei wurde nach jeder durchgeführten PCR nur ein Teilstück des neuen *lhca*-Gens fertig gestellt, das bereits einen Überhang enthielt, um mit der Matrize in der darauf folgenden PCR annealen zu können. Der Ansatz konnte sowohl vom N-Terminus (N-terminale- und luminaire Schleifenmutanten), als auch vom C-Terminus (C-terminale- und stromale Schleifenmutanten) her erfolgen, je nachdem was die Bildung kleinerer DNA-Fragmente zur Folge hatte, da sich dadurch in den späteren PCR-Reaktionen weniger unspezifische Amplifikate bildeten.

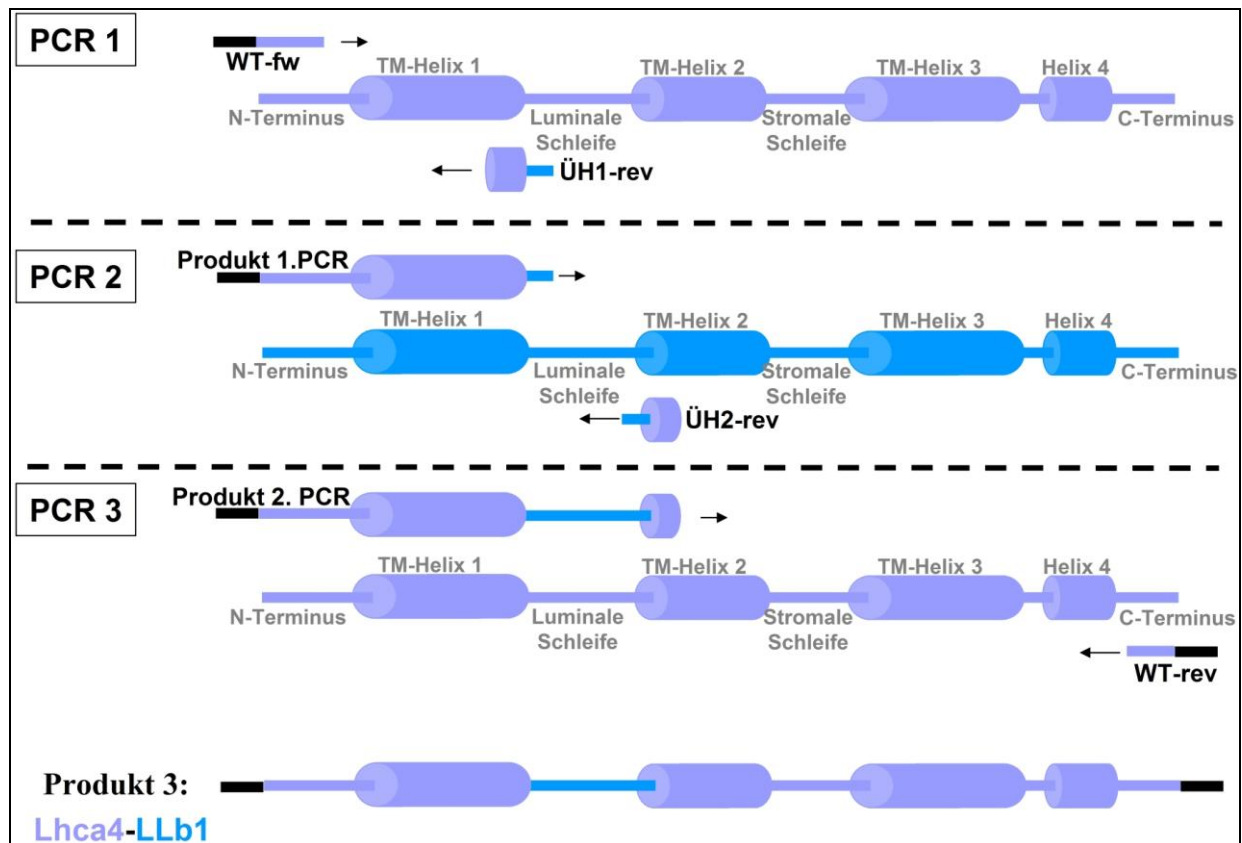


Abb. 12: Schematische Darstellung der Herstellung chimärer Lhc-Proteine durch 3-stufige PCR am Beispiel des Lhca4 mit substituiertem luminaler Schleife des Lhcb1 (Lhca4-LLb1). Die Überhangprimer enthalten neben den Basen, die sich an die Matrize anlagern, immer überhängende Basen, die zu der Matrize in der darauf folgenden PCR passen. (WT): Wildtyp; (fw): forward Primer; (rev): reverse Primer; (ÜH1/ÜH2): Überhangprimer 1 und 2; (TM): Transmembran; (schwarz): NdeI- und XhoI-Erkennungssequenzen; (violett): Lhca4-Bestandteile; (blau): Lhcb1-Bestandteile.

Zur Herstellung N- und C-terminaler Domänentauschmutanten wurden nur 2 PCR-Durchgänge benötigt. Lag die zu substituierende Domäne im inneren des Gens (luminaler Schleife, stromaler Schleife), so mussten mindestens 3 nacheinander geschaltete PCR-Läufe erfolgen. Bei zu niedriger Produktausbeute nach der 3. PCR wurde sogar noch eine 4. PCR mit WT-Primern durchgeführt, um mehr vom gewünschten Amplifikat zu erhalten.

Nach dem jeweils letzten PCR-Durchgang wurden die Produkte durch Isopropanol gefällt (Kap. C1.8.1), mittels NdeI und XhoI geschnitten (Kap. C1.9.1), per Gel aufgereinigt (Kap. C1.8.3), in den pET44a-Vektor ligiert (Kap. C1.10) und damit kompetente DH5 α -Zellen transformiert (Kap. C1.11).

In der Nomenklatur der Einzeldomänentauschmutanten wird das Grundprotein gefolgt von der ausgetauschten Domäne (N, LL, H2, SL, C) und dem Kürzel für dessen Herkunft (a4, b1, b4) beschrieben. Wurde z.B. der N-Terminus des Lhcb1 durch den des Lhca4 ersetzt, entstand die Lhcb1-Na4-Mutante. Analog dazu wurden die Mutanten mit anderen substituierten Domänen genannt (luminaler Schleife des Lhca4 = LLa4; Helix 2 des Lhca4 = H2a4; stromaler Schleife des Lhca4 = SLa4; C-Terminus des Lhca4 = Ca4). Beim Tausch mehrerer Domänen wurden einfach mehrere der beschriebenen Suffixe angehängt.

1.7.4.1 Herstellung von Einzeldomänenmutanten mit substituiertem N- und C-Terminus durch eine zweistufige PCR

Diese Methode wurde eingeführt, nachdem eine multiple Ligation PCR-gefertigter 'blunt end'-Fragmente mehrheitlich nicht zum Ziel führte. Über eine zweistufige PCR waren die Generierung der fehlenden N-terminalen Mutanten und auch die Herstellung der noch ausstehenden C-terminalen Domänentauschmutanten recht schnell realisierbar.

Der Schlüssel zum Erfolg lag in den eigens dafür entwickelten Überhangprimern. Sie waren 40-50 Basen lang und bestanden aus zwei Teilen. Für die Amplifikation der N-terminalen Mutanten trugen diese Primer die letzten 25 Basen des N-Terminus des einen Gens (Bsp. *lhca4*) und die danach folgenden 25 Basen der Helix 1 eines zweiten Gens (Bsp. *lhcb1*), wodurch nach 2 PCR-Durchläufen der *Lhcb1*-Na4 entstehen konnte. In einem ersten PCR-Lauf (siehe 1. PCR Kap. C1.7.2) wurde mittels WT-fw-Primers (in diesem speziellen Fall der vorwärts WT-Primer des *lhca4*), dem *lhca4*-wt als Matrize und des eben beschriebenen Überhangprimers (reverse) ein DNA-Fragment amplifiziert, das neben dem *Lhca4*-N-Terminus auch 25 Basen der anschließenden Helix 1 des *lhcb1* enthielt.

In der zweiten Reaktion (siehe 2. PCR Kap. C1.7.2) diente das Produkt der 1. PCR als Vorwärtsprimer, der *lhcb1*-wt als Matrize und der *lhcb1*-wt-reverse als Rückwärtsprimer, wodurch das mutierte Volllängengen entstand. Im Falle der C-terminalen Domänentauschmutanten war der Überhangprimer vorwärts gerichtet, das Prinzip blieb aber gleich.

1.7.4.2 Austausch innen gelegener lhc-Domänen über 3- oder 4-stufige PCR

Der Austausch der luminalen oder stromalen Schleife erforderte den Einsatz von mindestens 3 PCR-Stufen. Technisch gesehen wurde die 1. PCR analog zur Herstellung eines Megaprimers durchgeführt (siehe Kap. C1.7.2: 1. PCR). Die 2. und 3. PCR erfolgten analog zur Volllängengensynthese (siehe Kap. C1.7.2: 2. PCR). In Abb. 12 ist schematisch die Generierung einer *Lhca4*-Mutante mit der luminalen Schleife des *Lhcb1* dargestellt (*Lhca4*-LLb1). In Ergänzung zur detaillierten Beschreibung der 2-stufigen Herstellungsweise der N- und C-terminalen Domänentauschmutanten ist hinzuzufügen, dass bei der Generierung der LL- und SL-Mutanten der Einsatz zweier Überhangprimer notwendig war, da die Matrizen-DNA in jedem PCR-Ansatz gewechselt wurde.

Im Falle der luminalen Schleifenmutanten wurden die Konstrukte vom N-Terminus her generiert, während die stromalen Schleifenmutanten vom C-Terminus ausgehend amplifiziert wurden. Der Grund liegt beim niedrigeren Fehlpriming kleinerer DNA-Fragmente (PCR-Produkte) mit der Matrize, wodurch weniger Nebenprodukte entstehen. War die gewünschte Bande, die das mutierte Volllängengen enthalten sollte zu schwach, um eine vernünftige Aufreinigung, Ligation und Transformation zu garantieren, wurde mittels zugehöriger WT-Primer in einem 4. PCR-Ansatz (siehe C1.7.2, 1. PCR) die Produktausbeute spezifisch erhöht.

1.7.5 Herstellung chimärer Proteine mittels "Quikchange® II Site-directed Mutagenesis Kit"

Das "Quikchange® II Site-Directed Mutagenesis Kit" von Stratagene (Amsterdam, NL) enthielt neben einem optimierten Puffer, dNTPs, der PfuUltra® High-Fidelity DNA Polymerase und DpnI zum verdauen der Matrizen-DNA, auch superkompetente XL1-Blue Zellen. Es waren alle Materialien bis auf die Mutageneseprimer in diesem Kit enthalten, um *E. coli* Klone mit genetisch veränderten Plasmiden zu generieren.

Zunächst mussten Oligonukleotide entworfen werden, die der Amplifikation der in das *lhc*-Gen zu inserierenden Domäne (Bsp.: Helix 2) dienten und darüber hinaus an dieses Amplifikat auch überhängende Sequenzbereiche integrierten. Diese Abschnitte entsprachen dem *lhc*-Gen, in welchem die Substitutionsmutation stattfinden sollte, da sie in der nächsten PCR zum annealen an die Matrize benötigt wurden. Es handelte sich demnach um zwei Überhangprimer (Kap. C1.7.4), die simultan in einer PCR zur Amplifikation eines Megaprimeres dienten, der für den Austausch großer Genfragmente Voraussetzung war (Kirsch und Joly, 1998). So wurde für die Herstellung einer Lhca4-H2b1-Mutante als Matrize in PCR 1 (Kap. C1.7.4.1) der *lhcb1-wt* verwendet, wodurch ein Fragment von ca. 110 bp entstand, das neben der Helix 2 des *lhcb1* zusätzlich 'up'- und 'downstream' 25 *lhca4*-Basen implementiert hatte. Dieses Amplifikat wurde aufgereinigt (Kap. C1.8.3) und quantifiziert (Kap. C1.6.1) und diente in der folgenden Mutagenese-PCR als Megaprimer.

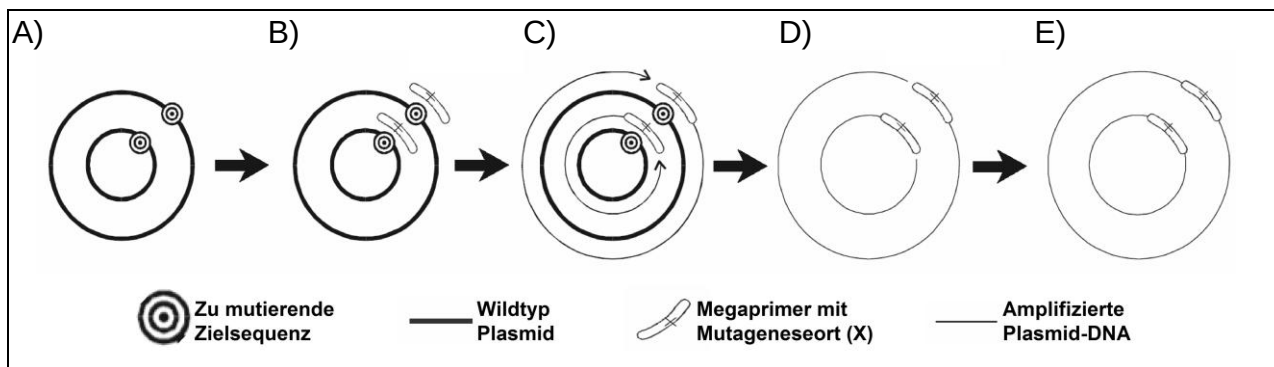


Abb. 13: Schematische Darstellung des "Quikchange® II Site-Directed Mutagenesis Kit" von Stratagene, das zur Generierung der Helix 2 Domänentauschmutanten und zur Substitution sehr großer Genabschnitte verwendet wurde. Abgeänderte Abbildung aus 'Instruction Manual' (Revision A.01).

Während der Mutagenese-PCR (Tabelle 6) wird, anders als bei herkömmlichen PCR-Techniken, das komplette Plasmid amplifiziert und das Produkt nicht bei jedem neuen PCR-Zyklus verdoppelt, da die Produkte nicht wieder als Matrize dienen können. Aus diesem Grund werden große Mengen Matrizen-DNA und Mutageneseprimer im Ansatz benötigt (Tabelle 7). Wie in Abb. 13C zu erkennen ist, werden beim Amplifikationsvorgang der komplette Sense- und Antisensestrang amplifiziert. Allerdings ist aus technischen Gründen kein Ringschluss durch die Polymerase möglich.

Tabelle 6: Thermocyclerprotokoll der Mutagenese-PCR zum Austausch großer DNA-Bereiche mittels "Quikchange® II Site-Directed Mutagenesis Kit".

Schritte	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Denaturierung	1	95	30
Denaturierung	20	95	30
Annealing		55	60
Amplifikation		68	60 / kb Plasmidlänge
Kühlung	1	4	∞

Nach der Mutagenese-PCR wurde ein 1%iges Agarosegel (Kap. C1.4) mit bis zu 20 µl PCR-Volumen angefertigt, um die erfolgreiche Amplifikation zu überprüfen. Wurde keine Bande erwarteter Größe detektiert, war eine Fortführung des Experiments in der Regel erfolglos und die Mutagenese-PCR musste wiederholt werden.

Bei Gelingen musste der Ansatz nach Amplifikation einem *DpnI*-Verdau (Abb. 13 C → D) unterzogen werden, um die nicht mutierte Matrizen-DNA zu verdauen, damit später keine falsch positiven Kolonien mit unveränderten WT-Genen auf den Platten wuchsen.

(Theorie zur Methodik, siehe Kap. C1.9.1). Dazu wurde dem PCR-Ansatz 1 µl des mitgelieferten Restriktionsenzym *DpnI* (10 U/µl) beigemischt und der Ansatz für mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 7: Pipettierschema für eine Mutagenese-PCR mittels “Quikchange® II Site-Directed Mutagenesis Kit“ unter Verwendung von zuvor hergestellten Megaprimern, zum Austausch großer DNA-Bereiche.

Reagenzien	Endkonzentration	50 µl-Ansatz [µl]
Matrizen-DNA: [5 ng/µl]	50 ng	10
Pfu-Polymerase-Puffer (10x)	1x	5
dNTP-Mix (proprietär)	unbekannt	1
Megaprimer aus 1. PCR	1000 ng / 100 bp	variabel
PfuUltra®-Polymerase [2,5 U/µl]	2,5 U	1,0
ddH ₂ O	ad 50 µl	variabel

Dem Restriktionsverdau folgte direkt die Transformation (Kap. C1.11) von 50 µl superkompetenten XL1-Blue Zellen mit 2-3 µl des verbliebenen PCR-Ansatzes. Dabei kamen unter anderem die nicht mitgelieferten, aber vom Hersteller empfohlenen 14 ml Falcon Polypropylen Rundbodenröhrchen (BD Bioscience, Heidelberg) und ein exakt 42 °C warmes Wasserbad zum Einsatz, um den 45sekündigen Hitzeschock effizient zu gestalten. Abschließend erfolgte eine 2minütige Inkubation auf Eis. Der DNA-Reparaturmechanismus (*recA1*-Gen) der Bakterien wurde benötigt, um die ungeschlossenen Sense- und Antisensestränge der Plasmide wieder zu schließen. Nach Zugabe von 0,5 ml 42 °C warmem SOB-Medium (Hanahan, 1983: 2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) MgSO₄ x 7 H₂O, 0,05% (w/v) NaCl, 0,0186% (w/v) KCl, pH 7,0 mit NaOH), das anstelle des empfohlenen NZY⁺ broth Mediums verwendet wurde, und einer Stunde Inkubationszeit im 37 °C warmen Brutschrank im Kulturrad, konnte der Ansatz auf herkömmlichen LB-Agarplatten (Ampicillin: 100 ng/µl) ausplattiert werden.

1.7.6 Kolonie-PCR zur Identifikation positiver Klone

Klone, die eine substituierte Helix 2 trugen oder nach Restriktion nur schwer von einem Wildtyp-Kontrollverdau unterschieden werden konnten, waren nicht über einen Restriktionsverdau zu identifizieren, da als Produkte nur ähnlich große DNA-Fragmente entstanden. Außerdem konnte über eine Kolonie-PCR schon eine Vorabkontrolle der gepickten Kolonien stattfinden, bevor die doch etwas zeitintensivere Variante mit Übernachtskultur, Plasmidisolation, Restriktionsverdau und Agarosegel den endgültigen Nachweis brachte.

Tabelle 8: Thermocyclerprotokoll zur Identifikation positiver Klone mittels Kolonie-PCR

Schritte	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Denaturierung	1	94	5
Denaturierung	35	94	1
Annealing		54	1
Amplifikation		72	1
Amplifikation	1	72	7

Ein Nachweis mittels PCR (Cyclerprotokoll in Tabelle 8) wurde in der Regel unter Verwendung eines WT-Primers und eines korrespondierenden Primers geführt, der nur in der substituierten Domäne binden konnte. Falls die generierte Mutante eine vom Wildtyp abweichende Genlänge aufwies, konnte auch mit beiden WT-Primern die Identifikation der entsprechenden Kolonie erfolgen.

Tabelle 9: Pipettierschema einer Kolonie-PCR zur Identifikation positiver Klone

Reagenzien:	
Bakterienzellen aus Übernachtskultur	2 µl
Reaktionspuffer-Puffer Y (10 x)	5 µl (1 x)
(+)-Primer: variabel [100 ng/µl]	2,5 µl (250 ng)
(-)-Primer: variabel [100 ng/µl]	2,5 µl (250 ng)
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
Taq-Polymerase (2500 U/ml)	0,5 µl
ddH ₂ O (ad 50 µl)	36,5 µl

Zu diesem Zweck wurden die per ÜN-Kultur vermehrten Bakterien als Suspension dem PCR-Ansatz (Tabelle 9) beigegeben. Durch die hohen Denaturierungstemperaturen im PCR-Zyklus wurden die Bakterienzellen zerstört und die Plasmid-DNA für die Primer und die verwendete Taq-Polymerase (Peqlab, Erlangen oder New England Biolabs GmbH, Frankfurt) zugänglich gemacht. Die Visualisierung der Resultate erfolgte via Agarose-Gelelektrophorese (C1.4).

1.8 Methoden zur DNA-Aufreinigung

Es wurden zwei Methoden der alkoholischen DNA-Fällung angewandt, die auf der Sachlage basieren, dass Alkohol der DNA Wasser entzieht, wodurch diese zusammen mit den in Lösung befindlichen Salzen ausfällt. Wird die pelletierte DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen, so lösen sich darin die Salze, nicht aber die DNA. Eine Fällung war notwendig, wenn zwischen einzelnen Arbeitsschritten zu Reinigungszwecken Puffer, Nukleotide oder Salze entfernt werden mussten.

Wenn zusätzlich zur DNA-Aufreinigung auch die Abtrennung von nicht erwünschten DNA-Fragmenten erfolgen sollte, wurde ein PCR- oder Restriktionsansatz in einem Agarosegel aufgetrennt, die gewünschte Bande ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA mittels Gelextraktionskit (Peqlab, Erlangen) isoliert. Restringierte Plasmide, die mit NdeI und XhoI geschnitten wurden, sollten stets mit einer höherwertigen GTQ-Agarose (Roth, Karlsruhe) aufgetrennt werden, da die Nutzung der sonst üblichen Peggold-Agarose (Peqlab, Erlangen) ein Misslingen der anschließenden Ligation dieser Vektors mit entsprechender Insert-DNA zur Folge hatte. Eventuell ist die Peggold-Agarose mit Polysacchariden verunreinigt, die aufgrund ihrer Ladung eine Ligation erschweren.

1.8.1 DNA-Aufreinigung durch Isopropanolfällung zur Primerabtrennung

Diese Methode wurde im Anschluss an eine PCR-Mutagenese angewandt. Sie eignet sich neben der Abtrennung von Puffern und Salzen auch zum Entfernen von Nukleotiden und Primern, die kleiner als 80 bp sind, da diese unter den nachfolgend beschriebenen Bedingungen nicht mit der DNA ausfallen (Sambrook und Russel, 2001). Dabei wurde das PCR-Produkt mit dH₂O auf 150 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen 4 M Ammoniumacetat versetzt. Nach Zugabe von 300 µl Isopropanol wurde die Lösung gemischt und für 40 min zentrifugiert (Jouan BR4i; AB 1.14-Rotor; 14000 Upm; 4 °C). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 300 µl 70%igem (4 °C) Ethanol gewaschen und erneut für 20 min zentrifugiert (s.o.). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet für 10 min in der Speed-Vak mit Heizung getrocknet. Die DNA wurde in der Regel in 55 µl ddH₂O aufgenommen.

1.8.2 Quantitative DNA-Fällung mittels Ethanol zur Reinigung kleiner Fragmente

Um sehr kleine DNA-Fragmente unter 100 bp ohne Verluste aufzureinigen, was unter anderem nach Amplifikation der N-terminalen Lhca4-Fragmente erfolgte (C1.7.3), musste die DNA mittels Ethanol quantitativ gefällt werden. Dabei wurden die PCR-Produkte (100 µl) mit 15 µl 3 M Na-Acetat-Lösung versetzt und mit 250 µl absolutem Ethanol vermischt. Diese Lösung wurde für 5 min bei –80 °C schockgefroren und für 30 min zentrifugiert (Jouan BR4i; AB 1.14-Rotor; 14000 Upm; 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 20 min zentrifugiert (s.o.). Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Pellet-Trocknung für 10 min in der Speed-Vak mit Heizung und eine Resuspendierung des Pellets mit 35 µl ddH₂O. Da alternativ auch eine Gelaufreinigung in Betracht kam wurde diese Methode nur selten genutzt.

1.8.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen zur Abtrennung unerwünschter PCR-Nebenprodukte

Mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA-Fragmente (Insert- und Vektor-DNA) und DNA-Amplifikate aus PCR-Reaktionen mit vielen unspezifischen Produktbanden (Kap. C1.7.4) wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die entsprechenden Banden konnten unter einer langwelligen UV-Lampe mit einer Rasierklinge herausgetrennt und in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt werden. Dadurch wurden vor allem unerwünschte PCR-Amplifikate und mit DpnI geschnittene Matrizen-DNA abgetrennt. Die Extraktion der DNA aus den Agarosegelen wurde mittels des E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kits (Pierce & Warriner GmbH, Erlangen) bewerkstelligt. Das ausgeschnittene Agarosegelstück wurde mit dem einfachen Volumen an XP2-Bindpuffer aufgefüllt. Nachdem die Agarose im Heizblock bei 60 °C unter regelmäßigem Invertieren des Gefäßes gelöst war, wurde der pH-Wert des Puffers überprüft. Bei einer orange-roten Färbung (pH über 7,5) mussten einige µl 5 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) zugegeben werden, bis der Puffer wieder einen hellgelben Farbton annahm. Ein zu hoher pH-Wert verringert die Effizienz der DNA-Bindung an die HiBind[®]-Säulenmatrix. Die Zentrifugensäulen in den 2 ml Sammelröhrchen wurden anschließend drei mal mit je maximal 750 µl DNA-Agaroselösung beladen und nach jeder Beladung bei Raumtemperatur zentrifugiert (10000 g; 1 min). Der Säulendurchfluss wurde jedes Mal verworfen und die Säule mit 750 µl DNA-Waschpuffer beladen, welcher nach 2-3 min Inkubationszeit abzentrifugiert (s.o.) und ebenfalls verworfen wurde. Die Trocknung der Säule erfolgte durch einminütige Zentrifugation (s.o.). Nachdem die Säule auf ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert wurde, konnte die DNA mit 35 µl, 60 °C warmem und sterilem dH₂O durch erneute Zentrifugation bei 10000 g für 1 min eluiert werden. Die Ausbeute konnte durch einminütige Inkubation des erwärmten dH₂O deutlich erhöht werden. Die eluierte DNA wurde bei –20 °C für die anschließende Ligation oder weitere PCR-Anwendungen aufbewahrt.

1.9 Restriktionsendonucleasereaktionen

Um die durch PCR-Mutagenese hergestellte Insert-DNA in die Vektoren zu klonieren, mussten beide Komponenten die gleichen Schnittstellen besitzen, damit sie später über eine DNA-Ligase miteinander verknüpft werden konnten. Diese Schnittstellen wurden mittels Restriktionsendonucleasen (RE) (Tabelle 10) erzeugt, die spezielle palindromische DNA-Sequenzen erkennen und an einer bestimmten Position diese

doppelsträngige DNA hydrolytisch spalten. Die Erkennung der palindromischen DNA-Sequenzen beruht auf der Struktur von Restriktionsenzymen, welche zum größten Teil aus zwei identischen Polypeptiduntereinheiten zusammengesetzt sind, von denen jede die Sequenz erkennt und die DNA schneidet. Bisher sind mehr als 2000 prokaryotische Restriktionsenzyme bekannt, die über 200 unterschiedliche Spezifitäten aufweisen (Madigan et al., 2000).

Tabelle 10: Auflistung aller verwendeten Restriktionsenzyme mit Pufferangaben und Besonderheiten. (▼): Schnittstelle der RE; (dam und dcm): Methylierung von Adenin- und Cytosinresten; (T_{Opt.}): optimale Arbeitstemperatur des RE; (met): methylierte Basen.

Enzym (c)	Verwendete Puffer	Erkennungssequenz	Hersteller	Besonderheiten
<i>Bam</i> HI (10 U/μl)	BamHI-Puffer 2 x Tango	G▼GATCC	Fermentas	Sternaktivität ab 5 U/h und μg DNA
<i>Dpn</i> I (10 U/μl)	Blauer Puffer 1+2 x Tango	GA _{met} ▼TC	Fermentas	Schneidet nur methylierte DNA
<i>Hind</i> III (10 U/μl)	Roter Puffer 1+2 x Tango	A▼AGCTT	Fermentas	
<i>Nde</i> I (10 U/μl)	Orange Puffer 2 x Tango	CA▼TATG	Fermentas	
<i>Sal</i> I (10 U/μl)	Orange Puffer 2 x Tango	G▼TCGAC	Fermentas	Kompatible Enden zu <i>Xho</i> I
<i>Sfi</i> I (10 U/μl)	Grüner Puffer 1 x Tango	GGCCNNNN▼NGGCC	Fermentas	T _{Opt.} :50°C; bei 37 °C Nur 10% Aktivität; dam sensitiv
<i>Xho</i> I (10 U/μl)	Roter Puffer 2 x Tango	C▼TCGAG	Fermentas	

Die Namensgebung eines Restriktionsenzym bezieht sich auf den Organismus aus dem es isoliert wurde (Bsp.: *Hind*III aus *Haemophilus influenzae*). Bakterien benötigen Restriktionsenzyme um eingedrungene Fremd-DNA schnell und wirkungsvoll zu eliminieren. Dabei ist die Entwicklung eigener Schutzmechanismen wichtig, um die eigene DNA nicht zu zerschneiden. Dies wird durch Methylierung der entsprechenden Schnittstellen mittels DNA-Methyltransferasen erreicht, wobei S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonor fungiert. Die verwendeten Zelllinien JM 101, DH5α, XL1-Blue und BL21 von *E. coli* besitzen sowohl das *dcm*- als auch das *dam*-Gen. Dadurch werden neben Adenin-Resten in einer GA_{met}TC-Sequenz auch die Cytosin-Reste in CC_{met}AGG- und CC_{met}TGG-Sequenzen methyliert (met). Dies hat zur Folge, dass unter ungünstigen Bedingungen das Restriktionsenzym *Sfi*I aus Tabelle 10 die methylierte DNA aus den verwendeten Zelllinien nicht schneiden könnte. Da dieses Restriktionsenzym aber eine Erkennungssequenz mit intern gelegenen variablen Basen um die Schnittregion aufweist, trat diese Situation der Schnittblockade nicht ein, da es nur zur Anwesenheitskontrolle der 2. Helix des *Lhcb1* diente, wo keine *dam*-Methylierungserkennungssequenz liegt.

Eine praktische Anwendung mit methylierter Plasmid-DNA war, dass nach einem PCR-Lauf die im Ansatz befindliche WT-DNA mittels *Dpn*I verdaut werden konnte. Dieses Restriktionsenzym schneidet nur methylierte DNA aus Bakterien und nicht die in der PCR gebildete.

Die Enzymkonzentrationen aus Tabelle 10 sind in Units/μl angegeben und beschreiben die Enzymaktivität. Eine Unit (U) eines Enzyms ist in der Lage innerhalb einer Stunde bei optimalen Temperaturverhältnissen 1 μg DNA zu verdauen.

1.9.1 Restriktionsverdau der Plasmid-, Vektor-, und Insert-DNA zur Herstellung neuer Mutanten

Die Tomaten-Gene wurden mit *HindIII* und *BamHI* in die Polylinkerregion des pDS12/RBSII-Vektors (Abb. 7) kloniert. Die später angefertigten Arabidopsis-Klone wurden zwecks Proteinexpression über *NdeI* und *XhoI* in den pET44a-Vektor (Abb. 8) mit C-terminal gelegenen His-tag einkloniert.

Die durch Isopropanolfällung (Kap. C1.8.1) aufgereinigten PCR-Produkte und die Vektoren wurden mittels *BamHI* / *HindIII* (pDS-Vektor) oder *NdeI* / *XhoI* (pET-Vektor) zurechtgeschnitten, um sie später miteinander zu ligieren (Kap. C1.10). Durch die Verwendung zwei verschiedener RE in einem Doppelverdau, wurde die Insertionsrichtung des Gens festgelegt. Da ein gewisser Anteil an ursprünglicher, unmutierter Matrizen-DNA nach den PCR-Durchgängen immer vorhanden war, musste die Insertion dieser unveränderten *lhc*-Gene in die Vektoren schon im Vorfeld ausgeschlossen werden. Da die Matrizen-DNA immer aus Plasmiden besteht, die mittels Midi-Prep (Kap. C1.5.2) aus dam-positiven *E. coli*-Stämmen isoliert wurden, und da die durch PCR-Mutagenese hergestellte DNA immer unmethyliert ist, konnte durch Einsatz des *DpnI*-Restriktionsenzym (Tabelle 10) die methylierte Matrizen-DNA komplett verdaut werden. Um ein Vollständigen einer Punkt-, Doppel-, Bereichs- oder Domänentauschmutante zurechtzuschneiden, die nicht mittels "Quikchange® Site-Directed Mutagenesis Kit" generiert wurden, waren je nach Zielvektor 3 verschiedene Restriktionsenzyme im Ansatz (Tabelle 11) enthalten

Tabelle 11: Restriktionsverdau der mittels Isopropanolfällung aufgereinigten Insert-DNA. Der Enzymüberschuss ist abhängig von der zu verdauenden DNA-Menge und den Herstellerangaben bezüglich der empfohlenen Überschussmenge (www.fermentas.com/doubledigest/index.html), um 1 µg DNA vollständig zu verdauen.

Restriktionsansatz:	Endkonzentration
2 x Tango	14,0 µl
<i>BamHI</i> und <i>HindIII</i> (pDS-Vektor)	Je 6 x Überschuss
<i>NdeI</i> und <i>XhoI</i> (pET-Vektor)	Je 6 x Überschuss
<i>DpnI</i>	4 x Überschuss
DNA (PCR-Produkt)	Gesamtmenge aus Reinigung
dH ₂ O	Ad 70 µl

Auch die Vektor-DNA wurde wie in Tabelle 11 verdaut, wobei auf den Einsatz von *DpnI* verzichtet wurde, da es sich um das methylierte Originalplasmid handelt. Alle Ansätze wurden für mindestens 3 Stunden, aber häufig über Nacht im Heizblock bei 37 °C verdaut.

1.9.2 Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA zur Identifikation positiver Klone

Nach einer Transformation bestand die Möglichkeit, dass nicht nur Bakterien mit Insert-tragendem Plasmid (positive Klone), sondern auch negative Klone mit fehlendem Insert und reinem Vektor auf der Agarplatte wuchsen. Letztere konnten dadurch entstehen, dass während des Restriktionsverdaus des Vektors anstelle beider Restriktionsenzyme nur eines schnitt, sodass der Vektor nur linearisiert wurde. Während der Ligation können diese Vektoren religieren und - nach Transformation in ein Bakterium - durch ihre Resistenzgene auf der LB-Ampicillin-Platte wachsen. Um sicherzustellen, dass ein Klon auch einen Vektor mit Insert enthält, wurden entweder ein Restriktionsverdau oder eine Kolonie-PCR (Kap. C1.7.6) durchgeführt.

Für den Nachweis per Restriktionsverdau wurden Kolonien gepickt, mittels Übernachtskultur (Kap. C1.1) vermehrt und die Plasmid-DNA per Mini-Prep (Kap. C1.5.1) isoliert. Bei *Lhca4*-Punkt, Doppel- und Bereichsmutanten, die in kompetente Zellen transformiert wurden konnte der Nachweis durch einen Verdau bei 37 °C für mindestens 3 Stunden im Heizblock mit *Bam*HI / *Hind*III oder *Nde*I / *Xho*I erfolgen (Tabelle 12), wobei das inserierte Gen wieder herausgeschnitten wurde.

Alternativ dazu konnte auch ein Mikrowellenschnellverdau bei 600 Watt Leistung durchgeführt werden. Dabei war es wichtig die Proben nur jeweils 5 s der Strahlung auszusetzen und die Reaktionsgefäße im Anschluss wieder zu durchmischen (Abkühlung). Diese Prozedur musste 7-mal wiederholt werden.

Die Überprüfung, ob ein Insert der zu erwartenden Größe herausgeschnitten wurde, erfolgte durch Auftrennung in einem 1,5%igen Agarosegel, wobei die *lhca4*-Inserts 600 bp groß waren. Ein Einbau von Wildtyp-DNA (Matrize bei der PCR-Mutagenese; Kap. C1.7) konnte durch den Einsatz des *Dpn*I-Enzyms (Tabelle 10) weitgehend ausgeschlossen werden.

Tabelle 12: Restriktionsansatz zum Nachweis positiver Klone durch Herausschneiden des inserierten Volllängengens im pDS- oder pET-Vektor.

Restriktionsansatz	Endkonzentration
DNA aus Mini-Prep	10 µl (etwa 0,5-2 µg)
Tango-Puffer (10 x)	3 µl (2 x)
<i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III (pDS-Vektor)	0,5 µl (6 x Überschuss)
<i>Nde</i> I und <i>Xho</i> I (pET-Vektor)	0,5 µl (6 x Überschuss)
ddH ₂ O (ad 15 µl)	1 µl

Alle angefertigten Domänentauschmutanten – bis auf die Helix 2 Mutanten – konnten sogar über die Größe des Volllängengens direkt identifiziert werden. Dies war möglich, da N-Termini, C-Termini, luminale und stromale Schleifen der *Lhca4*-, *Lhcb1* und *Lhcb4*-Proteine unterschiedlich lang sind. Nach Restriktionsverdau der isolierten Plasmide mit anschließender Gelauf trennung konnte dadurch direkt ein Unterschied zwischen Mutante und WT-Kontrollverdau festgestellt werden.

Die Mutanten mit substituierter 2. Helix konnten nicht aufgrund der Schnittmuster ihrer Volllängengene vom jeweiligen WT unterschieden werden, da die 2. Helix im *Lhca4*, *Lhcb1* und *Lhcb4* die gleiche Länge hat. Deswegen wurden unique Schnittstellen für Restriktionsenzyme herangezogen, die in Helix 2 des *Lhca4* (*Sa*II) und des *Lhcb1* (*Sfi*I) vorhanden sind. Das Schema des Verdaus war das gleiche wie in Tabelle 12 angegeben, nur dass zusätzlich entweder auf An- oder Abwesenheit der Helix 2 des *Lhca4* oder des *Lhcb1* getestet wurde. Dabei waren je nach Ansatz entweder 2 kleinere Doppelbanden oder eine große Volllängengenbande im Gel sichtbar. Wurden beispielsweise *Lhcb4*-H2a4-Mutanten untersucht (*Nde*I+*Sa*II+*Xho*I im Ansatz), musste als Kontrolle der *lhca4-wt* mit aufgetragen werden, der 3-mal geschnitten wurde. Die *lhcb4-wt* Negativkontrolle wurde nur 2-mal geschnitten.

1.10 Ligation von Insert- und Vektor-DNA

Die Insertion der geschnittenen und mittels Agarose-Gelelektrophorese oder Photometrie quantifizierten (Kap. C1.6) DNA-Fragmente in die jeweiligen Vektoren erfolgte durch eine T₄-Ligase-Reaktion. Für eine schnelle Ligation wurde das "Rapid DNA Ligation Kit" von Fermentas (St. Leon-Roth) verwendet. Die DNA-Ligase verbindet dabei unter ATP-Verbrauch die freien Nukleotide der Insert- und der Vektor-DNA durch Ausbildung neuer Phosphodiesterbindungen. In einem 20 µl Ligationsansatz befanden sich neben Insert und Vektor der 1-fach konzentrierte "Rapid Ligation buffer"

(Stammlösung 5 x) und 1 µl der T₄-DNA-Ligase (5 U/µl). Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf 20 µl komplettiert. Die eingesetzte Vektor-DNA-Menge sollte bei einem molaren Verhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) den Wert von 200 ng nicht überschreiten. Allerdings konnte mit einem molaren Verhältnis von 4:1 (Insert:Vektor) die Anzahl der gewachsenen Kolonien nach der Transformation um das Doppelte gesteigert werden, wobei die Vektor-DNA-Menge üblicherweise auf 100 ng pro Reaktionsansatz reduziert wurde. Die Ligation sollte für mindestens 5 min bei 22 °C erfolgen. Eine Erhöhung der Inkubationsdauer auf maximal eine Stunde steigerte laut Hersteller nochmals die Ligationseffizienz.

1.11 Transformation verschiedener *E.coli* Zelllinien

Durch die zuvor künstlich induzierte Kompetenz (Kap. C1.2) waren die *E. coli*-Zellen transformierbar, wobei es bei der Durchführung der Transformation bezüglich der verwendeten Zelllinien kleine Unterschiede gab. Der Ligationsansatz (20 µl) mit nun geschlossen vorliegenden Plasmiden wurde für gewöhnlich komplett zu 50 µl auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli* Zellen gegeben und zur Durchmischung leicht angestupst. BL21 Zellen waren zu 100 µl aliquotiert. Bei Verwendung des "Quikchange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit" wurden nur 2-3 µl des Ansatzes für eine Transformation benötigt. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Transformationsansatz mit sterilem dH₂O anstelle eines Ligationsansatzes verwendet. Alle für die jeweiligen Zelltypen abweichenden Inkubationszeiten und -temperaturen sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Inkubationszeiten und –Temperaturen aller verwendeten kompetenten *E. coli* Zelltypen.

	JM 101	DH5α	BL21 (DE3)	XL1-Blue
Bakterienvolumen	50 µl	50 µl	100 µl	50 µl
1. Inkubation auf Eis	30 min	20 min	10 min	30 min
Hitzeschock (Dauer/Temperatur)	5 min, 22 °C	45 s, 42 °C	45 s, 42 °C	45 s, 42 °C
2. Inkubation auf Eis	-	2 min	2 min	2 min
Komplexmedium (Volumen/Temperatur)	LB-Medium (225 µl / 37 °C)	LB-Medium (250 µl / 37 °C)	LB-Medium (250 µl / 37 °C)	SOB-Medium (500 µl / 42 °C)

Nach Inkubation auf Eis wurden die Bakterien einem Hitzeschock unterzogen, um die Transformationseffizienz zusätzlich zu steigern. Danach wurden einige Zelltypen nochmals auf Eis heruntergekühlt. Damit transformierte Zellen die Ampicillin-Resistenz ausbilden konnten, wurden die Transformationsansätze mit Flüssigmedium ohne Ampicillin versetzt und für eine Stunde bei 37 °C im Kulturrad festgeklemmt inkubiert. Schließlich wurde der Transformationsansatz vollständig auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte ausplattiert. Bei 37 °C wurden die Petrischalen mit dem Deckel nach unten über Nacht in den Wärmeschrank gestellt. Eine positiv transformierte Bakterienzelle sollte bis zum nächsten Tag eine Kolonie aus geklonten (identischen) Zellen gebildet haben, die zur weiteren Untersuchung gepickt und in einer Übernachtskultur vermehrt wurde (Kap. C1.1). Die Kontrollansätze sollten kein Koloniewachstum zeigen, da durch das fehlende Plasmid auch keine Ampicillin-Resistenz gegeben war.

1.12 DNA-Sequenzierung zur Überprüfung eingefügter Mutationen

Zur Absicherung der Ergebnisse aus den Nachweisen auf positive Klone (Kap. C1.9.1) und um ungewollte Mutationen während der PCR-Mutagenese auszuschließen, wurden die Plasmide isoliert (Kap. C1.5), quantifiziert (Kap. C1.6.1) und nach einer PCR-

Sequenzierreaktion zur Ermittlung der vollständigen DNA-Sequenz an die Fa. GENTerprise (Mainz) gegeben. Die Sequenzierreaktion mit dem BigDye®-Terminator v3.1-Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer) wurde selbst durchgeführt.

Die Sequenzierreaktion findet im Thermocycler statt (Reaktionsansatz in Tabelle 14; Thermocyclerprotokoll in Tabelle 15) und benötigt die zu sequenzierende Plasmid-DNA und einen fertigen Premix (Gemisch aus mehrheitlich normalen Didesoxynucleotiden mit einem kleinen Prozentsatz markierter Nucleotidtriphosphate, die keine 3'-OH-Gruppe an der Desoxyribose tragen, sowie DNA-Polymerase und Puffer). Außerdem müssen Sequenzierprimer der Reaktion beigemischt werden, die aber je nach verwendetem Plasmid unterschiedlich sind (pDS12-Vektor: pDS12 (+)-Primer; pET44a-Vektor: T7-Primer; pBluescript-Vektor: T7- und T3-Primer).

Tabelle 14: Reaktionsansatz zur Sequenzierung der inserierten *lhc*-Gene mit zugehörigem Thermocyclerprotokoll.

	BigDye®-Terminator v3.1
Mini- oder Midi-Prep-DNA	300 ng
Sequenzierprimer (10 µM)	1 µl
BigDye-Premix ver3.1™	2 µl
5 x Sequenzierung buffer v3.1™	2 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Während der Sequenzierreaktion kommt es zur Bildung unterschiedlich langer DNA-Fragmente, da es jedes Mal zum Kettenabbruch kommt, wenn ein markiertes ddNTP eingebaut wird. Wird dieses Gemisch an Amplifikaten mittels Kapillarsequenziergerät der Größe nach aufgetrennt, so erscheint nach Detektion im Chromatogramm die zeitlich versetzte Basenabfolge, wobei jedes markierte ddNTP durch eine andere Farbe codiert wird.

Tabelle 15: Thermocyclerprotokoll für BigDye®-Sequenzierreaktionen.

Schritte	Zyklenzahl	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	1	96	1
2	30	96 55	10 240

Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen und Chromatogramme erfolgte mittels der Alignment-Funktion der Demosoftware DS Gene (Accelrys Cambridge, UK) oder ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) bzw. mit Chromas 1.45 Software (Griffith University, Southport, Australia).

2 Biochemische und biophysikalische Methoden

2.1 Überexpression und Isolierung von Einschlusskörperproteinen

Alle mutierten Proteine sowie deren Wildtypen wurden durch Überexpression in JM 101- oder BL21-Zellen von *E. coli* gewonnen. Die Überexpression des im Vektor integrierten *lhc*-Gens wird durch die Zugabe eines Induktormoleküls (IPTG) gestartet (Kap. B4.1) und das verstärkt exprimierte Protein in Form von Einschlusskörperchen (Inclusion bodies bzw. IBs) im Bakterium abgelagert. Aufgrund der transmembranen Bereiche ist die Hydrophobizität der überexprimierten Lhc-Proteine sehr hoch, wodurch sich schwer lösliche Proteinaggregate bilden, die nach Aufschluss der Bakterien isoliert werden können. Da die Überexpression kein natürlich gesteuerter Prozess ist, unterliegt die Produktion nach einer gewissen Zeitspanne unausweichlichen Degradationsprozessen, an deren Ende der Abbau des überexprimierten Proteins steht, was nur unter Berücksichtigung der Wachstumsphasen und des Nährstoffverbrauchs verhindert werden kann.

Für die Überexpression wurden 200 ml Kulturen in einem 500 ml Erlenmeyerkolben verwendet, um eine große Oberfläche und damit eine gute Belüftung der Kultur zu gewährleisten. Dazu wurde ein mit 200 ml LB-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) gefüllter Kolben mit 2 ml der gewünschten Bakteriensuspension aus einer ÜN-Kultur (Kap. C1.1) beimpft. Nach ungefähr 2 Stunden im Schüttler (250 Upm) bei 37 °C befanden sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase und wiesen einen OD₅₅₀-Wert zwischen 0,45 und 0,65 auf. Durch Zugabe von 200 µl 1 M IPTG wurde die Überexpression induziert und bei gleich bleibenden Wachstumsbedingungen für weitere 4-5 Stunden inkubiert, um genügend Protein zu synthetisieren. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurden die Zellen abzentrifugiert (9000 g; 4 °C), und wenn nötig bei -20 °C zwischengelagert.

Zur Isolation der IBs wurden die Bakterienpellets zunächst in 1,6 ml Lysis-Puffer (50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 25% (w/v) Saccharose; 1 mM EDTA (pH 7,8)) resuspendiert, zur Lyse der Zellwände mit 0,4 ml frisch angesetzter Lysozym-Lösung (10 mg/ml Lysis-Puffer) versetzt und anschließend gevortext. Unter gelegentlichem Schwenken des Röhrchens wurde die Suspension für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die bakterielle DNA abzubauen, wurden im Anschluss 20 µl 1 M MgCl₂, 20 µl 100 mM MnCl₂ und 20 µl DNase 1 Lösung (1 mg/ml DNase; 20 mM Tris/HCl (pH 8,0); 50 mM NaCl; 1 mM DTT; 50% Glycerin) zugegeben und gut durchmischt. Es folgte eine weitere 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit gelegentlichem Schütteln des Röhrchens. Da die überexprimierten Proteinaggregate schwer löslich sind, konnten die bakteriellen Proteine und Membranen durch Zugabe von schwachen Detergenslösungen größtenteils abgetrennt werden. Dazu wird die Suspension zuerst mit 4 ml Detergenslösung A (200 mM NaCl; 1% Desoxycholat; 1% Nonidet 40; 20 mM Tris/HCl (pH 7,5); 2 mM EDTA/NaOH (pH 7,8)) versetzt, zu welcher kurz zuvor 1 M Dithiotreitol (DTT) zu einer 30 mM Endkonzentration beigemischt wurde, das die Bildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten verhindert. Nach guter Durchmischung wurden 4 ml Detergenslösung B (0,5% Triton X-100; 1 mM EDTA/NaOH (pH 7,8)) zugegeben, welche zuvor mit 1 M DTT auf eine Endkonzentration von 20 mM gebracht wurde. Die Röhrchen mit dem Protein-Detergenslösungs-Gemisch wurden anschließend auf einem Schüttler fixiert und für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt (9000 g; 4 °C) wurden die abzentrifugierten Proteine in 600 µl IB-Suspensionslösung (50 mM

Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA/NaOH (pH 7,8)) resuspendiert, welche vorher mit 1 M DTT auf eine Endkonzentration von 20 mM gebracht wurde. Die Aufbewahrung der Einschlusskörperproteine erfolgte bei -20°C .

In Detergenslösung A wurde das Nonidet 40 im späteren Verlauf der Arbeit, wegen fehlender Bezugsquelle, durch die äquivalente Menge Triton X-100 ersetzt. Zudem war es wichtig das DTT nur dann den verschiedenen Puffer beizumischen, wenn mit diesem Apoprotein keine Trimerisierung via Nickel-Säule (Kap. C2.6.2) versucht werden sollte. DTT reduziert das an der Sepharose gebundene Nickel, was sich in einer Braunfärbung der Säule widerspiegelt, wodurch den Lichtsammelkomplexen mit His-tag keine Bindung an das Säulenmaterial mehr möglich wäre.

2.2 Proteinquantifizierung mittels Bio-Rad-Assay nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der isolierten Einschlusskörper wurde auf den Bradford-Assay der Firma Bio-Rad (München) zurückgegriffen. Durch die Verschiebung der maximalen Absorptionswellenlänge des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250, bei Bindung der Proteine, von 460 nm auf 595 nm (Bradford, 1976), kann die Konzentration der Farbstoff-Protein-Komplexe im Photometer detektiert werden. Dazu wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) ermittelt, um daraus die Konzentration der gemessenen IB-Proben zu errechnen. Dabei darf die Absorption der unbekannten Probe den Maximalwert der Eichpunkte für die Gerade nicht überschreiten. Außerdem sollte für das jeweilige Photometer bekannt sein, in welchem Bereich eine lineare Detektion der Absorption überhaupt möglich ist.

Tabelle 16: Herstellung der Lösungen unterschiedlicher BSA-Konzentration aus einer BSA-Stammlösung für die Erstellung einer BSA-Eichgerade zur Proteinquantifizierung isolierter Einschlusskörperproteine.

Eichpunkte	BSA-Stammlösung (1 mg/ml) [µl]	ad 80 µl dH ₂ O [µl]	In 20 µl enthaltene Proteinmenge [µg]
1	10	70	2,5
2	20	60	5
3	30	50	7,5
4	40	40	10
5	50	30	12,5
6	60	20	15
7	70	10	17,5
8	80	-	20

Zur Erstellung einer Eichgerade wurden, wie in Tabelle 16 beschrieben, zunächst BSA-Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen angesetzt, von welchen jeweils 20 µl entnommen und mit 980 µl verdünntem Bio-Rad-Reagenz (1:5 mit Wasser verdünnt) versetzt wurden.

Da zwei Bakterienstämme zur Proteinexpression verwendet wurden, und BL21-Zellen bis zu 5-mal mehr Apoprotein mit weniger bakterieller Verunreinigung als die JM 101-Zellen produzieren, wurde das folgende Rezept in Bezug je nach IB-Herkunft variiert. Die folgenden Volumenangaben sind deshalb immer zweigeteilt (JM 101/BL21).

Von den mittels Ultraschallbad und Vortexer homogen suspendierten 'Inclusion bodies' wurden mit einer abgeschnittenen Spitze 5 µl zu 5/10 µl einer 1%igen LDS-Lösung (Lithiumdodecylsulfat) pipettiert und sorgfältig gevortext. Wenn das Gemisch eine Trübung aufwies wurde es für kurze Zeit im Heizblock bei 60°C erwärmt oder für 1 min im Wasserbad gekocht, bis das Protein vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 30/65 µl dH₂O wurden 10 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Zur Kontrolle wurde eine Protein-freie LDS-Probe angesetzt, indem 5 µl

der 1%igen LDS-Lösung mit 35 µl dH₂O vermischt wurden, wovon 10 µl entnommen und mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt wurden. Die angesetzten 20 µl Proben wurden zeitgleich mit den Proben für die Eichgerade mit 980 µl verdünntem Bio-Rad-Reagenz gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Messung erfolgte im Spektralphotometer mit Kunststoffküvetten, wobei zuerst ein Nullabgleich mit zwei Proben verdünntem Bio-Rad-Reagenz (20 µl dH₂O + 980 µl verdünnte Reagenzlösung) durchgeführt wurde. Danach wurden die Proben für die Eichgerade, die LDS-Probe und die IB-Proben in der Reihenfolge der Zugabe des Bio-Rad-Reagenz mindestens zweimal bei 595 nm vermessen.

Der Wert der LDS-Probe wurde von den Werten der IB-Proben subtrahiert. Aus den Werten der BSA-Messungen wurde eine Regressionsgerade ($y = mx + b$) ermittelt (MS Excel). Um die Proteinkonzentration (x [µg/µl]) der IB-Proben zu errechnen, musste die Absorption (y) der IB-Proben (abzüglich A_{LDS}) in die Geradengleichung eingesetzt werden. Nach Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors konnte der Proteingehalt der IBs errechnet werden. Die tatsächliche Proteinkonzentration beruhte auf dem Volumen (1,25 bzw. 0,625 µl) der IB-Stammlösung, die im Messansatz enthalten war ($[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = x \cdot 0,8$ bzw. $1,6$ für den BL21-Ansatz).

2.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wird zur Auftrennung eines Proteingemisches in einem elektrischen Feld verwendet. Polyacrylamid dient dabei als Matrix und ist ein Polymer aus langen Acrylamid-Ketten, die durch Bisacrylamid (N,N'-Methylenbisacrylamid) vernetzt werden. Je nach Verhältnis und Konzentration der beiden Substanzen lässt sich die Porengröße der Gele variieren. Zur Verknüpfung der Monomere wird als Radikalstarter Ammoniumperoxodisulfat (APS) eingesetzt. Um die freie Sulfatradikalbildung, die zur Polymerisation benötigt wird, zu beschleunigen, wird der Reaktion Tetramethylethyldiamin (Temed) zugesetzt, da es die Zersetzung des APS katalysiert.

Um Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufzutrennen, müssen sie in eine Art „Ladungsmantel“ gehüllt werden, der in einem konstanten Verhältnis zu ihrem Molekulargewicht steht und die Eigenladung der AS abschirmt. Dies wird durch Lösen der Proteine in einem negativ geladenen Detergens bewerkstelligt. Für voll denaturierende Gele werden die Proteine in einem Überschuss an SDS gelöst. Bei schwach denaturierenden Gelen ist LDS lediglich im Kathodenpuffer enthalten, um Proteinaggregationen zu verhindern. Da sich für 2 Aminosäuren ungefähr ein Detergensmolekül anlagert, bewegt sich ein Protein linear zum reziproken Logarithmus seiner Größe in einem angelegten elektrischen Feld. Das bedeutet, dass kleine Proteine aufgrund der vorgegebenen Porengröße bzw. dem geringeren Laufwiderstand im Gel schneller zur Anode wandern als die großen Proteine (Berg et al., 2003).

Zur Trennung von Proteinen und Pigment-Protein-Komplexen wurden immer diskontinuierliche Gele aus Sammel- und Trenngel verwendet. Dies brachte den Vorteil, dass die Proteine beim Verlassen des Sammelgels an der Grenze zum Trenngel fokussiert wurden, wodurch eine schärfere Auftrennung der Bestandteile gewährleistet war. Die Ursache liegt in der unterschiedlichen Acrylamid-Konzentration von Sammel- und Trenngel.

Die Trennung von Einschlusskörper-Proteinen, zur Überprüfung der Anreicherung der Apoproteine aus der Überexpression, wurde in voll denaturierenden Gelen nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Bestimmung der Molekularmasse erfolgte durch Vergleich mit dem mit aufgetragenen SDS 7-Marker (Kap. B4.4). Rekonstituierte

Pigment-Protein-Komplexe wurden nach der Methode von Schmid und Schäfer (1994) in einem schwach denaturierenden Gel aufgetrennt.

2.3.1 Voll denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Anreicherung der Lhc-Proteine in den IB-Präparationen wurden voll denaturierende SDS-Gele mit der in Tabelle 17 aufgeführten Zusammensetzung verwendet.

Tabelle 17: Auflistung aller Materialien zum Gießen von voll denaturierenden SDS-Gelelen.

Reagenzien	15%iges Trenngel	6%iges Sammelgel
30% Acrylamid/Bisacrylamid (30:1)	13,75 ml	3 ml
1 M Tris/HCl (pH 8,8)	11,3 ml	-
1 M Tris/HCl (pH 6,8)	-	2,6 ml
dH ₂ O	2,6 ml	14,2 ml
10% APS	200 µl	100 ml
TEMED	13 µl	10 µl

In einem Gelgießstand wurde nach Fixierung von 5 durch 'Spacer' getrennte Glasplatten zunächst das Trenngel gegossen und zum Schutz gegen Austrocknung mit wassergesättigtem 1-Butanol übergossen und mit Folie abgedeckt. Nach Auspolymerisierung des Trenngels erfolgte ein Waschschriff mit technischem Ethanol um das Butanol zu entfernen. Um wiederum das Ethanol zu entfernen, wurden die Gele mehrmals mit destilliertem Wasser gespült. Nach Gießen des Sammelgels wurden die Kämme zur Bildung der Taschen eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war konnte das Gelsystem demontiert, die Gele mit dH₂O gewaschen und diese bis zu mehreren Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Vor dem Lauf wurden die Gele nach Entfernung der Kämme und Grundreinigung der Taschen vertikal in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Vorrichtung mit Puffer befüllt. Der Anodenpuffer (50 mM Tris; 384 mM Glycin; 1 mM EDTA) war mit dem Kathodenpuffer, bis auf den Zusatz von 0,1% SDS zu letztgenanntem, identisch.

Von den IBs wurden 4 µg Protein mit IB-Suspensionslösung auf ein Volumen von 15 µl gebracht, zu welchem noch einmal 7,5 µl Protein-Denaturierungspuffer (5% LDS; 180 mM DTT; 70 mM Tris/HCl (pH 8,4); 0,66 M Saccharose) zugesetzt wurde. Nach einminütiger Kochzeit im Wasserbad und zweiminütiger Zentrifugation (RT, 15000 g) wurde mit 10 µl des Ansatzes auf ein Gel beladen, was ungefähr einer Proteinmenge von 1,8 µg pro Geltasche entsprach. Neben den Proben wurden stets 5 µl des SDS 7-Markers aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 12 °C und konstant 20 mA pro Gel (Höhe Trenngel: 50 mm; Höhe Sammelgel: 15 mm; Gelbreite: 84 mm; Geldicke: 1,5 mm) für ungefähr eine Stunde, bis die Bromphenolblau-Front das Ende des Trenngels erreicht hatte.

Um die denaturierten Proteine sichtbar zu machen, wurden die Gele im Anschluss für 20 min in Coomassie-Färbelösung (0,3% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue; 50% (v/v) technisches Ethanol; 7% (v/v) Essigsäure) inkubiert, wobei der Farbstoff unter anderem an Arginin- und andere basische Reste bindet. Im Anschluss wurden die Gele für ungefähr 15 min im 1. Entfärber (20% (v/v) technisches Ethanol; 7% (v/v) Essigsäure) inkubiert, bis die ersten Banden zu erkennen waren. Die darauf folgende Inkubation im 2. Entfärber (10% (v/v) Essigsäure) geschah über Nacht, was zur vollständigen Entfärbung des Gelhintergrundes führte. Um die Gele in Cellophan gehüllt zu trocknen, musste die Essigsäure durch mehrere Wasserbäder aus dem Gel entfernt werden, da es ansonsten zu Brüchen im Gel kommen konnte.

2.3.2 Schwach denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Methode wurde zur schonenden Auftrennung von rekonstituierten Pigment-Protein-Komplexen verwendet. Die Herstellung der Gele und die Durchführung der Gelelektrophorese zeigen nur geringe Unterschiede zur voll denaturierenden SDS-PAGE. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Auflistung aller Materialien zum Gießen von 5 schwach denaturierenden LDS-Gelen.

Reagenzien	12%iges Trenngel	4%iges Sammelgel
30% Acrylamid/Bisacrylamid (30:1)	12 ml	2,67 ml
2,12 M Tris/HCl (pH 9,1)	6 ml	-
270 mM Tris/HCl (pH 6,1)	-	4 ml
2 M Saccharose	4,38 ml	2,92 ml
dH ₂ O	7,5 ml	10,3 ml
10% APS	90 µl	120 µl
TEMED	22,5 µl	15 µl

Nachdem die Geltaschen gesäubert und mit Kathodenpuffer gespült worden waren, um eventuelle Acrylamidrückstände und Saccharose-Ablagerungen zu entfernen, wurden die Rekonstitutionsansätze (Kap. C2.6) mit einer Hamilton-Spritze (20 µl) vorsichtig aufgetragen. Beide Puffer setzten sich aus 25 mM Tris und 192 mM Glycin zusammen, wobei dem Kathodenpuffer zusätzlich 0,1% LDS beigemischt wurde. Durch die Verwendung von LDS, das im Gegensatz zu SDS bei tiefen Temperaturen nicht ausfällt, konnte die Elektrophorese zur Schonung der Komplexe bei 4 °C durchgeführt werden. Außerdem wurde die Stromstärke auf konstant 4 mA pro Gel reduziert und die Gelkammer abgedunkelt, um den Zerfall der LHCs während der Elektrophorese zu minimieren. Die elektrophoretische Auftrennung wurde beendet, wenn sich das freie Pigment, Monomere und Dimere bzw. Trimere voneinander getrennt hatten. Die Dokumentation erfolgte durch umgehendes Scannen des Gels.

Um den Proteingehalt jedes Rekonstitutionsansatzes zu überprüfen, bzw. um sicher zu stellen, dass auf allen Gelbahnen die gleichen Proteinmengen aufgetragen wurden, fand im Anschluss eine Coomassiefärbung der Gele statt (siehe Kap. C2.3.1).

2.4 Isolation von Totalpigmentextrakt aus Tomatenpflanzen

Um Rekonstitutionsexperimente durchführen zu können, musste ein Totalpigmentextrakt hergestellt werden. Dazu wurden Tomatenpflanzen angesät, geerntet und Thylakoide daraus isoliert, in denen die Photosysteme mit Lipiden und Pigmenten lokalisiert sind. Ausgehend von der Thylakoidpräparation wurden mittels Ether-Aceton-Pigmentextraktion alle für eine Rekonstitution benötigten Bestandteile (Chlorophylle, Carotinoide, Lipide) in Form eines Totalextrakts isoliert.

2.4.1 Tomatenanzucht

Die Samen der zur Thylakoidisolierung mit nachfolgender Pigmentisolation bestimmten Tomatenpflanzen wurden auf Vermiculit ausgesät und beim ersten Mal kräftig gewässert. Die verwendete Sorte Hellfrucht (Gartenland GmbH, Aschersleben) wuchs unter Langtagbedingungen (16h Licht; Leuchtstoffröhren: ca. 120 µmol Photonen/m²·s) im Anzuchttraum (wahlweise Gewächshaus im Sommer) für ungefähr 5 Wochen bei 22 °C.

2.4.2 Thylakoidisolierung aus frischen Pflanzen

Nach ca. 5 Wochen Wachstum wurden 4-6 Anzuchtschalen mit Tomatenpflanzen geerntet. Lediglich das oberste Drittel der Pflanzen wurde mittels Schere abgeschnitten und in eine eisgekühlte Homogenisierungslösung (0,4 M Sorbitol; 0,1 M Tricine/NaOH, pH 7,8) überführt. Nach zügiger Zerkleinerung des Blattmaterials durch einen Ultraturrax, wurde zum Abtrennen faseriger Pflanzenbestandteile die Suspension durch 4 Lagen Microcloth filtriert. Ein 5minütiger Zentrifugationsschritt (4 °C, 3000 g) pelletierte die Chloroplastenfraktion. Durch Resuspendierung des Pellets in einer Breaklösung (50 mM Sorbitol; 10 mM Tricine/NaOH, pH 7,8; 5 mM EDTA/NaOH, pH 7,8) wurden die Chloroplasten aufgebrochen. Um die Thylakoide vom restlichen Material zu trennen, wurde eine zweite Zentrifugation (4 °C, 10000 g) durchgeführt und das Pellet in Thylakoidsuspensionslösung (30% (w/v) Saccharose; 10 mM Tricine/NaOH pH, 7,8; 1 mM EDTA/NaOH, pH 7,8) aufgenommen. Nach photometrischer Bestimmung des Chlorophyllgehalts (Kap. C2.5) konnte die Ausbeute berechnet, und die Thylakoidpräparation bei -80 °C zwischengelagert werden.

2.4.3 Extraktion des Totalpigmentextrakts aus Tomatenthylakoiden

Bevor aus den zuvor gewonnenen Thylakoiden die Pigmente isoliert werden konnten, musste Ether für die Pigmentextraktion destilliert werden. Dazu wurden 1,5 L Diethylether (Siedetemperatur: 35 °C) in einem Schliffrundkolben mit 10 KOH Plättchen für 2 Stunden unter Rückfluss destilliert. Das KOH dient dabei nicht nur als Siedestein, sondern hat zudem die Funktion eine Peroxid-Bildung durch Ether zu verhindern. Nach Ablauf der notwendigen Zeitspanne wurde der Ether in einer eisgekühlten dunkelbraunen Glasflasche aufgefangen und in einem explosionsgeschützten Kühlschrank aufbewahrt. Neben Ether, der zum Ausschütteln benötigt wurde, war auch gekühltes destilliertes Aceton für die Pigmentextraktion notwendig.

Thylakoide mit einem Chlorophyllgehalt von 100 mg wurden wegen des hohen Saccharosegehalts, der eine Pellettierung der Thylakoide verhindert hätte, mit dem 10-fachen Volumen 20 mM Tricine/NaOH (pH 7,8) verdünnt und bei 12000 g (25 min, 4 °C) abzentrifugiert. Das Pellet wurden in 300 ml eiskaltem Aceton_{redest.} resuspendiert und erneut abzentrifugiert (12000 g, 10 min, 4 °C). Der die Pigmente enthaltende Überstand wurde in einen Scheidetrichter (ohne Schliff Fett) abgefüllt und 250 ml Ether (4 °C) und 200 ml 2 M NaCl (4 °C) zugegeben, um die Acetonphase polarer zu machen. Nach mehrmaligem Ausschütteln und Entgasen (5-10 min) wurde die untere Acetonphase abgelassen. Durch dH₂O-Zugabe (200 ml) wurde das polare Aceton in die untere Etherfreie Phase gezwungen. Die Etherphase wurde in einem mit Alufolie umwickelten, eisgekühlten Rundkolben gesammelt und über Nacht bei -80 °C aufbewahrt, um das Wasser auszukristallisieren.

Der auf -80 °C vorgekühlte Rundfilter wurde auf einen entsprechend vorgekühlten Trichter gelegt, der auf eine bereits aktivierte Saugflasche gesteckt wurde. Schnellstmöglich wurden durch Filtern der Etherfraktion die Eiskristalle entfernt. In einem Rundkolben wurde das Pigment-Ether-Gemisch im Rotationsverdampfer eingetrocknet, bis dieser einen Druck von 4 mbar anzeigte. Der eingetrocknete Totalextrakt wurde mit N₂ überschichtet und bei -20 °C eingefroren, um später eine Chlorophyllbestimmung durchzuführen und die Pigmente zu aliquotieren.

2.5 Bestimmung der Chlorophyllkonzentration nach Porra

Die Ermittlung der Chlorophyllkonzentration isolierter Tomatenthylakoide (Kap. C2.4.2, extrahierter Pigmente (Kap. C2.4.3) oder der mittels Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation (Kap. C2.8) aufgereinigten Komplexe erfolgte nach Porra et al. (1989) im Spektralphotometer (U 2000). Dabei wurden 200 µl der isolierten Komplexe mit 800 µl 100%igem Aceton zu einer 80%igen Acetonlösung vermischt, Proteine und andere nicht-lösliche Bestandteile kurz anzentrifugiert und bei 646,4 nm und 663,6 nm vermessen. Außerdem wurde zur Korrektur lichtstreuender Partikeln die Absorption bei 750 nm gemessen, welche von den anderen Werten subtrahiert wurde. Zum Nullabgleich bzw. als Referenz für die Messungen wurde 80%iges Aceton verwendet. Die Werte für die Absorption (A) und der Verdünnungsfaktor (in diesem Fall 5) wurden in die nachfolgenden Formeln eingesetzt und die Gesamt-Chlorophyllkonzentration (Chl_{ges}) errechnet:

$$\begin{aligned}\text{Chl } a \text{ } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] &= (12,3 \times (A_{663,6} - A_{750}) - 2,55 \times (A_{646,6} - A_{750})) \times 5 \\ \text{Chl } b \text{ } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] &= (20,3 \times (A_{646,6} - A_{750}) - 4,9 \times (A_{663,6} - A_{750})) \times 5 \\ \text{Chl}_{\text{ges}} \text{ } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] &= [\text{Chl } a] + [\text{Chl } b]\end{aligned}$$

Im Anschluss wurden die rekonstituierten LHCs für die noch anstehenden Versuche zur Bestimmung der Pigmentzusammensetzung und der Fluoreszenzemissionsspektren vorbereitet und bei -70°C aufbewahrt.

2.6 Rekonstitution von rekombinanten Lichtsammelkomplexen

Die aus *E.coli* isolierten Lhc-Apoproteine (Kap. C2.1) und der aus Tomatenthylakoiden gewonnene Totalpigmentextrakt (Kap. C2.4) wurden für die Rekonstitution nach dem Prinzip der Detergenswechsellmethode (Paulsen et al., 1993) verwendet, wobei sich den nativen LHCs gleichende rekombinante Pigment-Protein-Komplexe bildeten, wie von Plumley und Schmidt (1987) gezeigt wurde.

Zur Rekonstitution monomerer und dimerer LHCs wurden zunächst die Apoproteine in LDS gelöst. Nach Zugabe von Octylglucosid (OG), einem zuckerhaltigen nichtionischen Detergens, bilden sich nach kurzem Kochen Mischmicellen aus LDS, OG und Protein. Nach Beimischung der Pigmente, wird mittels Kaliumchlorid (KCl) bei tiefen Temperaturen der Übergang von den LDS-OG-Mischmicellen zu reinen OG-Micellen erzwungen, da das Dodecylsulfat als KDS ausfällt. Währenddessen verändert sich die Proteinumgebung, sodass eine Faltung des Proteins mit Anlagerung der Pigmente induziert wird (Schmid et al., 1997). Diese modifizierte Vorgehensweise dient speziell der Rekonstitution von Lhca-Proteinen und eignet sich sowohl für Monomer- als auch für Dimerrekonstitutionen von Lhca1 und Lhca4, kann aber auch dazu verwendet werden monomere Lhcb1- oder Lhcb4-Komplexe zu rekonstituieren.

Um Lhcb1-Lichtsammelkomplexe zu rekonstituieren, wurde auch ein etwas abgeändertes Protokoll angewendet, das im Zusammenhang mit einer anschließenden Trimerisierung der Komplexe bestens erprobt ist (Rogl et al., 1998). Unter anderem wird auf DTT als Reduktionsmittel verzichtet und durch β -Mercaptoethanol ersetzt, welches im Gegensatz zum DTT keine Reduktion des an die Sepharose gebundenen Nickels während der Trimerisierung hervorruft.

Im Folgenden sind zwei Protokolle für die Rekonstitutionen beschrieben. Monomere und dimere Komplexe wurden mittels schwach denaturierender Gelelektrophorese aufgetrennt (Kap. C2.3.2). Eine leichte Variation des Protokolls war erforderlich, wenn diese Komplexe über SDG-UZ (Kap. C2.8) aufgetrennt wurden (Schmid et al., 1997). Letztere Methode ist nicht nur schonender bezüglich ihrer Auftrennungsmethode,

sondern ermöglicht die direkte Sammlung der getrennten Komplexe zur weiteren Charakterisierung. Das zweite Protokoll beschreibt eine Rekonstitution trimerer Komplexe, die je nach Probenaufbereitung sowohl per LDS-PAGE, als auch mittels SDG-UZ aufgetrennt werden konnten.

2.6.1 Monomer- und Heterodimerrekonstitutionen

Zur Rekonstitution von monomeren Lichtsammelkomplexen zwecks Auftrennung im schwach denaturierenden Gel wurden 33,4 µg der isolierten Einschlusskörperproteine mit IB-Suspensionslösung (50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA/NaOH (pH 7,8)) auf ein Volumen von 21,3 µl gebracht und ausgiebig gevortext. Für eine Dimerrekonstitution wurden von jedem Apoprotein je 16,7 µg eingesetzt. Zu den Proteinlösungen wurde das gleiche Volumen 2-fach Rekonstitutionspuffer mit Saccharose (200 mM Tris/Base; 10 mM ε-Amino-n-capronsäure; 2 mM Benzamidin; 25% (w/v) Saccharose; 4% (w/v) LDS; 100 mM DTT) gegeben und nochmals gevortext, um das Protein in Lösung zu bringen. Nach Zugabe von 4,95 µl 20%igem OG wurde der Ansatz gevortext, für eine Minute gekocht, auf Eis abgekühlt und mit 1,6 µl 1 M DTT-Lösung versetzt. Unterdessen wurden 40 µg des auf Eis aufgetauten Totalpigmentextrakts in 3 µl Ethanol gelöst. Die mit DTT versetzte Proteinlösung wurde unter Vortexen in die Pigmentlösung pipettiert, für eine Minute gekocht und auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte unter Vortexen die Zugabe von 7,7 µl 1 M KCl (kalt). Der Rekonstitutionsansatz wurde für 20 min in einen Schüttler im Kühlschrank gestellt. Das ausgefallene KDS wurde im Anschluss abzentrifugiert (17000 g; 4 °C; 6 min). Der Überstand wurde abgezogen, in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und auf ein schwach denaturierendes Gel zur Trennung der LHCs von nicht gebundenen Pigmenten aufgetragen.

Um hohe Ausbeuten an rekonstituierten LHCs für weitere Untersuchungen zu erhalten, mussten große Rekonstitutionsansätze angefertigt werden, die anschließend im Saccharosedichtegradienten mittels Ultrazentrifugation (Kap. C2.8) aufgetrennt wurden. Das Protokoll unterscheidet sich vom Rekonstitutionsansatz für Gele in den Mengenangaben, sowie in der Zusammensetzung des Rekonstitutionspuffers und der OG-Lösung, nicht aber in der Versuchsdurchführung. Es wurden 167 µg Protein mit IB-Suspensionslösung auf 106,7 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen 2-fach Rekonstitutionspuffer ohne Saccharose versetzt. Anstelle von 20%igem Octylglucosid wurden 24,7 µl 10%iges OG verwendet. Ansonsten wurden 8 µl 1 M DTT, 200 µg Totalpigmentextrakt (in 12 µl Ethanol gelöst) und 38,4 µl 1 M KCl eingesetzt. Nach Entfernung des ausgefallenen KDS durch Zentrifugation (17000 g; 4 °C; 6 min) wurden 200 µl des Überstands auf SDG (Kap. C2.8) pipettiert.

2.6.2 Trimerrekonstitution über eine Nickel-Chelating-Sepharose-Säule

Lhcb1-Komplexe die einen His-Tag (Hexahistidylrest) tragen, können via Nickel-Sepharose-Säule trimerisiert werden (Rogl et al., 1998). Dabei werden die zuvor rekonstituierten Lhcb1-Proteine mit C-terminal gelegenen His-Tag über die Nickel-Ionen an die Sepharosematrix gebunden. Durch Anwesenheit des Phospholipids Phosphatidylglycerin (PG) und die räumliche Nähe der rekonstituierten Komplexe zueinander auf der Säule, sollen nach einer Inkubation LHCII-Trimere entstehen, die mittels Imidazol von der Säule eluiert werden können.

Um die Ni-Säule nutzen zu können, musste eine variierte Detergenswechselrekonstitution durchgeführt werden. Dazu wurden 250 µg Apoprotein in 300 µl 2-fach Solubilisierungspuffer (200 mM Tris/HCl (pH 9); 10 mM ε-

Aminocaprinsäure; 2 mM Benzamidin; 25% (w/v) Saccharose; 4% (w/v) LDS) gelöst und mit 300 µl dH₂O verdünnt. Die Proteinlösung wurde für 1 min gekocht, auf Eis abgekühlt und 30 µl 1 M β-Mercaptoethanol wurden hinzugegeben. 500 mg Totalextrakt wurden in 60 µl Ethanol (p.a.) aufgenommen, gründlich gevortext und für 10 s im Ultraschallbad inkubiert. Unter Vortexen wurde die Pigmentlösung in die Proteinlösung pipettiert und für 30 s intensiv durchmischt. Nach 5minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Beimischung von 75 µl 10%igem Octylglucosid. Nach kräftiger Durchmischung folgte eine 5minütige Inkubation bei RT. Danach wurden 75 µl einer eisgekühlten 2 M KCl-Lösung unter Vortexen hinzupipettiert und die Lösung wurde für 10 min auf Eis stehen gelassen. Das gefällte KDS wurde abzentrifugiert (Jouan BR4i; AB 1.14-Rotor; 14000 Upm; 4 °C; 5 min), der Überstand erneut für 15 min auf Eis inkubiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Die rekonstituierten Komplexe wurden vor der Weiterverwendung auf Eis gestellt.

Die eigentliche Trimerisierung erfolgte soweit möglich bei Dunkelheit und 4 °C (Rotorraum einer Kühlzentrifuge). Zuvor jedoch mussten die Poly-Prep-Säulen (Bio-Rad, München) vorbereitet werden. Pro µg Protein wurde ein µl Chelating Sepharose (Amersham Bioscience, Freiburg), die in 20% Ethanol vorlag, in die Säulen mit Fritte pipettiert. Nach Absetzen der Sepharose wurde zuerst mit einem einfachen Säulenvolumen (SV) dH₂O gespült, bevor ein zweifaches SV 0,1 M NiCl₂-Lösung hinzu pipettiert wurde, wodurch die Säule hellgrün wurde. Nach Zugabe des 3-5-fachen SV 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) wurde die Säule hellblau. Zum Äquilibrieren wurde ein einfaches SV OG-Puffer (1% OG; 0,1 M Tris/HCl (pH 9); 12,5% (w/v) Saccharose) zugegeben, um die Säule gebrauchsfertig zu machen.

Unter Kühlung (dunkel, 4 °C) wurde der Rekonstitutionsansatz auf die Säule pipettiert, bis die Lösung vollständig in die Sepharose hineingelaufen war. Anschließend wurde die Säule mit einem Stopfen verschlossen und der Ansatz für 30 min inkubiert. Danach wurde die Säule mit einem einfachen SV OG-Puffer gewaschen und mit 2-3-fachem SV TX-Puffer (0,05% Triton X-100; 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5); 0,1 mg/ml PG) äquilibriert. Zur Elution wurde so viel Elutionspuffer (0,05% Triton X-100; 10 mM Tris/HCl (pH 7,5); 0,3 M Imidazol; 0,1 mg/ml PG) auf die Säule gegeben, bis unten keine grün gefärbte Lösung mehr herauskam.

Um die Trimerrekonstitutionsansätze per schwach denaturierender Gelelektrophorese (Kap. C2.3.2) auftrennen zu können, musste die Probe aus Mangel an Saccharose zuerst beschwert werden. Dazu wurden 8 µl einer 80%igen Glycerinlösung mit 32 µl des Eluats vermischt. Der restliche Ansatz wurde für gewöhnlich via SDG-UZ (Kap. C2.8) aufgetrennt.

Zur Regeneration der Sepharose wurden zunächst mit dem 2-3-fachen SV Regenerationspuffer (2% SDS; 0,5 M Imidazol) alle Proteine von der Säule gewaschen und mit 5 SV dH₂O nachgespült. Die folgenden Schritte (2 SV 0,5 M EDTA/NaoH (pH 8,0); 5 SV H₂O) führten zur Elution des gebundenen Nickels, weshalb die Eluate als Schwermetallabfall entsorgt werden mussten. Um die Sepharose schonend zu regenerieren und nicht durch plötzlich steigende Ethanolkonzentrationen eine Denaturierung zu verursachen, wurde ein aufsteigender (je 1 SV 20%, 40%, 60%, 80% und 100%) und ein absteigender (je 1 SV 100%, 80%, 60%, 40% und 20%) Gradient mit technischem Ethanol auf die Säulen aufgetragen, bevor die Sepharose in den Sammelbehälter zurückpipettiert wurde.

2.7 Densitometrische Quantifizierung zur Auswertung der Rekonstitutionen

Die densitometrische Auswertung der per schwach denaturierender Gelelektrophorese (Kap C2.3.2) aufgetrennten Rekonstitutionsansätze, diente einer Präzisierung der beobachteten Monomer- und Dimerausbeuten. Sie war hilfreich, um die teils schwachen aber reproduzierbaren Unterschiede zwischen verschiedenen Punkt- und Bereichsmutanten des Lhca4 besser herauszuarbeiten und wurde bei Experimenten an der luminalen und stromalen Schleife, sowie der Helix 2 angewendet.

Zu diesem Zweck wurden die zuvor gescannten Gelbilder (Canonscan 3200, Canon (Amsterdam, NL); Einstellungen: +20 Kontrast, -20 Helligkeit) in das Analyseprogramm Quantity One (Bio-Rad, München) geladen und als Graustufenbild dargestellt. Die Quantifizierung zur Bestimmung der Komplexausbeuten erfolgte nach folgendem Schema. In den Graustufenbildern, wie dem in Abb. 14 dargestellten, mussten zuerst die Gelbahnen (1-6) detektiert und deren Mitte zentriert werden. Als nächstes wurden die Banden automatisch detektiert, wobei pro Bahn nur 2 Banden verwendet wurden. Eine wurde zur Detektion der relevanten Monomer- oder Dimerbande benötigt und die zweite wurde soweit vergrößert, dass sie die gesamte Bahn umfasste. Dabei wurden sämtliche grauen Bereiche/Banden einer Bahn umklammert wurden, um keine Hintergrundfärbung abziehen zu müssen. Aufgrund von Verzerrungseffekten, die an den Rändern der Bahnen oft zu beobachten waren, wurde die zu detektierende Bandenbreite auf 6 mm eingestellt. Um sicherzustellen, dass alle relevanten Komplexbanden auch durch das Programm erfasst wurden, musste die Empfindlichkeit (in diesem Fall die Baseline) angehoben werden, bis im Flächenprofil (Linie, die vertikal jede Bahn schneidet) gesehen, nur noch die Peaks (die für die Banden stehen) und nicht mehr der Hintergrund detektiert wurde.

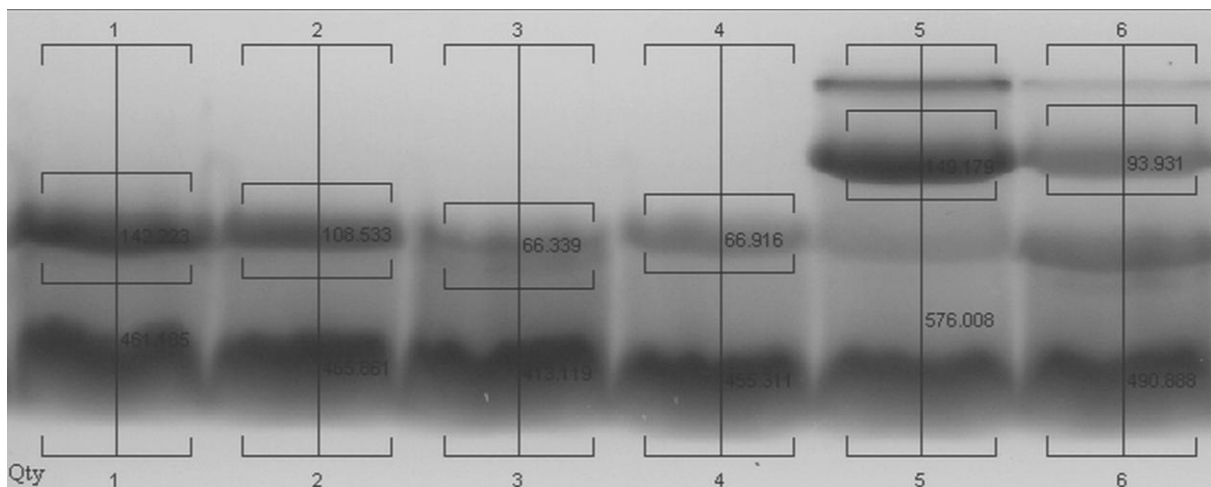


Abb. 14: Beispielhafte densitometrische Auswertung von Monomer- und Dimerrekonstitutionen nach Gelaufftrennung mittels Quantity One Software (Bio-Rad).

Dividiert man den Anteil der grauen Fläche einer ganzen Bahn durch die alleinige Fläche der für die Analyse relevanten Bande, so erhält man einen Quotienten, der den Grauteil der Bande in der betreffenden Bahn beschreibt. Der Quotient steht für den Anteil der Pigmente, die an Lhc-Proteine gebunden vorliegen. Der Quotient, der immer zum Vergleich mit aufgetragenen Wildtyp-Rekonstitution, wurde 100% gesetzt und mit dem Quotienten einer vom gleichen Gel stammenden Mutanten-Rekonstitution verglichen. Die Graustufenintensität wurde über den Modus 'Trace Quantity' bestimmt. Nach Quantifizierung mehrerer Gele konnte ein Mittelwert mit Standardabweichung berechnet werden.

2.8 Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation

Die Auftrennung der Pigment-Protein-Komplexe im Saccharosedichtegradienten durch Ultrazentrifugation erfolgt nach deren Größe und Dichte entlang eines Gradienten mit zunehmender Saccharosekonzentration. Dies wird durch starke Gravitationskräfte ermöglicht, die in einer Ultrazentrifuge mit evakuiertem Rotorraum unter hohen Umdrehungszahlen entstehen. Schwere, kompakt gefaltete Proteine legen die weiteste Wegstrecke zurück.

Zur Herstellung der Saccharosedichtegradienten wurden 10,6 ml einer Saccharoselösung (0,35 M Saccharose; 5 mM Tricine/NaOH (pH 7,8); 0,06% (w/v) β -D-Dodecylmaltosid) im Zentrifugenröhrchen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Durch Auftauen des Röhrchens bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bildet sich ein kontinuierlicher Saccharosegradient aus, der oben eine niedrige und unten eine hohe Saccharosekonzentration aufweist, da das Wasser langsamer als die Saccharose in die Flüssigphase übergeht und sich beide Komponenten mit fließendem Übergang trennen. Um ein Einsinken der Proben zu vermeiden, wurde der oberste Milliliter abgezogen.

Zur Auftrennung von Monomer- und Heterodimerrekstitutionen wurden die Röhrchen für die anstehende Zentrifugation austariert und mit 200 μl des Rekonstitutionsansatzes (Kap. C2.6.1) beladen. Die Proben wurden stets bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 37000 Upm für 24 Stunden zentrifugiert (Optima 80 oder Optima 100; SW40- und SW41-Rotor).

Bei den Ni-Säulen-Eluat-Proben der Trimerisierungsexperimente (Kap. C2.6.2) wurde der komplette Ansatz auf Saccharosedichtegradienten oben beschriebener Zusammensetzung pipettiert und danach austariert. Ein weiterer Unterschied zu den Monomer- und Dimerkomplexauftrennungen bestand in der mit 16 h erheblich kürzeren Laufzeit der Ultrazentrifuge.

Im Anschluss wurden die Gradienten im Ständer mittels Digitalkamera dokumentiert und die jeweiligen Monomer- oder Dimerkomplexbanden mit einer Spritze vollständig abgezogen. Falls nötig konnte eine Bande auch als zwei Fraktionen (oberer und unterer Teil) gesammelt werden. In der Regel wurde direkt im Anschluss der Chlorophyllgehalt (Kap. C2.5) der Komplexe photometrisch bestimmt.

2.9 Solubilisierung von isolierten Thylakoiden

Die Pigment-Proteine solubilisierter Erbsen- und Tomatenthylakoide wurden im experimentellen Verlauf als „Größenstandard“ in schwach denaturierenden Gelelektrophoresen verwendet, um die Größe eines Lichtsammelkomplexes bzw. dessen Oligomerisierungsgrad zu ermitteln.

Dazu wurden Thylakoide (Kap. C2.4.2) mit einem Chlorophyllgehalt von 100 μg mit Thylakoidsuspensionslösung (siehe C2.4.2) auf ein Volumen von 40 μl gebracht. Danach kamen 44 μl eines weiteren Puffers (15 mM Tris/HCl (pH 7,5), 30% Glycerin) hinzu. Nach Detergenzugabe (8 μl 20%iges OG und 8 μl 10%iges LDS) wurden die Thylakoide für ca. 10 min auf Eis solubilisiert. Wahlweise wurden 5 oder 10 μg der solubilisierten Thylakoide als Standard auf ein schwach denaturierendes Gel aufgetragen.

2.10 TCA-Fällung der Apoproteine aus rekonstituierten Lichtsammelkomplexen

Wenn nach Rekonstitutionsexperimenten höhermolekulare Komplexbanden unbekannter Zusammensetzung auftraten, wurden diese Banden aus dem Saccharosedichtegradienten abgezogen und näher untersucht. Da die Identifikation der im Komplex enthaltenen Proteine nur im Vergleich mit einem mit aufgetragenen

bekannten Lhc-Apoprotein in einem voll denaturierenden Gel erfolgen konnte, mussten die an die Proteine gebundenen Lipide, Pigmente und Detergentien wieder vom Proteingerüst entfernt werden. Dies wurde durch eine Fällung der Komplexe mittels Trichloressigsäure (TCA) bewerkstelligt.

Zu 10 µl aus SDG-UZ isolierten LHCs (ca. 100 µg Chlorophyll) wurde TCA bis zu einer Endkonzentration von 5% zugesetzt. Unter gelegentlichem Schwenken wurde der Ansatz für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach einer 10minütigen Zentrifugation (17000 g; 4 °C) wurde der Überstand abgezogen und das Pellet noch einmal für 5 min zentrifugiert (s.o.), um den gesamten Überstand verwerfen zu können. Das Pellet wurde in 5 µl Proteindenaturierungspuffer (Kap. C2.3.1) und 10 µl dH₂O gelöst und für 1 min gekocht. Der Ansatz wurde komplett auf ein voll denaturierendes Gel aufgetragen.

2.11 High Pressure Liquid Chromatography

Um die rekonstituierten LHCs auf ihre Pigmentzusammensetzung hin zu untersuchen, wurden die Pigmente in 80%igem Aceton gelöst und mittels analytischer HPLC aufgetrennt. Dabei werden die Chromophoren zunächst am Säulenmaterial gebunden, welches aus einem Polymer mit aliphatischen Resten besteht. Die Elution der Pigmente erfolgte durch einen steigenden Acetongradienten (Protokoll Chromolith A: Abb. 15), wobei zuerst die polareren und später die unpolaren Pigmente die Affinität zum Trägermaterial verlieren und die Säule verlassen. Mittels Dioden-Array-Detektor wird die Absorption der eluierten Pigmente gemessen.

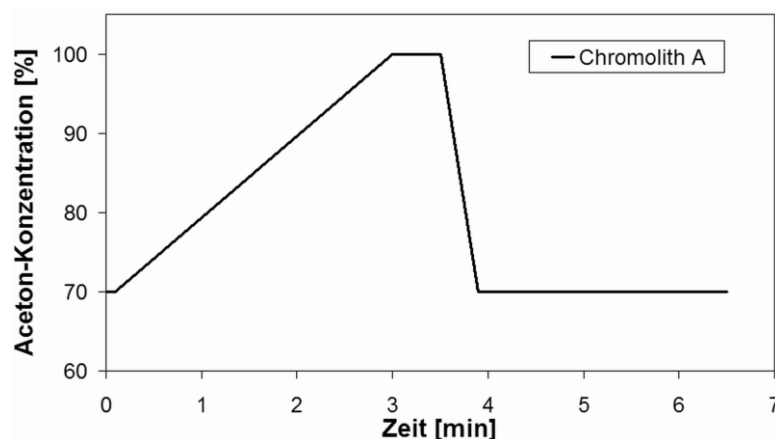


Abb. 15: Elutionsprofil des Acetongradienten (Chromolith A) zur Bestimmung der Pigmentzusammensetzung rekombinanter Lichtsammelkomplexe mit Hilfe der HPLC.

Mit den erhaltenen Werten kann die Software Borwin PDA durch Integration die Fläche unter den Peaks berechnen. Um aus der Fläche die Pigmentkonzentration zu ermitteln, waren Umrechnungsfaktoren nötig. Diese wurden von Dr. Stephan Hobe (Mainz) unter Verwendung von Pigmentlösungen bekannter Konzentration ermittelt und sind in Tabelle 19 dargestellt. Zur Bestimmung der Pigmentmenge [ng] musste lediglich die Peakfläche durch den Umrechnungsfaktor dividiert werden. Um aus der Pigmentmenge die molaren Verhältnisse der einzelnen Pigmente zu errechnen, musste die Pigmentmenge durch das Molekulargewicht des Pigments dividiert und der Verdünnungs- ($\div 20$) und Umrechnungsfaktor ($\div 1000$: zur Angleichung der Einheiten an mol/l) berücksichtigt werden. Die Angabe der gebundenen Pigmente erfolgte auf Basis der am LHC gebundenen Carotinoide.

Tabelle 19: Umrechnungsfaktoren nach Kontrolleichungen zur Bestimmung der Pigmentmengen [ng]. Molekulargewichtsangabe der Pigmente zur Berechnung der molaren Verhältnisse.

Pigmente	Umrechnungsfaktoren	Molekulargewichte [g/Mol]
Neoxanthin	8151,8	600,88
Violaxanthin	9978,2	600,88
Lutein	8669	568,88
Chl <i>b</i>	2593,9	907,5
Chl <i>a</i>	1788	893,5
β-Carotin	7295,2	536,88

Zur Vorbereitung der Proben wurden LHCs mit 1 µg Chlorophyllgehalt (nach Porra ermittelt, Kap. C2.5) mit 33 µl sekundärem Butanol versetzt und gevortext. Durch Zugabe von 16,5 µl 5 M NaCl wurde die Polarität zwischen der entstandenen oberen pigmenthaltigen, organischen (unpolar) Phase und der unteren wässrigen (polar) Phase verstärkt. Nach erneutem Vortexen wurde das 2-Phasen-Gemisch zentrifugiert (Mikroliter; 2 min; max. Upm) und 17 µl der Butanolphase abgezogen. Zu den in Butanol gelösten Pigmenten kamen 34 µl 80%iges Aceton, und die Lösung wurde nochmals für eine Minute zentrifugiert, um Schwebeteilchen zu pellettieren. Die Säule wurde mit 20 µl der Pigment-Lösung beladen. Vor jedem Lauf wurde die Hamilton-Spritze mit 100%igem Aceton gereinigt. Um die HPLC-Säule zu reinigen, war es notwendig, vor und nach einer Versuchsreihe einen Leerlauf mit 80%igem Aceton zu fahren.

2.12 77 K Fluoreszenzemissionsspektroskopie

Eine Untersuchung der isolierten Lichtsammelkomplexe mittels Tieftemperatur-Fluoreszenzspektroskopie erlaubt es, Aussagen über die Funktionalität der rekonstituierten Proteine zu treffen. Nach Anregung der in einem Komplex gebundenen Chl *b*-Moleküle bei 470 nm wurden Fluoreszenzemissionsspektren von 620 nm bis 800 nm aufgenommen. Im Vergleich mit den Spektren der Wildtyp-Komplexe, erlauben sie Aussagen bezüglich des Energietransfers von Chl *b* zu Chl *a*.

Die Fluoreszenzspektroskopie bei 77 K findet deshalb Anwendung, da die Bandbreite eines Fluoreszenzmaximums unter anderem auch von der Umgebungstemperatur abhängt. Die Absorption eines Lichtquants erfolgt durch Anhebung eines Elektrons aus seinem Grundzustand in einen angeregten Zustand. Dabei entspricht die absorbierte Wellenlänge dem Energiesprung des Quants. Bei niedrigen Temperaturen wird der Bereich der möglichen Energiesprünge in Form von Valenz- bzw. Deformationsschwingungen der Moleküle eingeschränkt, wodurch die Fluoreszenzmaxima schärfer werden.

Die Spektren wurden am Fluoreszenzspektrometer Fluoromax-3 bei einer Spaltbreite von 2 nm und einer Integrationszeit von 0,3 s pro Datenpunkt aufgenommen. Zur Rundung der Spektren wurden die Proben dreimal nacheinander gemessen, wobei die Werte automatisch gemittelt wurden. Jede Probe hatte einen Chlorophyllgehalt von 1,2 µg (nach Porra ermittelt, Kap. C2.5), die mit Saccharose- Dichtegradientenlösung (0,35 M Saccharose; 5 mM Tricine/NaOH (pH 7,8); 0,06% (w/v) β-D-Dodecylmaltosid) auf 87 µl aufgefüllt wurde. Vor der Messung wurden 913 µl 75%ige Fluoromax-Lösung (75% Glycerin; 5 mM Tricine/NaOH (pH 7,8); 0,03% (w/v) β-D-Dodecylmaltosid) zugegeben, sodass in der Küvette eine 68,5%ige Glycerin-Konzentration vorlag. Die anschließende Messung in der mit flüssigem Stickstoff gefüllten Messapparatur erfolgte nach 5minütiger Wartezeit, um die Probe herunterzukühlen. Die Ergebnisse wurden mittels der Analysensoftware Datamax ausgewertet.

3 Bioinformatische Methoden

3.1 Datenbanksuche und Erstellung multipler Sequenzalignments

Da schwach konservierte Domänen vermutlich für das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten der Lhc-Proteine verantwortlich sind und um herauszufinden, welche AS auch Species-übergreifend schwach konserviert sind, wurden Consensussequenzen aller Lhc-Proteine benötigt. Um diese zu generieren, war es wichtig eine umfassende Datengrundlage zu schaffen, die Lhc-Sequenzen aus allen zu diesem Zeitpunkt zugänglichen Spezies enthielt. Zu diesem Zwecke wurden mittels bekannter Sequenzen von Arabidopsis-Proteinen (Jansson, 1999) öffentliche Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) durchforstet. Dabei fand entweder der Suchmodus nach ähnlichen vollständigen Proteinsequenzen Verwendung (BLASTP), oder es wurde nach übersetzten EST-Sequenzen (expressed sequence tag) gesucht (TBLASTN). Um das Vollhängen eines Lhc-Proteins aus verschiedenen ESTs zusammenzusetzen wurde das frei zugängliche Alignment-Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) benutzt (Thompson et al., 1994). Die anschließende Translation der Nukleotidsequenz in die Proteinsequenz erfolgte mittels 'ExPASy-Translate-Tool' (<http://expasy.org/tools/#translate>). Für die Ermittlung der Consensussequenzen aller Lhca- und Lhcb-Proteine wurden unter Verwendung von ClustalW pro Lhc-Protein die Sequenzen von 10-14 Species herangezogen. Wahlweise erfolgte die Durchführung auch via der Alignment-Funktion der Demosoftware DS Gene (Accelrys, Cambridge, UK) oder durch die Software BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA). Alle multiplen Sequenzalignments zur Gewinnung der Lhc-Consensussequenzen sind im Anhang zu finden (A2). Neben *A. thaliana*, *S. lycopersicum*, *Oryza sativa* und *Zea mays*, deren Sequenzen bei allen Lhc-Proteinen verwendet wurden, kamen für die einzelnen Lhc-Proteine die Sequenzen der folgenden Arten zum Einsatz: Lhca1 (*Pinus sylvestris*, *Hordeum vulgare*, *Malus x domestica*, *Asarina barclaiana*, *Solanum tuberosum*, *Helianthus annuus*, *Nicotiana tabacum*), Lhca2 (*H. annuus*, *H. vulgare*, *Lolium temulentum*, *M. x domestica*, *Nicotiana benthamiana*, *Petunia hybrida*, *P. sylvestris*, *Pinus tadae*, *Pisum sativum*, *S. tuberosum*), Lhca3 (*H. annuus*, *H. vulgare*, *N. benthamiana*, *P. sylvestris*, *P. sativum*, *S. tuberosum*), Lhca4 (*M. x domestica*, *H. annuus*, *S. tuberosum*, *N. tabacum*, *P. sylvestris*, *P. sativum*), Lhca5 (*Glycine max*, *H. vulgare*, *Lactuca sativa*, *Triticum aestivum*, *Populus tremula*, *S. tuberosum*, *Sorghum bicolor*, *Vitis vinifera*) Lhcb1 (*Brassica oleracea*, *H. annuus*, *H. vulgare*, *M. x domestica*, *N. sylvestris*, *N. tabacum*, *P. sativum*, *Sinapis alba*, *S. tuberosum*), Lhcb2 (*Helianthus paradoxus*, *H. vulgare*, *M. x domestica*, *N. benthamiana*, *P. sativum*, *Prunus persica*, *Gossypium hirsutum*, *P. tadae*), Lhcb3 (*H. annuus*, *H. vulgare*, *M. x domestica*, *N. benthamiana*, *S. tuberosum*, *P. sativum*, *Daucus carota*, *Vigna radiata*, *Brassica napus*), Lhcb4 (*H. annuus*, *M. x domestica*, *N. benthamiana*, *S. tuberosum*, *V. radiata*, *P. tadae*), Lhcb5 (*H. annuus*, *H. vulgare*, *M. x domestica*, *N. benthamiana*, *S. tuberosum*, *Brassica juncea*, *P. sylvestris*), Lhcb6 (*H. annuus*, *H. vulgare*, *M. x domestica*, *N. benthamiana*, *S. tuberosum*, *Brassica rapa*, *V. radiata*, *Spinacia oleracea*). Auf Basis der Consensussequenz jedes Lhc-Proteins konnte ein weiteres multiples Sequenzalignment erfolgen, wie es bereits zuvor schon für Arabidopsis-Proteine angefertigt worden war (Jansson, 1999), um hoch konservierte Bereiche und Domänen mit niedriger Sequenzidentität zu identifizieren.

3.2 Abstandsmessungen in Modellen der Lichtsammelkomplexe

Lhc-Proteine weisen unterschiedlich lange luminale und stromale Schleifenregionen auf. Anhand der vorliegenden PSI- und LHCII-Kristallstrukturen sollten die Längen der Schleifen im Modell von Lhca1, Lhca2, Lhca3, Lhca4 und Lhcb1 nachgemessen werden. Die Dateien der Modelle wurden aus einer allgemein zugänglichen Datenbank bezogen (RCBS Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org>). Unter Verwendung der Software YASARA (YASARA Biosciences, Graz, Austria) wurden die Schleifen des LHCII-Modells von Liu et al. (2004; 1RWT) und des PSI-Modells von Ben-Shem et al. (2003; 1QZV) analysiert.

Um die Länge der luminalen Schleife zu ermitteln, wurde das letzte C α -Atom der 1. Helix eines Proteins markiert und der Abstand bis zum ersten C α -Atom der 2. Helix gemessen. Analog dazu wurde die stromale Schleifenlänge aufgrund der Distanz zwischen dem letzten C α -Atom der Helix 2 und dem ersten C α -Atom der Helix 3 bestimmt.

Im LHCII-Modell 1RWT war die Zuordnung der zu vermessenden Lhcb1-Proteinbestandteile aufgrund der hohen Auflösung (2,72 Å) unproblematisch. Die entsprechenden AS konnten direkt im Modell identifiziert und markiert werden, da die Nummerierung der AS-Positionen im Modell mit der allgemein bekannten Lhcb1-Sequenz übereinstimmte. Anders gestaltete sich das Verfahren für die Längenbestimmung der Schleifenregionen der Lhca-Proteine, die in einem Modell gemessen werden mussten, das anhand einer Kristallstruktur mit einer viel geringeren Auflösung (4,4 Å) angefertigt wurde. Zum einen waren durch die geringere Auflösung aufgrund fehlender Seitenketten die genauen Positionen der relevanten AS nicht erkennbar. Zum anderen waren die Schleifenregionen auch nicht vollständig aufgelöst, wodurch nicht einmal alle C α -Atome eines Lhca-Proteins identifiziert werden konnten. Infolge dessen konnten die AS-Positionen im Modell nicht 1:1 auf die bekannten Lhca-Sequenzen übertragen werden. Zudem war die Nummerierung C α -Atome der Lhcs nicht durchgehend, sondern lückenhaft. Über die Identifikation eines C α -Atoms am Anfang oder Ende einer Helix war nur eine ungefähre Vermessung des Modells möglich.

D ERGEBNISSE

Die Oligomerisierungszustände von Lichtsammelproteinen (Lhc-Proteinen) sind durch entsprechende Untersuchungen an Kristallstrukturen des PS I (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007) und LHC II (Kühlbrandt et al., 1994; Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005) bzw. durch EM-Studien des PSII (Hankamer et al., 2001) weitläufig bekannt. Viele biochemische Analysen belegen das Vorkommen monomerer, heterodimerer und trimerer LHCs (Giuffra et al., 1996, Lam et al., 1984, Kühlbrandt et al., 1983). Es existieren inzwischen zahlreiche Arbeiten, welche die *in vitro* Faltung oder die Komplexbildung der einzelnen Lhc-Proteine erörtern (Plumley und Schmid, 1987; Paulsen et al., 1993; Schmid et al., 1997). Es wurden auch viele Pigmentbindungsstudien (Schmid et al., 2002b), spektroskopische Untersuchungen (Gobets and Grondelle, 2001) und zeitaufgelöste Faltungsexperimente (Horn et al., 2007) durchgeführt. Aber oftmals blieben dabei die Fragen nach den strukturellen Besonderheiten der einzelnen Proteine, die zu den unterschiedlichen Oligomerisierungsformen der daraus resultierenden Pigment-Protein-Komplexe führen ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde einerseits an bis dato vorliegende Untersuchungsergebnisse über die für eine Dimerisierung wichtigen Interaktionsbereiche zwischen Lhca1 und Lhca4 im LHCI-730 (Schmid et al., 2002a) angeknüpft. Ein zweites Ziel sollte auf Arbeiten (Hobe et al., 1995; Kuttkat et al., 1996) aufbauen, die zum Ziel hatten, die für eine Trimerisierung des Lhcb1 essentiellen Bestandteile zu identifizieren. Durch Hinzuziehen des lediglich monomerisierenden Lhcb4 wurde die Liste der unterschiedlich oligomerisierenden Untersuchungsobjekte auf drei erweitert.

Analog zu bereits existierenden multiplen Sequenzalignments von Arabidopsis-Genen (Jansson, 1999), wurden nach intensiver Durchforstung verschiedener Datenbanken, Consensussequenzen aller Lhc-Proteine auf Grundlage unterschiedlicher Spezies erstellt. Es wurden interessante bzw. schwach konservierte Proteindomänen lokalisiert, die wegen ihrer Variabilität im Verdacht stehen Informationen zu enthalten, die Auslöser für das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten von Lhc-Proteinen sein könnten. Im nächsten Schritt wurden die in Frage kommenden Domänen komplett gegen äquivalente Bereiche anderer Lhc-Proteine ersetzt. Lag eine Beeinträchtigung des Oligomerisierungsverhaltens vor, wurden diese Bereiche weiteren Mutationsanalysen unterzogen, um die Interaktionsbereiche näher einzugrenzen oder einzelne wichtige AS zu identifizieren. Nach dem Aufdecken der für die Heterodimerisierung und Trimerisierung essentiellen Domänen von Lhca4 und Lhcb1, wurde zum einen durch Austausch von ein, zwei oder drei Domänen versucht das Oligomerisierungsverhalten von einem Lhc-Protein auf die beiden anderen Lhc-Proteine zu übertragen. Zum anderen wurde durch Einbau von Lhca4-Bestandteilen in den Lhca1 die Herstellung einer multimerisierenden Mutante angestrebt, die "LHC-Polymere" bilden kann.

Viele Lichtsammelkomplexe aus den Einzeldomänentauschexperimenten wurden bezüglich ihrer Pigmentzusammensetzung und ihres Energietransfers untersucht. Diese Resultate wurden mit den deren Monomer- und Dimerausbeuten der jeweiligen Komplexe verglichen und ein Zusammenhang mit der am Protein durchgeführten Mutation hergestellt.

Die Mutationsanalysen einzelner Aminosäuren oder ganzer Aminosäurebereiche erfolgten nur am Lhca4 zur Aufklärung der internen LHCI-730 Interaktionen. Zur Substitution wurden Lhca3-AS verwendet, da dieses Lhca-Protein weder mit Lhca4, noch mit dem Lhca1 Dimere bilden kann. Die per schwach denaturierender Gelelektrophorese aufgetrennten Rekonstitutionsansätze wurden densitometrisch

ausgewertet und bezüglich ihrer Monomer- und Dimerstabilität untersucht. Zusätzlich wurde eine vergleichende Analyse aller Chlorophyllbindungsstellen der Helix 2 des Lhca4 durchgeführt.

1 Ermittlung von Consensussequenzen der Lhc-Proteine durch Sequenzalignments

Pflanzliche Lhc-Proteine besitzen laut Pichersky und Jansson (1996) eine Sequenzdivergenz von 65%, wodurch sich eine Sequenzidentität von 35% ableiten lässt. Die gemeinsame Struktur (Kap. A4) leitet sich daraus ab. Die restlichen 65% können aus ähnlichen oder aber auch komplett anderen Aminosäuren bestehen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Bereiche außerhalb der Helices unterschiedliche Sequenzlängen aufweisen, wodurch Lücken in Sequenzalignments beim Vergleich verschiedener Lhc-Proteine entstehen. Diese Abweichungen von der konservierten Grundstruktur der Lhc-Proteine müssen die Informationen beinhalten, welche zur Aufklärung der unterschiedlichen Oligomerisierungszustände beitragen könnten. Ein vergleichendes Sequenzalignment mit Arabidopsis-Proteinen wurde bereits 1999 von S. Jansson durchgeführt. Inzwischen existieren aber in den Datenbanken die Sequenzen von Lhc-Proteinen vieler Spezies, wodurch die Ermittlung so genannter Consensussequenzen möglich wurde. Sie zeigen auf, welche Aminosäuren speziesübergreifend konserviert und damit interessant für die Suche nach Interaktionsmöglichkeiten sind, und welche aufgrund ihrer Variabilität bezüglich dieser vereinfachten Betrachtungsweise ausscheiden. Neben der Suche nach Proteinabschnitten und Aminosäurepositionen mit geringer Sequenzidentität durch ein Consensussequenzalignment, waren auch Vergleiche unter den Sequenzen nur einer der verwendeten Spezies notwendig, um geeignete Substitutionsaminosäuren für die Mutationsanalysen zu identifizieren.

1.1 Identifikation von Lhc-Proteindomänen mit niedriger Sequenzidentität

Zur Ermittlung der potentiell am Oligomerisierungsverhalten mitwirkenden Proteindomänen wurden 9-13 Spezies je Lhc-Protein aus Datenbanken zusammengestellt und ein Sequenzalignment durchgeführt (Kap. C3.1). Daraus ließen sich je Lhc-Apoprotein bestimmte Consensussequenzen ableiten, die vor allem die Information für die konservierten Aminosäuren der Lhcs höherer Pflanzen beinhalten (Anhang A2). Versuche, verwandte Lhc-Proteine von Grünalgen in die Auswertung mit aufzunehmen scheiterten an den doch sehr großen Sequenzunterschieden. Da diese Lichtsammelsysteme anders als die von Gefäßpflanzen konstruiert und angeordnet sind, ist eine herkömmliche Kategorisierung via Lhc-Nomenklatur nicht möglich (Elrad und Grossman, 2004), weshalb keine Lhc-Sequenzen außer die der höheren Pflanzen bei den Untersuchungen berücksichtigt wurden.

Die Zuordnung der hier untersuchten Lhc-Proteinabschnitte basiert zum einen auf älteren Berechnungen von Hydropathieplots (Green et al., 1991), um die hydrophoben helicalen Bereiche zu identifizieren, und zum anderen auf neueren Untersuchungen von LHCI-Kristallstrukturen (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005), in welchen die verschiedenen Proteinabschnitte eindeutig den entsprechenden Aminosäuresequenzen zugeordnet werden konnten.

Die generierten Consensussequenzen der unterschiedlichen Lhca- und Lhcb-Proteine fanden im Anschluss Verwendung in einem multiplen Sequenzalignment (Abb. 16) zur Identifikation konservierter und variabler Aminosäuren der verschiedenen Lhc-Proteine (Kap. C3.1). Von besonderem Interesse sind Aminosäurepositionen, die

speziesübergreifend einheitlich, aber zwischen den verschiedenen Lhc-Proteinen (einer Spezies) unterschiedlich sind. Im Gegensatz dazu, existieren an bestimmten Positionen entweder unterschiedliche Aminosäuren (X) oder bei allen Lhc-Proteinen die gleiche Aminosäure. Diese Möglichkeiten beschreiben zum einen die große Variabilität an einer AS-Position eines Lhc-Proteins zwischen den Spezies, die dadurch nicht für ein bestimmtes Oligomerisierungsverhalten verantwortlich sein kann, oder die starke Konserviertheit einzelner AS innerhalb der Proteinfamilie, anhand deren ein unterschiedliches Assemblierungsverhalten ebenfalls nicht geklärt werden könnte.

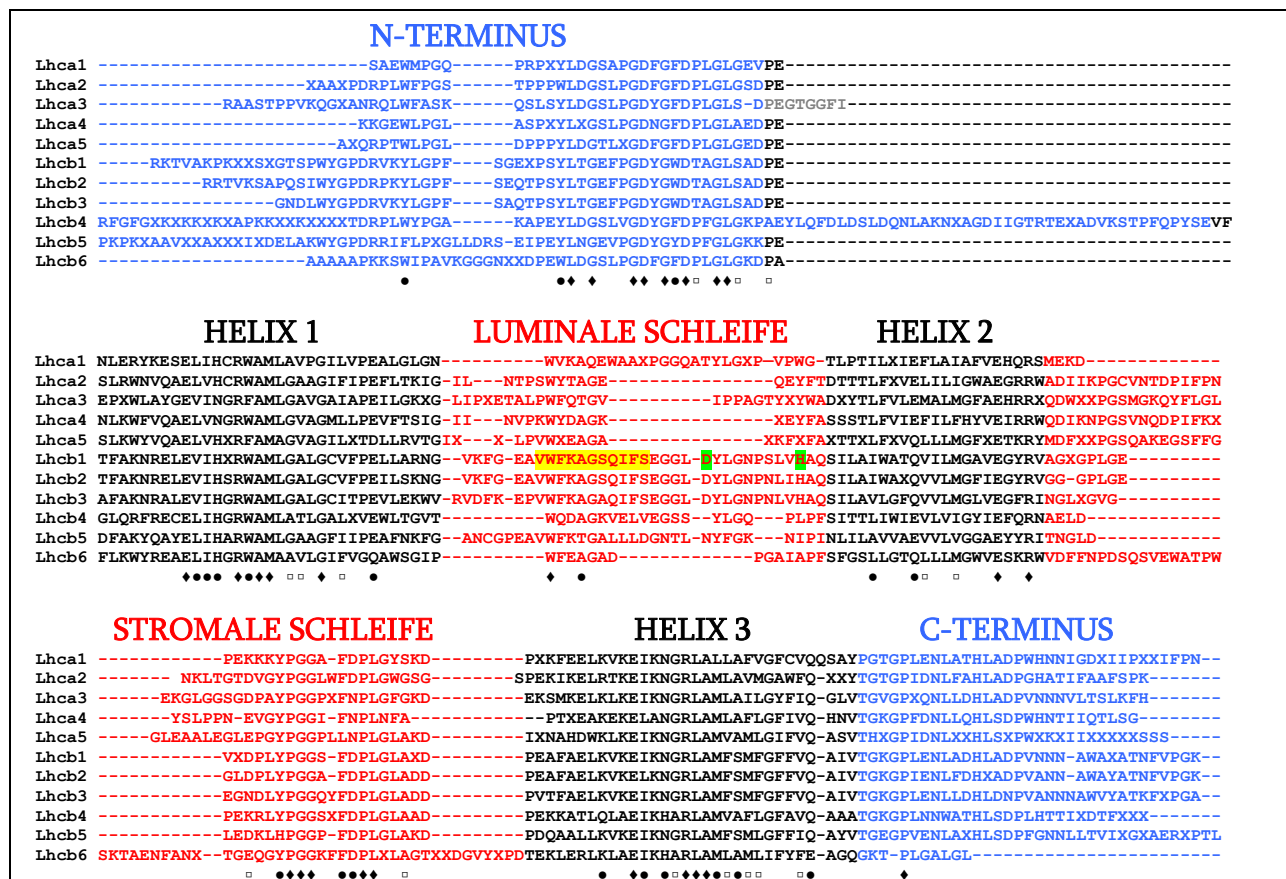


Abb. 16: Proteinalignment prozessierter Lhc-Consensussequenzen mit ClustalW 1.83. Jede Lhc-Sequenz wurde aus mindestens 10 verschiedenen Spezies ermittelt. (♦): identische Aminosäuren; (●): stark konserviert, alle homolog; (°): stark konserviert, aber nicht alle homolog; (blau): Termini; (schwarz): Helices; (rot): Schleifenregionen; (hellgrau): Zuordnung ungewiss; (gelb): amphiphile Helix im Lhcb1; (hellgrün): gegenüber liegende AS in β -Faltblatt-Struktur der Lhcb1-Schleife.

Bei Betrachtung des Sequenzalignments fallen neben lückenlosen homologen Proteinsequenzen vor allem Bereiche auf, die nicht zusammenhängend wirken, da sich dort die Proteindomänen in ihren Längen unterscheiden, wodurch Lücken in den Sequenzen entstanden. Davon betroffen waren neben den N- und C-Termini vor allem die luminale und die stromale Schleifenregion, wohingegen die Helices 1, 2 und 3 im Alignment stark zusammenhängende Sequenzbereiche aufwiesen.

Das multiple Consensussequenzalignment weist bei phylogenetischer Betrachtung 316 AS-Positionen auf, wobei 8% der AS identisch, 15% stark konserviert und homolog und 19% konserviert, aber nicht alle homolog sind. Die Einteilung identisch, stark konserviert/alle homolog und konserviert/nicht alle homolog, erfolgt gemäß der Einteilung durch ClustalW (C3.1). Rechnet man aber - wie im funktionalen Ansatz üblich - die Positionen heraus, welche nur durch ein Lhc-Protein abgedeckt werden (Lücken/Gaps), so finden sich in der Consensussequenz ohne 43 AS des Lhcb4 C-

Terminus und ohne 14 AS der stromalen Schleife des Lhcb6, 10% identische, 18% stark konservierte (alle homolog) und 24% konservierte (nicht alle homolog) Aminosäuren.

Die Strukturen mit den größten Anteilen an schwach oder nicht konservierten Bereichen sind der N- und C-Terminus, die luminal und stromal gelegene Schleife und die 2. Helix, welche alle neben einem geringen Konservierungsgrad auch eine exponierte Stellung im LHC-Monomerkomplex einnehmen. Im Gegensatz dazu stehen die Helices 1 und 3 für Proteinabschnitte mit einer hohen Sequenzidentität und sind darüber hinaus nicht nur lückenlos im Alignment, sondern auch länger als die 2. Helix.

Diese 5 inhomogenen und teilweise sehr schwach konservierten Bereiche wurden im Verlauf dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Bedeutung für das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten von Lhca4, Lhcb1 und Lhcb4 genauer untersucht.

1.2 Betrachtung einzelner Lhc-Proteinabschnitte

Bei Erfolg, d.h., falls eine der vorher untersuchten Domänen eine wichtige Rolle für das spezielle Assemblierungsverhalten spielte, wurden auch Bereichs- und Einzelmутanten angefertigt, um zum einen Interaktionsbereiche einzugrenzen und zum anderen für die Assemblierung wichtige Aminosäuren zu identifizieren. Da für die vorliegende Arbeit sowohl die Proteine von Tomate, als auch von Arabidopsis verwendet wurden, war es notwendig die jeweils genauer untersuchten Domänen der verwendeten Spezies (Helix 2: Abb. 17, Schleifenregionen: Abb. 18) im gleichen Kontext wie das Consensussequenzalignment zu betrachten. Für die anstehenden Mutationsanalysen war die Kenntnis über die genauen Substitutionspartner notwendig, da zwischen den Spezies viele homologe, aber unterschiedliche Aminosäuren existieren, die - falls in ein anderes Protein transferiert - trotzdem die gleiche Funktion wie die dort substituierte erfüllen könnten. Um die Herstellung von Erfolg versprechenden Mutanten zu forcieren, waren Vergleiche der Speziesalignments der interessanten Proteinabschnitte (aus Abb. 17: Tomate und Abb. 18: Arabidopsis) mit dem Consensussequenzalignment (Abb. 16) sinnvoll, um Einzel- und Bereichsmutanten zu konstruieren.

Die Lhc-Teilbereiche Helix 2 und Schleifendomänen wurden im Lhca4 intensiv untersucht, wobei mittels Mutationsanalysen Lhca4 Aminosäuren durch im Lhca3 unterschiedliche Aminosäuren an gleicher Position ersetzt werden sollten. Die AS-Positionen im Alignment beruhen auf der Lhca4-Sequenz (Abb. 17).

(A)	86	106	(B)	86	106
Lhca1	TLPTILAIEFLAIAFVEHQRS		Lhca1	TLPTILAIEFLAIAFVEHQRS	
Lhca2	DTTTLFIVELVLIGWAEGRRW		Lhca2	DTTTLFIVELVLIGWAEGRRW	
Lhca3	DNYTLFVLEMAIMGFAEHRRF		Lhca3	DNYTLFVLEMAIMGFAEHRRF	
Lhca4	SSSTLFVIEFILFHYVEIRRW		Lhca4	SSSTLFVIEFILFHYVEIRRW	
Lhca5	STTTLLIIQLLLMGFVETKRY		Lhca5	STTTLLIIQLLLMGFVETKRY	
				♦♦♦ ♦♦♦ ♦ ♦♦ ♦♦	
Lhcb1	SILAIWACQVVLMGAVEGYRI				
Lhcb2	SILAIWACQVVLMGFVEGYRV				
Lhcb3	SILAVLGFQVVLMLVEGFRI				
Lhcb4	SITTLIWIIEVLVIGYIEFQRN				
Lhcb5	NLILAVVAEVVLVGGAEYRI				
Lhcb6	SFGSLLGTQLLLMGWVESKRW				
	♦ ♦♦ ♦♦				

Abb. 17: Proteinalignment der Helix 2 diverser Lhc-Proteine von Tomate zur Identifikation schwach konservierter Aminosäuren. Neben einem multiplen Alignment aller Lhc-Proteine (A) wurden die Lhca-Proteine auch für sich alleine betrachtet auf Unterschiede hin untersucht (B). (♦): identische Aminosäuren; (●): stark konserviert, alle homolog; (◐): stark konserviert, aber nicht alle homolog; (blau): schwach konservierte Teilbereiche; Positionsnummern der AS beziehen sich auf die Lhca4-Sequenz.

Das Alignment der 2. Helix unterschiedlicher Lhc-Proteine zeigt, dass nur wenige stark konservierte Aminosäurereste existieren (Abb. 17A). Ein tieferer Einblick eröffnet sich bei der alleinigen Betrachtung der Lhca-Proteinen (Abb. 17B). Innerhalb der Helices 2 aus der Lhca-Gruppe kristallisierten sich 3 Bereiche (blaue AS) heraus, die nicht bzw. nur schwach konserviert sind und deshalb in den Folgeversuchen näher untersucht wurden. Da mit Proteinen von Tomate nur die Lhca1-Lhca4-Interaktion des LHCI-730 untersucht wurde, waren die Sequenzunterschiede zwischen Lhca4 und Lhca3 von besonderer Relevanz, da aus der Lhca3-Sequenz die AS für Mutationsanalysen im Lhca4 rekrutiert wurden.

Die Proteinalignments der Domänen luminaire (Abb. 18A) und stromale (Abb. 18B) Schleife von Arabidopsis, zeigen wie die Alignments der 2. Helix von Tomate ebenfalls nur einen geringen Grad an Sequenzidentitäten zwischen allen Lhca- (oben) und Lhcb-Proteinen (unten) an. Hinzu kommt, dass die Schleifenregionen stark variierende Sequenzlängen aufweisen, wodurch sich die Sequenzidentitäten weiter verringern. Aus diesem Grund ist eine getrennte Betrachtung der Lhca- und Lhcb-Proteinalignments sinnvoll. Da für Mutationsanalysen an der luminalen und stromalen Schleife des Lhca4 die Arabidopsis-Gene Verwendung fanden, wurden die Alignments mit Proteinen der entsprechenden Spezies durchgeführt, wobei die Nummerierung der AS-Positionen auf der Lhca4-Sequenz beruht (Abb. 18).

Während die luminalen Schleifen aller Lhcs nur 2-4 stark konservierte Aminosäuren beinhalten, finden sich bei allen untersuchten stromalen Schleifen von Lhca-Proteinen in den ersten 50% der Sequenz nur eine konservierte AS und bei den Lhcb-Proteinen in der 1. Hälfte keine einzige. Zudem fällt dieser Abschnitt bei den Lhcb-Proteinen in einen Bereich, der ohne die lange stromale Schleife des Lhcb6 (57 stromale AS insgesamt) mit 8 AS recht klein ausfällt. Im Gegensatz dazu präsentiert sich der zweite Teil der stromalen Schleife als stark konservierter Abschnitt, wobei Unterschiede im Grad der Konserviertheit zwischen Lhca- und Lhcb-Proteinen auftreten. Bei den Lhc-Proteinen des PSI sind 8 von 22 AS hoch konserviert, wohingegen bei den PSII Lhc-Proteinen bis zu 12 von 28 AS stark konserviert vorliegen.

(A)		(B)	
58	85	107	152
Lhca1	---WVKAQEWALPGGQATYLGPNVPVWG	MEKD-----PEKKKYPGGA-FDPLGYSKDP	
Lhca2	IL---NTPSW--YTAGE-----QEYFT	ADIIKPGSVNTDPVFPN---NKLTGT-DVGYPGGLWFDPLGWGSSP	
Lhca3	LIPAETALPW--FQTGVIPPAGTYTYWA	QDWYNPGSMGKQYFLGL--EKGLAGSGNPAYPGGPFNPLGFGKDE	
Lhca4	II---NVPEW--YDAGK-----EQYFA	QDIKNPGSVNQDPFIKQ---YSLPKG-EVGYPGG-IFNPLNF----	
Lhca5	IR---NLPVW--YEAGA-----VKFDFA	MDVSPGSGAQEGSFFFGLEAALEGL-EPGYPGGPLLNPLGLAKDV	
Lhca6	FI---ENFSW--YDAGS-----REYFA	ADLIKPGSVDIKPYPH---KVNPKP-DAGYPGGLWFDPMWGRGSP	
	♦ ♦	• □ ♦♦♦ ♦♦	
Lhcb1	--VKFGEAVWFKAGSQIFSDGGL-DYLGPNPSLVHAQ	AGNGPLGE-----AEDLLYPGGS-FDPLGLATDP-----	
Lhcb2	--VKFGEAVWFKAGSQIFSEGL-DYLGPNPLIHAQ	GG-GLGE-----GLDPLYPGGA-FDPLNLAEDP-----	
Lhcb3	-RVDFKEPVWFKAGSQIFSEGL-DYLGPNPLVHAQ	NGLDGVGE-----GND-LYPGGQYFDPLGLADDP-----	
Lhcb4	-----WQDAGKVELVDGSS--YLGQ--PLPFS	AELD-----SEKRLYPGGKFFDPLGLAADP-----	
Lhcb5	-ANCGPEAVWFKTGALLLDGNTL-NYFGK--NIPIN	TN--GLD-----FEDKLHPGGP-FDPLGLAKDP-----	
Lhcb6	-----WFEAGAQ-----PDAIAPF	VDFNPDSQSVEWATPWSKTAENFANYTGQQYPGGRFFDPLGLAGKNRDGVYEPDF	
	♦ ♦♦	□ ♦♦♦ ♦♦♦♦♦	

Abb. 18: Proteinalignment der luminalen (A) und stromalen (B) Schleife verschiedener Lhca- (oben) und Lhcb-Proteine (unten) von Arabidopsis zur Identifikation schwach konservierter Aminosäuren. Die unterschiedlich langen Schleifenregionen sind aufgrund ihrer geringen Sequenzidentität interessante Proteinabschnitte, die zur Entstehung des unterschiedlichen Oligomerisierungsverhaltens führen könnten. (♦): identische Aminosäuren; (•): stark konserviert, alle homolog; (◻): stark konserviert, aber nicht alle homolog; Positionszahlen der AS beziehen sich auf die Lhca4-Sequenz.

Ohne Beachtung der Lhcb6-Sequenz, die in der stromalen Schleife stark von den übrigen Lhcb-Proteinen (unten) abweicht, besitzen 17 von 30 AS-Positionen in der stromalen Schleife einen konservierten Charakter. Ein ähnliches Bild ergibt ein Lhca-Proteinalignment (oben), ohne das in seiner stromalen Sequenz sehr kurz erscheinende

Lhca1-Protein. Bei Nichtberücksichtigung des Lhca1 erhöht sich die Zahl der konservierten Aminosäuren in der gesamten stromalen Schleife von zunächst 9 (von 56) auf 17 (von 47), wobei die dabei zusätzlich entstehenden hoch konservierten Positionen, nahe eines PGS-Motivs zu Beginn der luminalen Schleife lokalisiert sind.

Für Mutationsanalysen interessante Bereiche befinden sich demnach an fast jeder Position der luminalen Schleife und vor allem in Hälfte 1 der stromalen Schleife. Da bereits Untersuchungen existieren, die eine Beteiligung der Helix 2 des Lhca4 an der LHCI-730-Assemblierung belegen (Corbet, 2004), sollten vor allem die an die 2. Helix angrenzenden Schleifenregionen mit AS geringer Sequenzidentität für Mutationsanalysen berücksichtigt werden.

1.3 Abstandsmessungen in LHCII- und PSI-Kristallstrukturen zum Vergleich der Schleifenregionen unterschiedlicher LHCs

Da die Kristallstruktur des Photosystem I noch in keiner allzu hohen Auflösung vorliegt, und die darin enthaltenen Strukturinformationen über daran gebundene LHCs ebenfalls noch unzureichend sind um strukturelle Besonderheiten der luminalen oder stromalen Schleifenregionen besser sichtbar machen zu können, wurde versucht auf Basis der hoch aufgelösten LHCII- (PDB: 2BHW) und der verfügbaren PSI-Kristallstruktur (PDB: 1QZV) Gemeinsamkeiten in der Sekundärstruktur bisher nur rudimentär aufgelöster LHCI-Schleifenbestandteile zu ermitteln.

Die in einer Peptidbindung vorkommenden Torsionswinkel bestimmen entweder den Abstand zweier Carbonyl-Kohlenstoffatome (ϕ), den Abstand zweier Amid-Stickstoffe (ψ) oder den Abstand zweier α -Kohlenstoffe (ω). Durch die Planarität der Peptidbindung liegt der ω -Winkel entweder in der häufigen trans-Konformation (180°) vor oder in der seltenen cis-Konformation (0°), die nur bei X-Pro-Peptidbindungen (X ist beliebige AS) vorkommt. Die Abstände zwischen den $C\alpha$ -Atomen bei trans-Konformation betragen $3,85 \text{ \AA}$, bei einer cis-Konformation liegen $2,8 \text{ \AA}$ zwischen den α -Kohlenstoffen. Davon ausgehend war neben einer Vermessung der Abstände im Modell die Berechnung der Länge einer theoretisch gestreckten luminalen oder stromalen Proteinschleife möglich (Kap. C3.2). Die Differenz zu in der Kristallstruktur bzw. einem Modell gemessenen Längen entspricht demnach dem Anteil einer Schleifenregion, der an Faltungen, Windungen oder an der Bildung von Helices beteiligt sein könnte.

Tabelle 20: Darstellung der Längendifferenz zwischen berechneter und gemessener Länge von luminalen (LL) und stromalen (SL) Proteinbereichen von Lhca-Proteinen und dem Lhcb1. Die Positionen im Modell kennzeichnen die $C\alpha$ -Atome zwischen denen die Abstände im lückenhaften PSI- bzw. dem LHCII-Modell vermessen wurden. Lhcb4-Daten sind als Vergleich mit aufgeführt. (orange): kurzer Abstand bei hoher AS-Zahl; (grau): Schleifen-Anteile, die gefaltet gewunden oder helical vorliegen könnten.

	Position im Modell	Anzahl AS	theoretische Länge [Å]	gemessener Abstand [Å]	Längendifferenz [%]
LL					
Lhca1	62-95	25	96,3	29,4	69,5
Lhca2	90-72	17	65,5	29	55,7
Lhca3	77-113	26	100,1	24,9	75,1
Lhca4	65-88	17	65,5	31,7	51,6
Lhcb1	G89-S123	33	127,1	27,4	78,4
Lhcb4		22	84,7		
SL					
Lhca1	115-144	23	88,6	22,2	74,9
Lhca2	110-156	42	161,7	25,7	84,1
Lhca3	133-174	43	165,6	20,2	87,8
Lhca4	15-108	38	146,3	22,9	84,3
Lhcb1	I143-P170	27	104,0	24,5	76,4
Lhcb4	-	24	92,4	-	-

In Tabelle 20 sind die Daten, die zur Berechnungen der luminalen und stromalen Schleifenanteilen führten dargestellt, die aufgrund ihrer Abstände in der Kristallstruktur nicht linear vorliegen können. Die C α -Atome der Lhca-Proteine im Modell sind nicht alle aufgelöst, weswegen sich laut Positionsangaben weniger AS im Modell finden lassen, als die Lhca-Proteine laut Sequenz tatsächlich besitzen. Es können aber auch rechnerisch mehr AS sein, wenn wie im Falle der stromalen Schleife des Lhca4, die Nummerierung im Modell nicht fortlaufend ist. Als Referenz kann der gefaltete Proteinanteil (78%) der luminalen Lhcb1-Schleife im LHCII betrachtet werden, von welchem aufgrund der hohen Auflösung bekannt ist, dass er neben einer antiparallelen Strukturen auch eine amphiphile Helix enthält. Ähnlich hohe Anteile der Längendifferenz in der luminalen Schleife ergaben sich nach Berechnung der Lhca1- (70%) und Lhca3-Struktur (75%). Die luminalen Schleifen des Lhca2 und Lhca4 wiesen dahingegen nur geringe Längendifferenzen zum Vermessenen Modell auf.

Die stromalen gefalteten Anteile sind schwieriger zu beurteilen, da zum einen keine Daten über Sekundärstrukturen bekannt sind und zum zweiten alle theoretisch berechneten Werte recht nah beisammen lagen.

Die Daten des Lhcb4 wurden als Vergleich mit aufgeführt, da dieser ebenfalls Gegenstand der Untersuchungen war. Berechnungen konnten aber aufgrund fehlender Kristallstrukturdaten nicht angefertigt werden. Es bleibt festzuhalten, dass der Lhcb4 aufgrund der Sequenzdaten mit 24 AS eine luminale Schleife durchschnittlicher Länge hat, aber seine stromalen Schleife - wie die des Lhca1 - sehr kurz ausfällt.

2 Einfluss von Proteindomänen mit niedriger Sequenzidentität auf das Oligomerisierungsverhalten von Lichtsammelproteinen

In den Experimenten des vorliegenden Kapitels wurde versucht, durch Austausch ganzer Domänen gegeneinander, strukturelle Besonderheiten verschiedener Lhc-Proteine in Bezug zu ihrem Oligomerisierungsverhalten zu setzen.

Als Untersuchungsobjekte wurden die Arabidopsis-Proteine Lhca4, Lhcb1 und Lhcb4 ausgewählt, die sich alle in ihrem Oligomerisierungsverhalten unterscheiden. Während sich der Lhcb4 nur zu monomeren Komplexen rekonstituieren lässt und den größten LHC, das CP29 bildet (Bassi et al., 1987; Giuffra et al., 1996), kann das zweite untersuchte PSII-Lhc-Protein, der Lhcb1 Trimere bilden (Burke et al., 1978; Kühlbrandt et al., 1983; Hobe et al., 1994). Der LHCII von Gefäßpflanzen liegt meist in einer Mischform aus Lhcb1, Lhcb2 oder Lhcb3 vor (Spangfort und Andersson, 1989; Jackowski und Pielucha, 2001). Das dritte Protein, der Lhca4 aus dem PSI bildet mit dem ebenfalls verwendeten Lhca1 den heterodimeren Komplex LHCI-730 (Schmid et al., 1997; Ihalainen et al., 2000).

Das Zustandekommen von stabilen Monomerkomplexen war eine Grundvoraussetzung für die experimentellen Arbeiten mit allen Lhc-Proteinen. Nur wenn die Monomerausbeuten der Mutanten vergleichbar hoch wie die Ausbeuten der Wildtypen waren, konnte ernsthaft von einem durch die Mutationen hervorgerufenen Effekt auf das Oligomerisierungsverhalten gesprochen werden. Bei reduzierten Monomerausbeuten einer Mutante konnte nicht unterschieden werden, ob eventuell auftretende Reduktionen der Dimer- oder Trimerausbeuten ein direkter Effekt der Mutation auf das Oligomerisierungsverhalten darstellte, oder ob sich die Instabilität der Monomere auf die oligomeren Komplexe übertrug. Des Weiteren wurde zur Auswertung der Experimente nur die Ausbeute nach einem Rekonstitutionsexperiment vermerkt, da es nicht möglich war zu unterscheiden, ob eine Mutation die Komplexbildung beeinträchtigte, oder ob durch die Mutation die gebildeten Komplexe schneller wieder zerfielen, was sicherlich auch mit der Wahl der Auftrennungsmethode zusammenhing.

Zuerst wurde der Einfluss der schwach konservierten Domänen, die unter anderem durch diverse Sequenzalignments (Kap. D1) eruiert wurden, durch Herstellung von Einzeldomänenmutanten untersucht. Dabei wurde eine Domäne aus einem Proteins dazu benutzt, die äquivalente Region in den beiden anderen Proteinen zu ersetzen, um danach die Oligomerisierungseigenschaften, die Pigmentbindung und den Energietransfer der rekonstituierten Lichtsammelkomplexe zu ermitteln. Zu diesen Domänen gehören neben den N- und C-Termini, auch die luminalen und stromalen Schleifenregion, sowie die Helix 2. Bei Identifikation von für die Heterodimerisierung (LHCI-730) wichtiger Domänen mit geringer Sequenzidentität, wurden zusätzlich Bereichs- und Einzelmутanten hergestellt, um die Beteiligung einzelner AS nachzuweisen.

Die Anfertigung der Einzeldomänenmutanten erfolgte aus zwei wichtigen Gründen. Zum einen sollte durch Einbau einer proteinfremden Domäne der Einfluss auf das typische Oligomerisierungsverhalten untersucht werden, falls der ersetzte Abschnitt dafür essentiell war. Dies galt nicht für den Lhcb4, da dieser nur monomere Komplexe ausbilden kann.

Die zweite Frage, die durch die Einzeldomänenmutanten geklärt werden sollte bestand darin, ob der Transfer von Oligomerisierungseigenschaften, durch die Übertragung von proteinfremden Domänen möglich ist. So wurden sukzessive ein, zwei, drei oder mehr Domänen und Teildomänen eines Proteins in einem anderen substituiert, um damit die Fähigkeit zur Ausbildung einer anderen Oligomerisierungsform zu bewirken.

In einem weiteren Teilprojekt wurde versucht, die für eine Heterodimerisierung essentiellen Bestandteile des Lhca4 im Lhca1 zu integrieren. Dadurch sollte eine Lhca1-Mutante generiert werden, die in einer Art Polymerrekonstitution mit sich selbst interagieren kann, um große lineare Pigment-Protein-Komplexe herzustellen.

2.1 Betrachtung des Oligomerisierungsverhaltens von Lhca4, Lhcb1 und Lhcb4 nach Austausch einer einzelnen Proteindomäne

Um die Ursachen für das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten von Lhc-Proteinen zu ergründen, wurden 3 unterschiedlich assemblierende Lhc-Proteine von Arabidopsis einer näheren Betrachtung unterzogen. Auf Basis jedes Wildtyps wurden so jeweils 2 Mutanten mit je einer getauschten schwach konservierten Domäne generiert. Dies geschah entweder durch eine mehrstufige PCR (Kap. C1.7.4) oder mittels Mutagenese-Kit (Kap. C1.7.5)

Die durchgeführten multiplen Sequenzalignments zeigten, dass insgesamt 5 für eine Substitution interessante Domänen existieren (Kap. D1.1). So weisen nicht nur die unterschiedlich langen N- und C-terminalen Proteinbereiche und die 2 Schleifendomänen niedrige Sequenzidentitäten auf, sondern auch die 2. Helix unterscheidet sich stark zwischen den Lhc-Proteinen der Gefäßpflanzen.

Die Untersuchungen der Bedeutung einzelner Domänen für das Oligomerisierungsverhalten erfolgten an mutierten Lhc-Genen, mit welchen kompetente *E. coli* Zellen transformiert wurden, die durch heterologe Expression das gewünschte Apoprotein herstellten (Kap. C2.1). Mittels Detergenswechsellmethode erfolgte die Rekonstitution der Pigment-Protein-Komplexe (Kap. C2.6), deren Oligomerisierungszustände durch Auftrennung in schwach denaturierenden Gelen oder Saccharosedichtegradienten untersucht wurden. Zur genaueren Quantifizierung wurden die Banden mancher Gele densitometrisch (Kap. C2.7) erfasst. Zudem bestand die Möglichkeit, durch SDG-Ultrazentrifugation (Kap. C2.8) aufgereinigte Lichtsammelkomplexe bezüglich ihrer Pigmentzusammensetzung (Kap. C2.11) und ihres Energietransfers (Kap. C2.12) zu untersuchen.

2.1.1 Beitrag aminoterminaler Domänen am Oligomerisierungsverhalten

Die N-terminale Domäne ist unter den Lhc-Proteinen nicht nur sehr schwach konserviert, sondern variiert auch stark in ihrer Länge (Abb. 16). Die drei Untersuchungsobjekte sind diesbezüglich ebenfalls sehr verschieden. Der Lhca4-N-Terminus ist 33 AS lang, der des Lhcb1 besteht aus 55 AS und der Lhcb4 hat mit 101 AS den längsten N-Terminus aller bekannten Lhc-Proteine höherer Pflanzen.

Untersuchungen des Lhcb1 zeigten, dass im N-Terminus ein AS-Motiv existiert, welches für die Trimerisierung dieses Lhc-Proteins essentiell ist (Hobe et al., 1995). Auch die N-terminalen AS des Lhca4 wurden bereits einer genaueren Analyse unterzogen (Rupprecht et al., 2000; Schmid et al., 2002a). Dabei war aber kein Einfluss bestimmter AS dieses Abschnitts auf die Heterodimerisierung mit dem Lhca1 feststellbar. Ein spezieller Grund für die Existenz des langen Lhcb4 N-Terminus ist bis jetzt noch nicht bekannt, wurde aber auch noch nicht untersucht.

Ausgehend von den Wildtyp-Genen konnten die Mutanten mit ausgetauschtem N-Terminus über eine 'blunt end' Ligation (Kap. C1.7.3), oder eine zweistufige PCR (Kap. C1.7.4.1) hergestellt werden. Die in BL21-Zellen überexprimierten Apoproteine wurden aufgereinigt (Kap. C2.1), quantifiziert (Kap. C2.2) und mit einem Totalextrakt bestehend aus Pigmenten und Lipiden rekonstituiert (Kap. C2.6). Eine Auftrennung zur Identifikation der unterschiedlichen Oligomerisierungsformen erfolgte über ein schwach denaturierendes LDS-Gel (Kap. C2.3.2), oder via Ultrazentrifugation in einem Saccharosedichtegradienten (Kap. C2.8). Letztere Methode ist schonender und wurde auch für die Isolation der Komplexe angewendet, die einer Charakterisierung unterzogen wurden (Kap. D2.1.6).

Zunächst wurden Monomerrekonstitutionen durchgeführt, um die Komplexstabilität der Mutanten zu untersuchen (Abb. 19A). Auffallend war, dass der Lhca4-Nb1 eine ähnlich stark ausgeprägte Monomerkomplexbande wie der dargestellte Lhca4-WT aufweist. Der Lhca4 mit Lhcb4-N-Terminus hingegen bildet eine schwächere Monomerbande. Aufgrund der Länge des Lhcb4-N-Terminus lief die Monomerbande dieser Mutante in etwa genauso weit wie die Monomere des Lhcb4-WT, die im Vergleich zum Lhca4- oder Lhcb1-WT eine geringere Monomerausbeute aufwies.

Die Monomerausbeuten der Lhcb1-Mutanten entsprachen denen ihres Wildtyps. Die Lhcb4-Mutanten hatten ohne den langen N-Terminus viel höhere Monomerausbeuten als der Lhcb4-WT und liefen demzufolge auch etwas weiter im Gel. Die kompletten N-terminalen Einzeldomänenmutanten konnten als gut rekonstituierbar eingestuft werden.

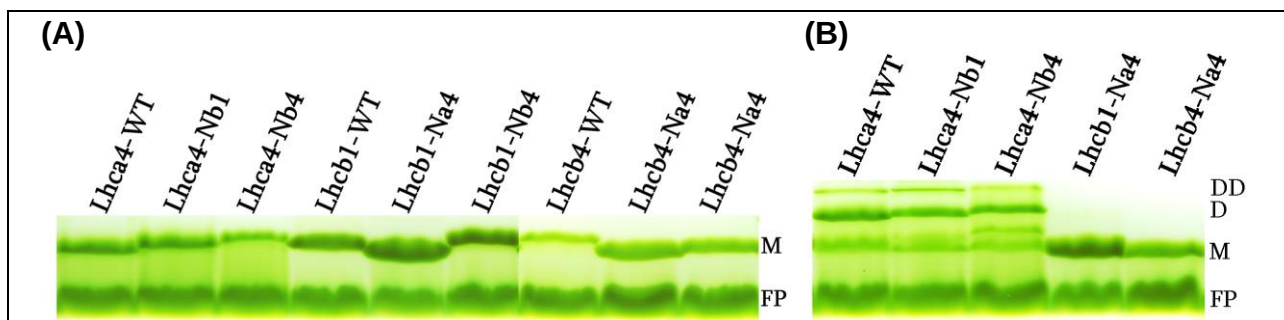


Abb. 19: Auswirkung eines substituierten N-Terminus auf die Monomer- (A) und Dimerrekonstitution (B) von Lhca4-, Lhcb1- und Lhcb4-Mutanten nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Monomerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (D): Dimerbande; (DD): Doppeldimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Bei Betrachtung der Dimerrekonstitutionen aller N-terminalen Mutanten mit Lhca4-Bestandteilen nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel (Abb. 19B) fällt auf,

dass die Lhca4-Mutanten mit substituiertem N-Terminus trotzdem zu einer Heterodimerisierung mit dem Lhca1-WT befähigt waren. Im Gel liefen diese dimeren Komplexe - analog zu den Monomeren - aufgrund des größeren N-Terminus und der damit verbundenen höheren Molekularmasse, etwas kürzer als die Wildtypen. Zusätzlich wurde sowohl in der WT-Rekonstitution, als auch bei den zwei Lhca4-Mutanten eine höhermolekulare Bande beobachtet, die als Doppeldimer eingeordnet wurde (siehe Kap. D2.1.1.1 und D2.1.1.2).

Die Lhcb1- und Lhcb4-Mutanten mit dem N-Terminus von Lhca4 waren nicht im Stande Heterodimere mit dem Lhca1-WT zu bilden (Abb. 19B). Somit wurde durch den Austausch der N-Termini weder die Dimerisierungseigenschaft der Lhca4-Proteine verringert, noch eine Interaktion des Lhcb1- oder Lhcb4-Proteins mit dem Lhca1-WT bewirkt werden.

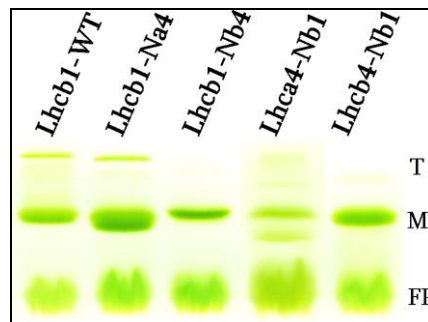


Abb. 20: Trimerrekonstitution von Einzeldomänenmutanten des Lhcb1 mit ersetzttem N-Terminus, sowie Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit Lhcb1 N-Terminus, nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. (T): Trimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Neben der Heterodimerbildung wurde auch die Fähigkeit zur Bildung von Trimeren aller neuen Mutanten mit Lhcb1-Bestandteilen untersucht (Abb. 20). Die Auftrennung im Gel liefert bezüglich der Lhcb1-Proteine mit substituiertem N-Terminus ein inhomogenes Bild. Während der Lhcb1 mit Lhca4-N-Terminus eine ebenso schwache Trimerausbeute aufwies wie der rekonstituierte Lhcb1-WT, waren beim Lhcb1 mit dem langen Lhcb4-N-Terminus keine Trimere mehr zu beobachten. Im N-Terminus des Lhca4 müssen AS enthalten sein, die eine Trimerisierung der Lhcb1-Mutante ermöglichen.

Der Versuch, Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit Lhcb1-N-Terminus zu trimerisieren scheiterte. Keine der beiden Mutanten zeigte eine Bande auf Höhe der Lhcb1-Trimerkomplexe. Lediglich in diesem gezeigten Experiment ließen sich beim Lhca4-Nb1 höhermolekulare Banden erkennen, die aber auch im schwächeren Maße beim Wildtyp zu finden waren. Da sie nicht auf Trimerhöhe liefen, stellen sie vermutlich unspezifische Dimer-Artefakte dar, die durch ungewollte Disulfidbrücken entstanden waren. Bei dieser speziellen Mutante ist unterhalb der Monomerkomplexbande eine weitere Bande zu erkennen, die möglicherweise eine Zerfallsstufe des Monomers enthält.

Um den doch recht stringenten Einfluss, der durch eine Auftrennung im schwach denaturierenden Gel entsteht zu vermeiden, wurden die Rekonstitutionsansätze auch in als schonender geltenden Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Während die Monomerrekonstitutionen (nicht gezeigt) für eine nachfolgende Komplexcharakterisierung Verwendung fanden, wurden die Dimer- (Abb. 21A) und Trimerrekonstitutionen (Abb. 21B) vor allem wegen der mildereren Auftrennung und damit genaueren Betrachtung der Oligomerisierungszustände durchgeführt.

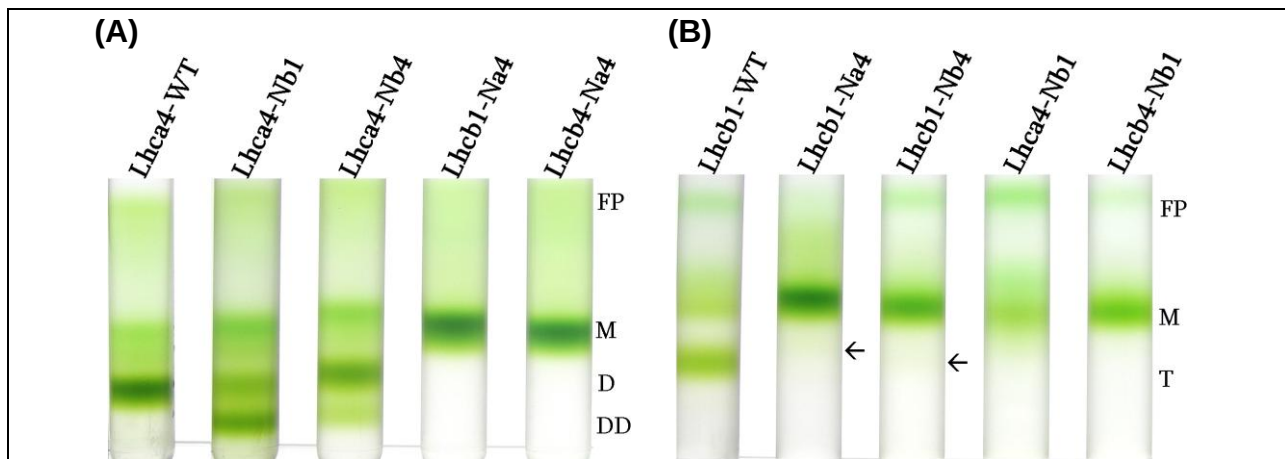


Abb. 21: Dimer- (A) und Trimerrekonstitution (B) N-terminaler Einzeldomänenmutanten nach 24- (A) bzw. 16-stündiger (B) Auftrennung im Saccharosedichtegradienten. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Trimerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (T): Trimerbande; (DD): Doppeldimerbande; (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment; (←): zerfallene Trimerbande.

Die Dimerisierungsexperimente (Abb. 21A) sind bis auf eine Beobachtung deckungsgleich mit den per Gel erhaltenen Ergebnissen. Die im Gel beobachteten Doppeldimerbanden der Lhca4-Mutanten konnten auch nach Auftrennung im Saccharosedichtegradienten beobachtet werden. Die Doppeldimerbanden des Wildtyps sind im Gradienten nicht mehr zu erkennen. Dieses Resultat war unerwartet, da das Phänomen, wie es beim Wildtyp beobachtet werden konnte, schon länger bekannt war und deshalb zunächst als Gelartefakt gewertet wurde. Ohne Lhca4-N-Terminus konnte über ein dem Wildtyp ähnliches Heterodimer hinaus eine weitere Oligomerisierungsform beobachtet werden. Dabei zeigte die Lhca4-Mutante mit dem N-Terminus des Lhcb1 nicht nur höhere DD-Ausbeuten, als die Mutante mit Lhcb4-N-Terminus, es wurden auch sichtbar mehr DD als Dimere gebildet. Die Zusammensetzung der mutmaßlichen Doppeldimere wurde im Anschluss genauer untersucht.

Im Grunde bestätigen die Trimerisierungsversuche mit nachfolgender Auftrennungen per Dichtegradient die vorherigen Gel-Experimente. Allerdings war die Auftrennung im Gradienten nicht schonender als im Gel, sondern eher harscher. So waren die vermutlich trimeren Lhcb1-Na4-Komplexe kaum bzw. nur als sehr schwache Banden (Pfeil) zu erkennen. Die Monomerbande des Lhca4-Nb1 erschien auch im Gradienten deutlich schwächer sowie diffuser.

2.1.1.1 Nachweis der Bildung von Doppelheterodimeren nach Auftrennung der Lhca4-Mutante mit getauschtem N-Terminus

Durch die Rekonstitution und Auftrennung der N-terminalen Lhca4-Mutanten im schwach denaturierenden Gel und SDG, konnte sowohl bei der Lhca4-Nb1-Mutante, als auch bei der Lhca4-Nb4-Mutante eine Oligomerisierungsform in Kombination mit dem Lhca1-WT beobachtet werden, die höher als ein Heterodimer anzusiedeln war.

Um nachzuweisen, welche Proteine an dem neuen Komplex beteiligt sind, und wie dessen Proteinzusammensetzung beschaffen ist, wurden die isolierten Dimer- und Doppeldimerbanden dem Dichtegradienten entnommen, die Apoproteine mit TCA gefällt (Kap. C2.10) und zusammen mit den für die Rekonstitution verwendeten IB-Proteinen auf ein stark denaturierendes SDS-Gel (Kap. C2.3.1) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

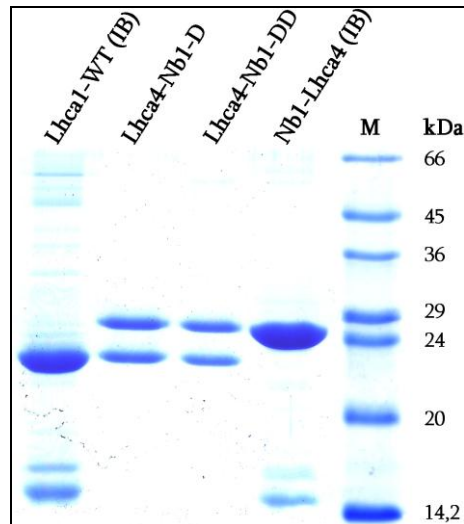


Abb. 22: Gelelektrophoretische Auftrennung der Dimer- und Doppeldimerbande aus Saccharosedichtegradienten, die nach Rekonstitution des Lhca4-Nb1 mit dem Lhca1-WT erhalten wurden. Die in den Banden enthaltenen Proteine wurden mit TCA gefällt und zusammen mit den für die Rekonstitutionen eingesetzten Proteinen in einem voll denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt. (D) bzw. Doppelheterodimeren (DD). (IB): nicht rekonstituiertes Apoprotein; (M): SDS 7-Standard.

Nach einer Coomassie-Färbung des Gels (Abb. 22) zeigte sich, dass sich sowohl die Dimer-, als auch die Doppeldimerbande aus Lhca1-WT und Lhca4-Nb1 zusammensetzt. Darüber hinaus sind beide Apoproteinbanden, die in der Dimer- und Doppeldimerbahn aufgetrennt wurden im gleichen Verhältnis vertreten. Dies bedeutet, dass die zusätzliche Oligomerisierungsform der Lhca4-Mutante mit Lhcb1-N-Terminus als Doppelheterodimer zu bezeichnen ist.

2.1.1.2 Identifizierung einer hochmolekularen Bande bei Dimerisierungsexperimenten als Doppeldimere

Im Verlauf der Experimente traten, als ein schon länger bekanntes aber bisher nicht untersuchtes Phänomen, nach Gelauf trennung von Lhca1-Lhca4 Heterodimeren zusätzliche höhermolekulare Komplexbanden auf, die im folgenden bezüglich ihrer Zusammensetzung hin untersucht wurden.

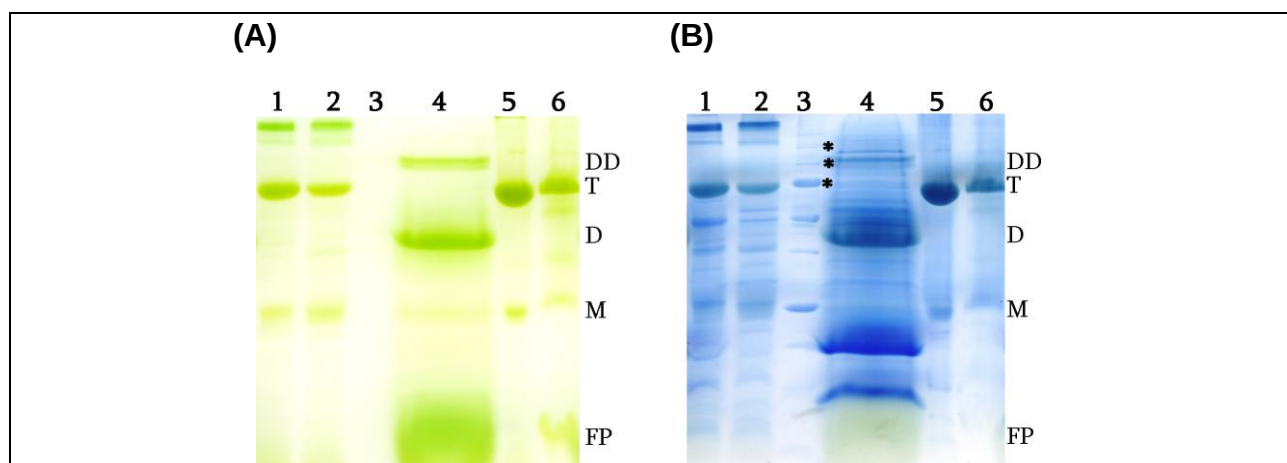


Abb. 23: Nachweis von Lhca1-Lhca4-Doppelheterodimeren nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel (A) und nach anschließender Coomassie-Färbung (B). (1): 5 µg solubilisierte Erbsenthylakoide; (2): 5 µg solubilisierte Tomatenthylakoide; (3): Precision Plus Protein marker (250, 150*, 100*, 75*, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa); (4): Dimerrekonstitution Lhca1-wt + Lhca4-wt (Tomate); (5): 5 µg native LHCII Trimere (aus Erbse, in 1% OG solubilisiert); (6): 5 µg rekombinante LHCII Trimere (in 1 % β-DM solubilisiert). (T): Trimerbande; (DD): Doppeldimerbande; (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Seit längerem bestand die Vermutung, dass es sich bei der höhermolekularen Bande um Doppelheterodimeren handeln könnte. Nachdem sie nur nach einer Auftrennung im schwach denaturierenden Gel zu detektieren ist und nicht nach SDS-ZU, dürfte sie ein experimentelles "Artefakt" darstellen. Da dieses Phänomen über Jahre hinweg konstant blieb und Rekonstitutionen mit Apoproteinen von sowohl Arabidopsis, als auch Tomate zu diesem Ergebnis führen, stellte sich die Frage nach der tatsächlichen Größe und Zusammensetzung dieser Bande.

Dazu wurden zwecks Größenbestimmung neben einem WT-Dimerrekonstitutionsansatz auch solubilisierter Erbsen- und Tomatenthylakoide, native und rekombinante LHCII-Trimere und ein Molekulargewichtsstandard (Precision Plus Protein marker (Bio-Rad, München) auf ein schwach denaturierendes Gel aufgetragen. Die Solubilisierung der nativen Bestandteile war notwendig, um die für eine Molekulargewichtsbestimmung benötigten Komplexe aus den Thylakoiden herauszulösen (Kap. C2.9). Die aufgetragenen Komplexe wurden für ca. 3 Stunden in einem schwach denaturierenden Gel elektrophoretisch getrennt und anschließend einer visuellen Prüfung unterzogen.

In Abb. 23A erkennt man, dass die eigentlichen Heterodimere weiter liefen als der trimere LHCII in Reinform bzw. der aus Thylakoiden solubilierte. Eine kürzere Laufstrecke wiesen die mutmaßlichen Doppelheterodimere auf.

Um das Molekulargewicht bzw. die Anzahl der pro Komplex enthaltenen Apoproteine abschätzen zu können, wurde das Gel einer Coomassie-Färbung (Abb. 23B) unterzogen. Anhand des ebenfalls mit aufgetragenen Molekulargewichtsstandards, der zwar in dieser schwach denaturierenden Umgebung auch nur als tendenzieller Maßstab zu betrachten war, konnte die molekulare Masse der unbekannten Bande auf ca. 100 kDa geschätzt werden. Damit wären vier Lhca1 oder Lhca4-Apoproteine an der Bildung dieses Komplex-Artefakts beteiligt.

2.1.2 Bedeutung der carboxyterminalen Domäne für das Oligomerisierungsverhalten

Die C-terminalen Abschnitte der Lhc-Proteine sind ebenfalls schwach konserviert (Abb. 16). In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden alle Bereiche, die sich an die 3. TM-Helix anschließen als C-Terminus bezeichnet. Dazu gehört neben den carboxyterminalen endständigen Aminosäuren auch die amphiphile vierte kurze Helix, die der Thylakoidmembran angelagert ist und einige wenige AS, welche die Helix 3 mit der kleinen Helix 4 verbinden.

Konservierte Aminosäuren treten, wenn überhaupt im Bereich der Helix 4 auf. Die aufgrund der kurzen C-terminalen Sequenz, kann beim Lhcb6 aber nur rudimentär vorhanden sein. Ein weiteres Merkmal der C-Termini ist neben der unterschiedlichen Länge bei den verschiedenen Lhc-Proteinen (siehe Abb. 16), auch die variierende AS-Anzahl zwischen den Lhc-Proteinen auf Ebene verschiedener Gefäßpflanzen-Spezies (siehe A2).

Untersuchungen am C-Terminus des Lhca4 (Schmid et al., 2002a) zeigten bereits, dass C-terminale Deletionsmutanten ebenso mit dem Lhca1 dimerisieren konnten, wie der Lhca4-WT. Mutationsanalysen am C-Terminus des Lhcb1 offenbarten, dass das W222 als wichtig für die Bildung stabiler Trimere einzustufen ist, und alle 'downstream' gelegenen Aminosäuren keinen Einfluss auf die Trimerisierung haben (Kuttkat et al., 1996).

Ob die schwach konservierten C-terminalen Domänen darüber hinaus einen Beitrag zur Ausbildung der unterschiedlichen Lhc-Oligomerisierung leisten, wurde an den Untersuchungsobjekten Lhca4, Lhcb1 und Lhcb4 getestet. Mittels 2-stufiger PCR (Kap.

C1.7.4.1) wurde dieser Abschnitt jeweils durch den C-Terminus der beiden anderen Proteine ersetzt.

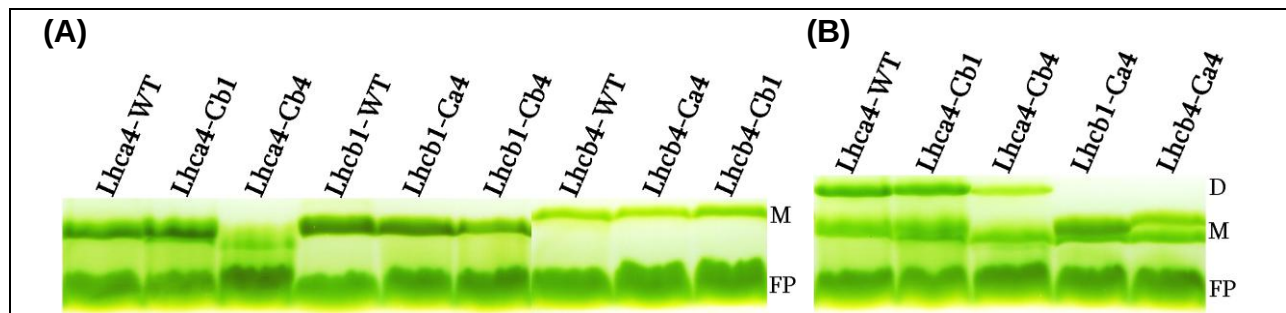


Abb. 24: Auswirkung eines substituierten C-Terminus auf die Monomer- (A) und Dimerrekonstitution (B) von Lhca4-, Lhcb1- und Lhcb4-Mutanten nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Monomerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Die Monomerrekonstitutionen nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel, zum Nachweis der Komplexstabilität (Abb. 24A), deuten auf einen destabilisierenden Einfluss des Lhcb4 C-Terminus im Lhca4 und Lhcb1 hin. Weder die Komplexe des Lhcb1-Cb4, noch die des Lhca4-Cb4 reichten an die Monomerausbeuten ihres zugehörigen Wildtyps heran, wobei letztgenannte Mutante aufgrund hoher Komplexinstabilität im Gel zerfiel. Die Lhcb4-Mutanten verhalten sich, bis auf den in der Ausbeute leicht erhöhten Lhcb4-Cb1, ähnlich dem Lhcb4-WT.

Bei Dimerrekonstitution (Abb. 24B) mit dem Lhca1-WT weist die Lhca4-Cb1-Mutante die gleiche Bandenintensität wie die Wildtyp-Dimerbande auf. Dagegen waren die Dimerausbeuten der Lhca4-Mutante mit Lhcb4-C-Terminus gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert. Verglichen mit den Monomerausbeuten dieser Mutante wird ersichtlich, dass die Gründe für die reduzierten Dimerausbeuten vermutlich bei den instabilen Lhca4-Cb4-Monomerkomplexen lagen. Ein Transfer des Lhca4 C-Terminus auf das Lhcb1- oder Lhcb4-Protein führte nicht zu deren Dimerisierung mit dem Lhca1-WT.

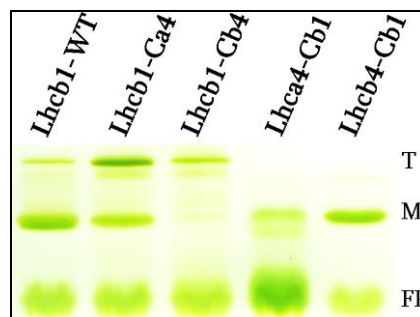


Abb. 25: Trimerrekonstitution von Einzeldomänenmutanten des Lhcb1 mit ersetzttem C-Terminus, sowie Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit Lhcb1 C-Terminus, nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. (T): Trimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Die Gelauf trennung der Rekonstitutionsansätze nach Trimerisierung via Ni-Säule (Abb. 25) zeigte, dass die beiden Lhcb1-Mutanten immer noch Trimere bilden konnten. Die Trimer ausbeuten der Lhcb1-Ca4-Mutante waren im Gegensatz zu den Monomerausbeuten sogar höher als die des Wildtyps. Auch bei der Lhcb1-Mutante mit Lhcb4-C-Terminus war eine im Vergleich zum WT erhöhte Trimer ausbeute nachzuweisen. Analog zur Gelauf trennung der Monomerrekonstitution war auch nach

Elution von der Ni-Säule keine Monomerbande detektierbar. Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit dem C-Terminus des Lhcb1 bildeten hingegen keine Trimere.

Um die Einflüsse der C-terminalen Domänenaustausche unter schonenden Bedingungen zu untersuchen, wurden große Rekonstitutionsansätze angefertigt und per SDG-Ultrazentrifugation aufgetrennt.

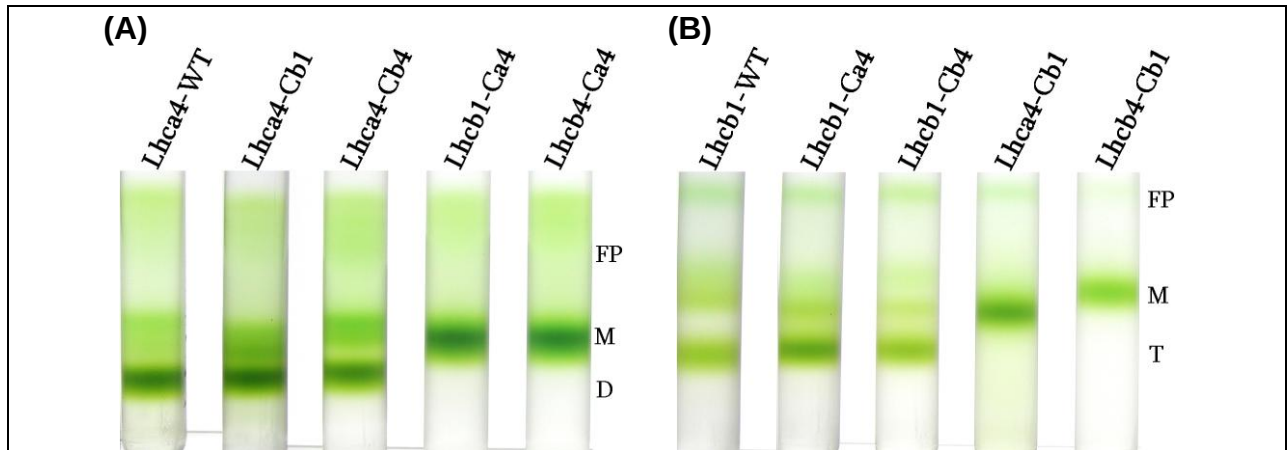


Abb. 26: Dimer- (A) und Trimerrekonstitution (B) C-terminaler Einzeldomänenmutanten nach 24-(A) bzw. 16-stündiger (B) Auftrennung im Saccharosedichtegradienten. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Trimerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (T): Trimerbande; (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Die Auftrennung der Dimer- und Trimerrekonstitutionen im SDG (Abb. 26) untermauert die vorherigen Befunde aus den Experimenten nach Gelaufftrennung. Die C-terminalen Lhca4-Mutanten sind beide in der Lage mit dem Lhca1-WT Heterodimere auszubilden, wobei die Reduktion der Dimerausbeuten der Lhca4-Cb4-Mutante, aufgrund der schonenden Auftrennungsart, kaum auffällt und eher der Wildtyprekonstitution entspricht. Wie im Gel beobachtet, konnte weder die Lhcb1- noch die Lhcb4-Mutante mit Lhca4-C-Terminus ein Heterodimer mit dem Lhca1-WT formen.

Nach der Trimerrekonstitution zeigten beide Lhcb1-Mutanten kräftige Trimerbanden im SDG, wobei die Trimerbande der Lhcb1-Ca4-Mutante die des Lhcb1-WTs in ihrer Intensität noch übertraf. Auch hier zeigte sich, dass der Lhcb1 C-Terminus nicht dazu geeignet war Lhca4- und Lhcb4-Mutanten zum Trimerisieren zu bringen.

2.1.3 Einfluss der luminalen Schleifenregion auf die LHC-Oligomerisierung

Die luminal Schleife verbindet Helix 1 mit Helix 2 und ist zwischen den verschiedenen Lhc-Proteinen nur schwach konserviert (Abb. 16). Auch ein gesondertes Alignment dieser Region von nur Lhca- und nur Lhcb-Proteinen (Abb. 18A) förderte keine größeren Gemeinsamkeiten innerhalb beider Lhc-Gruppen zu Tage. Zudem erschweren stark variierende Sequenzlängen der luminalen Schleifen einen direkten Vergleich zwischen den Lhc-Proteinen. Auch die für die Untersuchung verwendeten Lhc-Proteine hatten hoch variable luminal Domänen.

Während der heterodimerisierende Lhca4 mit 17 AS eine sehr kurze luminal Schleife aufweist, finden sich beim lediglich Monomerkomplex-ausbildenden Lhcb4 in diesem Teilabschnitt 23 AS. Die mit 33 AS mit Abstand längste luminal Schleife der drei untersuchten Apoproteine besitzt der Trimer-bildende Lhcb1.

Anders als die N- und C-terminalen Bereiche, befinden sich die Schleifen mitten im Protein. Zur Herstellung der Einzeldomänenmutanten musste eine minimal dreistufige PCR-Strategie (Kap. C1.7.4.2) herangezogen werden. Die mutierten Gene wurden

analog zu den vorherigen Kapiteln zur Expression mutierter Apoproteine verwendet, welche zunächst zwecks eines Tests auf Monomerbildung der Mutanten rekonstituiert wurden.

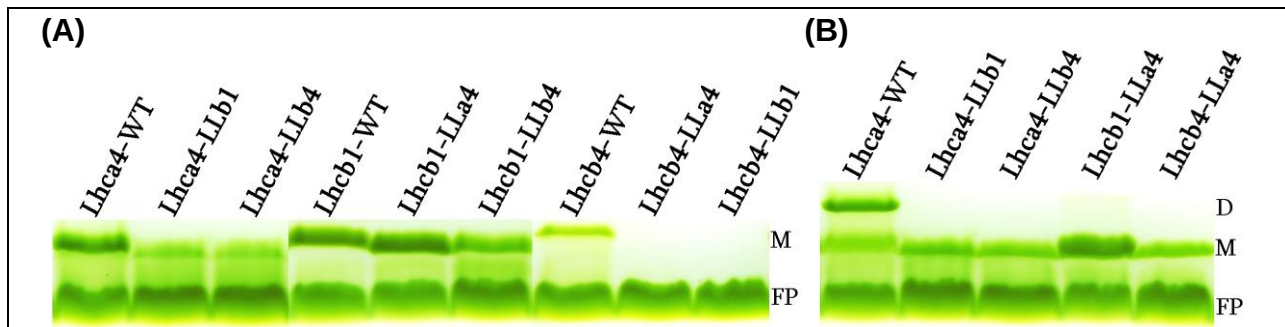


Abb. 27: Auswirkung einer substituierten luminalen Schleife auf die Monomer- (A) und Dimerrekonstitution (B) von Lhca4-, Lhcb1- und Lhcb4-Mutanten nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Monomerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Die in Abb. 27A dargestellte Gel-Auftrennung der Monomerrekonstitution deutet auf eine generelle Instabilität der luminalen Lhca4- und Lhcb4-Schleifenmutanten hin. Die beiden Monomerbanden der Lhca4-Mutanten waren zu Beginn der Auftrennung ähnlich intensiv wie die WT-Bande, zerfielen aber zum größten Teil während der weiteren 2stündigen Auftrennung. Die größte Komplexausbeute war bei den Monomeren der Lhcb1-LLa4-Mutante zu beobachten, gefolgt von denen der Lhcb1-LLb4-Mutante, deren Bande nur wenig schwächer wirkte als die des Lhcb1-WTs. Durch den Domänentausch der luminalen Schleife im Lhcb4 konnten die daraus resultierenden Mutanten Lhcb4-LLa4 und Lhcb4-LLb1 keine stabilen Monomerkomplexe mehr ausbilden. Es bleibt anzumerken, dass bei allen Mutanten Monomerkomplexe nach SDG-Auftrennung nachgewiesen werden konnten (nicht gezeigt), die für weiterführende Analysen (Kap. D2.1.6) herangezogen wurden.

Die Dimerrekonstitutionen mit dem Lhca1-WT (Abb. 27B), die mit allen Mutanten durchgeführt wurden, welche Lhca4 Bestandteile beinhalteten, demonstrierten die Wichtigkeit dieses Abschnitts für die Dimerisierung. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass nach Auftrennung der Monomerrekonstitutionen teils recht niedrige Monomerkomplexausbeuten erzielt wurden. Unklar bleibt, ob die eingeführten Mutationen die Dimerisierung direkt beeinflussen, oder ob der Effekt auf die Dimere durch eine indirekte Beeinflussung auf Monomerebene verursacht wurde. Da nach Monomerrekonstitution noch Monomere entstehen, aber nach Dimerrekonstitution keine Dimere zu beobachten waren, wirken sich die Mutationen wahrscheinlich sowohl auf die Monomerisierung, als auch auf die Dimerisierung negativ aus.

Allerdings konnte ein Einbau der luminalen Lhca4-Schleife in den Lhcb1 oder den Lhcb4 auch keine Dimerisierung mit dem Lhca1-WT bewirken. Nur beim Lhcb1-LLa4 ist eine äußerst schwache Bande auf Höhe der Dimere zu erkennen, die dort aber wahrscheinlich nur aufgrund mangelnder Reduktionsmittelkonzentration im diesem Ansatz hervorgerufen wurde, was zur Bildung unspezifischer Disulfidbrücken im Lhcb1 führen konnte. Die nachfolgenden Untersuchungen der Rekonstitutionen im SDG (Abb. 29A) untermauerten diese Vermutung, da die Dimerbanden - trotz schonender Auftrennungstechnik - nicht wieder beobachtet werden konnten.

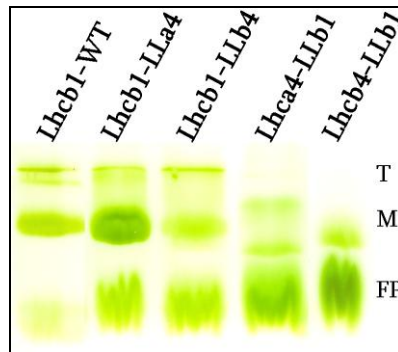


Abb. 28: Trimerrekonstitution von Einzeldomänenmutanten des Lhcb1 mit ersetzter luminaler Schleifenregion, sowie Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit der luminalen Schleife des Lhcb1, nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. (T): Trimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Die Trimerrekonstitutionen mit anschließender Gelauf trennung (Abb. 28) zeigten, dass der Austausch der luminalen Schleife bei beiden Lhcb1-Mutanten eine leichte Reduktion der Trimer ausbeuten zur Folge hatte. Des Weiteren war es unmöglich durch Einbau der luminalen Lhcb1-Schleife in das Lhca4- oder Lhcb4-Protein, diese zu Trimeren zu rekonstituieren.

Um die möglicherweise zerstörerischen Effekte, die während einer LDS-PAGE auf die rekonstituierten Komplexe einwirken können bei der Betrachtung auszublenzen, wurden zusätzlich Rekonstitutionsansätze in SDG per Ultrazentrifugation aufgetrennt.

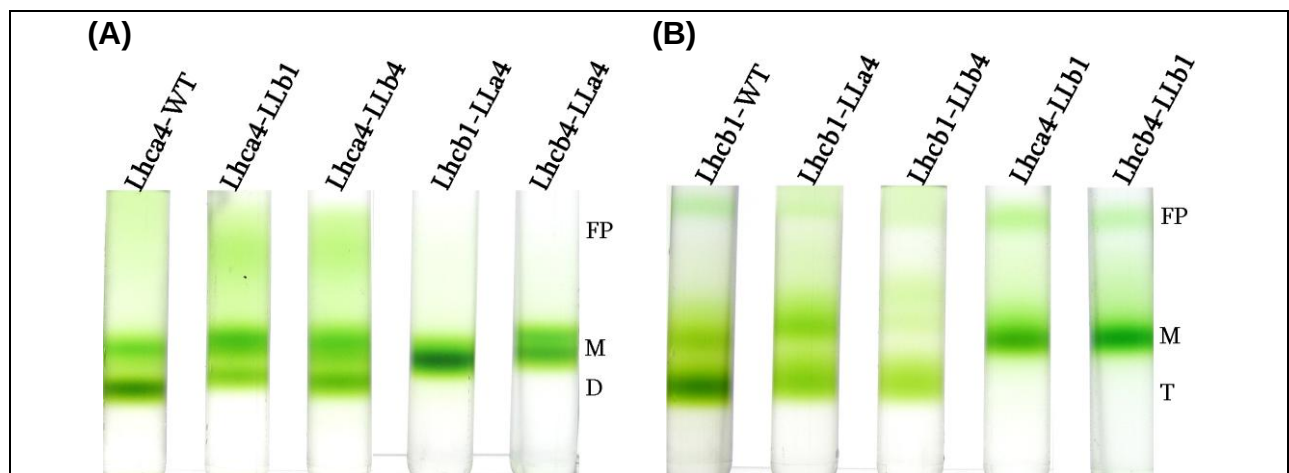


Abb. 29: Dimer- (A) und Trimerrekonstitution (B) von Einzeldomänenmutanten mit substituierter luminaler Schleife nach 24- (A) bzw. 16-stündiger (B) Auftrennung im Saccharosedichtegradienten. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Trimerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (T): Trimerbande; (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Nach Auftrennung der Dimerrekonstitutionen in Saccharosedichtegradienten (Abb. 29A) waren im Gegensatz zur Gelauf trennung deutliche Dimerbanden bei den Lhca4-Mutanten erkennbar. Dabei war die Dimerausbeute der Lhca4-LLb4-Mutante etwas höher, als bei der Lhca4-LLb1-Mutante. Dennoch wiesen beide eine geringere Dimerausbeute auf als bei Rekonstitution des WT mit dem Lhca1. Die mit dem Lhca1 rekonstituierten Lhcb1-LLa4- und Lhcb4-LLa4-Mutanten bildeten auch nach SDG-Auftrennung keine Dimerbanden.

Die Versuche der SDG-aufgereinigten Trimerrekonstitutionen (Abb. 29B) bestätigten die vorherigen Beobachtungen aus der Gelauf trennung. Sowohl die Lhcb1-Mutante mit luminaler Lhca4-Schleife, als auch jene mit luminaler Lhcb4-Schleife war in der Lage stabile Trimere auszubilden, wobei die Ausbeuten deutlich hinter denen des Lhcb1-WT

zurückblieben. Eine interessante Beobachtung ist, dass die Lhcb4-LLb4-Mutante weniger Trimer bildet als der WT, aber fast keine Monomere im Gradienten zu erkennen sind.

2.1.3.1 Identifikation des luminalen Lhca4-Interaktionspunkts zum Lhca1 durch Punktmutationen

Nachdem die Substitution der luminalen Domäne im Lhca4 den bisher stärksten Effekt auf die Heterodimerisierung hatte, wurde diese Region einer näheren Mutationsanalyse unterzogen, um die mit dem Lhca1 interagierenden Aminosäuren zu identifizieren. Aufgrund früherer Untersuchungen war bekannt, dass die 2. Helix des Lhca4 zwar einen essentiellen Beitrag zur Bildung des LHCI-730 leistet (Corbet, 2004), es darüber hinaus aber noch weitere AS in anderen Lhca4-Abschnitten geben muss, die für die Assemblierung mit dem Lhca1 wichtig sind. Da die Helix 2 direkt mit der luminalen Schleife in Verbindung steht, war für die Mutationsanalysen die Grenzregion auf luminaler Seite von besonderem Interesse.

Um geeignete Aminosäuren für Punktmutationen auszusuchen, die zum einen keine zufällige Interaktion mit dem Lhca1 bewirken könnten und von denen bekannt war dass sie an dieser Stelle mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mit dem Lhca1 in Wechselwirkung treten können, wurde auf die bewährte Substitution durch Lhca3-AS zurückgegriffen. Auf eine Substitution durch Lhcb1- oder Lhcb4-AS wurde verzichtet, weil eine Zuordnung der AS-Positionen zwischen Lhca- und Lhcb-Proteinen aufgrund der stark variierenden Schleifenlängen nur annähernd möglich wäre. Somit wäre auch eine Lhca1-Interaktion durch "zufällig passende" AS aus Lhcb1 oder Lhcb4 (PS II), die vom evolutionären Standpunkt aus betrachtet weiter entfernt vom Lhca3 (PS I) lokalisiert sind als der Lhca4, möglicherweise ausgeschlossen.

Für die Untersuchung der luminalen Lhca4-Schleife wurden 3 Typen von Mutanten generiert. Zuerst wurden bei der Bereichsmutante Lhca4-K80-84W, vier AS des Lhca4 (**K-E-Q-Y-F**) gegen die Lhca3 AS (**T-Y-T-Y-W**) getauscht, die in diesem Teilabschnitt unterschiedlich waren und sich direkt an die 2. Helix anschlossen. Danach wurde in einer Kombinationsmutante zusätzlich zu dieser Mutation auch noch ein für die Dimerisierung wichtiger Serincluster, der in der 2. Helix liegt, mutiert (Lhca4-F80-84W+S86-88Y: beinhaltet S86D, S87N und S88Y), um belegen zu können, dass entweder ein oder zwei Interaktionspunkte in diesen Abschnitten mutiert wurden. Außerdem konnte so der Einfluss dieses luminalen AS-Bereichs besser im Kontext mit den anderen in Helix 2 mutierten AS betrachtet werden (Kap. D3). Ein weiterer Mutantentyp waren Doppel- und Einzelmutanten, um den Interaktionspunkt einzugrenzen bzw. genau zu definieren.

Nach einer 2-stufigen PCR (Kap. C1.7.2) erfolgte die Herstellung der Mutanten analog zu den obigen Einzeldomänenmutanten.

Die Monomerrekonstitutionen wurden, wie die Dimerrekonstitutionen mit dem Lhca1-WT, mindestens 3 mal durchgeführt, densitometrisch ausgewertet, gemittelt, und die Standardabweichung bestimmt (Kap. C2.7).

Die Prüfung der Monomerstabilität (Abb. 30 oben), die für eine Ableitung des Einfluss' der Mutation auf die Dimerisierung essentiell war, zeigte, dass laut densitometrischer Auswertung, im Mittel alle Mutanten annähernd die Komplexausbeute des WTs erreichten, oder sogar darüber lagen (Kombinationsmutante). Die einzige Ausnahme bildete die E81Y-Mutante, die nur einen Wert von ca. 82% erreichte.

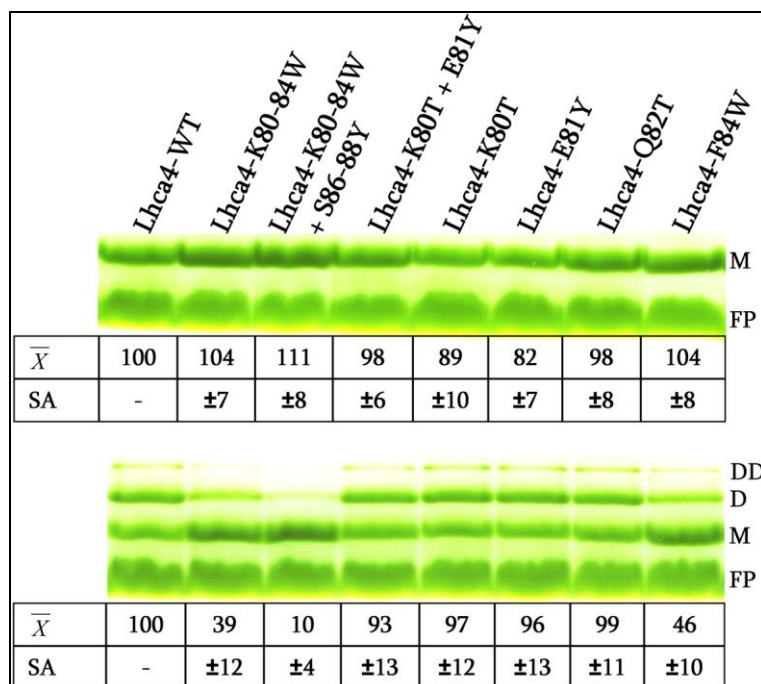


Abb. 30: Monomer- (oben) und Dimerrekonstitution (unten) von Lhca4-Punktmutanten mit Substitutionen gegen Lhca3 Aminosäuren in der luminalen Schleife, nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel und anschließender densitometrischer Quantifizierung von jeweils 4 Experimenten. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Monomerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (DD): Doppeldimer; (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment; ($\bar{X}$): Mittelwert; (SD): Standardabweichung.

Bei Betrachtung der Dimerausbeuten (Abb. 30 unten) der Bereichsmutante K80-84W zeigte sich, dass lediglich 39% der WT-Ausbeute erreicht wurden. Die Kombinationsmutante kam dagegen auf deutlich niedrigere Dimerausbeuten von ca. 10%, so dass vermutlich zwei Interaktionspunkte mutiert wurden. Die Doppelmutante K80T+E81Y, sowie die Einzelmутanten K80T, E81Y und Q82T zeigten ein dem Wildtyp ähnliches Bild und somit keine signifikanten Unterschiede, obwohl E81Y zumindest geringere Monomerausbeuten aufwies. Die einzige Solomutante, die mit der Bereichsmutante bezüglich des Effekts der reduzierten Dimerausbeuten gleichgesetzt werden konnte, war mit 46% die F84W-Mutante. Die Untersuchungen im Abschnitt der luminalen Schleife deuten somit auf eine Interaktion des Phenylalanins 84 des Lhca4 mit dem Lhca1 hin.

2.1.3.2 Einfluss der Lhca-Spezies, des Lhca1-His-tags und der Länge des Lhca1 C-Terminus auf die Dimerausbeuten des LHCI-730

Bei der Identifikation der AS in der luminalen Schleife des Lhca4, die zur LHCI-730 Assemblierung beiträgt, trat ein experimentelles Phänomen auf, das beinahe die Bedeutung des Phenylalanins 84 verschleierte hätte. Durch Rekonstitution des Lhca1-WT von Tomate in Kombination mit der Lhca4-F84W-Mutante aus Arabidopsis war zunächst kein Unterschied in der Dimerausbeute verglichen mit dem WT-Heterodimer bestehend aus nur Tomatenproteinen zu erkennen.

Es stellte sich die Frage, worin sich die Lhca1- und Lhca4-Apoproteine unterschieden, wodurch die Ausbeuten eines Heterodimers hätten erhöht oder auch reduziert werden können. Zur Aufklärung wurden sowohl Proteine von Tomate, als auch von Arabidopsis verwendet, um den Effekt des Lhca1-C-Terminus zweier Spezies und des Lhca1-His-

tags von 2 Arabidopsis-Wildtypen auf die Heterodimerisierung zu untersuchen. Von den 6 C-terminalen AS am Tomaten-Lhca1 fehlen 4 AS im Lhca1 von Arabidopsis. Da der C-Terminus des Lhca1 an der Dimerisierung mit dem Lhca4 beteiligt ist (Schmid et al., 2002a), könnte neben dessen Länge bzw. spezifischer Sequenz auch der His-tag einen Einfluss auf die Ausbildung stabiler Heterodimere haben. Zusätzlich wurde getestet, ob durch die Verwendung unterschiedlicher Lhca4-Spezies eine Reduktion oder Steigerung der Dimerausbeuten möglich ist.

Um den Einfluss einer Lhca1- oder Lhca4-Species genau bestimmen zu können, sollten falls möglich ein Dimer bestehend aus Tomaten- und Arabidopsisprotein, sowohl mit Arabidopsisdimeren, als auch mit Tomatendimeren verglichen werden. Dadurch konnte demonstriert werden, dass eine gleichmäßige Reduktion bzw. Erhöhung der Dimerausbeuten vorlag, je nachdem welches WT-Dimer als Vergleichsgrundlage diente.

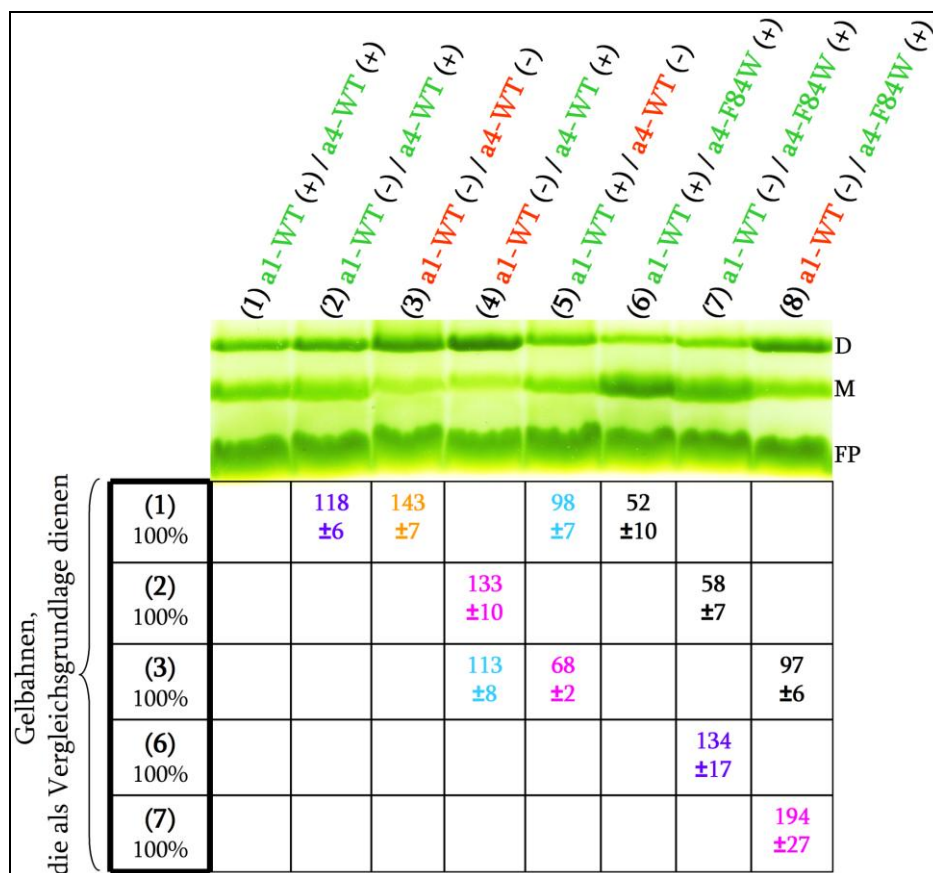


Abb. 31: Einfluss der Lhc-Species und des Lhca1-His-tags auf die Heterodimerausbeuten von Lhca1 und Lhca4, nach Auftrennung der Rekonstitutionsansätze im schwach denaturierenden Gel und anschließender densitometrischer Quantifizierung. Vergleichsgrundlage aller Experimente sind die in den Klammern (1, 2, 3, 5, 6) stehenden Gelbahnen (linke Spalte: Basiswert 100%). Alle Mittelwerte aus mindestens 3 Experimenten sind in Prozent und mit Standardabweichung ($\pm$) angegeben. (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment; (grün): Arabidopsis (rot): Tomate (schwarz): Einfluss der Phe84 Mutation in Verbindung mit unterschiedlichen Lhca1-WT Spezies (violett): His-tag-Faktor am Lhca1; (orange): Spezies-Faktor im Dimer verglichen; (blau): Lhca4-Spezies-Faktor; (pink): Lhca1-Spezies- bzw. C-Terminus-Faktor; (+): Protein mit His-tag; (-): Protein ohne His-tag.

Im Falle der F84-Untersuchung im Lhca4 wurde in einem ersten Experiment der Lhca1-WT von Tomate und Lhca4-F84W von Arabidopsis in einem Rekonstitutionsexperiment verwendet (Abb. 31, Bahn 8) und mit dem Tomaten-WT-Dimer (Bahn 3) verglichen, wobei kein Einfluss des F84 (97%) auf die Dimerisierung nachgewiesen werden konnte.

Erst in einem zweiten Experiment wurde die Lhca4-F84W-Mutante mit einem Lhca1-WT aus Arabidopsis rekonstituiert (Bahn 6) und mit einem Arabidopsis-WT-Dimer (Bahn 1) verglichen (ca 52% Ausbeutenverlust), wodurch der Nachweis gelang, dass F84 an der Dimerisierung beteiligt sein könnte (siehe Kap. D2.1.3). Eine Rekonstitution des Lhca4-F84W von Arabidopsis mit dem Lhca1-WT aus Tomate führte zu einer Maskierung des F84-Einfluss auf die Heterodimerisierung.

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern die Lhca1-Species (genauer: dessen C-Terminus), der Lhca1-His-tag und die Lhca4-Species die Entdeckung der Interaktion zwischen F84 des Lhca4 und dem Lhca1 behindert haben.

Ein Vergleich der beiden WT-Dimerrekonstitutionen (orange) zeigt, dass die beiden Tomatenproteine (Bahn 3) zu einer ca. 40% höheren Dimerausbeute fähig waren, als die beiden Arabidopsisproteine (Bahn 1).

Zur Untersuchung des Effekts der Lhca4-Species wurden 2 Experimente durchgeführt (blau). Bei Rekonstitution eines Tomaten-Lhca4 mit einem Lhca1 aus Arabidopsis (Bahn 5) konnte kein signifikanter Unterschied zur Ausbeute des Arabidopsis-Dimers (Bahn 1) festgestellt werden. Wurde durch umgekehrte Herangehensweise, die Ausbeute eines Tomaten-Lhca1/Arabidopsis-Lhca4-Dimers (Bahn 4) mit einem reinen Tomaten-Dimer (Bahn 3) verglichen, waren die Unterschiede der beobachteten Ausbeuten ebenfalls nicht signifikant.

Dahingegen waren die Änderungen der Dimerausbeuten, die durch Variationen des His-tags am Arabidopsis-Lhca1 auftraten durchaus signifikant. Ohne His-tag am Lhca1 (Bahn 2 verglichen mit Bahn 1) erhöhte sich die Dimerausbeute im Arabidopsis-Wildtydimer um bis zu 18% (violett) und im Arabidopsis-Dimer mit F84-Mutation am Lhca4 sogar um 34% (Bahn 7 verglichen mit Bahn 6), obwohl bei letzterem die Standardabweichung mit 17% ebenfalls stark zunahm.

Im dritten Teilversuch wurden zwei verschiedenen Lhca1-Spezies mit unterschiedlichem C-Terminus, bzw. deren Einfluss auf die Heterodimererausbeuten untersucht. Wurde der Tomaten-Lhca1 mit dem Arabidopsis-Lhca4 rekonstituiert (Bahn 4), lagen deren Dimerausbeuten 33% über denen des reinen Arabidopsis-Dimers (Bahn 2). Wurde ein Dimer aus Arabidopsis-Lhca1 mit His-tag und Tomaten-Lhca4 (Bahn 5) mit einem Tomaten-Dimer (Bahn 3: immer ohne His-tag) verglichen, sanken die Dimerausbeuten auf 68% ab. Am deutlichsten konnte der Ausbeute-steigernde Effekt des Tomaten-Lhca1 im Vergleich mit dem Arabidopsis-Dimer mit F84-Mutation beobachtet werden, wobei trotz hoher Standardabweichung ein Anstieg der Dimerausbeuten um 94% beobachtet werden konnte.

Von den drei untersuchten Kriterien, die im Verdacht stehen eine Erhöhung oder Reduktion der Dimerausbeuten zu verursachen, hatte die Lhca4-Species - falls überhaupt - den geringsten Effekt. Ein His-tag am Lhca1 bewirkte eine deutliche Reduktion der Dimerausbeuten. Am stärksten beeinflusste aber die Lhca1-Species die Dimerausbeuten, wobei der Lhca1 aus Tomate - egal mit welchem Lhca4 rekonstituiert – viel höhere Dimerausbeuten aufwies als der Arabidopsis-Lhca1.

2.1.4 Einfluss der stromalen Schleife auf das Oligomerisierungsverhalten

Sequenzalignments der stromalen Schleifenregionen zeigten, dass diese Domäne unterschiedlich stark konserviert ist (Abb. 18B). Während die erste Hälfte, die in Richtung Helix 2 orientiert ist keine identischen AS aufweist, treten vor allem bei den Lhcb-Proteinen in der 2. Hälfte beträchtliche Sequenzidentitäten auf. Neben dem etwas geringeren Konservierungsgrad in Hälfte 2 der Lhca-Proteine untereinander, ist ein weiteres Unterscheidungsmerkmal die Präsenz zusätzlicher Aminosäuren in der nicht

konservierten Region der Lhca-Proteine, wodurch deren stromale Schleifen - mit Ausnahme des Lhcb6 - im Schnitt um ca. 30% länger sind als die der Lhcb-Proteine. Für die Versuche bedeutete dies, dass den 37 AS der stromalen Lhca4-Schleife 28 AS des Lhcb1 und lediglich 25 AS des Lhcb4 gegenüber standen. Da Lhcb1-Mutanten mit Punktmutationen in der stromalen Schleife oftmals schlecht oder nicht rekonstituierbar waren (Mick, 2005; Geister, 2003), war nicht absehbar, ob ein gegenseitiger Tausch der kompletten Domänen die Tertiärstruktur der Monomerkomplexe negativ beeinflusst. Darüber hinaus ist die stromale Domäne aufgrund ihrer Heterogenität ein viel versprechender Aspirant für Protein-Protein-Wechselwirkungen, die das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten bewirken.

Die Herstellung der Mutanten erfolgte analog zu den luminalen Schleifen-Mutanten mittels 3- bzw. 4-stufiger PCR (Kap. C1.7.4.2) und einer sich anschließenden heterologen Proteinexpression in *E. coli* Zellen. Auf Basis der Lhca4-SLb1-Mutante wurde zusätzlich eine Wiederherstellungsmutante mit 4 zurückgetauschten original Lhca4-AS generiert (A107Q, G108D, N109I, G110K, P111N und L112P), um die Fähigkeit zur Dimerisierung mit dem Lhca1-WT wieder zu etablieren.

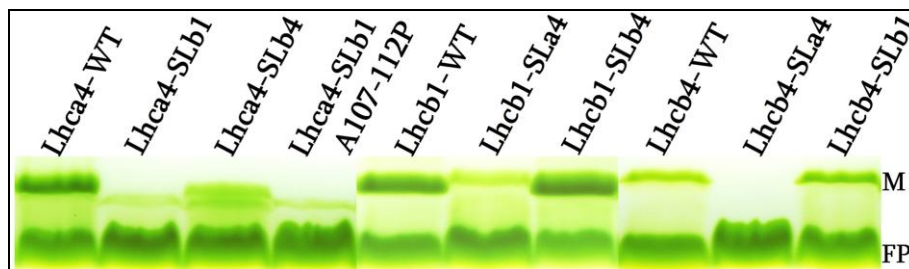


Abb. 32: Monomerrekonstitution von Lhca4-, Lhcb1- und Lhcb4-Einzeldomänenmutanten mit ausgetauschter stromaler Schleifenregion und Lhca4-SLb1-Mutante mit teilweise wiederhergestellter stromaler Lhca4-Schleife (Lhca4-SLb1-A107-112P), nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Als erstes wurde die Fähigkeit zur Ausbildung stabiler Monomerkomplexe nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel getestet (Abb. 32). Die Lhca4-Mutanten mit ausgetauschter stromaler Schleife zeigten im Vergleich zum Lhca4-WT erheblich verringerte Komplexausbeuten und ein schnelleres Laufverhalten. Auch die Lhca4-SLb1-Mutante, in welcher 6 AS der Lhca4-Schleife zurückmutiert wurden, wies eine geringere Intensität der Monomerbande auf.

Der Austausch der stromalen Schleife im Lhcb1 wirkte sich je nach Herkunft der inserierten AS unterschiedlich auf die Monomerstabilität der Mutanten aus. Während der Lhcb1-SLa4 ähnlich den Lhca4-Mutanten zur Bildung instabiler Monomerkomplexe neigte, erreichte die Lhcb1-Mutante mit stromaler Lhcb4-Schleife dem WT vergleichbare Monomerausbeuten.

Im Lhcb4 führte der Einbau der stromalen Lhca4-Schleife sogar zu einem kompletten Fehlen der Monomerbande. Dahingegen verringerte die stromale Lhcb1-Schleife die Monomerausbeuten nicht, sondern vermochte diese im WT-Vergleich sogar zu steigern. Untersuchungen von Monomerkomplexen, deren Rekonstitutionsansätze im Saccharosedichtegradienten aufgetrennt wurden belegten, dass alle Mutanten mit ausgetauschter stromaler Schleife in der Lage waren Monomerkomplexe zu bilden (nicht gezeigt). Da die Ausbeuten trotz schonender Auftrennung verglichen mit den Wildtypen dennoch reduziert waren, müssen alle Ergebnisse, welche die Dimer- oder Trimerbildung dieser Mutanten beschreiben unter Vorbehalt betrachtet werden, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Beeinflussung der Monomerbildung/stabilität die Oligomerisierung beeinträchtigt.

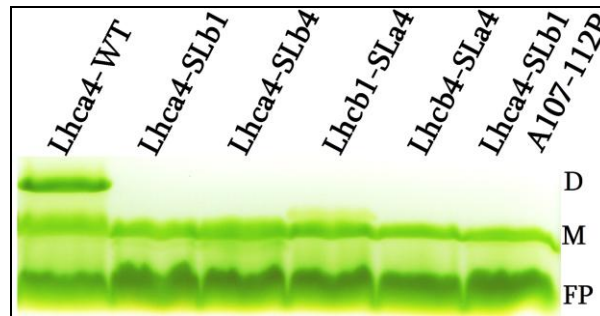


Abb. 33: Dimerrekonstitution von Lhca4-, Lhcb1- und Lhcb4- Einzeldomänenmutanten mit ausgetauschter stromaler Schleifenregion und Lhca4-SLb1-Mutante mit teilweise wiederhergestellter stromaler Lhca4-Schleife, nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT. (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Die Dimerisierungsexperimente des Lhca1-WT mit chimären Lhc-Proteinen, die entweder die stromale Schleife oder das Grundgerüst des Lhca4 beinhalten, offenbarten, dass keine der untersuchten stromalen Mutanten in der Lage war, ein stabiles Heterodimer auszubilden (Abb. 33). Weder die Lhca4-Mutanten mit Lhcb1- oder Lhcb4-Schleife, noch die Wiederherstellungsmutante Lhca4-SLb1-A107-112P, deren Zweck es war die Dimerisierungsfähigkeit der Lhca4-SLb1 Mutante wieder zu etablieren, konnten im Gel nachweisbare Dimerkomplexe mit dem Lhca1-WT bilden. Außerdem konnte durch den Transfer der stromalen Schleifenregion des Lhca4 keine Dimerisierungsfähigkeit auf Lhcb1 oder Lhcb4 übertragen werden.

Um den Beitrag der stromalen Lhcb1-Schleife an der Trimerisierung zu ermitteln, wurden die Rekonstitutionsansätze aller Lhcb1-haltigen Proteine im schwach denaturierenden Gel aufgetrennt (Abb. 34). Eine Substitution der stromalen Schleife im Lhcb1 hatte zur Folge, dass weder die SLa4-, noch die SLb4-Mutante Trimere ausbilden konnte. Auch der alleinige Transfer der stromalen Lhcb1-Schleife war nicht ausreichend, um trimere Lhca4- oder Lhcb4-Komplexe zu rekonstituieren.

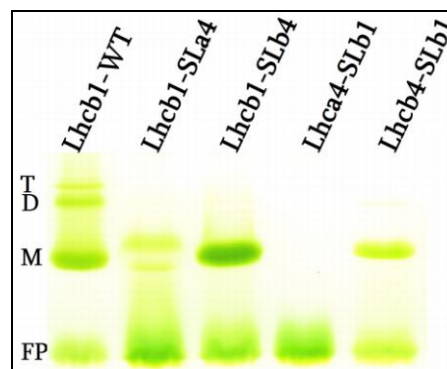


Abb. 34: Trimerrekonstitution von Einzeldomänenmutanten des Lhcb1 mit ersetzter stromaler Schleifenregion, sowie Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit der stromalen Schleife des Lhcb1, nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. (T): Trimerbande; (D) unspezifische Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Zwecks schonender Analyse wurden die Dimer- (Abb. 34A) und Trimerrekonstitutionen (Abb. 34B) auch im Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Aber auch durch Verwendung dieses Trennverfahrens war weder der Nachweis von Heterodimeren, noch von Trimeren möglich. Da aus Gründen der geringen Monomerausbeuten keine 100%ige Aussage über die Beteiligung der stromalen Schleifen am Dimer- und Trimerisierungsprozess zu treffen ist, besteht tendenziell dennoch eine sehr hohe

Wahrscheinlichkeit, dass die stromalen Schleifenregionen Strukturen enthalten, die auf beide Oligomerisierungsformen einen starken Einfluss ausüben.

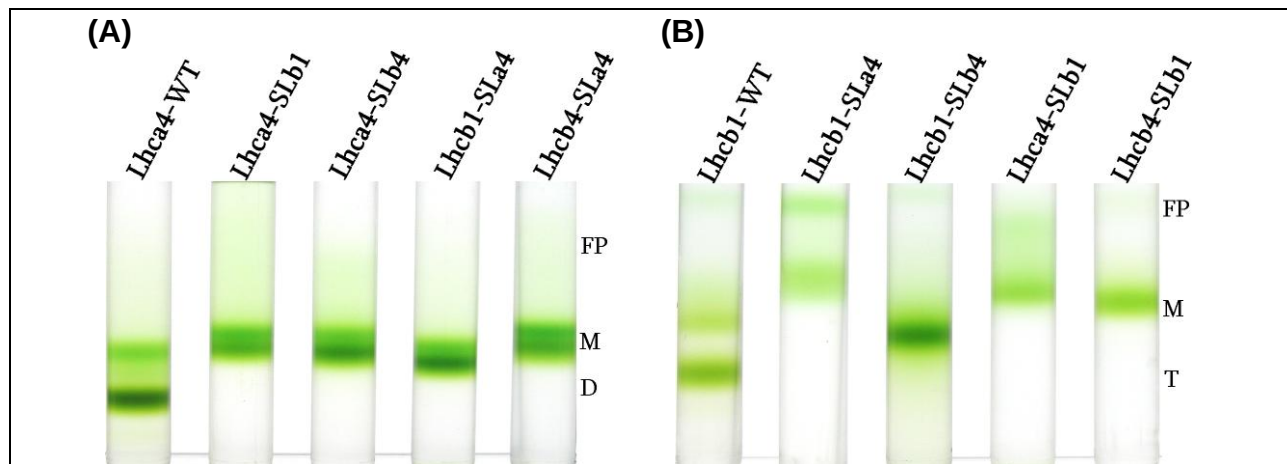


Abb. 35: Dimer- (A) und Trimerrekonstitution (B) von Einzeldomänenmutanten mit substituierter stromaler Schleife nach 24- (A) bzw. 16-stündiger (B) Auftrennung im Saccharosedichtegradienten. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Trimerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (T): Trimerbande; (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

2.1.4.1 Eingrenzung der mit dem Lhca1 interagierenden Lhca4-Aminosäuren durch Erzeugung von Doppel- und Bereichsmutanten

Um genaueren Einblick hinsichtlich der für die Dimerisierung wichtigen AS in der stromalen Schleife zu erhalten, wurden auch in der stromalen Schleife des Lhca4 Mutationsanalysen durchgeführt.

Um die für Mutationsanalysen geeigneten AS-Substituenten zu finden, wurden zuvor Sequenzalignments mit Lhca-Proteinen angefertigt (Abb. 18B oben). Da aus früheren Untersuchungen (Corbet, 2004) eine Beteiligung von AS der 2. Helix des Lhca4 bei der LHCI-730-Assemblierung bekannt war und die 1. Hälfte der stromalen Schleife kaum konservierte AS aufweist, wurden zunächst die AS getauscht, welche in der Nähe der 2. Helix positioniert sind und zudem eine Abweichung zur AS-Sequenz des Lhca3 aufweisen. Wie bereits in Kap. D2.1.3.1 erwähnt ist der Lhca3 weder in der Lage mit Lhca1, noch mit dem Lhca4 zu interagieren.

Die Betrachtung der Sequenzalignments führte ausgehend vom Lhca4-WT zur Herstellung von einer Doppel- (Lhca4-I109W-K110Y), zweier Bereichs- (Lhca4-V115-118Q und Lhca4-P119-122G) und einer Kombinationsmutante (Lhca4-V115-122G), die alle 8 AS-Änderungen, die in den beiden Bereichsmutanten jeweils zur Hälfte vorgenommen wurden, beinhaltet. Die Generierung der Mutanten erfolgte durch Anwendung einer 2-stufigen Mutagenese-PCR (Kap. C1.7.2). Die aufgereinigten Apoproteine wurden rekonstituiert, im Gel aufgetrennt und densitometrisch ausgewertet oder einer Ultrazentrifugation im SDG unterzogen.

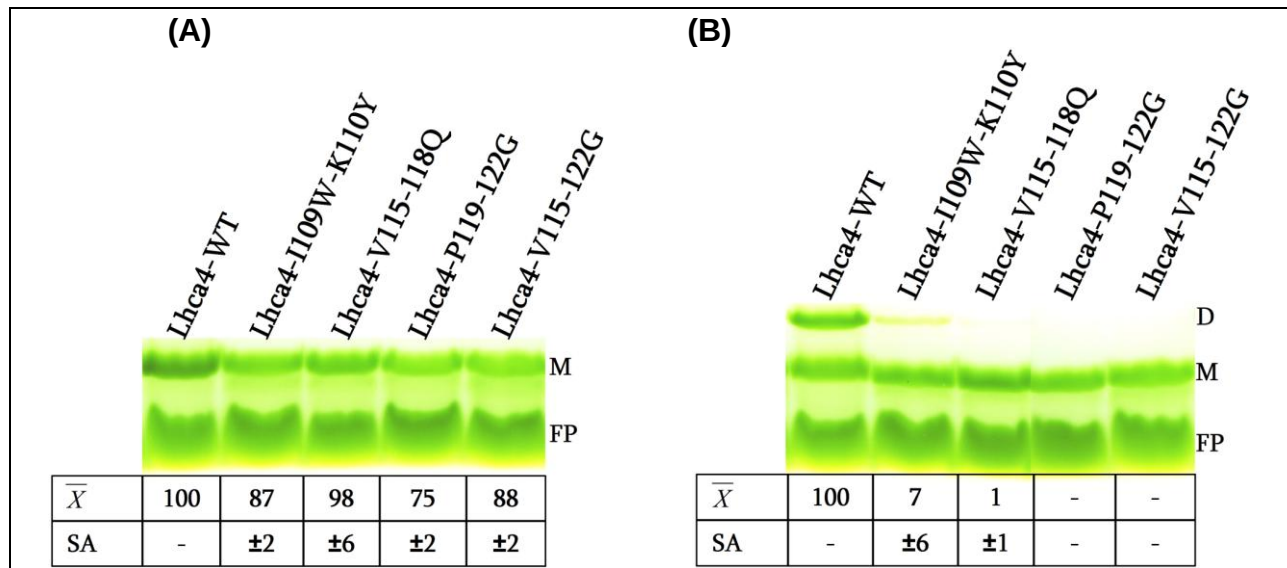


Abb. 36: Monomer- (A) und Dimerrekonstitution (B) von Lhca4-Punktmutanten mit Substitutionen gegen Lhca3 Aminosäuren in der stromalen Schleife, nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel und anschließender densitometrischer Quantifizierung von jeweils 4 Experimenten. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Monomerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment; ($\bar{X}$): Mittelwert; (SA): Standardabweichung.

Die Monomerrekonstitutionen (Abb. 36A) mit anschließender Gelauf trennung zeigten, dass die Mutanten mit AS-Substitutionen in der stromalen Lhca4-Schleife stabile Monomerkomplexe bilden konnten. Die Doppelmutante Lhca4-I109W+K110Y wies gegenüber dem WT eine um ca. 13% reduzierte Komplexausbeute auf. Die Bereichsmutante V115-118Q verhielt sich diesbezüglich wie der Wildtyp. Eine 25%ige Ausbeutenreduktion war bei der P119-122G-Mutante zu beobachten. Der Austausch dieser vier AS beeinflusste die Monomerausbeute (88%) nicht so stark im Vergleich zur Kombinationsmutante V115-122 bei der zusätzlich noch die vier AS aus der anderen Bereichsmutante mutiert waren.

Die Auftrennung der Dimerrekonstitutionen (Abb. 36B) mit Lhca1-WT im schwach denaturierenden Gel offenbarte, dass von allen untersuchten Mutanten der stromalen Lhca4-Schleife nur die Doppelmutante - verglichen mit den Wildtypen - eine mit 7% sehr schwache Heterodimerbande zeigte. Spuren einer Dimerbande (1%) ließen sich bei der Bereichsmutante V115-118Q identifizieren, welche aber unter Berücksichtigung der gleich hohen Standardabweichung als nicht relevant zu betrachten waren. Sowohl die zweite Bereichsmutante P119-122G, als auch die Kombinationsmutante V115-122G konnte nach Gelauf trennung keine stabilen Heterodimere mit dem Lhca1-WT ausbilden.

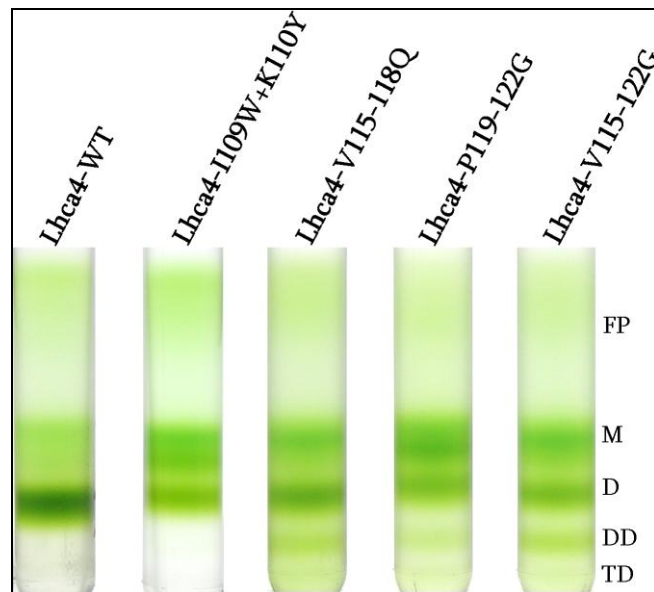


Abb. 37: Dimerrekonstitution von Lhca4-Punktmutanten mit gegen Lhca3 Aminosäuren substituierte Bereiche der stromalen Schleife nach 24-stündiger Auftrennung im Saccharosedichtegradienten. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT. (TD): Trippeldimerbande; (DD): Doppeldimerbande; (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Die Auftrennung der Dimerrekonstitutionsansätze per Saccharosedichtegradienten-UZ lieferte unerwartete Ergebnisse. Während bei der Doppelmutante I109W+K110Y - wie im Gel beobachtet - niedrigere Dimerausbeuten als bei der Wildtyprekonstitution nachzuweisen waren, wurden in Versuchen mit den drei anderen Mutanten mehrere höhermolekulare Banden beobachtet. Die Dimerausbeuten waren in diesen Fällen auch stark reduziert, jedoch war ein gewisser Proteinanteil in höhermolekularen Banden enthalten, bei welchen es sich möglicherweise um Doppel- und Trippel-Dimere handelt. AS-Mutationen im Bereich 115-122 der stromalen Schleife scheinen auf Kosten der Dimerausbeuten, eine doppel- oder dreifach Assemblierung des LHCI-730 zu forcieren, während Mutationen des I109 und K110 lediglich eine Reduktion der Dimerausbeute zur Folge hatte.

2.1.5 Bedeutung der Helix 2 für das Oligomerisierungsverhalten von Lhc-Proteinen

Die Region der 2. Helix ist eine der schwach konserviertesten Lhc-Proteinabschnitte innerhalb dieser Proteinfamilie (Abb. 16). Aufgrund der Annahme, dass alle Lhc-Proteine eine dem aus der LHCI-Struktur bekannten Lhcb1 ähnliche Struktur aufweisen, und des weiteren alle schwach bis nicht konservierten Bereiche für eine Interaktion der Lhc-Proteine untereinander, oder als Kontaktpunkte mit anderen Proteinen des Photosystems in Betracht kommen, spricht für das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten verantwortlich sind, stand die Helix 2 des Lhca4 schon seit längerem im Verdacht eine essentielle Rolle bei der Assemblierung des LHCI-730 zu spielen.

Eine detaillierte Betrachtung dieser Region offenbarte drei mehr oder weniger große Bereiche, die vor allem zwischen Lhca- und Lhcb-Proteinen voneinander abweichend sind (Abb. 17A). Die Lhca-Proteine untereinander sind in der 2. Helix etwas stärker konserviert (Abb. 17B). Ein Vorteil beim Tausch dieser Domäne ist die gleich hohe Zahl an AS, die in der 2. Helix aller Lhc-Proteine lokalisiert sind, wodurch weder zusätzliche AS in die entstehenden Mutanten inseriert wurden, noch eine Verkürzung der Primärstruktur eintrat.

Zu Beginn der Untersuchungen war die Orientierung der Helix 2 des Lhca4 zum Lhca1 noch nicht bekannt. Erst die Kristallstruktur des Photosystem I mit 4,4 Å Auflösung (Ben-Shem et al., 2003) und eine Modellierung des Lhca4 (Melkozernov and Blankenship 2003) in Kombination mit den von Corbet (2004) erzielten Daten aus Experimenten mit einer chimären Lhca4-Helix 2 Domänenmutante, lieferten nicht nur Einsicht über die allgemeine Bedeutung der 2. Helix bei der Interaktion mit dem Lhca1, sondern auch Informationen über ein am Histidin 99 des Lhca4 koordiniertes Chlorophyll.

Die Helix 2 Mutanten des Lhca4 sollten die vorherigen Untersuchungsergebnisse bestätigen. Aus den gewonnenen Erkenntnissen heraus, ließ sich zudem ein interessantes Experiment ableiten, in welchem versucht werden sollte ein chimäres Lhca1-Protein mit der 2. Helix des Lhca4 zu generieren, um eine Selbstassemblierung dieser Mutante hervorzurufen, was im Idealfall die Bildung linearer Molekülketten zur Folge gehabt hätte.

Auch im Lhcb1 könnte die zweite Helix eine Rolle bei der Trimerisierung spielen, da in den vorliegenden LHCI-Kristallstrukturen (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005) die zweiten Helices immer in Richtung der benachbarten Apoproteine orientiert sind und darauf bezogen auch Wechselwirkungen prognostiziert wurden.

Aus oben genannten Gründen wurden neben den sechs üblichen Einzeldomänenmutanten von Lhca4, Lhcb1 und Lhcb4 auch eine Lhca1-Mutante mit der 2. Helix des Lhca4 generiert. Die Herstellung erfolgte im Gegensatz zu den vorherigen Einzeldomänenmutanten mit intern zu tauschenden Proteinabschnitten mittels Quikchange Mutagenese-Kit (Kap. C1.7.5) und anschließender Apoproteingewinnung.

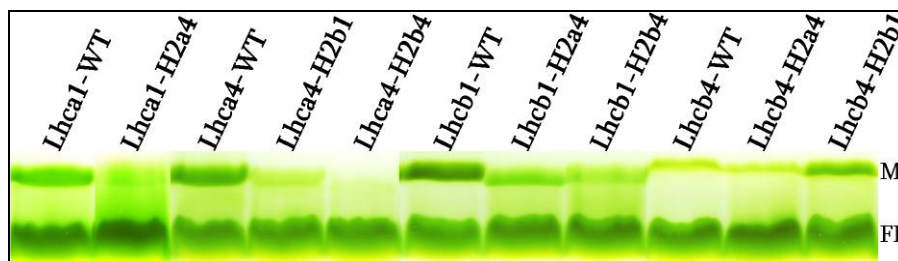


Abb. 38: Monomerrekonstitution von Lhca1-, Lhca4-, Lhcb1- und Lhcb4- Einzeldomänenmutanten mit substituierter Helix 2, nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Zur Prüfung der Monomerstabilität wurden die Rekonstitutionsansätze der Helix 2 Mutanten in einem schwach denaturierenden Gel aufgetrennt und mit den zugehörigen Wildtypen verglichen (Abb. 38). Darüber hinaus konnte bereits die möglicherweise mit sich selbst interagierende Lhca1-H2a4-Mutante getestet werden. Sie bildete aber keine höhermolekularen stabilen Banden im Gel und wies auch eine im Vergleich zum Lhca1-WT extrem instabile und schwach ausgeprägte Monomerbande auf.

Die Komplexausbeuten der monomeren Lhca4-Mutanten mit der Helix 2 aus Lhcb1- oder Lhcb4-Proteinen waren im Gegensatz zum Lhca4-Wildtyp sehr stark reduziert (Lhca4-H2b1), oder es waren im Gel sogar nur Spuren der zerfallenen Monomere erkennbar (Lhca4-H2b4).

Die zwei Lhcb1-Mutanten mit substituierter Helix 2 wiesen im Gel zwar etwas höhere Monomerausbeuten als die äquivalenten Lhca4-Mutanten auf, diese waren aber gegenüber dem Lhcb1-WT dennoch stark reduziert.

Interessanterweise war die einzige Mutante, die ihren Wildtyp bezüglich der Monomerausbeute übertraf der Lhcb4-H2b1. Die zweite Helix des Lhca4 im Lhcb4

befähigte diese Mutante zwar zur Ausbildung einer Monomerbande, die dem Lhcb4-WT ähnelte, aber es waren Spuren des Komplexzerfalls im Gel zu erkennen.

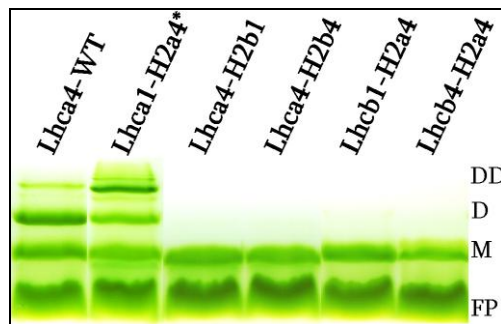


Abb. 39: Dimerrekonstitution von Lhca1-, Lhca4-, Lhcb1- und Lhcb4- Einzeldomänenmutanten mit substituierter Helix 2, nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten alle bis auf die Lhca1-H2a4-Mutante* zusammen mit dem Lhca1-WT. (DD): Doppeldimerbande; (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment; (*): mit Lhca4-WT rekonstituiert.

Eine Gelauf trennung der Dimerrekonstitutionen (Abb. 39) bestätigte frühere Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung der Helix 2 des Lhca4 bei der LHCI-730 Assemblierung. Während die Lhca1-Mutante mit Helix 2 des Lhca4 kaum in der Lage war stabile Monomere auszubilden, gelang in Kombination mit dem Lhca4-WT die Rekonstitution von mehreren hochmolekularen Banden, wobei die Doppeldimerbande am stärksten ausgebildet schien. Zudem war eine schwache Trimerbande unterhalb der DD-Bande zu erkennen. Darüber gelegen existierten mehrere visuell kaum trennbare höhermolekulare Banden, deren zurückgelegte Laufstrecken nur knapp unterhalb des Sammelgels endeten.

Alle mit dem Lhca1-WT rekonstituierten Lhca4-Mutanten mit getauschter Helix 2 waren außer Stande nach Gelauf trennung nachweisbare Dimerbanden zu bilden. Durch Transfer der 2. Helix des Lhca4 war es nicht möglich auch die Dimerisierungseigenschaft auf Lhcb1 oder Lhcb4 zu übertragen. Da die Helix 2 Mutanten im Allgemeinen und die Lhca4-Mutanten im Speziellen hauptsächlich instabile Monomerkomplexe bildeten, dürften die Ergebnisse der Dimerisierungsexperimente eigentlich nur als Tendenz betrachtet werden. Da aber teilweise wenig Monomere und gar keine Dimere gebildet wurden, ist trotzdem von einem starken Einfluss der 2. Helix des Lhca4 auf die Heterodimerisierung auszugehen.

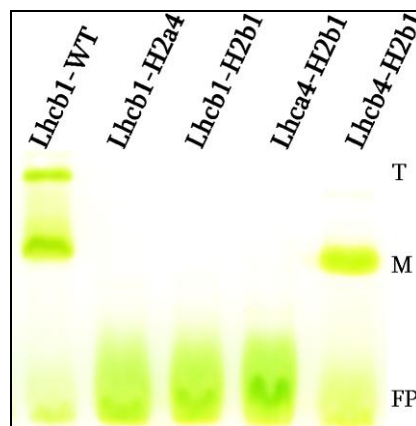


Abb. 40: Trimerrekonstitution von Einzeldomänenmutanten des Lhcb1 mit ersetzter Helix 2, sowie Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit der 2. Helix des Lhcb1, nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. (T): Trimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Die Gelaufftrennung der Trimerrekonstitutionen (Abb. 40) aller Helix 2 Mutanten mit Lhcb1-Bestandteilen zeigte, dass die 2. Helix des Lhcb1 auch für die Trimerisierung eine essentielle Domäne darstellt. Aufgrund der teilweise instabilen Monomerausbeuten war eine Reduktion der Ausbeuten zu erwarten. Nach einer Trimerisierung via Ni-Säule war aber weder die Lhcb1-H2a4-, noch die Lhcb1-H2b4-Mutante in der Lage Monomer- oder stabile Trimerkomplexe auszubilden, da, wie schon in Versuchen mit Mutanten der luminalen Schleife beobachtet (Kap. D2.1.3), instabile Monomer auf Ni-Säulen vollständig zerfallen. Das gleiche Bild lieferte eine Trimerekonstitution der Lhca4-Mutante mit Helix 2 des Lhcb1. Nur die Lhcb4-H2b1-Mutante, die auch nach Gelaufftrennung sehr hohe Monomerausbeuten zeigte, war auch nach erfolgloser Trimerisierung noch als stabiles Monomer von der Ni-Säule zu eluieren.

Die Dimer- und Trimerrekonstitutionsansätze wurden zwecks schonender Auftrennung auch per Saccharosedichtegradient separiert. Die Dimerisierungsexperimente (Abb. 41A) bestätigten die gewonnenen Erkenntnisse aus der Gelaufftrennung. Keine der Helix 2 Mutanten mit Lhca4-Bestandteil konnte mit dem Lhca1-WT Heterodimere bilden. Die Lhca1-H2a4-Mutante bildete aber zusammen mit dem Lhca4-WT weitaus weniger hochmolekulare Banden aus, als nach der Auftrennung im schwach denaturierenden Gel zu vermuten gewesen wäre. Zudem war im Gradienten die Ausbeute an herkömmlichen Dimeren höher und die Doppeldimerausbeute relativ dazu reduziert. Auffällig war im Vergleich mit den übrigen Gradienten ein grüner Hintergrund im unteren Abschnitt, der sich eventuell aus zerfallenen höhermolekularen Komplexen oder unspezifischen Aggregaten zusammensetzen könnte. Auf dem Boden des Zentrifugenröhrchens befanden sich pelletierte Chlorophyllaggregate, die ebenfalls auf einen Zerfall hindeuten.

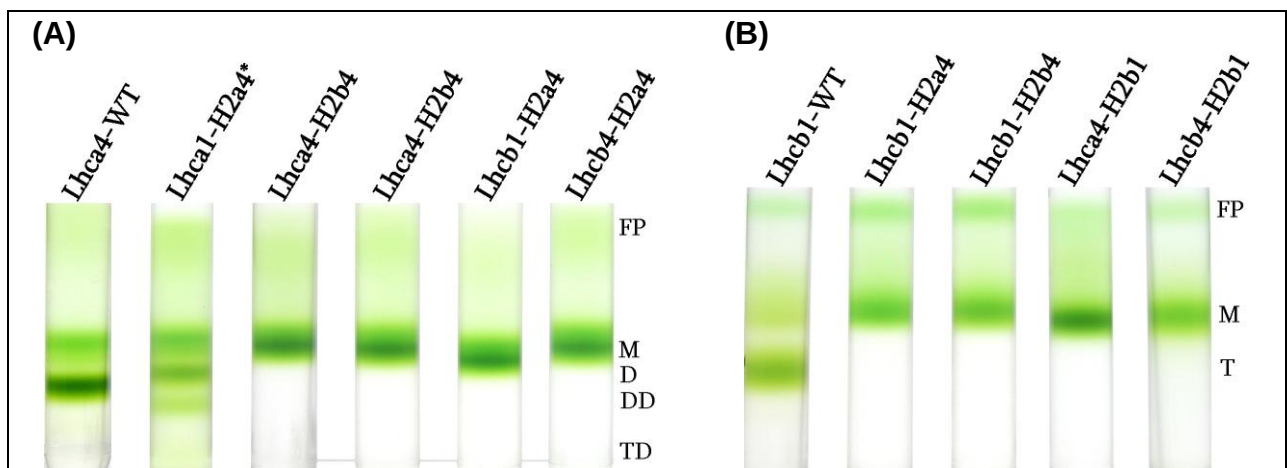


Abb. 41: Dimer- (A) und Trimerrekonstitution (B) von Einzeldomänenmutanten mit substituierter Helix 2 nach 24- bzw. 16-stündiger Auftrennung im Saccharosedichtegradienten. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten alle bis auf die Lhca1-H2a4-Mutante* zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Trimerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (T): Trimerbande; (TD): Trippeldimerbande; (DD): Doppeldimerbande; (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment; (*): mit Lhca4-WT rekonstituiert.

Im Gegensatz zur Gelaufftrennung konnten nach Auftrennung der Trimerekonstitutionen via SDG-UZ (Abb. 41B) bei allen Mutanten stabile Monomerkomplexe beobachtet werden. Aber auch bei diesen Experimenten wurden weder bei den Lhcb1-Mutanten mit substituierter Helix 2, noch bei den Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit Helix 2 des Lhcb1 Trimerbanden identifiziert.

Da die obigen Experimente mit Einzeldomänenmutanten die Bedeutung der Helix 2 des Lhca4 für die LHCI-730 Assemblierung bestätigte, war es im weiteren experimentellen Verlauf notwendig, diese Region einer ausführlichen Mutationsanalyse zu unterwerfen, da Domänentauschexperimente alleine nicht zur Aufklärung des Beitrags einzelner AS zur Lhca1-Lhca4-Interaktion genügen. Die Experimente basierten auf Grundlage der Lhca4-H2a3-Mutante von Corbet (2004), die durch Einbau der Helix 2 des Lhca3 keine Heterodimere ausbilden konnte. Als substituierende Aminosäuren wurden vorwiegend Lhca3-AS gewählt, da der Lhca3 weder Komplexe mit dem Lhca4, noch mit dem Lhca1 bildet.

Neben Bereichsmutanten, die jeweils ein Drittel der Lhca4-Helix umfassten, wurden auch Einzelmутanten generiert, um AS in einem zuvor für die Heterodimerisierung als wichtig befundenen Teilabschnitt zu identifizieren. Ein nächster Schritt war der kombinierte Austausch mehrerer für die Dimerisierung wichtiger AS und der Versuch, die Fähigkeit zur Heterodimerisierung in der Lhca4-H2a3-Mutante wiederherzustellen, indem wichtige original Lhca4-AS wieder in die Mutante eingebracht wurden. Außerdem wurde der Versuch unternommen, Lhca1- und Lhca4-AS zu identifizieren, die miteinander wechselwirken. Alle Punkt-, Bereichs- und Wiederherstellungsmutanten bezüglich Helix 2 des Lhca4 der nachfolgenden Unterkapitel wurden auf Basis des Lhca4-Proteins von Tomate gestaltet und mittels 2-stufiger PCR-Mutagenese (Kap. C1.7.2) hergestellt. Die für die Dimerisierungsexperimente verwendeten WT und Punktmutanten des Lhca1 in Dimerisierungsexperimenten waren ebenfalls Tomateproteine. Es wurden Tomatenproteine verwendet, da bereits einige Lhca1- und Lhca4-Mutanten existierten, die aus früher durchgeführten Untersuchungen stammten (Lago-Places, 2000; Thomé, 2000; Rautenberg, 2002; Rupprecht, 2002; Corbet 2004).

2.1.5.1 Untersuchung von 3 Aminosäure-Bereichen der Helix 2 des Lhca4 auf Interaktion mit Lhca1

Nachdem der Nachweis für das essentielle Mitwirken der 2. Helix des Lhca4 an der LHCI-730-Assemblierung erbracht war (Corbet, 2004), was auch die jüngsten Untersuchungen mit Einzeldomänenmutanten von Arabidopsis-Proteinen untermauerten (Kap. D2.1.5), wurden Lhca4-Mutanten generiert, in welchen nur Teilsegmente der Helix 2 gegen Lhca3-AS ersetzt wurden. Zu diesem Zweck wurde, wie in Abb. 42 dargestellt, die Lhca4-Sequenz (linke Seite) der Helix 2 mit der entsprechenden Lhca3-Sequenz (rechte Seite) verglichen, wodurch sich 3 AS-Bereiche in der Sequenz offenbarten, die zwischen den zwei Lhca-Proteinen unterschiedlich sind. Die drei daraus resultierenden Helix 2 Bereichsmutanten (Lhca4-S86-88Y, -I93-96A und -F98-103H) wurden unter den Gesichtspunkten Monomerstabilität und Fähigkeit zur Dimerisierung untersucht und die nachfolgenden densitometrisch ausgewertet. Zusätzlich wurde eine 4. Mutante (Lhca4-S86-88D) im Bereich des Serinclusters angefertigt, bei welcher alle 3 Serinreste gegen 3 Aspartatreste getauscht wurden.

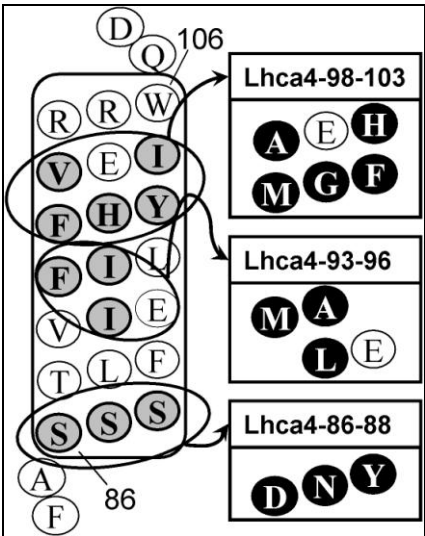


Abb. 42: Erzeugung von 3 Bereichsmutanten in Helix 2 des Lhca4 zur Untersuchung der Interaktionsbereiche mit Lhca1-WT. Die dick umkreisten, hellgrau hinterlegten Aminosäuren der Helix 2 des Lhca4 wurden gegen die schwarz gekennzeichneten Aminosäuren substituiert, die in der 2. Helix des Lhca3 an entsprechender Position zu finden sind.

Die Auftrennung der Monomerekonstitutionen (Abb. 43A) aller Bereichsmutanten machte deutlich, dass die Lhca4-S86-88Y-Mutante mit Lhca3-AS eine dem WT vergleichbare Monomerausbeute aufwies, während die Komplexe der äquivalenten Aspartat-Mutante nur zu 37% im Gel detektierbar waren. Noch deutlich reduzierte Monomerausbeuten (69%) waren bei Monomeren der Lhca4-I93-96A-Mutante zu erkennen. Im Gegensatz dazu war die Monomerbande der F98-103H-Mutante mit 92% Ausbeute kaum beeinträchtigt.

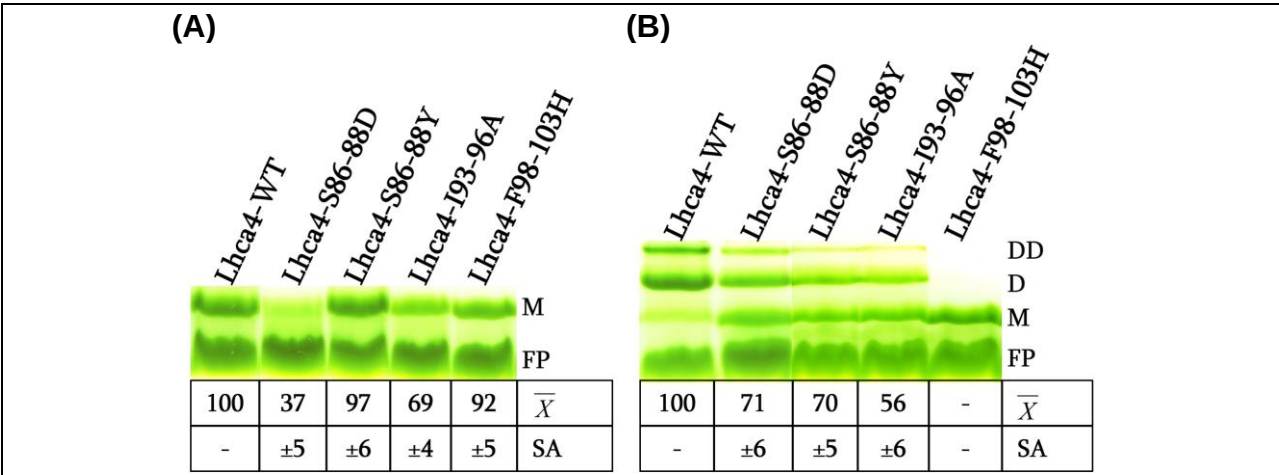


Abb. 43: Monomer- (A) und Dimerrekonstitution (B) von Lhca4-Bereichsmutanten in der Helix 2-Region nach Auftrennung per schwach denaturierender Gelelektrophorese. Original Aminosäuren des Lhca4 wurden durch Lhca3 Aminosäuren an äquivalenter Position ersetzt und mit einer Wildtyprekonstitution verglichen. Um Monomer- und Dimerausbeuten densitometrisch (Tabellen) zu bestimmen, wurden 4-6 Experimente gemittelt. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Monomerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (DD): Doppeldimerbande; (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment; ($\bar{x}$): Mittelwert; (SA): Standardabweichung.

Die Dimerrekonstitutionsansätze mit dem Lhca1 wurden ebenfalls in schwach denaturierenden Gelen aufgetrennt, um die Ausbeuten densitometrisch zu ermitteln (Abb. 43B). Der stärkste Effekt auf die Dimerisierung erfolgte bei Komplexen mit der F98-103H-Mutante, die nicht mehr in der Lage war Heterodimere auszubilden. Die Bereichsmutante I93-96A im mittleren Segment der Helix 2 brachte es auf ca. 56%

Dimerkomplexausbeute, während die zwei Serinclustermutanten S86-88Y und S86-88D trotz stark abweichender Monomerausbeuten mit 71% und 70% auf etwa gleich hohe Dimerausbeuten kamen.

Auffallend waren die mutmaßlichen Doppeldimerbanden, deren Ausbeuten sich stark an der Intensität der Heterodimerbanden orientierten. Untersuchungen, um die Zusammensetzung dieser im Grunde unerklärlichen Artefakt-Banden zu ermitteln, erfolgten in Kap. D2.1.1.2.

2.1.5.2 Mutationsanalysen zur Identifikation einzelner für die Dimerisierung wichtiger Aminosäuren der 2. Helix

Da in allen 3 untersuchten Bereichen der 2. Helix des Lhca4 AS lokalisiert sind, die einen Beitrag zur Lhca1-Lhca4-Interaktion leisten, mussten folglich Einzelmutationen bei allen in Frage kommenden AS-Positionen durchgeführt werden. Die Substitutionen erfolgten in der Regel gegen die AS an entsprechender Position der Helix 2 des Lhca3. Der untere sowie der obere Abschnitt wurden intensiver als das mittlere Segment analysiert, da die Ausbeuten aus Monomer- und Dimer-Rekonstitutionsversuchen der Bereichsmutante Lhca4-I93-96A ähnlich stark reduziert waren, was darauf hinwies, dass die Instabilität der Dimerkomplexe auf die reduzierte Monomerausbeute zurückzuführen ist.

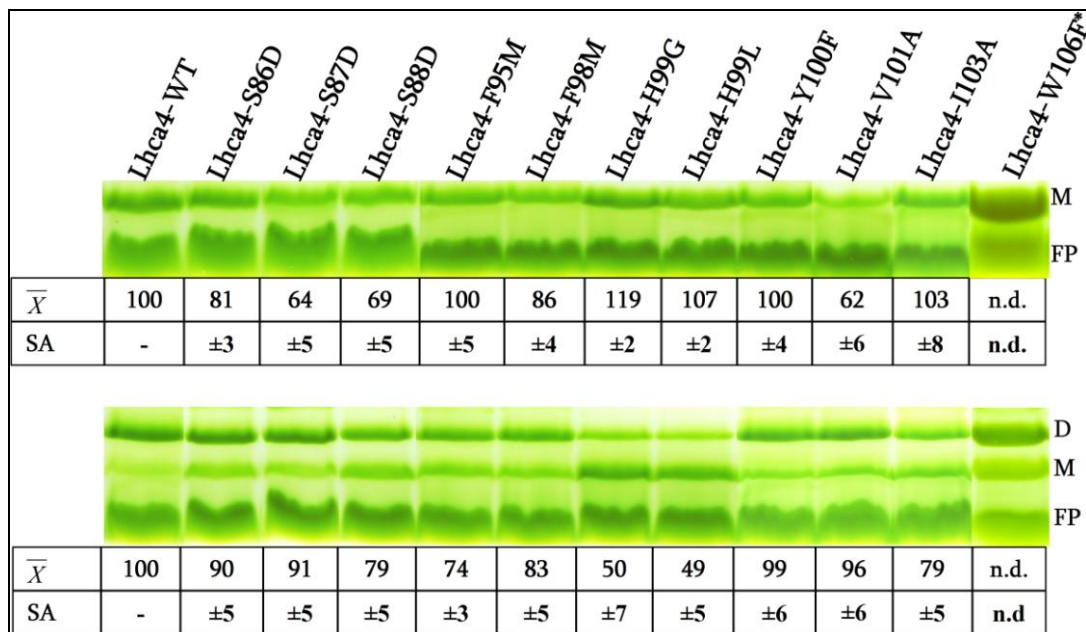


Abb. 44: Monomer- (oben) und Dimerrekonstitution (unten) von Lhca4-Einzelmутanten im Bereich der zweiten Helix, nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. Die Aminosäuren des Lhca4 wurden durch Lhca3 Aminosäuren an äquivalenter Position ersetzt und mit einer Wildtyprekonstitution verglichen. Um Monomer- und Dimerausbeuten densitometrisch (Tabellen) zu ermitteln, wurden 4-9 Experimente gemittelt. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Monomerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment; (n.d.): nicht durchgeführt; ($\bar{x}$): Mittelwert; (SA): Standardabweichung.

Die Gelauf trennung der Monomerrekonstitutionen (Abb. 44 oben) zeigte ein gemischtes Bild von mehr oder weniger stabilen Einzelmутanten. Während bei einigen Mutanten (S87D, S88D und V101A) zwischen 30 und 40% weniger Monomer als beim WT detektiert werden konnten, waren die S86D- (81%) und die F98M-Mutante (86%) kaum beeinträchtigt. Eine weitere Gruppe von drei Mutanten (F95M, Y100F und I103A) rekonstituierte ähnlich stabil wie der WT. Eine erhöhte Komplexausbeute konnte bei beiden H99-Mutanten beobachtet werden.

Die Dimerrekonstitutionen (Abb. 44 unten) offenbarten, dass in jedem der zuvor untersuchten AS-Bereiche der 2. Helix mindestens eine AS lokalisiert ist, die einen Effekt auf die Interaktion mit dem Lhca1 ausübte. Keinen nachweisbaren Einfluss auf die Dimerausbeute hatten Mutationen des Y100 und V101. Eine sehr schwache Reduktion der Komplexausbeute um ca. 10% trat bei der S86D- und der S87D-Mutante auf. Eine Abnahme der Dimerausbeute um ca. 20% konnte durch Mutationen des S88, F98 und I103 erzielt werden, wobei die F95M-Mutante sogar eine um 25% reduzierte Ausbeute vorzuweisen hatte. Der stärkste Effekt war nach Mutation des His 99 eingetreten, da beide Mutanten nur noch 50% der Dimerausbeute des WT's erreichten. Die W106F-Mutante (* im Gel) wurde nicht parallel zu den übrigen Einzelmутanten getestet, da sie experimentell aus einer anderen Zeitperiode stammte und das Tryptophan weder in einer der Bereichsmutanten enthalten war, noch ein großer Unterschied zur Lhca3-AS Phenylalanin an dieser Position existierte. Die damaligen Untersuchungen zeigten, dass weder die Monomer-, noch die Dimerausbeute nach Rekonstitution dieser W106F-Mutante von denen des WT's abwichen.

Die Feststellung, dass am His 99, welches ebenfalls Bestandteil der 2. Helix des Lhca4 ist, ein Chlorophyll gebunden ist, konnte bereits von Corbet (2004) getroffen werden. Zudem ist seit langem die Existenz zweier Chlorophyll-bindender Aminosäuren in der 2. Helix des Lhca4 bekannt, die beide innerhalb der verschiedenen Lhc-Proteine stark konserviert sind. Durch Mutationsanalysen konnte sowohl die Chlorophyllbindung am E94, als auch am E102 belegt werden (Lago-Places, 2000; Thomé, 2000; Rautenberg, 2002; Morosinotto et al., 2005). Nachfolgend wurden sämtliche in der AG Schmid generierten Lhca4-Proteine mit Mutationen an Chlorophyllbindungsstellen (E94Q, E94S, E94L, H99G, H99L, E102S und E102L) parallel rekonstituiert und bezüglich ihrer Monomer- und Dimerausbeute miteinander verglichen, da im LHCI-730 die 2. Helix des Lhca4 in Richtung Lhca1 orientiert vorliegt.

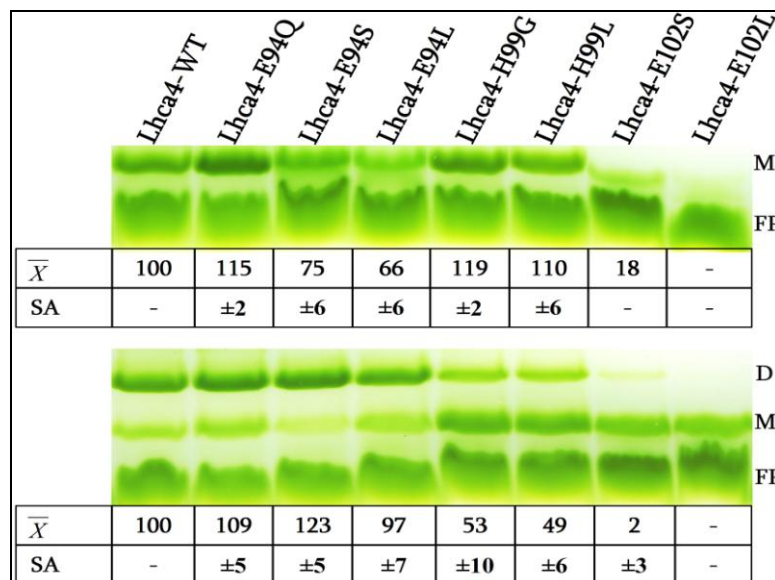


Abb. 45: Monomer- (oben) und Dimerrekonstitution (unten) von Lhca4 Mutanten mit Substitutionen von an der Chlorophyllbindung beteiligter Aminosäuren der zweiten Helix, nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. Die Aminosäuren des Lhca4 wurden durch ähnliche und unterschiedliche Aminosäuren an äquivalenter Position ersetzt und mit einer Wildtyprekonstitution verglichen, um Monomer- und Dimerausbeuten densitometrisch (Tabellen) zu ermitteln. wurden bis auf die E102S-Monomerrekonstitution (nur eine verwertbare Messung) 3-8 Experimente gemittelt. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Monomerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment; ($\bar{X}$): Mittelwert; (SA): Standardabweichung.

Die Ansätze der Monomerrekonstitutionen wurden in einem schwach denaturierenden Gel aufgetrennt (Abb. 45 oben). Die E94-Mutanten waren bis zu einem gewissen Grad alle stabil. Mit 115% Komplexausbeute gegenüber dem Lhca4-WT war die Monomerbande bei der E94Q-Mutante sogar intensivster als beim WT. Die E94S- (75%) und die E94L-Mutante (66%) zeigten hingegen reduzierte Monomerausbeuten. Die zwei Mutationsvarianten des His 99 lagen mit ihren Komplexausbeuten von 119% (H99G) bzw. 110% (H99L) auch leicht über der des WTs. Als extrem instabil (E102S) bzw. nicht trennfähig (E102L) im schwach denaturierenden Gel erwiesen sich die zwei E102-Mutanten.

Die aufgetrennten Dimerrekonstitutionen mit dem Lhca1-WT sind im unteren Bereich von Abb. 45 dargestellt. Die E94-Mutanten konnten alle sehr effektiv mit dem Lhca1 rekonstituieren und waren bezogen auf die Komplexausbeuten dem WT-Heterodimer nicht nur ähnlich, sondern übertrafen diesen zum Teil sogar deutlich (E94S). Wie aus Kap. D2.1.5.2 bereits bekannt, bewirkten Mutationen des His 99 eine Reduktion der Dimerkomplexausbeuten beider Mutanten um ca. 50%. Während auf Höhe der Dimerbande bei der E102S-Mutante noch andeutungsweise eine Komplexbande erkennbar war, die nur nach einem Experiment desitometrisch erfasst werden konnte, da die Bande sehr nah am freien Pigment lief, bildete der Lhca4-E102L nach Gelaufftrennung keine Heterodimerbande mehr Lhca1 aus.

2.1.5.3 Kombinationsmutante und Wiederherstellung der Dimerisierungsfähigkeit der Lhca4-H2a3-Mutante durch Reintegration von original Lhca4-Wildtyp Aminosäuren

Die vorhergehenden Untersuchungen mit Bereichs- und Punktmutanten zeigten, dass verschiedene Bereiche der Helix 2 des Lhca4 an einer Interaktion mit dem Lhca1 beteiligt sind. Dabei stellte sich heraus, dass die Bereichsmutante F98-103H einen sehr starken Einfluss auf die Dimerisierung ausübt und der Großteil des Effekts dabei dem Chlorophyll-bindenden Histidin 99 zugeschrieben werden kann.

Es stellte sich die Frage, ob eine Kombinationen mehrerer für die Dimerisierung wichtiger Einzelaminosäuren in einer Lhca4-Mutante, deren Dimerisierungsfähigkeit zum Erliegen bringen würde. In einem ersten Ansatz sollte geklärt werden, ob eine simultante Mutation des H99 und des Serinclusters (86-88) die Dimerisierung mit dem Lhca1 verhindern könnte (Lhca4-S86-88Y+H99G-Mutante). Ziel dieses Versuchs war es unter anderem Ergebnisse aus den Lhca4-Einzelmutationanalysen in den Gesamtkontext der Lhca1-Lhca4-Interaktionen besser einordnen zu können.

Ein zweiter Ansatz, um die Wichtigkeit verschiedener AS oder AS-Bereiche an der Dimerisierung herauszustellen, war die Substitution von Lhca3-AS in der Lhca4-H2a3-Mutante gegen original Lhca4-AS, die einen Einfluss auf die Heterodimerisierung mit dem Lhca1 hatten. Je essentieller die wieder eingebrachten AS für die Dimerisierung waren, desto höher sollten die Dimerausbeuten dieser Wiederherstellungsmutanten nach Rekonstitution mit dem Lhca1-WT sein. Neben der Generierung von Mutanten, in welchen ganze AS-Bereiche zurückgetauscht wurden (86-88; 99-103), wurden diese entweder miteinander (86-88+98-103), oder mit wichtigen einzelnen AS kombiniert (86-88+G99H), um die Wiederherstellung der Dimerisierungsfähigkeit auf so wenige AS wie nötig eingrenzen zu können.

Die Herstellung der Kombinationsmutante S86-88Y+H99G beim ersten Ansatz erfolgte auf Basis der Lhca4-H99G-Mutante. Als Grundlage für die Generierung der Wiederherstellungsmutanten des zweiten Ansatzes, wurde die Lhca4-H2a3-Mutante aus früheren Untersuchungen (Corbet, 2004) verwendet. Die Mutationen wurden via 2-stufiger PCR (Kap. C1.7.2) eingeführt. Die exprimierten und aufgereinigten Apoproteinene (Kap. C2.1) wurden im Anschluss rekonstituiert (Kap. C2.6.1) und densitometrisch (Kap. C2.7) ausgewertet.

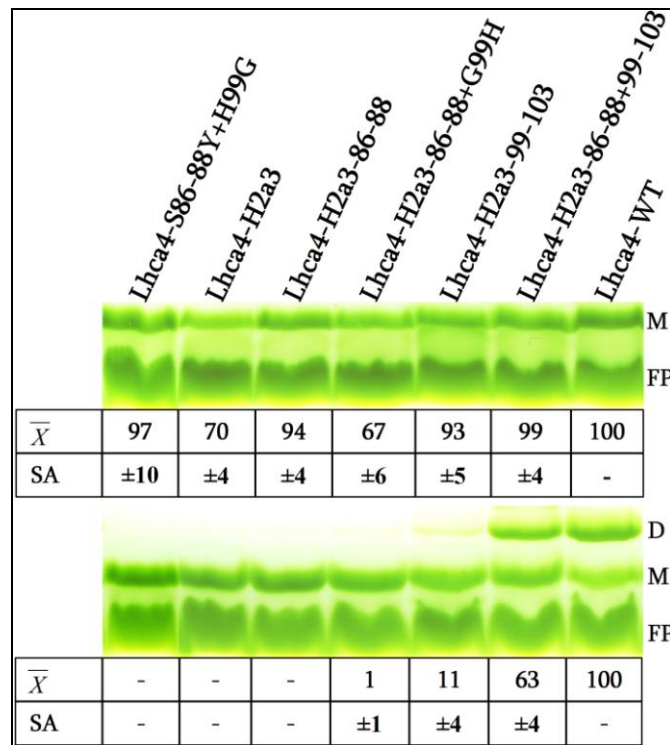


Abb. 46: Monomer- (oben) und Dimerrekonstitution (unten) einer Lhca4-Kombi- und Lhca4-H2a3-Wiederherstellungsmutante im Bereich der zweiten Helix, nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. Für die Kombimutante wurden mehrere für die Dimerisierung wichtige Aminosäuren des Lhca4 durch Lhca3 Aminosäuren an äquivalenter Position ersetzt. Durch Rücktausch von Lhca4-AS in die Lhca4-H2a3-Mutante wurde eine Wiederherstellung der Dimerisierungsfähigkeit angestrebt. Alle Experimente (3-5) wurden mit einer Wildtyprekonstitution verglichen, um Monomer- und Dimerisierausbeuten densitometrisch (Tabellen) zu ermitteln. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Monomerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment; ($\bar{X}$): Mittelwert; (SA): Standardabweichung.

Die Gelaufentrennung der Monomerrekonstitutionen von Kombinations- und Wiederherstellungsmutanten des Lhca4 sind in Abb. 46 (oben) dargestellt. Die Lhca4-Kombinationsmutante (S86-88Y+H99G) bildete Monomerkomplexe aus, die eine dem Lhca4-WT ähnliche Stabilität aufwiesen.

Die Komplexausbeute der Lhca4-H2a3-86-88-Monomere war deutlich höher als bei der Lhca4-H2a3-Mutante und mit 94% vergleichbar mit der Monomerausbeute des Lhca4-WT. Die Einfügung einer zusätzlichen Mutation, um das Histidin 99 wieder zu integrieren (Lhca4-H2a3-86-88+G99H) verschlechterte die Monomerausbeute (67%) dieser Mutante auf einen Wert, der noch unterhalb der ermittelten Lhca4-H2a3-Monomerausbeute lag (70%). Die Rückmutation des Bereichs 99-103 bzw. die simultane Wiederherstellung dieses Bereichs mit dem Serincluster (86-88) auf Basis der Lhca4-H2a3-Mutante, führte in beiden Fällen zur Ausbildung von Monomerkomplexen, deren Ausbeuten nahe an der des Lhca4-WT-Monomers orientiert waren.

Im unteren Teil der Abb. 46 sind die entsprechenden Dimerrekonstitutionen von Kombi- und Wiederherstellungsmutanten gezeigt. Eine Kombination aus Serincluster- (Kap. D2.1.5.1) und H99G-Mutante (Kap. D2.1.5.2) war wie der Lhca4-H2a3 außer Stande mit dem Lhca1-WT Heterodimere auszubilden, obwohl beide Mutationen als einzelne Ereignisse gesehen, theoretisch nur einen addierten Effekt von 80% Dimerausbeutenverlust aufweisen dürften.

Zur schrittweisen Wiederherstellung der Dimerisierungsfähigkeit der Lhca4-H2a3-Mutante wurde zunächst der Serincluster an Position 86-88 der Helix 2 rückgetauscht. Ein Nachweis von Heterodimeren nach Rekonstitution mit dem Lhca1-WT und der Lhca4-H2a3-86-88-Mutante war allerdings nicht möglich. Eine Verbesserung der Dimerausbeuten (1%) bzw. ein erster Hinweis, dass diese Wiederherstellungsversuche aussichtsreich waren, lieferte der zusätzliche Einbau des Histidins an Position 99 in die gerade zuvor beschriebene Mutante. Wurde der Bereich im oberen Drittel der 2. Helix zurückgetauscht (Lhca4-H2a3-99-103-Mutante), steigerte sich die Dimerausbeute auf 11% im Vergleich zum WT-Heterodimer. Eine Erweiterung der rücks substituierten Bereiche dieser Mutante um den Serincluster erhöhte die Dimerausbeute sogar auf 63%.

Es bleibt zu erwähnen, dass die Lhca4-H2a3-86-88+99-103-Mutante im Grunde genommen nichts anderes als eine Lhca4-93-98-Mutante darstellt und in dieser die Mutationen F95M und F98M enthalten sind, deren Wirkung bereits in Einzelmutationsanalysen untersucht wurde und zusammengerechnet eine Reduktion der Dimerausbeuten bewirken sollte, wie sie bei der Lhca4-H2a3-86-88+99-103-Mutante zu beobachten ist.

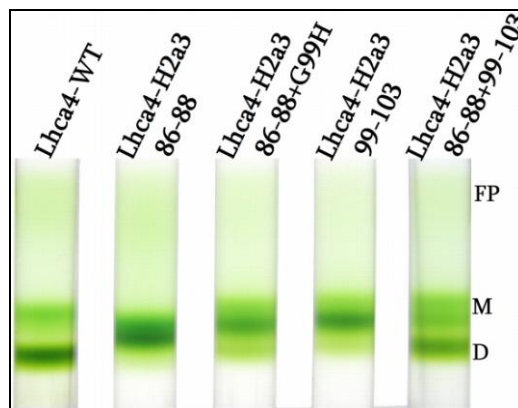


Abb. 47: Dimerrekonstitution von Lhca4-Mutanten zur Wiederherstellung der Dimerisierungsfähigkeit mit dem Lhca1-WT. Lhca3-AS in Helix 2 der Lhca4-H2a3-Mutante wurden schrittweise durch Lhca4-AS ersetzt, die einen Einfluss auf die Heterodimerisierung haben. Die Auftrennung erfolgte bei 24-stündiger Ultrazentrifugation im Saccharosedichtegradienten. (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Um die Komplex-destabilisierenden Effekte der harschen Auftrennung im schwach denaturierenden Gel zu vermeiden, wurden die Dimerrekonstitutionen auch mittels schonender Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation separiert (Abb. 47).

Durch die schonende Trenntechnik konnten schon mit wenigen rückgetauschten Lhca4-AS im Lhca4-H2a3 Effekte beobachtet werden, die für eine Wiederherstellung der Dimerisierungsfähigkeit sprachen. Unterhalb der im Vergleich zur Monomerbande des WTs sehr weit laufenden Lhca4-H2a3-86-88-Monomerbande war bereits eine - wenn auch äußerst schwache - Spur einer Bande zu erkennen, die auf Höhe der WT-Dimere angesiedelt war. Interessanterweise war nach Dimerrekonstitution der Lhca4-H2a3-86-88+G99H-Mutante eine Dimerbande zu erkennen, die stärker ausgeprägt war als die der Lhca4-H2a3-99-103-Mutante, obwohl im Gel nur die 99-103-Mutante in der Lage

war stabile Dimerkomplexe in nennenswertem Ausmaß zu formen. Die deutlichste Dimerbande war neben dem WT bei der Lhca4-H2a3-86-88-99-103-Mutante zu verzeichnen, bei welcher sowohl das obere, als auch das untere Lhca3-Teilsegment der 2. Helix zum Lhca4 rückmutiert worden war.

2.1.5.4 Rekonstitutionsversuche zur Identifikation eines möglichen Interaktionspunkts zwischen dem C-Terminus des Lhca1 und der 2. Helix des Lhca4

Nachdem in der 2. Helix des Lhca4 einige potentiell mit dem Lhca1 interagierende AS identifiziert worden waren, stellte sich die Frage, ob eine dieser AS des Lhca4 mit einer bereits bekannten und für die Dimerisierung ebenfalls wichtigen Lhca1-Seitenkette wechselwirkt.

Eine frühere Studie über die Bedeutung N- und C-terminale AS des Lhca1 und Lhca4 zeigte, dass ein Tryptophan an Position 185 des C-Terminus von Lhca1 mit dem Lhca4 interagiert (Schmid et al., 2002a). Unter Berücksichtigung der verbesserten PSI-Kristallstruktur (Amunts et al., 2007) und zweier Homologiemodellierungen (Jolley et al., 2005; Corbet et al., 2007) kamen als potentielle Interaktionspartner nur Lhca4-AS im unteren Bereich der 2. Helix oder in der luminalen Schleife in Betracht. Da bis dato noch keine Mutanten der luminalen Lhca4-Schleife von Tomate vorlagen, wurden die 3 existierenden Mutanten im Bereich des Serinclusters (S86D, S87D, S88D und) für die anstehenden Rekonstitutionsversuche mit der Lhca1-W185H-Mutante herangezogen.

Der Nachweis sollte aufgrund der Tatsache erfolgen, dass eine Rekonstitution von Lhca1- mit Lhca4-Mutanten, die im gleichen Interaktionspunkt verändert wurden, die gleiche Reduktion an Dimerausbeute gegenüber dem WT-Heterodimer aufweisen sollten, wie jede der beiden Mutanten für sich mit dem jeweilig korrespondierenden WT-Protein alleine.

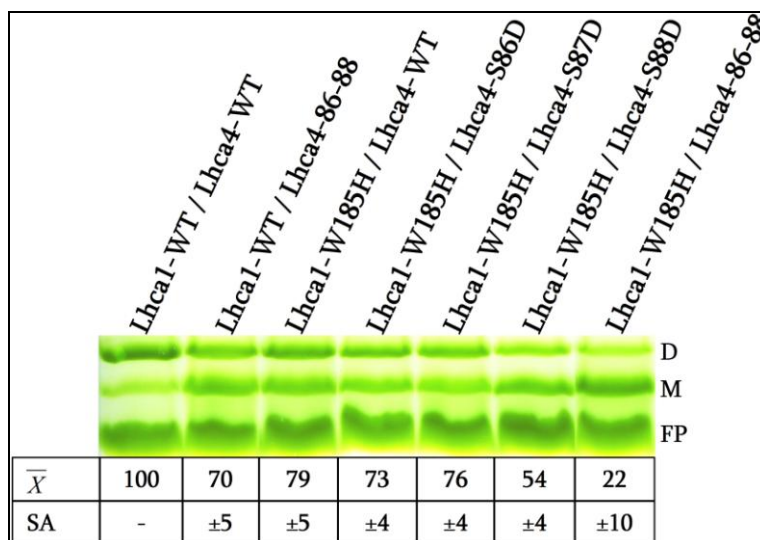


Abb. 48: Dimerrekonstitutionen zwischen Lhca1- und Lhca4- Mutanten, um eine potentielle Wechselwirkungen zwischen Serinresten der Helix 2 des Lhca4 mit dem C-terminal gelegenen W185 des Lhca1 nachzuweisen. Serincluster- oder Serineinzelmутanten des Lhca4 wurden mit dem Lhca1-WT und mit der ebenfalls in der Dimerbildung beeinträchtigten Lhca1-W185H-Mutante rekonstituiert, im schwach denaturierenden Gel aufgetrennt und mit einer Wildtyprekonstitution verglichen. Um die Dimerausbeuten zu ermitteln wurden die Gele von 3-7 Experimenten densitometrisch ausgewertet (Tabellen) und gemittelt. (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment; ($\bar{X}$): Mittelwert; (SA): Standardabweichung.

Zur Untersuchung einer direkten intermolekularen Wechselwirkung zwischen dem Lhca1 C-Terminus der Helix 2 des Lhca4 wurden eine Serincluster- (Lhca4-S86-88D) und drei Serineinzelmutanten des Lhca4 (S86D, S87D und S88D) mit der Lhca1-W185H-Mutante rekonstituiert (Abb. 48). Während die Bereichsmutante Lhca4-S86-88D, wie bereits erwähnt, bei einer Rekonstitution mit dem Lhca1-WT ca. 30% der Ausbeute einbüßt, erreichte die Lhca1-W185H-Mutante mit dem Lhca4-WT rekonstituiert ca. 79% der Dimerausbeute des WT-Heterodimers.

Die beiden Mutanten S86D und S87D zeigten, wie bereits bei Rekonstitutionen mit dem Lhca1-WT (siehe Kap. D2.1.5.2, Abb. 44 unten), auch nach Rekonstitution mit Lhca1-W185H nur einen geringen Effekt auf die Dimerausbeute und liefen auf dem Gel als Kontrollen mit. Beide Experimente zeigten erwartungsgemäß, dass sich die Dimerkomplexausbeuten der zwei Serinmutanten nicht sonderlich von den Ausbeuten der reinen Lhca1-W185H Rekonstitution unterscheiden. Anders gelagert war der Fall bei der simultanen Rekonstitution des Lhca1-W185H und der Lhca4-Mutante mit substituiertem S88, welches als eigentlicher Interaktionspartner vermutet wurde. Die daraus resultierende Dimerausbeute hätte sich auch durch eine Addition beider Ausbeuten aus den Einzelerperimenten ableiten lassen können, wodurch eine direkte Interaktion des W185 (Lhca1) mit dem S88 (Lhca4) unwahrscheinlich wurde. Interessanterweise war die Dimerausbeute, die aus der Rekonstitution der Lhca1-Mutante mit der Serinclustermutante resultierte, mit 22% im Vergleich zum WT-Dimer noch um einiges niedriger.

2.1.6 Charakterisierungen der rekonstituierten LHCs von Einzeldomänenmutanten und Punktmutanten

Nachdem der Einfluss einzelner Proteindomänen auf das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten von Lhca4, Lhcb1 und Lhcb4 untersucht worden war, stellte sich die Frage, ob die rekonstituierten chimären Lichtsammelkomplexe noch eine ihrem Wildtyp ähnliche Pigmentzusammensetzung aufweisen oder dessen charakteristische Fähigkeit zum Energietransfer besitzen. Diesbezüglich wurden auch die monomeren LHCs des Lhca4 mit Punktmutationen in den Schleifenregionen und den Chlorophyll-bindenden AS der 2. Helix untersucht.

Für die anstehenden Experimente wurden rekonstituierte Lichtsammelkomplexe mittels Saccharosedichtegradienten-UZ aufgetrennt, die gewünschten Monomer-, Dimer- und Trimerbanden abgezogen und anschließend der Chlorophyllgehalt für die nachfolgenden Analysen eingestellt. Die Pigmentzusammensetzungen der LHCs wurden via HPLC (Kap. C2.11) ermittelt, während der Energietransfer durch Messung der Tieftemperatur-emissionsfluoreszenz bei 77 K nach Chlorophyll *b*-Anregung untersucht wurde.

2.1.6.1 Effekte der getauschten Proteindomänen und Punktmutationen auf die Pigmentbindung der LHCs

Im Rahmen der HPLC-Analysen zur Untersuchung der Pigmentbindung wurden N- und C-terminale Mutanten, sowie luminale und stromale Schleifen-Mutanten genauer untersucht. Neben den Monomeren der Einzeldomänenmutanten wurden falls möglich auch Dimer- und Trimerkomplexe auf ihre Pigmentzusammensetzung hin untersucht. Messungen an Monomeren der Punkt- und Bereichsmutanten des Lhca4 mit Mutationen in der luminalen und stromalen Schleifenregion wurden alle nur einmaligen Analysen unterworfen, wodurch diese Ergebnisse lediglich als tendenziell zu betrachten

sind. Bezüglich Helix 2 wurden nur monomere und dimere Lhca4-Komplexe mit punktmutierten Chlorophyll-bindenden AS untersucht.

Nach der Probenaufbereitung wurde die extrahierte Pigmentlösung in einem HPLC-Lauf mit steigendem Acetongradienten aufgetrennt (Kap. C2.11). Die erhaltenen Daten wurden auf einen gemeinsamen Nenner gebracht, wobei davon ausgegangen wurde, dass pro Komplex eine definierte Zahl an Carotinoiden gebunden ist. Ein Lhca4-Monomer bindet wie ein Lhcb4 zwei Carotinoide (Bassi et al., 1999; Croce et al., 2002; Schmid et al., 2002). Im rekonstituierten Lhcb1 sind nur 3 der 4 möglichen Carotinoid-Bindungsstellen durch die Aufreinigung der Komplexe besetzt (Ruban et al., 1999; Hobe et al., 2000).

Darüber hinaus binden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lhc-Proteine in ihren Wildtypformen auch eine unterschiedliche Anzahl von Chlorophyllmolekülen, wodurch bei einer Ermittlung der im Komplex gebundenen Carotinoide auch diese Bezugsgröße je nach Lhc-Grundgerüst variiert. Laut (Croce et al., 2002) bindet der Lhca4 von Arabidopsis bis zu 10 Chlorophylle, während der Tomaten-Lhca4 bei Untersuchungen von Schmid et. al (2002b) durchschnittlich 12 Chlorophylle nachgewiesen wurden. Dies ist wichtig, da die Lhca4-Komplexe mit punktmutierten Chl-Bindungsstellen in Helix 2 im Gegensatz zu allen anderen Untersuchungsobjekten nicht mit Arabidopsis-Proteinen, sondern mit Tomaten-Proteinen rekonstituiert wurden. Die PSI-Kristallstruktur geht von 14 Chlorophyllen je Lhca-Protein aus, deren vollständige Bindung aber zuvor nie nachgewiesen wurde (Amunts et al., 2007). Am LHCII (Lhcb1) wurden bis zu 14 Chlorophylle in der Kristallstruktur identifiziert (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005) und am CP29 (Lhcb4) konnten durch Mutationsanalysen 8 Chlorophylle an konservierten Bindungsstellen entdeckt werden (Bassi et al., 1999).

Des Weiteren wurde auch die Bindung von verschiedenen Einzelcarotinoiden (Lutein, Neoxanthin, Violaxanthin und β -Carotin) untersucht, da die konservierten L1- und L2-Bindestellen in den luminalen und stromalen Schleifen der Lhc-Proteine lokalisiert sind (Pichersky und Jansson, 1996; Liu et al., 2004).

Alle Pigmentanalysen von Einzeldomänenmutanten bzw. Punktmutanten wurden (soweit nicht anders vermerkt) 2-4-mal experimentell wiederholt, gemittelt und daraus die Standardabweichung errechnet. Die Beobachtungen konnten in Bezug zum Wildtyp-Monomer, -Dimer oder -Trimer gesetzt und dadurch bewertet werden.

2.1.6.1.1 Auswirkungen der Punktmutationen an Chlorophyll-bindenden AS der 2. Helix des Lhca4 auf die Pigmentbindung monomerer und dimerer LHCs

Die Existenz zweier Chlorophyll-bindender Aminosäuren in der 2. Helix des Lhca4 ist hinlänglich bekannt. Mutationsanalysen an den stark konservierten AS E94 und E102 belegten die Chlorophyllbindung (Lago-Places, 2000; Thomé, 2000; Rautenberg, 2002; Morosinotto et al., 2005). Untersuchungen an Kristallen des PSI (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007;) und Homologiemodellierungen (Melkozernov and Blankenship 2003; Jolley et al., 2005) ergaben aber, dass nicht alle Chlorophylle, die im Lhca4 gebunden sind auch einer Seitenkette zugeordnet werden konnten. Mutationsanalysen an der Helix 2 des Lhca4 von Tomate führten zur Identifikation des H99 als dritte Chlorophyllbindungsstelle in dieser Domäne (Corbet, 2004). Wie einleitend erwähnt bindet der Lhca4 von Tomate im Durchschnitt 12 Chlorophylle pro 2 Carotinoiden (Schmid et al., 2002b) und damit 2 mehr als der Arabidopsis-Lhca4 (Croce et al., 2002). In einer vergleichenden Analyse sollten alle vorhandenen Lhca4-Proteine mit Mutationen in Helix 2 Chlorophyll-Bindungsstellen untersucht werden, da die

Ligandenbindung auch einen Einfluss auf die Lhca1-Lhca4-Interaktion ausüben kann (D2.1.5.2).

Tabelle 21: Pigmentzusammensetzung rekonstituierter Lhca4-Monomere mit Mutationen an Chlorophyllbindungsstellen der zweiten Helix. Ergebnisse sind Mittelwerte aus 4 Experimenten und mit Standardabweichung (SA) in grau dargestellt. (grün): signifikante Zunahme; (orange): signifikanter Verlust.

Lhca4-Monomere	WT	E94Q	E94S	E94L	H99G	H99L	E102S	E102L
Chlorophyll <i>a/b</i> Verhältnis	2,60	2,34	3,02	3,41	2,65	2,62	3,51	3,89
±SA	0,18	0,13	0,07	0,05	0,11	0,13	0,16	0,49
Chlorophyll-total/2 Carotinoide	11,89	11,02	9,80	8,05	10,81	8,95	8,45	8,48
±SA	0,29	0,43	0,67	0,87	0,26	0,65	0,50	0,45
Chlorophyll <i>a</i> /2 Carotinoide	8,58	7,70	7,35	6,22	7,85	6,47	6,57	6,74
±SA	0,22	0,18	0,46	0,72	0,25	0,47	0,36	0,52
Chlorophyll <i>b</i> /2 Carotinoide	3,31	3,31	2,44	1,83	2,97	2,48	1,88	1,74
±SA	0,21	0,25	0,21	0,21	0,07	0,21	0,16	0,08
Lutein / 2 Carotinoide	1,53	1,53	1,54	1,57	1,47	1,48	1,54	1,57
±SA	0,04	0,08	0,05	0,06	0,05	0,04	0,08	0,11
Neoxanthin / 2 Carotinoide	0,07	0,14	0,15	0,13	0,18	0,07	0,15	0,16
±SA	0,01	0,04	0,05	0,02	0,02	0,05	0,03	0,03
Violaxanthin / 2 Carotinoide	0,19	0,15	0,15	0,16	0,16	0,17	0,18	0,19
±SA	0,02	0,03	0,03	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01
β-Carotin / 2 Carotinoide	0,21	0,14	0,17	0,16	0,15	0,21	0,20	0,17
±SA	0,01	0,01	0,04	0,02	0,03	0,03	0,05	0,03
Carotinoide/12 Chlorophylle	2,15	2,24	2,38	2,71	2,53	2,89	2,80	2,76
±SA	0,14	0,09	0,17	0,29	0,47	0,14	0,17	0,14

Die Monomer- und Dimerrekonstitutionen wurden mittels Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation aufgetrennt (nicht gezeigt). Bei allen Mutanten wurden die Bande von vier der Monomer- (4 Experimente) und Dimerkomplexen (2 Experimente) isoliert abgezogen bezüglich ihrer Pigmentzusammensetzung per HPLC untersucht.

Tabelle 22: Pigmentzusammensetzung rekonstituierter Lhca4-Monomere mit Mutationen an Chlorophyllbindungsstellen der zweiten Helix. Ergebnisse sind Mittelwerte aus 2 Experimenten und mit Standardabweichung (SA) in grau dargestellt. (grün): signifikante Zunahme; (orange): signifikanter Verlust.

Lhca4-Dimere	WT	E94Q	E94S	E94L	H99G	H99L	E102S	E102L
Chlorophyll <i>a/b</i> Verhältnis	2,75	2,45	2,59	2,66	2,72	2,69	2,86	3,04
±SA	0,15	0,02	0,02	0,03	0,13	0,12	0,46	0,45
Chlorophyll-total/2 Carotinoide	10,51	10,52	10,14	9,84	10,50	10,56	9,71	8,70
±SA	0,30	0,26	0,21	0,05	0,39	0,50	0,12	0,80
Chlorophyll <i>a</i> /2 Carotinoide	7,71	7,47	7,31	7,16	7,67	7,70	7,15	6,50
±SA	0,33	0,16	0,13	0,01	0,38	0,45	0,22	0,35
Chlorophyll <i>b</i> /2 Carotinoide	2,81	3,05	2,83	2,69	2,82	2,86	2,55	2,20
±SA	0,05	0,09	0,07	0,04	0,03	0,04	0,33	0,44
Lutein / 2 Carotinoide	1,41	1,40	1,42	1,43	1,37	1,36	1,44	1,43
±SA	0,00	0,01	0,03	0,02	0,00	0,02	0,03	0,05
Neoxanthin / 2 Carotinoide	0,11	0,16	0,17	0,09	0,11	0,13	0,10	0,10
±SA	0,01	0,06	0,06	0,00	0,02	0,02	0,02	0,02
Violaxanthin / 2 Carotinoide	0,24	0,25	0,27	0,25	0,23	0,20	0,28	0,29
±SA	0,01	0,03	0,01	0,01	0,03	0,04	0,02	0,01
β-Carotin / 2 Carotinoide	0,24	0,15	0,13	0,21	0,25	0,28	0,26	0,26
±SA	0,00	0,01	0,01	0,02	0,03	0,02	0,01	0,00
Carotinoide/12 Chlorophylle	2,18	2,27	2,55	2,22	2,25	2,15	2,21	2,23
±SA	0,00	0,03	0,23	0,05	0,01	0,05	0,02	0,01

Die Pigmentzusammensetzungen aller monomeren Lhca4-Komplexe mit mutierten Chlorophyllbindungsstellen sind Tabelle 21 zu entnehmen. Einzelpigmente wurden in Bezug zu den 2 im Komplex gebundenen Carotinoiden gesetzt. Dabei konnten an einer Chlorophyllbindungsstelle je nach Art der substituierenden AS unterschiedlich starke Chl-Verluste detektiert werden. Im Fall des E94 führte der Austausch des E gegen Q zu einem Verlust von ca. einem Chl-Molekül im Monomer und einer leicht reduzierten β-Carotin-Bindung. An gleicher Stelle bewirkte die Einführung eines Serinrestes ein Sinken des Chl-Gehalts um 2 Moleküle pro Komplex. Der stärkste Effekt zeigte sich

nach Verwendung eines L anstelle des Chl-bindenden E, wodurch die Anzahl der an das Protein gebundenen Chlorophylle um 4 Moleküle abnahm.

Die Chl-Bindung an LHCs der H99-Mutanten war je nach Wahl der ersetzenden AS ebenfalls unterschiedlich stark beeinträchtigt. Während ein Glycin an dieser Position lediglich zum Verlust eines Chl-Moleküls führte und der Neoxanthin-Gehalt leicht anstieg, gingen bei einer Substitution gegen ein Leucin 3 Chlorophylle verloren.

Nur bei Mutationen des E102 war kein Effekt durch die Eigenschaft der neu eingesetzten AS zu beobachten: sowohl die Serin- als auch die Leucinvariante wiesen um 3,5 weniger Chlorophyll-Moleküle als der WT auf.

Die starken Chlorophyll-Verluste, die in den Lhca4-Monomeren auftraten, konnten in den Heterodimeren der meisten Mutanten nicht mehr nachgewiesen werden (Tabelle 22). Die Dimerkomplexe der E94-Mutanten hatten im Falle des Glutamin- und Serin-Austauschs nur weniger β -Carotin gebunden als ein WT-Dimer. Eine Substitution des E94 gegen Leucin bewirkte im Dimer nur einen geringen allgemeinen Chl-Verlust. Es konnten keine Unterschiede in der Pigmentausrüstung zwischen H99L- und H99G-Mutanten und dem WT-Dimer festgestellt werden.

Einzig die Dimerkomplexe mit E102-Mutanten waren in ihrem Chl-Gehalt gegenüber dem WT-Dimer deutlich reduziert. Diesmal waren aber im Gegensatz zu den monomeren Komplexen unterschiedlich starke Chl-Verluste bei Verwendung der zwei Mutanten aufgetreten. Während im Fall der E102S-Mutante die Heterodimere nicht ganz ein Chlorophyll verloren, wurden bei Komplexen der E102L-Mutante 2 Chlorophylle weniger als im WT-Heterodimer gefunden.

2.1.6.1.2 Auswirkungen des Austauschs und der Punktmutation luminaler und stromaler Schleifendomänen auf die Pigmentbindung monomerer und dimerer LHCs

Die Pigmentuntersuchungen an monomeren und dimeren Domänentauschmutanten erfolgten vor allem aufgrund der Tatsache, dass je eine Carotinoidbindungsstelle in der luminalen bzw. der stromalen Schleife lokalisiert ist und die mit den Iononringen jeweils eines Carotinoide wechselwirken (Bassi et al., 1997; Liu et al., 2004). Diese L1- und L2-Bindungsstellen sind in allen Lhc-Proteinen konserviert, da die zwei gebundenen Carotinoide die Superhelix aus Helix 1 und Helix 3 stabilisieren (Pichersky und Jansson (1996). Nicht konserviert sind allerdings die Präferenzen für ein spezielles Carotin- oder Xanthophyll-Molekül. Die L1-Bindungsstelle bindet in allen Lhc-Proteinen Lutein, während die L2-Bindungsstelle meist durch 2 unterschiedliche Xanthophylle mit variablem Verhältnis besetzt ist (Bassi und Caffari, 2000). Deshalb kann sich ein Austausch der luminalen (L2) bzw. stromalen Schleife (L1) auf die Pigmentbindung und folglich auf die Monomerstabilität auswirken (D2.1), da die zweiten Bindungsstellen für die Carotinoide, welche sich am N-Terminus (L2) und am C-terminalen Ende (L1) der Helix 3 befinden, im Originalzustand bleiben.

Der Lhcb1 weist neben den L1- und L2-Bindungsstellen zwei weitere Xanthophyllbindungsstellen V1 und N1 auf, wobei sich letztere im Bereich der Helix 2 befindet und im nativen LHCI mit Neoxanthin besetzt ist. Die V1-Bindungsstelle ist nach Rekonstitution nicht besetzt, weshalb die Pigmentdaten der Lhcb1-Komplexe immer auf 3 Carotinoide bezogen wurden (Croce et al., 1999b; Ruban et al., 1999; Hobe et al., 2000).

Tabelle 23: Pigmentzusammensetzung rekonstituierter Lhca4-Monomere mit substituierter luminaler oder stromaler Schleifendomäne. Ergebnisse sind Mittelwerte aus 2 (Mutante) und 5 (WT) Experimenten und mit Standardabweichung (SA) in grau dargestellt. (grün): signifikante Zunahme; (orange): signifikanter Verlust.

Monomere	Lhca4-WT	Lhca4-LLb1	Lhca4-LLb4	Lhca4-SLb1	Lhca4-SLb4
Chlorophyll <i>a/b</i> Verhältnis	2,37	2,92	3,12	3,36	2,93
±SA	0,11	0,06	0,06	0,13	0,05
Chlorophyll-total/2 Carotinoide	9,84	7,82	9,25	5,93	7,21
±SA	0,24	0,44	1,26	0,36	0,36
Chlorophyll <i>a</i> /2 Carotinoide	6,91	5,83	7,01	4,57	5,38
±SA	0,19	0,31	0,99	0,23	0,26
Chlorophyll <i>b</i> /2 Carotinoide	2,93	2,00	2,24	1,36	1,83
±SA	0,13	0,13	0,28	0,12	0,10
Lutein / 2 Carotinoide	1,50	1,39	1,44	1,33	1,44
±SA	0,03	0,02	0,07	0,03	0,03
Neoxanthin / 2 Carotinoide	0,14	0,25	0,21	0,30	0,23
±SA	0,03	0,01	0,03	0,03	0,02
Violaxanthin / 2 Carotinoide	0,21	0,20	0,19	0,23	0,20
±SA	0,03	0,02	0,03	0,00	0,02
β-Carotin / 2 Carotinoide	0,15	0,16	0,16	0,15	0,14
±SA	0,02	0,01	0,02	0,00	0,01
Carotinoide/10 Chlorophylle	2,03	2,56	2,21	3,38	2,78
±SA	0,05	0,15	0,32	0,19	0,14

Die Zusammensetzung des Pigmentgehalts von Monomerkomplexen aus luminalen und stromalen Lhca4-Domänenmutanten sind in Tabelle 23 dargestellt. Der Lhca4 von *Arabidopsis* bindet nur 10 Chlorophylle pro 2 Carotinoide und damit 2 weniger als der Lhca4 von Tomate. In einem Einzelexperiment wurde die Monomerbande nach Lhca4-Rekonstitution in einer oberen und einer unteren Fraktion gesammelt. Die obere Fraktion der Monomerkomplexe enthielt 8, die untere Fraktion 12 Chlorophylle pro 2 Carotinoide. Die luminal Schleife des Lhcb1 im Lhca4 bewirkte sowohl den Verlust eines Chl *a*-, als auch eines Chl *b*-Moleküls. Zusätzlich war weniger Lutein, aber mehr Neoxanthin am Lhca4-LLb1 gebunden. Durch Substitution der luminalen Schleife des Lhca4 gegen den äquivalenten Lhcb4-Proteinabschnitt trat eine geringe Reduktion des Chl *b*-Gehalts um 0,6 Moleküle ein.

Ein Austausch der stromalen Lhca4-Domäne führte zu massiven Chl-Verlusten. Der Einbau der stromalen Schleife des Lhcb1 reduzierte den Chl *a*-Gehalt in dieser Lhca4-Mutante um bis zu 2 Moleküle. Von ursprünglich 3 Chl *b* im WT konnten bei dieser Mutante nur noch ca. 1,5 Moleküle nachgewiesen werden. Außerdem lag eine Reduktion der pro Monomer gebundenen Luteinmoleküle, und eine erhöhte Bindung von Neoxanthin vor. Einen weniger drastischen, aber dennoch starken Effekt auf die Pigmentbindung bewirkte die Substitution der stromalen Lhca4-Schleife gegen die entsprechende Lhcb4-Region. Neben einem schachen Neoxanthin-Anstieg gingen im Komplex 2,5 Chl *a*- und ein Chl *b*-Molekül durch die Mutation verloren.

In Tabelle 24 sind die Pigmentdaten der Monomerkomplexe aus luminalen und stromalen Lhcb1 Einzeldomänenmutanten zusammengefasst. Der Einbau der luminalen Lhca4-Schleife in den Lhcb1 führte zum Verlust eines Chl *b*, wohingegen der Austausch gegen die luminal Lhcb4-Schleife eine Chl *a*-Reduktion um 1,5 Moleküle und eine leichte Violaxanthin-Abnahme zur Folge hatte.

Beim Tausch der stromalen Schleife verlor die Lhcb1-SLa4-Mutante ein Chl *a*-Molekül. Neben einer deutlichen Zunahme des Neoxanthin-Gehalts, konnten Abnahmen im Violaxanthin- und β-Carotin-Gehalt pro Komplex detektiert werden. Die Pigmentbindung am Lhcb1-SLb4-Monomer war um ein Chl *b* geringer als beim zugehörigen Lhcb1-WT.

Tabelle 24: Pigmentzusammensetzung rekonstituierter Lhcb1-Monomere mit substituierter luminaler oder stromaler Schleifendomäne. Ergebnisse sind Mittelwerte aus 2 (Mutante) und 3 (WT) Experimenten und mit Standardabweichung (SA) in grau dargestellt. (grün): signifikante Zunahme; (orange): signifikanter Verlust.

Monomere	Lhcb1-WT	Lhcb1-LLa4	Lhcb1-LLb4	Lhcb1-SLa4	Lhcb1-SLb4
Chlorophyll <i>a/b</i> Verhältnis	1,97	2,50	2,03	1,80	2,52
±SA	0,11	0,17	0,50	0,02	0,25
Chlorophyll-total/3 Carotinoide	13,85	12,98	11,68	12,49	12,57
±SA	1,19	0,02	0,50	0,12	1,12
Chlorophyll <i>a</i> /3 Carotinoide	9,19	9,27	7,69	8,03	9,01
±SA	0,97	0,16	0,33	0,04	1,05
Chlorophyll <i>b</i> /3 Carotinoide	4,66	3,72	3,99	4,46	3,56
±SA	0,22	0,19	0,83	0,07	0,07
Lutein / 3 Carotinoide	2,02	1,91	1,92	1,99	1,92
±SA	0,04	0,07	0,08	0,06	0,09
Neoxanthin / 3 Carotinoide	0,51	0,57	0,72	0,77	0,57
±SA	0,07	0,02	0,18	0,03	0,01
Violaxanthin / 3 Carotinoide	0,28	0,25	0,21	0,14	0,24
±SA	0,00	0,02	0,03	0,02	0,01
β-Carotin / 3 Carotinoide	0,18	0,27	0,15	0,10	0,27
±SA	0,03	0,03	0,08	0,00	0,07
Carotinoide/14 Chlorophylle	3,05	3,23	3,60	3,36	3,37
±SA	0,25	0,01	0,15	0,03	0,30

Die Monomere der Lhcb4-Domänenmutanten mit substituierten luminalen und stromalen Schleifen banden alle weniger Chlorophyll als der Wildtyp (Tabelle 25). Die luminalen Schleifen von Lhca4 und Lhcb1 im Lhcb4 bewirkten den Verlust je eines Chl *a*- und Chl *b*-Moleküls, eine deutliche Reduktion des Neoxanthin-Gehalts und eine signifikante Zunahme der β-Carotin-Bindung. Des Weiteren war lag im Lhcb4-LLb1-Monomer eine niedrigere Violaxanthin-Bindung als im WT vor.

Ein Austausch der stromalen Lhcb4-Domäne gegen den entsprechenden Lhca4-Abschnitt führte zu einer stark verminderten Chl-Bindung, da neben einem leichten Anstieg des β-Carotin-Gehalts von ursprünglich 8 Chlorophyllen nur noch ca. 4 Chl *a* und 1 Chl *b* nachgewiesen werden konnten. Der Einbau der stromalen Lhcb1-Schleife in den Lhcb4 reduzierte lediglich den Chl *a*-Gehalt um 1, während die Chl *b*- und die Carotinoid-Bindung in diesem Fall unbeeinträchtigt blieben.

Tabelle 25: Pigmentzusammensetzung rekonstituierter Lhcb4-Monomere mit substituierter luminaler oder stromaler Schleifendomäne. Ergebnisse sind Mittelwerte aus 2 (Mutante) und 4 (WT) Experimenten und mit Standardabweichung (SA) in grau dargestellt. (grün): signifikante Zunahme; (orange): signifikanter Verlust.

Monomere	Lhcb4-WT	Lhcb4-LLa4	Lhcb4-LLb1	Lhcb4-SLa4	Lhcb4-SLb1
Chlorophyll <i>a/b</i> Verhältnis	2,07	2,98	3,11	3,30	1,84
±SA	0,36	0,20	0,18	0,61	0,12
Chlorophyll-total/2 Carotinoide	8,11	5,97	5,92	4,96	7,00
±SA	0,55	0,23	0,02	1,20	0,21
Chlorophyll <i>a</i> /2 Carotinoide	5,42	4,47	4,47	3,82	4,53
±SA	0,20	0,25	0,05	1,09	0,24
Chlorophyll <i>b</i> /2 Carotinoide	2,69	1,50	1,44	1,14	2,47
±SA	0,46	0,02	0,07	0,12	0,03
Lutein / 2 Carotinoide	1,08	1,30	1,33	1,11	1,14
±SA	0,21	0,03	0,00	0,13	0,01
Neoxanthin / 2 Carotinoide	0,54	0,33	0,32	0,47	0,57
±SA	0,12	0,02	0,01	0,08	0,01
Violaxanthin / 2 Carotinoide	0,34	0,21	0,18	0,26	0,23
±SA	0,11	0,01	0,02	0,07	0,00
β-Carotin / 2 Carotinoide	0,04	0,16	0,17	0,16	0,06
±SA	0,03	0,00	0,01	0,01	0,00
Carotinoide/8 Chlorophylle	1,98	3,36	3,38	3,43	2,86
±SA	0,13	0,13	0,01	0,83	0,08

Da kein Lhca4 mit ausgetauschter stromaler Schleife mit dem Lhca1 dimerisierte und ein Transfer dieser stromalen Lhca4-Domäne in andere Lhcs die Eigenschaft zur Dimerbildung nicht mit übertrug, waren lediglich Pigmentanalysen der Dimerkomplexe

aus Lhca1 und Lhca4-Einzeldomänenmutanten mit getauschter luminaler Schleife durchführbar (Tabelle 26).

Sowohl die luminale Lhcb1-, als auch die luminale Lhcb4-Schleife beeinträchtigte die Pigmentbindung der Dimerkomplexe nur minimal. In beiden Mutanten war auf 2 Carotinoide bezogen kein Chl *a*-Verlust zu verzeichnen und lediglich eine schwache Chl *b*-Reduktion von 0,3-0,4 Molekülen nachzuweisen. Außerdem konnte in den Heterodimeren beider Mutanten ein Anstieg des gebundenen Luteins und eine Reduktion des β -Carotin-Gehalts festgestellt werden.

Tabelle 26: Pigmentzusammensetzung der rekonstituierten heterodimeren Komplexe aus Lhca1-WT und Lhca4 Einzeldomänenmutanten mit substituierter luminaler Schleifenregion. Ergebnisse sind aus 2 (Mutanten) und 4 (Wildtyp) Experimenten gemittelt und mit Standardabweichung (grau) dargestellt. (grün): signifikante Zunahme; (orange): signifikanter Verlust.

Dimere	Lhca4-WT	Lhca4-LLb1	Lhca4-LLb4
Chlorophyll <i>a/b</i> Verhältnis	2,45	2,72	2,88
$\pm$ SA	0,11	0,04	0,04
Chlorophyll-total/2 Carotinoide	9,84	9,43	9,31
$\pm$ SA	0,41	0,08	0,03
Chlorophyll <i>a</i> /2 Carotinoide	6,99	6,89	6,91
$\pm$ SA	0,33	0,03	0,01
Chlorophyll <i>b</i> /2 Carotinoide	2,85	2,54	2,40
$\pm$ SA	0,12	0,05	0,03
Lutein / 2 Carotinoide	1,34	1,50	1,52
$\pm$ SA	0,05	0,00	0,01
Neoxanthin / 2 Carotinoide	0,10	0,07	0,07
$\pm$ SA	0,03	0,00	0,01
Violaxanthin / 2 Carotinoide	0,31	0,37	0,36
$\pm$ SA	0,04	0,01	0,00
β -Carotin / 2 Carotinoide	0,24	0,07	0,06
$\pm$ SA	0,04	0,01	0,00
Carotinoide/10 Chlorophylle	2,04	2,12	2,15
$\pm$ SA	0,08	0,02	0,01

Von den angefertigten Punkt- und Bereichsmutanten des Lhca4 mit Mutationen in den luminalen und stromalen Proteinabschnitten zur Aufklärung der Lhca1-Lhca4-Interaktion existieren nur Einzelmessungen isolierter Monomerkomplexe, wodurch die daraus gewonnenen Erkenntnisse nur als tendenziell zu bewerten sind. Aufgrund der vorliegenden PSI-Modelle (Jolley et al., 2005) und Kristallstrukturen (Ben-Shem et al., 2003, Amunts et al., 2007) und der hoch aufgelösten LHCI-Struktur (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005), war eine Beteiligung der mutierten Bereiche an einer Chlorophyll- oder Carotinoidbindung auch nicht zu erwarten. Da Mutationen in diesen Regionen aber früher bereits zu instabilen Komplexen führten, war eine Überprüfung dieser Komplexe angemessen, wobei nur eine Analyse pro Mutante durchgeführt wurde.

In Tabelle 27 sind die Pigmentdaten von monomeren Lhca4-Punkt- und Bereichsmutanten mit substituierten AS in der luminalen Schleife aufgelistet. Die Lhca4-K80T-Mutante wies als einzige einen um ca. 0,5 Moleküle leicht reduzierten Chlorophyllgehalt auf. Alle anderen Mutanten besitzen die für einen Lhca4 typische Pigmentzusammensetzung, wobei tendenziell sogar leicht mehr Chl *a* und Chl *b* als im WT gebunden wurde. Insbesondere Komplexe der F84W- und 80-84-Mutante haben eine um 0,8-0,9 erhöhte Chlorophyllbindung. Bezüglich der Carotinoidgehalte konnte bei keinem Monomer mit mutiertem Lhca4-Proteine eine Abweichung zum WT festgestellt werden.

Tabelle 27: Pigmentzusammensetzung der rekonstituierten monomeren Komplexe aus Lhca4 Punktmutanten mit substituierten Aminosäuren der luminalen Schleifenregion. Die Mutanten wurden nur einmal untersucht, die WT-Daten stammen aus 5 Experimenten und wurden mit Standardabweichung (grau) dargestellt. (grün): Zunahme.

Monomere	Lhca4-WT	Lhca4 K80T	Lhca4 E81Y	Lhca4 K80T+E81Y	Lhca4 Q82T	Lhca4 F84W	Lhca4 K80-84W	Lhca4-80-84 +86-88
Chlorophyll a/b Verhältnis	2,37	2,46	2,38	2,40	2,35	2,37	2,41	2,42
±SA	0,11							
Chlorophyll-total/2 Carotinoide	9,84	9,39	10,12	10,26	10,41	10,70	10,58	10,42
±SA	0,24							
Chlorophyll a/2 Carotinoide	6,91	6,67	7,13	7,24	7,30	7,52	7,48	7,37
±SA	0,19							
Chlorophyll b/2 Carotinoide	2,93	2,72	2,99	3,02	3,10	3,17	3,10	3,05
±SA	0,13							
Lutein / 2 Carotinoide	1,50	1,44	1,50	1,49	1,51	1,52	1,51	1,50
±SA	0,03							
Neoxanthin / 2 Carotinoide	0,14	0,16	0,12	0,12	0,11	0,10	0,11	0,12
±SA	0,03							
Violaxanthin / 2 Carotinoide	0,21	0,20	0,19	0,19	0,18	0,19	0,19	0,18
±SA	0,03							
β-Carotin / 2 Carotinoide	0,15	0,20	0,18	0,20	0,20	0,20	0,19	0,20
±SA	0,02							
Carotinoide/10 Chlorophylle	2,03	2,13	1,98	1,95	1,92	1,87	1,89	1,92
±SA	0,05							

Die Pigmentdaten der stromalen des Lhca4-Mutanten sind in Tabelle 28 aufgelistet. Die Doppelmutante I109+110Y erreichte als rekonstituierter Komplex knapp die Pigmentzusammensetzung, wie sie für den Lhca4-WT typisch ist. Die Monomere der V115-118Q-Mutante lagen bezüglich des Chl a-Werts (0,4-0,5) leicht über dem WT-Wert. Ein besonders starker Anstieg der Chl a-Bindung war bei den Q118-122G- (+1,6) und V115-122G-Mutanten (+1,1) zu beobachten.

Tabelle 28: Pigmentzusammensetzung der rekonstituierten monomeren Komplexe aus Lhca4 Punktmutanten mit substituierten Aminosäuren der stromalen Schleifenregion. Die Mutanten wurden nur einmal untersucht, die WT-Daten stammen aus 5 Experimenten und wurden mit Standardabweichung (grau) dargestellt. (grün): Zunahme; (orange): Verlust.

Monomere	Lhca4-WT	Lhca4 I109W+K110Y	Lhca4-V115-118Q	Lhca4-Q118-122G	Lhca4-V115-122G
Chlorophyll a/b Verhältnis	2,37	2,42	2,66	2,82	2,90
±SA	0,11				
Chlorophyll-total/2 Carotinoide	9,84	9,67	10,15	11,56	11,03
±SA	0,24				
Chlorophyll a/2 Carotinoide	6,91	6,84	7,38	8,53	8,20
±SA	0,19				
Chlorophyll b/2 Carotinoide	2,93	2,82	2,77	3,03	2,83
±SA	0,13				
Lutein / 2 Carotinoide	1,50	1,51	1,52	1,58	1,46
±SA	0,03				
Neoxanthin / 2 Carotinoide	0,14	0,13	0,12	0,12	0,16
±SA	0,03				
Violaxanthin / 2 Carotinoide	0,21	0,19	0,17	0,16	0,17
±SA	0,03				
β-Carotin / 2 Carotinoide	0,15	0,18	0,19	0,13	0,22
±SA	0,02				
Carotinoide/10 Chlorophylle	2,03	2,07	1,97	1,73	1,81
±SA	0,05				

2.1.6.1.3 Auswirkungen des Austauschs der N- und C-terminalen Domäne auf die Pigmentbindung monomerer, dimerer und trimerer LHCs

Zur Untersuchung der Pigmentbindung N- und C-terminalen Einzeldomänenmutanten wurden monomere, dimere und soweit möglich trimere Lhca4-, Lhcb1- und Lhcb4-Komplexe nach Auftrennung im Saccharosedichtegradienten nach Ultrazentrifugation isoliert und per HPLC analysiert, da vor allem bei den N-terminalen

Domänentauschmutanten mit Veränderungen in der Besetzung der L2-Carotinoidbindungsstelle zu rechnen war. Da sich die Mittelwerte der Pigmentdaten der Mutanten-Komplexe im Gegensatz zu denen der Wildtypen (3-5 Experimente) nur aus 2 Experimenten zusammensetzen, sind die Standardabweichungen nur unter Vorbehalt zu betrachten.

Tabelle 29: Pigmentzusammensetzung der rekonstituierten monomeren Komplexe aus Lhca4 Einzeldomänenmutanten mit substituiertem N- oder C-Terminus. Ergebnisse sind Mittelwerte von 2 (Mutanten) und 5 (Wildtyp) Experimenten und mit Standardabweichung (SA) in grau dargestellt. (grün): signifikante Zunahme; (orange): signifikanter Verlust.

Monomere	Lhca4-WT	Lhca4-Nb1	Lhca4-Nb4 oben	Lhca4-Nb4 unten	Lhca4-Cb1	Lhca4-Cb4 oben	Lhca4-Cb4 unten
Chlorophyll <i>a/b</i> Verhältnis	2,37	2,37	3,13	2,08	2,33	2,98	2,13
±SA	0,11	0,28	0,20	0,10	0,20	0,28	0,01
Chlorophyll-total/2 Carotinoide	9,84	10,64	5,10	10,79	11,85	8,69	10,99
±SA	0,24	0,88	0,89	0,13	0,64	0,88	0,37
Chlorophyll <i>a</i> /2 Carotinoide	6,91	7,44	3,87	7,29	8,28	6,48	7,47
±SA	0,19	0,45	0,74	0,20	0,51	0,50	0,25
Chlorophyll <i>b</i> /2 Carotinoide	2,93	3,20	1,23	3,50	3,57	2,21	3,51
±SA	0,13	0,50	0,16	0,07	0,27	0,38	0,12
Lutein / 2 Carotinoide	1,50	1,57	1,30	1,66	1,59	1,29	1,52
±SA	0,03	0,15	0,00	0,02	0,09	0,06	0,04
Neoxanthin / 2 Carotinoide	0,14	0,09	0,33	0,03	0,11	0,24	0,07
±SA	0,03	0,08	0,01	0,03	0,07	0,09	0,00
Violaxanthin / 2 Carotinoide	0,21	0,18	0,24	0,21	0,10	0,23	0,20
±SA	0,03	0,04	0,00	0,02	0,09	0,02	0,01
β-Carotin / 2 Carotinoide	0,15	0,17	0,13	0,10	0,20	0,24	0,21
±SA	0,02	0,06	0,01	0,01	0,05	0,05	0,05
Carotinoide/10 Chlorophylle	2,03	1,89	4,05	1,85	1,69	2,32	1,82
±SA	0,05	0,17	0,71	0,02	0,08	0,23	0,06

In Tabelle 29 sind die Pigmentdaten der monomeren N- und C-terminalen Lhca4-Einzeldomänenmutanten zusammengefasst. Der N-Terminus des Lhcb1 am Lhca4 bewirkte keine nennenswerte Veränderung in dessen Pigmentzusammensetzung. Nach Auftrennung der Monomerkomplexe der Lhca4-Nb4-Mutante waren 2 Banden (oben/unten) zu erkennen (nicht gezeigt), die getrennt untersucht wurden. In der unteren Bande waren bis auf leicht erhöhte Chl *b*- und Lutein-Werte nur eine leichte signifikante Reduktion des Neoxanthin-Gehalts im Vergleich zum WT zu erkennen. Die obere Bande setzte sich aus Komplexen zusammen, die in ihrer Pigmentbindung völlig von den WT-Daten abwichen. Neben einem erhöhten Chl *a/b*-Verhältnis waren insgesamt ca. 50% weniger Chl *a*- und fast 2,5 weniger Chl *b*-Moleküle gebunden. Außerdem konnte eine leichte Abnahme im Lutein-Gehalt und eine Zunahme des Neoxanthin-Gehalts detektiert werden.

Der C-Terminus des Lhcb1 führte im Lhca4 zu einer Zunahme von sowohl Chl *a* (ca. 1,5), als auch Chl *b* (ca. 0,5), wodurch pro 10 Chlorophylle weniger als 2 Carotinoide detektiert wurden. Die Substitution des Lhca4 C-Terminus durch einen äquivalenten Lhcb4-Proteinabschnitt führte wie beim N-Terminus zur Ausbildung einer Doppelbande im SDG nach Monomerauftrennung. Die Pigmentzusammensetzung der Komplexe beider Banden entsprach trotz leicht erhöhter (unten) bzw. reduzierter (oben) Chl-Werte wieder weitgehend der des Lhca4-WTs, wobei die Komplexe der oberen Bande etwas mehr β-Carotin, und die Komplexe der unteren Bande mehr Chlorophylle (0,5 Chl *a*, 0,5 Chl *b*) aber etwas weniger Neoxanthin gebunden hatten.

Die Pigmentdaten der monomeren N- und C-terminalen Lhcb1 Einzeldomänenmutanten sind in Tabelle 30 dargestellt. Bei Substitution des Lhcb1 N-Terminus gegen den entsprechenden Lhca4-Abschnitt war trotz Reduktion kein signifikanter Rückgang des Chl *a*-Gehalts in dieser Mutante feststellbar. Wie im Lhca4 führte der Austausch des N-

Terminus im Lhcb1 gegen Lhcb4-AS zu einer Doppelbande nach Auftrennung der Rekonstitution im SDG. Die obere Bande zeigte auch hier stark verminderte Chl-Gehalte, aber bis auf weniger Neoxanthin und mehr Violaxanthin blieb der Carotinoid-Gehalt WT-ähnlich. Die weiter sedimentierten Komplexe der unteren Bande verloren ca. 2 Chl *a*-Moleküle gegenüber dem WT und wiesen des Weiteren reduzierte Carotinoid-Gehalte auf, wohingegen sich der Neoxanthin-Gehalt fast verdoppelte.

Tabelle 30: Pigmentzusammensetzung der rekonstituierten monomeren Komplexe aus Lhcb1 Einzeldomänenmutanten mit substituiertem N- oder C- Terminus. Ergebnisse sind Mittelwerte von 2 (Mutanten) und 3 (Wildtyp) Experimenten und mit Standardabweichung (SA) in grau dargestellt. (grün): signifikante Zunahme; (orange): signifikanter Verlust; (oben/unten): fragmentierte SDG-Monomerbande.

Monomere	Lhcb1-WT	Lhcb1-Na4	Lhcb1-Nb4 oben	Lhcb1-Nb4 unten	Lhcb1-Ca4	Lhcb1-Cb4
Chlorophyll <i>a/b</i> Verhältnis	1,97	1,87	2,35	1,27	1,73	1,24
±SA	0,11	0,10	0,03	0,18	0,23	0,33
Chlorophyll-total/3 Carotinoide	13,85	13,22	6,56	11,91	13,00	12,86
±SA	1,19	0,04	0,43	0,54	0,60	0,10
Chlorophyll <i>a</i> /3 Carotinoide	9,19	8,60	4,60	6,60	8,23	6,98
±SA	0,97	0,13	0,28	0,38	0,78	0,84
Chlorophyll <i>b</i> /3 Carotinoide	4,66	4,62	1,96	5,30	4,77	5,88
±SA	0,22	0,17	0,15	0,62	0,18	0,91
Lutein / 3 Carotinoide	2,02	2,06	2,09	1,92	2,01	1,95
±SA	0,04	0,05	0,02	0,03	0,01	0,05
Neoxanthin / 3 Carotinoide	0,51	0,53	0,37	0,97	0,66	0,88
±SA	0,07	0,03	0,05	0,12	0,08	0,22
Violaxanthin / 3 Carotinoide	0,28	0,28	0,37	0,09	0,21	0,11
±SA	0,00	0,01	0,00	0,07	0,04	0,11
β-Carotin / 3 Carotinoide	0,18	0,13	0,17	0,03	0,12	0,07
±SA	0,03	0,01	0,02	0,03	0,03	0,07
Carotinoide/14 Chlorophylle	3,05	3,18	6,43	3,53	3,24	3,27
±SA	0,25	0,01	0,42	0,16	0,15	0,03

Bei den Lhcb1-Mutanten mit substituiertem C-Terminus wirkte sich der Lhca4-C-Terminus in Form einer tendenziell leichten Verminderung des Chl-Gehalts weniger auf die Pigmentbindung aus, als der Lhcb4-C-Terminus. Diese Mutante verlor zwar gegenüber dem WT bis zu 2 Chl *a*-Moleküle und wenig Violaxanthin, der Chl *b*-Gehalt steigerte sich jedoch um 1 und es wurde mehr Neoxanthin gebunden, woraus ein sehr niedriges Chl *a/b*-Verhältnis resultierte.

Tabelle 31: Pigmentzusammensetzung der rekonstituierten monomeren Komplexe aus Lhcb4 Einzeldomänenmutanten mit substituiertem N- oder C- Terminus. Ergebnisse sind Mittelwerte von 2 (Mutanten) und 4 (Wildtyp) Experimenten und mit Standardabweichung (SA) in grau dargestellt. (grün): signifikante Zunahme; (orange): signifikanter Verlust.

Monomere	Lhcb4-WT	Lhcb4-Na4	Lhcb4-Nb1	Lhcb4-Ca4	Lhcb4-Cb1
Chlorophyll <i>a/b</i> Verhältnis	2,07	2,29	2,47	2,72	2,41
±SA	0,36	0,23	0,14	0,03	0,31
Chlorophyll-total/2 Carotinoide	8,11	7,69	8,98	7,45	7,40
±SA	0,55	0,37	0,34	0,19	0,70
Chlorophyll <i>a</i> /2 Carotinoide	5,42	5,33	6,40	5,44	5,20
±SA	0,20	0,09	0,32	0,12	0,29
Chlorophyll <i>b</i> /2 Carotinoide	2,69	2,36	2,59	2,01	2,21
±SA	0,46	0,28	0,08	0,08	0,40
Lutein / 2 Carotinoide	1,08	1,25	1,31	1,37	1,20
±SA	0,21	0,07	0,06	0,03	0,17
Neoxanthin / 2 Carotinoide	0,54	0,52	0,44	0,36	0,45
±SA	0,12	0,10	0,09	0,03	0,10
Violaxanthin / 2 Carotinoide	0,34	0,20	0,17	0,15	0,29
±SA	0,11	0,01	0,03	0,00	0,13
β-Carotin / 2 Carotinoide	0,04	0,04	0,08	0,12	0,06
±SA	0,03	0,02	0,04	0,01	0,06
Carotinoide/8 Chlorophylle	1,98	2,09	1,78	2,15	2,18
±SA	0,13	0,10	0,07	0,05	0,20

Alle Pigmentzusammensetzungen monomerer N- und C-terminaler Lhcb4-Einzeldomänenmutanten sind in Tabelle 31 aufgeführt. Bei Austausch des langen Lhcb4-N-Terminus gegen das relativ kurze Lhca4-Äquivalent traten bis auf eine minimale Violaxanthin-Reduktion, bezogen auf den Lhcb4-WT keine besonderen Abweichungen in der Pigmentbindung auf. Ein Lhcb1-N-Terminus im Lhcb4 führte zu einer nachweisbaren Erhöhung des Chl-Gehalts (1 Molekül) am Komplex, die auf eine Chl *a*-Zunahme zurückzuführen ist. Zudem binden diese Monomere weniger Violaxanthin als der Lhcb4-WT.

Während die Lhcb4-Mutante mit Lhca4-C-Terminus gegenüber dem WT 0,7 Chl *b*-Moleküle verlor, fiel die Reduktion in der Lhcb4-Cb1-Mutante mit 0,5 Chl *b*-Molekülen tendenziell etwas schwächer aus. Außerdem binden die Monomere des Lhcb4-Ca4 weniger Violaxanthin und mehr β -Carotin als der Lhcb4-WT.

Tabelle 32: Pigmentzusammensetzung der rekonstituierten heterodimeren Komplexe aus Lhca1-WT und Lhca4 Einzeldomänenmutanten mit substituiertem N oder C Terminus. Ergebnisse sind Mittelwerte von 2 (Mutanten) und 4 (Wildtyp) Experimenten und mit Standardabweichung (SA) in grau dargestellt. (grün): signifikante Zunahme; (orange): signifikanter Verlust; (DD): Doppeldimer; (D): Dimer.

Dimere	Lhca4-WT	Lhca4-Nb1 oben [D]	Lhca4-Nb1 unten [DD]	Lhca4-Nb4	Lhca4-Cb1	Lhca4-Cb4
Chlorophyll <i>a/b</i> Verhältnis	2,45	2,41	2,45	2,44	2,62	2,38
±SA	0,11	0,07	0,03	0,07	0,10	0,07
Chlorophyll-total/2 Carotinoide	9,84	9,75	9,68	10,03	10,27	10,13
±SA	0,41	0,56	0,50	0,25	0,55	0,50
Chlorophyll <i>a</i> /2 Carotinoide	6,99	6,89	6,88	7,11	7,43	7,13
±SA	0,33	0,45	0,38	0,15	0,32	0,29
Chlorophyll <i>b</i> /2 Carotinoide	2,85	2,86	2,81	2,91	2,84	3,00
±SA	0,12	0,11	0,12	0,12	0,23	0,21
Lutein / 2 Carotinoide	1,34	1,28	1,27	1,33	1,35	1,36
±SA	0,05	0,07	0,09	0,05	0,05	0,06
Neoxanthin / 2 Carotinoide	0,10	0,11	0,11	0,10	0,14	0,09
±SA	0,03	0,02	0,03	0,03	0,01	0,03
Violaxanthin / 2 Carotinoide	0,31	0,24	0,23	0,24	0,23	0,26
±SA	0,04	0,00	0,00	0,04	0,04	0,06
β -Carotin / 2 Carotinoide	0,24	0,37	0,39	0,33	0,28	0,29
±SA	0,04	0,05	0,07	0,07	0,00	0,03
Carotinoide/10 Chlorophylle	2,04	2,06	2,07	2,00	1,95	1,98
±SA	0,08	0,12	0,11	0,05	0,10	0,10

In Tabelle 32 sind sämtliche Pigmentdaten heterodimerer Komplexe der Lhca4 Einzeldomänenmutanten mit substituiertem N- oder C-Terminus aufgelistet. Alle Mutanten die mit dem Lhca1-WT Dimere bilden konnten, oder wie im Falle des Lhca4-Nb1 auch als Doppeldimer vorlagen, wichen in ihrer Pigmentzusammensetzung kaum vom Lhca1-Lhca4-Heterodimer ab. Nur die Heterodimere und Doppelheterodimere des Lhca4-Nb1 hatten, verglichen mit dem WT-Heterodimer, weniger Violaxanthin und mehr β -Carotin gebunden.

Da bei den N-terminalen Lhcb1 Einzeldomänenmutanten keine Trimerbande vorhanden war, sind in Tabelle 33 nur die Pigmentdaten der Trimerkomplexe von C-terminalen Lhcb1-Mutanten aufgeführt. Während der C-Terminus des Lhca4 im Lhcb1 insbesondere zu einer Erhöhung der Chl *b*-Werte (0,7) führte, stiegen der Chl *b*-Gehalt im Lhcb1-Cb4 um 0,8 Moleküle, wobei 0,9 weniger Chl *a* je Apoprotein im Trimer gebunden wurde. In beiden Trimeren waren ein minimaler Anstieg der Neoxanthin-Bindung und kein gebundenes Violaxanthin mehr feststellbar.

Tabelle 33: Pigmentzusammensetzung der rekonstituierten trimeren Komplexe aus Lhcb1 Einzeldomänenmutanten mit substituiertem C Terminus. Ergebnisse sind Mittelwerte von 2 Experimenten und mit Standardabweichung (SA) in grau dargestellt. (grün): signifikante Zunahme; (orange): signifikanter Verlust.

Trimere	Lhcb1-WT	Lhcb1-Ca4	Lhcb1-Cb4
Chlorophyll <i>a/b</i> Verhältnis	1,13	1,02	0,88
±SA	0,03	0,01	0,03
Chlorophyll-total/3 Carotinoide	13,54	14,38	13,44
±SA	0,08	0,07	0,48
Chlorophyll <i>a</i> /3 Carotinoide	7,18	7,25	6,26
±SA	0,14	0,02	0,10
Chlorophyll <i>b</i> /3 Carotinoide	6,37	7,13	7,17
±SA	0,06	0,09	0,38
Lutein / 3 Carotinoide	2,01	1,97	1,93
±SA	0,02	0,01	0,03
Neoxanthin / 3 Carotinoide	0,95	1,03	1,07
±SA	0,02	0,01	0,03
Violaxanthin / 3 Carotinoide	0,05	0,00	0,00
±SA	0,00	0,00	0,00
β-Carotin / 3 Carotinoide	0,00	0,00	0,00
±SA	0,00	0,00	0,00
Carotinoide/14 Chlorophylle	3,10	2,92	3,13
±SA	0,02	0,01	0,11

2.1.6.2 Einfluss der getauschten Domänen und Punktmutationen auf den Energietransfer in LHCs

Analog zur biochemischen Untersuchung der Pigmentausstattung wurden die rekonstituierten Komplexe auch einer biophysikalischen Charakterisierung unterzogen. Dazu wurden neben den Monomeren von Lhca4-, Lhcb1- und Lhcb4-Einzeldomänenmutanten, auch die Heterodimere von Lhca1- und Lhca4-Proteinen und die trimeren Lhcb1-Komplexe unter Tieftemperaturbedingungen bei 470 nm (Chl *b*) angeregt und derer Fluoreszenzemission gemessen. Beim Vergleich der Emissionsspektren der Mutanten mit den Spektren der Wildtyp-Komplexe konnten Aussagen bezüglich des Energietransfers von Chl *b* zu Chl *a* getroffen werden.

Im Spektrum eines monomeren Lhca4-WT nach Chl *b*-Anregung lassen sich in der Regel 3 Chl-Populationen unterscheiden. Bei 654 nm emittieren die energetisch nicht gekoppelte Chl *b*-Moleküle, die ihre excitonische Anregungsenergie nicht auf andere im Komplex gebundenen Chlorophylle transferieren können. Zwei weitere Peaks von am Komplex gebundenen Chlorophyllen finden sich bei ca. 685 nm und 730 nm, wobei letztere die charakteristisch langwellige Fluoreszenzkomponente des Lhca4 darstellt, die im Heterodimer mit Lhca1 durch starke excitonische Kopplung noch ausgeprägt ist (Mukerji und Sauer, 1993; Schmid et al., 1997; Ihalainen et al., 2000; Schmid et al., 2001). In Fluoreszenzspektren von Lhcb1- (Hemelrijk et al., 1992)) und Lhcb4-Komplexen (Pascal et al., 1999) existieren nur die ersten beiden Chlorophyllpopulationen, aber keine langwellige Fluoreszenzkomponente.

Alle Spektren wurden - falls nicht anders angegeben - auf die gemeinsame Amplitude zwischen 685 nm und 690 nm normiert, wodurch neben den energetisch ungekoppelten Chlorophyllen insbesondere bei den Lhca4-Komplexen, die Unterschiede zur charakteristischen langwelligen Fluoreszenz bei ca. 735 nm deutlich wurden.

2.1.6.2.1 Auswirkungen der Punktmutationen an Chlorophyll-bindenden AS der 2. Helix des Lhca4 auf den Energietransfer in monomeren und dimeren LHCs

Monomere und Heterodimere mit Mutationen in Chlorophyllbindungsstellen in der zweiten Helix des Lhca4 wurden bezüglich ihrer Fluoreszenzemission untersucht. Das am E102 gebundene Chl b5 bildet mit dem am N47 gebundenen Chl a5 ein Chlorophyll a-Dimer, welches hauptsächlich für die langwellige Fluoreszenzkomponente des Lhca4 verantwortlich ist (Morosinotto et al., 2005). In der gleichen Studie wurde auch eine leichte Beteiligung des am E94 gebundenen Chl b6 an der langwelligen Komponente belegt. Das am H99 des Lhca4 koordinierte Chlorophyll wurde zunächst postuliert (Melkozernov und Blankenship, 2003), danach biochemisch charakterisiert (Corbet, 2004) und schließlich auch in der Kristallstruktur gefunden (Ben-Shem et al., 2003). Durch die Orientierung zum Lhca1 scheint kein Einfluss auf das excitonisch gekoppelte Chlorophyll-Dimer vorzuliegen. Die vorliegende Analyse betrachtet alle vorliegenden Chlorophyllbindungsmutanten der Helix 2 des Lhca4 parallel, um sie in Zusammenhang mit den durchgeführten Dimerrekonstitutionen zu bringen, da die gebundenen Chlorophylle auch einen Einfluss auf die Dimerisierung mit dem Lhca1 haben (Kap. D2.1.5.2).

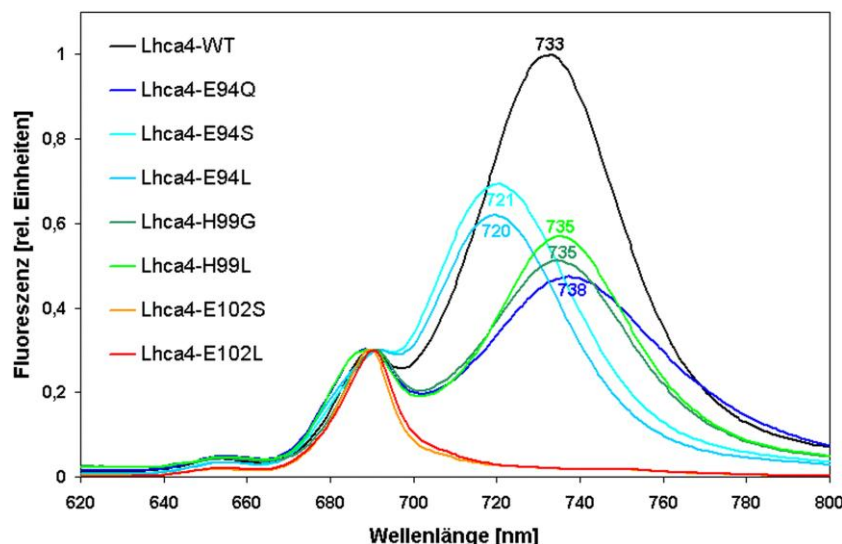


Abb. 49: Tieftemperaturmissionsfluoreszenzspektren rekonstituierter Monomerkomplexe aus Lhca4 Mutanten mit Substitutionen Chlorophyll-bindender Aminosäuren der zweiten Helix nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm. Kurven sind aus 4 Experimenten gemittelt und auf gemeinsame Amplitude im Bereich des 685er-Peaks normiert.

Die Normierung der aus vier Experimenten gemittelten 77K-Tieftemperaturfluoreszenzspektren der Monomere nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm (Abb. 49) erfolgte im Bereich des 685 nm Peaks. Der WT wies ein Maximum bei 733 nm auf, dass im Vergleich zur 695er Fluoreszenz sehr viel stärker ausgeprägt war. Auffallend war die Verschiebung der langwelligen Komponente bei Komplexen der E94S- (721 nm) und E94L-Mutante (720 nm) ins Kurzwellige und einer Verschiebung ins Langwellige bei Monomeren der E94Q-Mutante (738 nm), wobei die Maxima bei Komplexen der zwei H99-Mutanten nur geringfügig auf 735 nm versetzt waren. Die langwellige Komponente bei den E94- und H99 Mutanten war zwischen 30% (E94S) und 50% (E94Q) gegenüber dem 685er Peak reduziert. Die Komplexe mit E102-Mutationen haben durch die Folgen der Substitution jegliche langwelligen Fluoreszenzeigenschaften verloren.

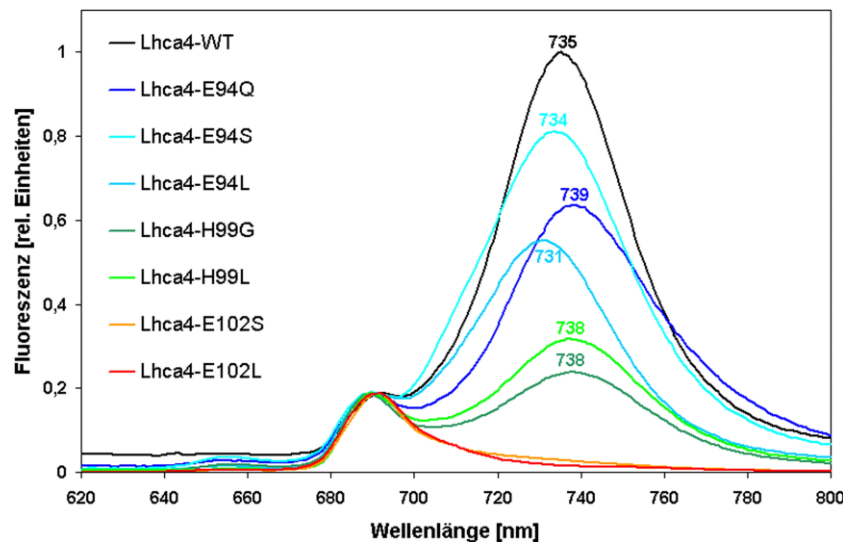


Abb. 50: Tieftemperaturemissionsfluoreszenzspektren rekonstituierter Dimerkomplexe aus Lhca4 Mutanten mit Substitutionen Chlorophyll-bindender Aminosäuren der zweiten Helix nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm. Kurven sind aus 2 Experimenten gemittelt und auf gemeinsame Amplitude im Bereich des 690er-Peaks normiert.

Die in Abb. 50 dargestellten Tieftemperaturemissionsspektren der isolierten Dimerkomplexe führten die Trends, welche aus den Monomerspektren bekannt waren, fort. Während die langwellige Fluoreszenz des WT-Dimers bei 735 nm lokalisiert war, lagen die Maxima der H99-Dimere bei 783 nm. Analog zu den Monomerspektren waren die Fluoreszenzmaxima von Dimeren der E94S- (734 nm) und E94L-Mutante (731 nm) ins Kurzwellige und Dimere der E94Q-Mutante (739 nm) ins Langwelige verschoben. Die Abschwächung der langwelligen Fluoreszenzkomponente gegenüber der des 685er Peaks verhielt sich noch etwas ausgeprägter als bei den Monomerspektren. Die Reduktion der Fluoreszenz bei Komplexen der E94S-Mutante beschränkte sich auf nur 20%, während die E94Q- (-40%) und die E94L-Fluoreszenz (-50%) im Heterodimer deutlich stärker abnahmen. Die schwächsten langwelligen Fluoreszenzemissionen wurden bei den Dimerkomplexen der zwei H99 Mutanten beobachtet, die nur noch auf 25-30% der WT-Emission kamen. Auch im Dimerkomplex mit Lhca1-WT war bei den zwei E102 Mutanten keine langwellige Fluoreszenz detektierbar.

2.1.6.2.2 Auswirkungen des Austauschs und der Punktmutation luminaler und stromaler Schleifendomänen auf den Energietransfer in monomeren und dimeren LHCs

Nachdem in einem vorherigen Kapitel der Einfluss der luminalen und stromalen Schleifenregionen auf die Di- und Trimerisierung von Lhc-Proteinen untersucht (Kap. D2.1.3 und D2.1.4), und rekombinante LHCs auf ihre Pigmentzusammensetzung hin analysiert worden waren (Kap. D2.1.6.1.2), sollten zusätzliche Fluoreszenzemissionsspektren dieser Mutanten aufgenommen werden. Da in diesen Domänen keine Chlorophylle gebunden sind, sondern nur die L1- (stromale Schleife) und L2-Carotinoidbindungsstellen (luminale Schleife) lokalisiert sind, können nur indirekte Auswirkungen auf die Fluoreszenzemission der energetisch gekoppelten oder ungekoppelten Chlorophylle beobachtet werden, die auf die Substitution oder fehlerhafte Carotinoidbindung zurückzuführen sind. Die Spektren von Komplexen der Einzeldomänenmutanten sind aus 2 Experimenten gemittelt. Alle Monomere von Lhca4-Mutanten mit Punktmutationen in den Schleifenregionen wurden nur einmal analysiert, wodurch die erzielten Ergebnisse nur unter Vorbehalt zu betrachten sind.

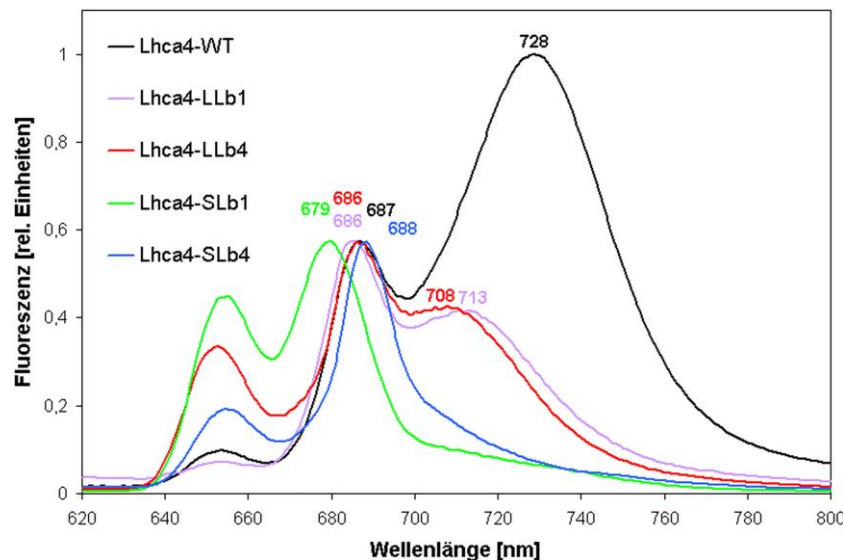


Abb. 51: Tieftemperaturemissionsfluoreszenzspektren rekonstituierter Monomerkomplexe aus Lhca4 Einzeldomänenmutanten mit substituierter luminaler oder stromaler Schleife nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm. Kurven sind aus 2 (Mutanten) und 5 (Wildtyp) Experimenten gemittelt und auf gemeinsame Amplitude im Bereich des 685er-Peaks normiert.

Die Tieftemperaturfluoreszenzspektren der Monomerkomplexe aus luminalen und stromalen Lhca4-Einzeldomänenmutanten sind in Abb. 51 dargestellt. Der Austausch der luminalen Lhca4-Schleife führte zu einer starken Reduktion der langwelligigen Fluoreszenz. Die Komplexe der Lhca4-LLb1-Mutante zeigten verglichen mit allen anderen Lhca4-Proteinen den niedrigsten Peak bei 654 nm. Das nächste zu längerer Wellenlänge verschobene Maximum lag ähnlich dem Lhca4-WT (687 nm) bei 686 nm, während die langwellige Fluoreszenz dieser Mutante nicht nur erniedrigt, sondern auch stark in den kurzwelligen Bereich (713 nm) des Spektrums verschoben vorlag. Ein starker Anstieg der Fluoreszenz energetisch ungekoppelter Chlorophylle war bei der Lhca4-LLb4-Mutante zu beobachten, die zwar einen dem WT ähnlichen 686er Peak aufwies, bei welcher jedoch nur noch eine geringe und ins Kurzwellige versetzte (708 nm) langwellige Fluoreszenzemission detektiert werden konnte.

Die zwei Lhca4-Mutanten mit substituierten stromalen Schleifenregionen wiesen einen starken Anteil ungekoppelter Chlorophyllfluoreszenz auf. Außerdem konnte bei diesen Lhca4-Mutanten keine langwellige Fluoreszenzpopulation mehr identifiziert werden. Wenn überhaupt, dann war die langwellige Schulter der Spektren monomerer Lhca4-SLb4-Komplexe etwas ausgeprägter als bei den Lhca4-SLb1-Monomeren. Der 688er Peak der Lhca4-SLb4-Mutante entsprach in diesem Abschnitt des Spektrums eher dem des Lhca4-WT, wohingegen bei der Lhca4-SLb1-Mutante eine Verschiebung dieser Chlorophyllpopulation (679 nm) in den kurzwelligeren Bereich des Spektrums stattfand.

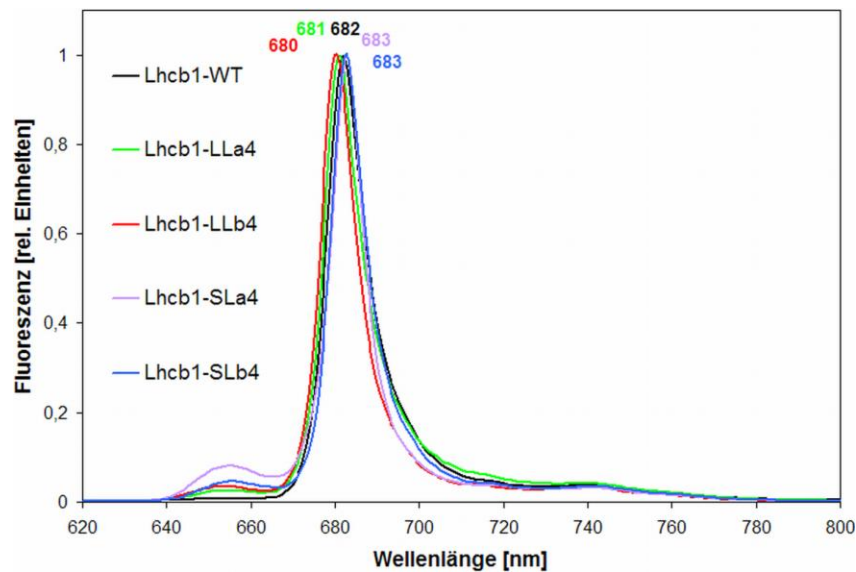


Abb. 52: Tieftemperaturemissionsfluoreszenzspektren rekonstituierter Monomerkomplexe aus Lhcb1 Einzeldomänenmutanten mit substituierter luminaler oder stromaler Schleife nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm. Kurven sind aus 2 (Mutanten) und 3 (Wildtyp) Experimenten gemittelt und auf gemeinsame Amplitude im Bereich des 682er-Peaks normiert.

In Abb. 52 sind die monomeren Lhcb1-Fluoreszenzemissionsspektren luminaler und stromaler Einzeldomänenmutanten abgebildet. Während beim Lhcb1-WT keine energetisch ungekoppelten Chlorophylle zu finden waren, wiesen alle luminalen und stromalen Schleifenmutanten niedrige Fluoreszenzemissionen im Bereich von 654 nm auf, wobei die Monomerkomplexe der Lhcb1-SLa4-Mutante am stärksten dort emittierten. Ansonsten bezogen sich die Abweichungen zwischen den Mutanten und dem WT auf die Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums, wobei die Komplexe der luminalen Mutanten Lhcb1-LLa4 (681 nm) und Lhcb1-LLb4 (680 nm) kurzwelliger und die Monomere der stromalen Mutanten Lhcb1-SLa4 (683 nm) und Lhcb1-SLb4 (683 nm) langwelliger ausgeprägt waren als beim WT.

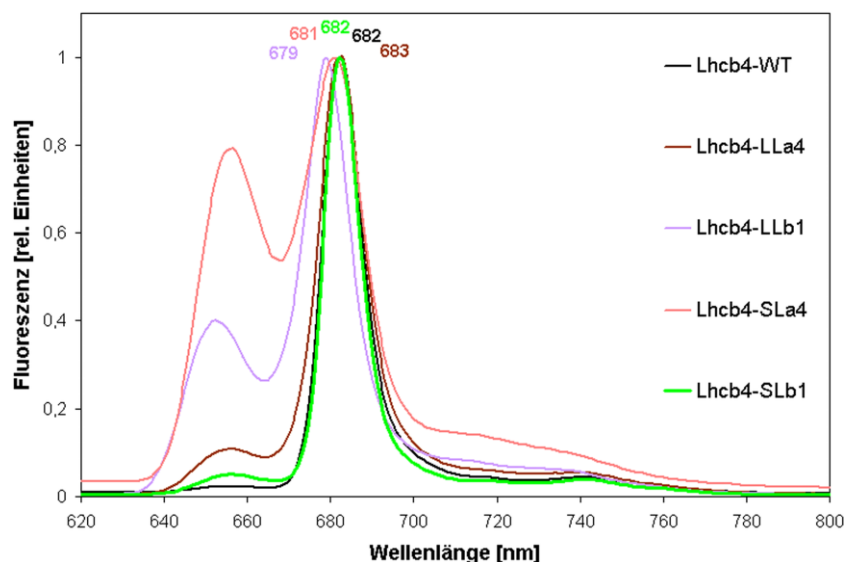


Abb. 53: Tieftemperaturemissionsfluoreszenzspektren rekonstituierter Monomerkomplexe aus Lhcb4 Einzeldomänenmutanten mit substituierter luminaler oder stromaler Schleife nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm. Kurven sind aus 2 (Mutanten) und 4 (Wildtyp) Experimenten gemittelt und auf gemeinsame Amplitude im Bereich des 682er-Peaks normiert.

Die Fluoreszenzemissionsspektren monomerer Lhcb4-Komplexe mit substituierter luminaler oder stromaler Domänen sind in Abb. 53 dargestellt. Die Untersuchung der Lhcb4-LLa4-Monomere zeigte, dass kaum ungekoppelte Chlorophylle in der Präparation vorlagen und dass das Fluoreszenzmaximum (683 nm) dieser Mutante dem des Lhcb4-WT (682 nm) sehr nahe kam. Die Spektren der Lhcb4-LLb1-Komplexe deuten auf einen beträchtlichen Anteil ungekoppelter Chlorophylle hin, wobei der 679er Peak auch stärker als bei allen anderen Mutanten der luminalen und stromalen Schleife in den kurzwelligen Bereich des Spektrums verschoben war.

Der Transfer der stromalen Schleifenregion des Lhca4 in den Lhcb4 führt nach Chl *b*-Anregung der Komplexe in dieser Mutante zum stärksten je beobachteten Fluoreszenzanstieg der energetisch ungekoppelten Chlorophylle. Das Maximum liegt mit 681 nm nahe dem WT-Maximum. Eine weitere Besonderheit war das Vorkommen einer langwelligen Fluoreszenz bei der Lhcb4-SLa4-Mutante, deren Existenz aber auf eine generell schwache Signalstärke der Fluoreszenzemission zurückzuführen sein könnte. Das Spektrum der Lhcb4-SLb1-Mutante war bis auf die leicht erhöhte 654er-Fluoreszenz deckungsgleich mit dem Lhcb4-WT.

Da keine Heterodimere mit Lhca4-Mutanten, deren stromale Schleife ausgetauscht worden war, hergestellt werden konnten, sind in Abb. 54 nur die Fluoreszenzemissionsspektren der Heterodimere von Lhca4-Mutanten mit substituierter luminaler Schleife dargestellt. Die Spektren beider Lhca4-Mutanten wichen so stark vom WT-Dimer ab, dass eine gemeinsame Normierung auf den 685er Peak nicht sinnvoll erschien, da dies zu einer ungleichmäßigen Gewichtung der langwelligen Fluoreszenz im WT-Dimer geführt hätte. Deshalb wurden die beiden Maxima der Mutanten mit getauschter luminaler Schleife und der 736er Peak des WT-Dimers gemeinsam auf 1 normiert.

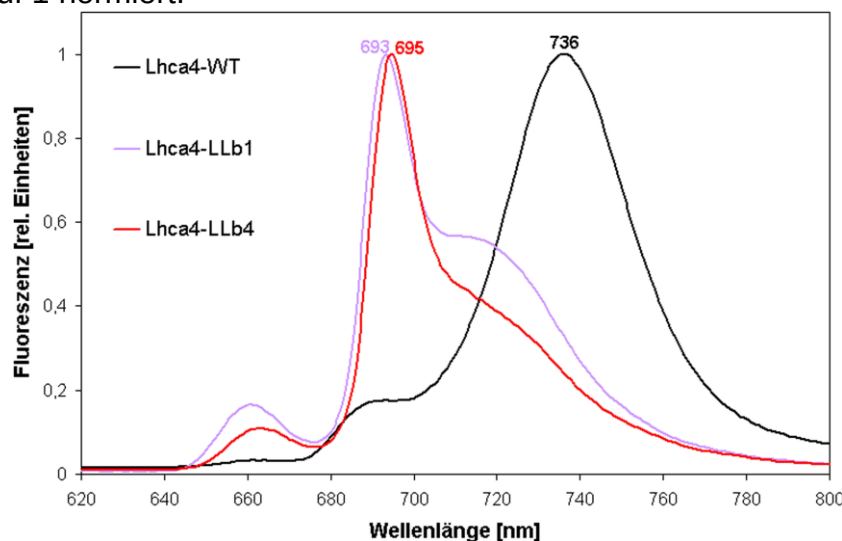


Abb. 54: Tieftemperaturemissionsfluoreszenzspektren rekonstituierter Dimerkomplexe aus Lhca4 Einzeldomänenmutanten mit substituierter luminaler Schleife nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm. Kurven sind aus 2 (Mutanten) und 4 (Wildtyp) Experimenten gemittelt und auf höchste Amplitude normiert.

Weder das Lhca1/Lhca4-LLb1-Dimer, noch das Lhca1/Lhca4-LLb4-Dimer weisen einen konkreten Peak im langwelligen Bereich des Spektrums auf. Bei beiden Komplexen war aber eine mehr (Lhca4-LLb1) oder weniger (Lhca4-LLb4) stark ausgeprägte Schulter im Spektrum zu erkennen. Bei beiden Dimerkomplexen mit mutierten Lhca4-Apoproteinen konnten Fluoreszenzemissionen ungekoppelter Chlorophylle detektiert werden. Die Maxima beider Dimerkomplexe sind mit 693 nm (Lhca4-LLb1) und 695 nm (Lhca4-LLb4) verglichen mit einem Monomer stark in den langwelligen Bereich des Spektrums

verschoben. Ein Vergleich mit dem WT-Heterodimer ist in dieser Region nicht möglich, da in diesem Abschnitt des Spektrums nur ein Fluoreszenzplateau liegt.

Die erhaltenen Fluoreszenzemissionsspektren der Lhca4-Mutanten mit luminal (Abb. 55) und stromal (Abb. 56) gelegenen Punkt- und Bereichsmutationen sind wegen der geringen Anzahl an Experimenten nicht abgesicherte Ergebnisse. Da die Signale einiger Spektren stark verrauscht waren, konnten die Maxima nicht immer klar zugeordnet werden.

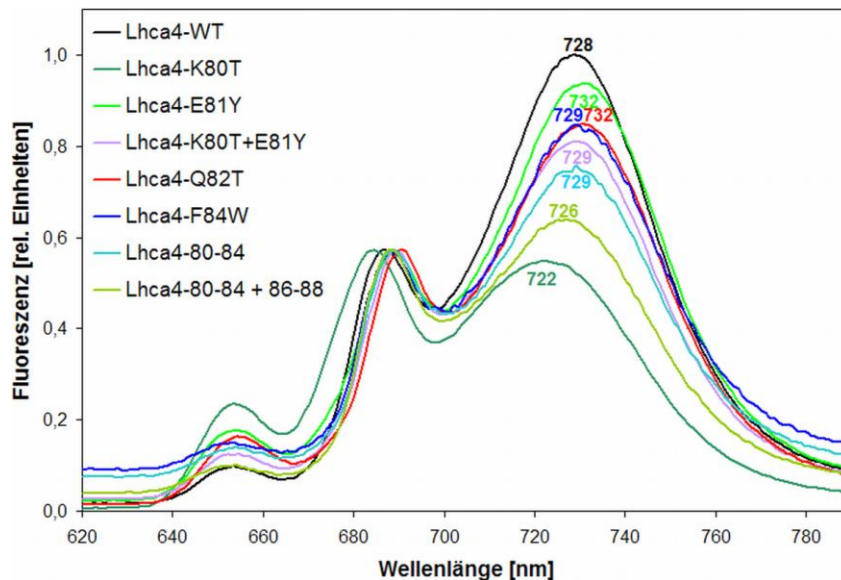


Abb. 55: Tieftemperaturemissionsfluoreszenzspektren rekonstituierter Lhca4-Monomerkomplexe mit Punktmutationen im Bereich der luminalen Schleife nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm. Kurven sind aus 1 (Mutanten) und 5 (Wildtyp) Experimenten gemittelt, und auf gemeinsame Amplitude im Bereich des 685er-Peaks normiert und auf gleichen Chl *b*-Peak bei 654nm korrigiert.

Bei Betrachtung der Spektren aller Lhca4-Mutanten mit Mutationen in der luminalen Schleife (Abb. 55), fällt auf, dass eine Verringerung der langwelligen Fluoreszenz mit einer Verschiebung des langwelligen Peaks ins Kurzwellige einherging. Im Falle des monomeren K80T-Komplexes war die langwellige Fluoreszenz am niedrigsten und bei 722 nm lokalisiert. Zudem war aber auch die vorgelagerte Fluoreszenz der anderen Chlorophyllpopulation ins Kurzwellige verschoben und gleichzeitig die Emission energetisch ungekoppelter Chlorophylle stark erhöht. Die zwei Bereichsmutanten und die Doppelmutante, welche ebenfalls die K80T-Mutation beinhaltet, waren in ihrer langwelligen Fluoreszenz reduziert, näherten sich aber immer mehr dem WT an. Die Spektren der übrigen Mutanten hatten im Grunde einen sehr ähnlichen Verlauf wie das WT-Spektrum.

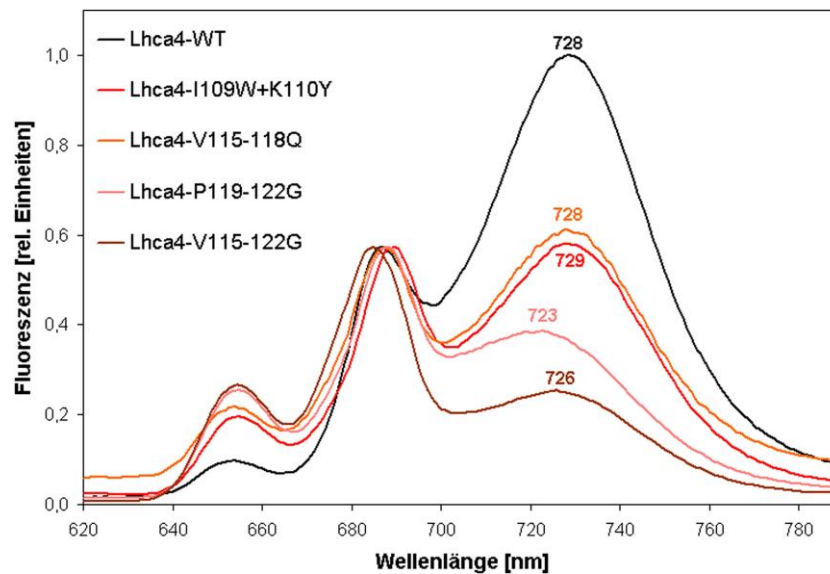


Abb. 56: Tieftemperaturemissionsfluoreszenzspektren rekonstituierter Lhca4-Monomerkomplexe mit Punktmutationen im Bereich der stromalen Schleife nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm. Kurven sind aus 1 (Mutanten) und 5 (Wildtyp) Experimenten gemittelt, auf gemeinsame Amplitude im Bereich des 685er-Peaks normiert und auf gleichen Chl *b*-Peak bei 654nm korrigiert.

Die Fluoreszenz aller Monomere der Punkt- und Bereichsmutanten (Abb. 56) war im langwelligen Bereich reduziert und im Bereich der ungekoppelten Chl-Fluoreszenz erhöht. Die langwellige Fluoreszenz der Doppelmutante I109W+K110Y sowie der Bereichsmutante V115-118Q war um ca. 50% gegenüber dem WT reduziert, wobei das Maximum bei 729 nm bzw. 728 nm lag. Die Bereichsmutante P119-122G war in ihrer langwelligen Fluoreszenz (Maximum bei 723 nm) am zweitstärksten gemindert und wurde nur von der V115-122G-Mutante unterboten, die lediglich einen langwelligen flachen Peak (Maximum bei 726 nm) aufzuweisen hatte.

2.1.6.2.3 Auswirkungen des Austauschs der N- und C-terminalen Domäne auf den Energietransfer in monomeren, dimeren und trimeren LHCs

Da die N-terminale Domäne des Lhcb1 einen Beitrag zur Trimerisierung des LHCII leistet (Hobe et al., 1995) und in diesem Proteinabschnitt bei allen untersuchten Lichtsammelproteinen eine konservierte, aber variabel zu besetzende Carotinoidbindungsstelle (L2) vorhanden ist (Croce et al., 1999b; Hobe et al., 2000) und da Pigmentanalysen an rekombinanten LHCs zeigen, dass vor allem Lhca4- und Lhcb1-Komplexe Chlorophyllverluste aufwiesen (D2.1.6.1.3), war die Untersuchung der Fluoreszenzemission der nächste Schritt. Es sollte geklärt werden, ob die Veränderungen in der Pigmentzusammensetzung der LHCs auch deren spektrale Eigenschaften beeinflussen, und ob sich variiierende Carotinoidgehalte auch auf die Fluoreszenzemission der energetisch gekoppelten Chlorophylle auswirken. Da beim Austausch der C-terminalen Domäne auch unerwartete Chl-Verluste eintraten, stellte sich die Frage, ob diese Chlorophylle im Energietransfer mit involviert sind.

Die Spektren von Komplexen der Einzeldomänenmutanten mit getauschtem N- oder C-Terminus sind aus 2 Experimenten gemittelt.

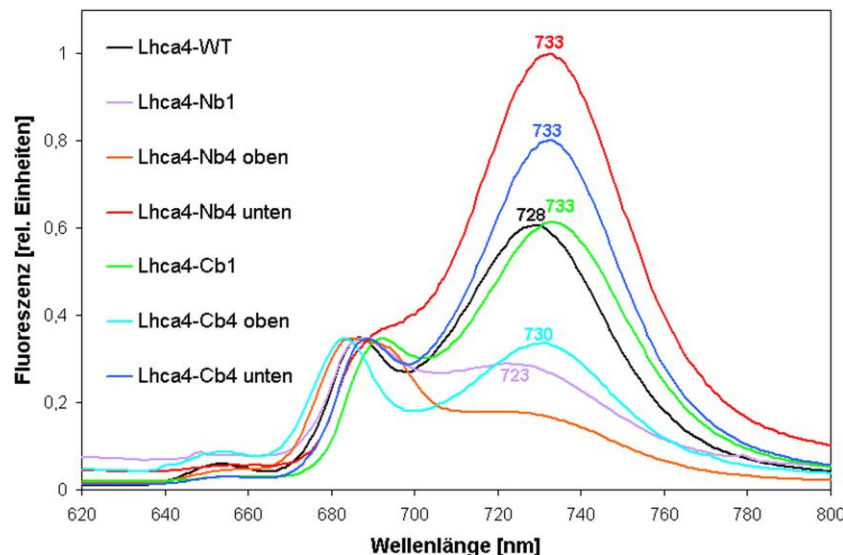


Abb. 57: Tieftemperaturemissionsfluoreszenzspektren rekonstituierter Monomerkomplexe aus Lhca4 Einzeldomänenmutanten mit substituiertem N- oder C-Terminus nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm. Kurven sind aus 2 (Mutanten) und 5 (Wildtyp) Experimenten gemittelt und auf gemeinsame Amplitude im Bereich des 685er-Peaks normiert. (oben/unten): zweiteilige SDG-Monomerbande.

Die in Abb. 57 dargestellten Fluoreszenzemissionsspektren der Monomerkomplexe aller Lhca4-Einzeldomänenmutanten mit substituiertem N- und C-Terminus wiesen wie der WT nur geringe Anteile ungekoppelter Chl-Fluoreszenz auf. Die langwellige Komponente bei Komplexen der Lhca4-Nb1-Mutante war nicht nur niedriger als deren 685er Peak, sondern auch auf 723 nm in den kurzwelligen Bereich des Spektrums verschoben. Die zwei erhaltenen Lhca4-Nb4-Monomerbanden waren auch spektroskopisch betrachtet sehr unterschiedlich. Während die untere Bande mit einem erhöhten 733er Maximum eher dem WT ähnelte, konnte bei der oberen Bande nur ein niedriges Plateau mit langwelliger Fluoreszenz detektiert werden, wobei auch die Fluoreszenzemission der anderen energetisch gekoppelten Chlorophyllpopulation auf 680 nm verschoben war.

Ein Austausch des C-Terminus im Lhca4 gegen den äquivalenten Lhcb1-Abschnitt verschob das gesamte Spektrum der Komplexe um 5 nm ins Langwellige (690 nm, 733 nm), wodurch aber keine Veränderungen in den Verhältnissen der Amplituden zueinander auftraten. Auch die Monomerrekonstitution des Lhca4-Cb4 führte zur Ausbildung von 2 Banden, die getrennt untersucht wurden. Der erste Peak (680 nm) der oberen Bande war stark ins Kurzwellige verschoben und erreicht die gleiche Amplitude wie der schwache langwellige Peak (730 nm). Die Komplexe der unteren Bande entsprachen in ihren spektralen Eigenschaften, bis auf eine Versetzung der langwelligen Fluoreszenz (733 nm) um 5 nm und dessen leicht erhöhten Amplitude, den Charakteristika des Wildtyps.

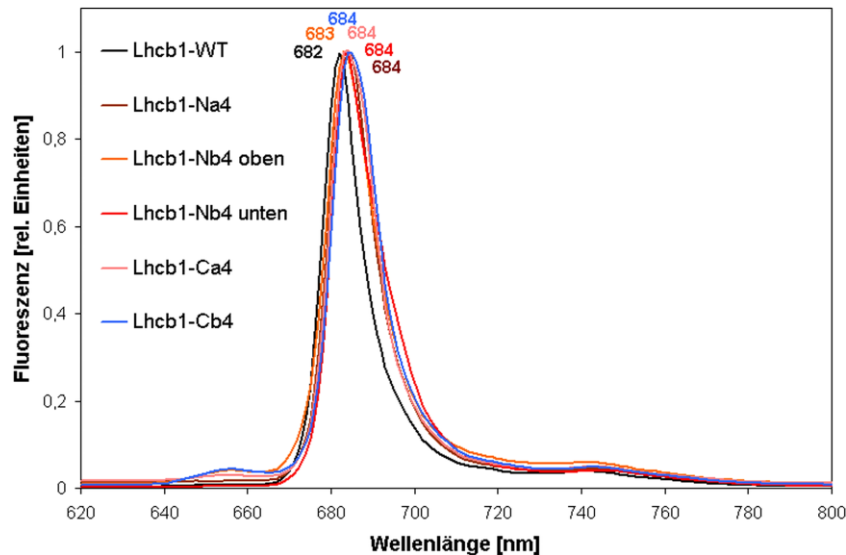


Abb. 58: Tieftemperaturemissionsfluoreszenzspektren rekonstituierter Monomerkomplexe aus Lhcb1 Einzeldomänenmutanten mit substituiertem N- oder C-Terminus nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm. Kurven sind aus 2 (Mutanten) und 3 (Wildtyp) Experimenten gemittelt und auf gemeinsame Amplitude im Bereich des 682er-Peaks normiert. (oben/unten): zweiteilige SDG-Monomerbande.

Die Monomerkomplexe N- und C-terminaler Lhcb1-Einzeldomänenmutanten (Abb. 58) zeigten nach Chl *b*-Anregung ein dem WT ähnlicheres und stärker übereinstimmendes Fluoreszenzspektrum als die Lhca4-Monomere. Da der Lhcb1-Komplex keine langwellige Chl-Population besitzt, konnte entweder energetisch ungekoppeltes Chlorophyll oder eine Verschiebung der Maxima detektiert werden. Ein niedriger 654er Peak war - wenn überhaupt - nur bei Komplexen des Lhcb1-Nb4-oben und bei der Lhcb1-Cb4-Mutante nachzuweisen. Ansonsten beschränkten sich die Unterschiede zum Lhcb1-WT in der Wellenlänge des Peakmaximums. Während der WT bei 682 nm am stärksten fluoreszierte, taten dies die Lhcb4-Nb4-oben Monomere bei 683 nm und alle anderen N- und C-terminalen Mutanten bei 684 nm, wodurch die Unterschiede aller Lhcb1-Mutanten als minimal zu betrachten waren.

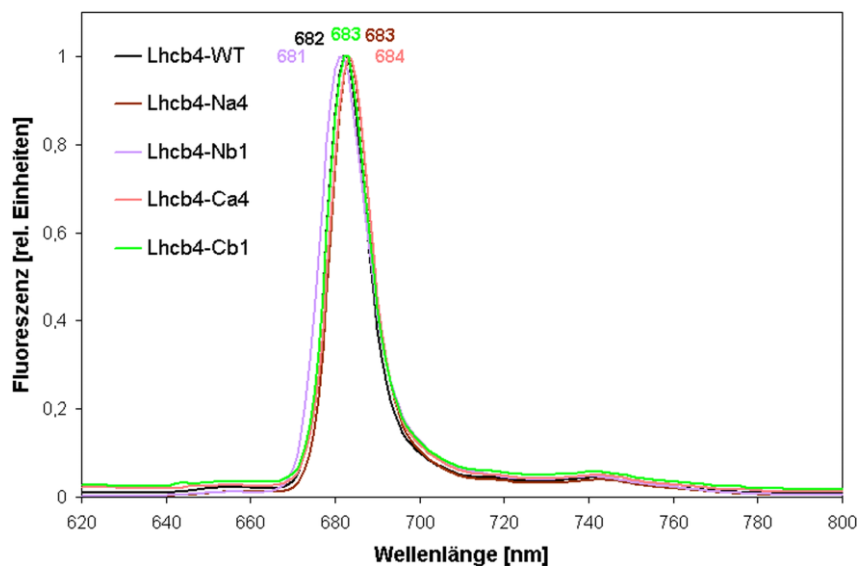


Abb. 59: Tieftemperaturemissionsfluoreszenzspektren rekonstituierter Monomerkomplexe aus Lhcb4 Einzeldomänenmutanten mit substituiertem N- oder C-Terminus nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm. Kurven sind aus 2 (Mutanten) und 4 (Wildtyp) Experimenten gemittelt und auf gemeinsame Amplitude im Bereich des 682er-Peaks normiert.

Ein ähnliches Szenario war bei den Monomerkomplexen der N- und C-terminalen Lhcb4 Einzeldomänenmutanten zu beobachten (Abb. 59). Weder beim Lhcb4-WT, noch bei den 4 Mutanten waren energetisch ungekoppelte Chlorophylle nachzuweisen. Der einzige Unterschied lag in der Wellenlänge der Maxima. Während die Monomerkomplexe des Lhcb4-WT bei 682 nm die stärkste Fluoreszenz zeigten, war das Maximum der Lhcb4-Nb1-Komplexe nach 681 nm verschoben, die Lhcb4-Na4- und Lhcb4-Cb1-Komplexe emittierten bei 683 nm maximal und der Peak der Lhcb4-Ca4-Mutante hatte mit einem Maximum bei 684 nm das langwelligste Fluoreszenzmaximum.

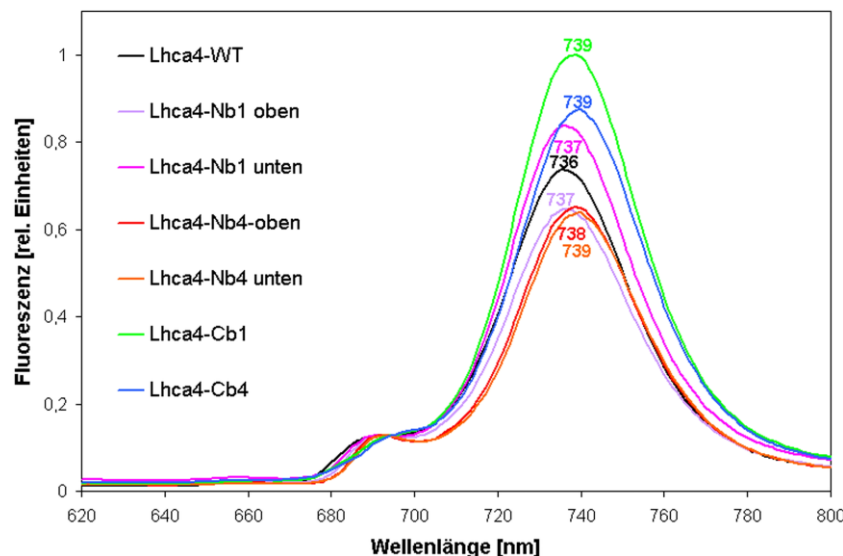


Abb. 60: Tieftemperaturemissionsfluoreszenzspektren rekonstituierter Dimerkomplexe aus Lhca1-WT und Lhca4 Einzeldomänenmutanten mit substituiertem N- oder C-Terminus nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm. Kurven sind aus 2 (Mutanten) und 4 (Wildtyp) Experimenten gemittelt und auf gemeinsame Amplitude im Bereich des 685er-Peaks normiert. (oben): Dimerkomplexe; (unten): Doppeldimerkomplexe.

Die spektroskopischen Auswirkungen des Austauschs N- und C-terminaler Lhca4-Domänen auf die damit hergestellten Heterodimere sind in Abb. 60 dargestellt. Da im Heterodimer die 685er Fluoreszenz viel geringer ausfällt bzw. die Komponente der langwelligeren Fluoreszenz noch stärker hervortritt, wird bei den Dimerkomplexen nur letztere Fluoreszenzpopulation genauer beschrieben. Sowohl für Lhca4-Nb1, als auch Lhca4-Nb4 waren nach Auftrennung im Saccharosedichtegradienten Heterodimere (oben) und Doppelheterodimere (unten) mit dem Lhca1 nachweisbar (Kap. D2.1.1.1). Der einzige Unterschied zwischen Dimeren und Doppeldimeren von Komplexen der Lhca4-Nb1-Mutante existierte in der etwas höheren Amplitude der langwelligeren Fluoreszenz bei letzteren, wobei die Wellenlänge der Maxima mit 737 nm gleich ausfiel. Bei Komplexen des Lhca4-Nb4 waren die langwelligeren Maxima von Dimer (738 nm) und Doppeldimer (739 nm) etwas verschoben, aber die Amplitude der langwelligeren Fluoreszenz war in beiden Fällen gleich hoch.

Eine Substitution der C-terminalen Domäne im Lhca4 führte zu einer Verschiebung des langwelligeren Fluoreszenzmaximums der Heterodimere auf 739 nm. Die Amplituden beider Spektren waren stärker ausgeprägt als beim WT-Dimer, wobei die Heterodimere mit Lhca4-Cb1 am intensivsten fluoreszierten.

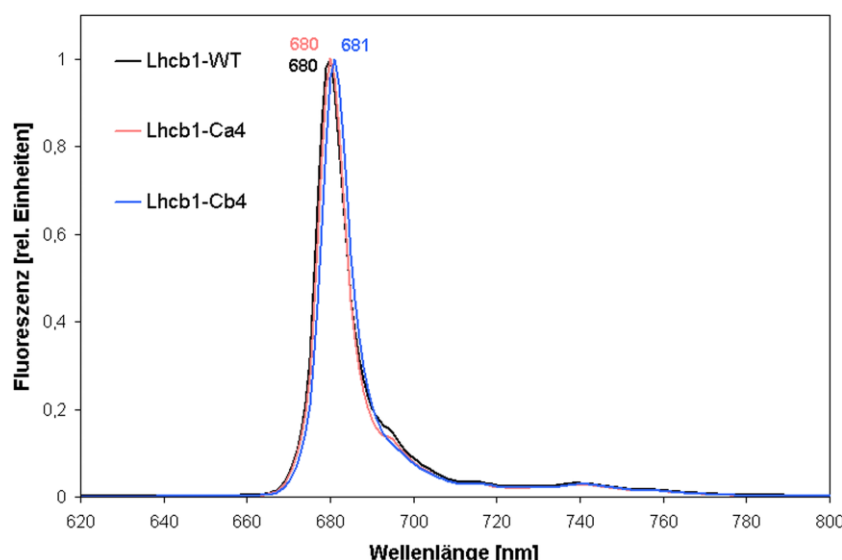


Abb. 61: Tieftemperatur-emissionsfluoreszenzspektren rekonstituierter Trimerkomplexe aus Lhcb1 Einzeldomänenmutanten mit substituiertem C-Terminus nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm. Kurven sind aus 2 Experimenten gemittelt und auf gemeinsame Amplitude im Bereich des 680er-Peaks normiert.

Aufgrund der Tatsache, dass eine Trimerisierung von Lhcb1-Mutanten mit getauschter N-terminaler Domäne nicht möglich war (siehe Abb. 21), werden im Folgenden auch nur die Fluoreszenzspektren der trimerisierenden C-terminalen Lhcb1-Einzeldomänenmutanten (Abb. 61) beschrieben. Die Trimerspektren beider untersuchten Mutanten waren beinahe deckungsgleich mit dem Spektrum des WT-Trimers. Die einzige relevante Abweichung bestand in der Wellenlänge des Lhcb1-Cb4-Maximums, das nicht wie im Falle des WTs und des Lhcb1-Ca4 bei 680 nm lag, sondern bei 681 nm detektiert wurde. Im WT-Spektrum war eine winzige Schulter bei ca. 695 nm zu beobachten, die weder in Trimeren der Lhcb1-Ca4-, noch in denen der Lhcb1-Cb4-Mutante nachgewiesen werden konnte. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der Bildung von Komplex-Aggregaten, die entweder durch zu hohe Probenkonzentrationen (unwahrscheinlich) oder zu langer Inkubationsdauer der Komplexe im Glycerinpuffer (wahrscheinlich) verursacht wurden.

2.2 Transfer der Dimerisierungs- oder Trimerisierungseigenschaften durch simultanen Austausch von zwei Proteindomänen

Die Grundidee, die zur Entwicklung dieser Domänenmutanten mit zwei substituierten Proteinabschnitten führte, war der Transfer der Dimerisierungseigenschaften auf Lhcb1 und Lhcb4 oder die Fähigkeit zur Ausbildung von Trimeren auf Lhca4 und Lhcb4 zu übertragen. Basis für diese Experimente waren die Ergebnisse mit den Einzeldomänenmutanten, welche die Bedeutung der separaten Bereiche für das jeweilige Oligomerisierungsverhalten herausgestellt hatten.

Da sich die Generierung der 2 Domänenmutanten zeitlich mit der Herstellung der Einzeldomänenmutanten überschneidet, konnte nicht der komplette Erfahrungsschatz aus den Einzelmuranten bei deren Konstruktion berücksichtigt werden, da einige Mutanten zu diesem Zeitpunkt noch nicht existierten (Helix 2-Mutanten). Deswegen waren diese Mutanten eher ein notwendiger, zum Teil auch methodisch bedingter Zwischenschritt für die Herstellung kompletter Transfermutanten (Kap. D2.3), die schließlich alle Ergebnisse aus Experimenten mit Einzeldomänenmutanten berücksichtigen.

Trotzdem können diese neuen Mutanten erste Anhaltspunkte für den Transfer des Oligomerisierungszustands auf andere Proteine liefern, da zum einen die Komplexstabilität der Doppeldomänenmutanten betrachtet werden soll und zum

anderen Effekte eintreten konnten, die durch die Untersuchungen der Einzeldomänenmutanten bzw. dem experimentellen Ansatz nicht vorhersagbar waren. Die Herstellung der Lhca4-Nb1-Cb1- und Nb1-SLb1-Mutante erfolgte durch einen Restriktionsverdau der Plasmid-DNA der jeweiligen Einzeldomänenmutanten mit anschließender Religation (Kap. C1.9.1). Die Lhcb1-LLa4-H2a4-Mutante und das entsprechende Lhcb4-Äquivalent wurden parallel zu den Helix 2 Mutanten mittels Quikchange-Mutagenese-Kit generiert, indem in der 1. PCR am 3'-Ende bezüglich luminaler Lhca4-Schleife komplementäre Primer verwendet wurden und nicht die WT-Plasmide, sondern die des Lhcb1 und Lhcb4-LLa4 als Matrizen dienten (Kap. C1.7.5). Die Aufreinigung des Apoproteins, dessen Quantifizierung und die Rekonstitutionen erfolgten analog zu den vorherigen Experimenten mit Einzeldomänenmutanten.

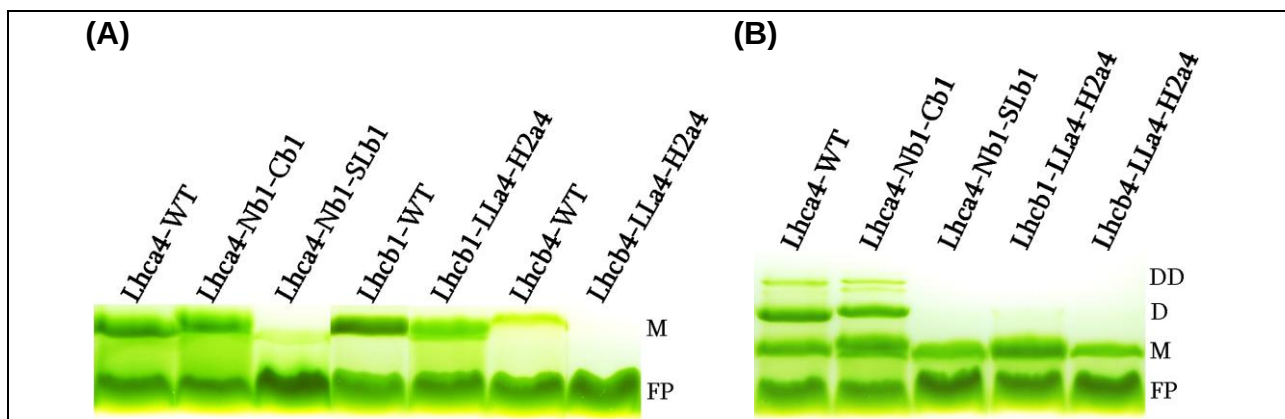


Abb. 62: Monomer- (A) und Dimerrekonstitution (B) von Lhca4-, Lhcb1- und Lhcb4-Mutanten mit zwei substituierten Domänen nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Monomerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (DD): Doppeldimerbande; (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Die Auftrennung der Pigment-Protein-Komplexe per schwach denaturierender LDS-PAGE nach Monomerrekonstitution (Abb. 62A) machte deutlich, dass auch die Komplexe der Mutanten mit 2 substituierten Domänen unterschiedlich stabil waren. Während die Lhca4-Nb1-Cb1-Mutante dem WT ähnliche Komplexausbeuten zeigte, traten die Monomere der Lhca4-Nb1-SLb1-Mutante nur als äußerst schwache Bande in Erscheinung. Die Lhcb1-LLa4-H2a4-Mutante schien zwar stabilere Monomere ausbilden zu können, die aber erstens weit hinter den Komplexausbeuten des Lhcb1-WT zurücklagen und zweitens anhand der Gelauf trennung in Mitleidenschaft gezogen wurden. Der Einbau der Helix 2 und der luminalen Schleife des Lhca4 in das Lhcb4-Protein führte nach dessen Rekonstitution zu keiner detektierbaren Komplexbande nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel.

Die Gelauf trennung der Dimerrekonstitutionen mit Mutanten die 2 substituierte Domänen besitzen sind in Abb. 62B dargestellt. Der Lhca4-Nb1-Cb1 war die einzige Mutante, welche dem WT-Dimer ähnliche Komplexausbeuten aufwies, aber da weder der N- noch der C-Terminus des Lhca4 (Kap. D2.1.1 und D2.1.2) an einer Heterodimerisierung mit dem Lhca1 beteiligt sind, war dieses Ergebnis nicht überraschend. Die zweite Lhca4-Mutante mit Substitutionen des N-Terminus und der stromalen Schleife bildete keine Heterodimere aus.

Bei den beiden für die Betrachtung der Dimerisierungsfähigkeit wichtigen Mutanten Lhcb1- und Lhcb4-LLa4-H2a4 war keine Heterodimerisierung mit dem Lhca1-WT erkennbar. Nach Auftrennung der Rekonstitution der Lhcb1-Mutante deutete sich zwar eine schwache Dimerbande an, die aber wahrscheinlich durch unspezifische

Disulfidbrücken hervorgerufen wurden, die sich durch zu wenig Reduktionsmittel im Ansatz bilden könnten. Falls es ein Homodimer der Lhcb1-LLa4-H2a4-Mutanten wäre, sollte nach Auftrennung im schonenderen SDG eine deutlichere Dimerbande zu erkennen sein. Der Transfer von für eine Heterodimerisierung benötigten Lhca4-Bestandteilen auf Lhcb1 und Lhcb4-Proteine scheint für einen sichtbaren Erfolg noch zu gering ausgefallen zu sein.

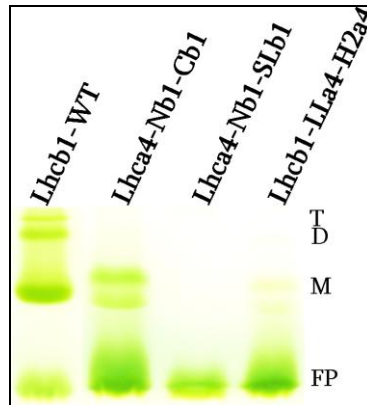


Abb. 63: Trimerrekonstitution von Lhcb1- und Lhca4-Mutanten mit zwei substituierten Domänen nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. (T): Trimerbande; (D): vermutliche Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Alle Mutanten mit zwei Lhcb1-Bestandteilen wurden einer Trimerrekonstitution unterzogen und anschließend in einem schwach denaturierenden Gel aufgetrennt (Abb. 63). Verglichen mit dem Wildtyp war keine der Mutanten in der Lage Trimerkomplexe auszubilden. Da die Lhcb1-LLa4-H2a4-Mutante ursprünglich dazu gedacht war, den Lhcb1 zum dimerisieren mit dem Lhca1 zu bewegen, konnte bezüglich Trimerisierung nicht mit einem positiven Ergebnis gerechnet werden. Zudem fanden die Untersuchungen dieser Mutante zeitgleich mit Experimenten der Helix 2 Einzeldomänenmutanten statt, in welchen sich ebenfalls eine starke Beteiligung der Helix 2 an der Lhcb1-Trimerisierung herauskristallisierte.

Beide Lhca4-Mutanten, die als mögliche Vorstufen zu einem kompletten Transfer von für eine Trimerisierung essentiellen Lhcb1-Bestandteilen hergestellt wurden, konnten mit nur 2 transferierten Lhcb1-Domänen ebenfalls keine Trimere bilden.

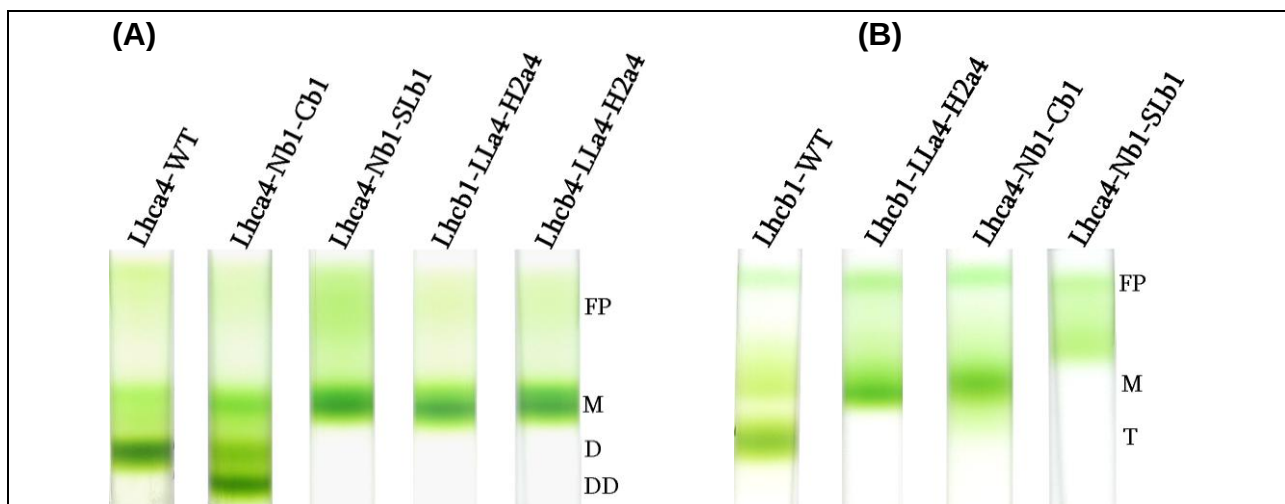


Abb. 64: Dimer- (A) und Trimerrekonstitution (B) von Einzeldomänenmutanten mit zwei substituierten Bereichen nach 24- bzw. 16-stündiger Auftrennung im Saccharosedichtegradienten. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Trimerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (T): Trimerbande; (DD): Doppeldimerbande; (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Um eventuell entstandene Dimer- oder Trimerkomplexe nachweisen zu können, die durch die zu harsche Gelaufftrennung zerstört wurden, erfolgte eine zusätzliche Aufreinigung der Dimer- und Trimerrekonstitutionsansätze via komplexschonende SDG-Ultrazentrifugation.

Es stellte sich heraus, dass auch eine schonende Reinigungstechnik keinen zusätzlichen Nachweis auf Dimerbildung bei den Mutanten mit zwei getauschten Bereichen erbringen konnte (Abb. 64A). Eine Besonderheit, die bereits bei der Lhca4-Nb1-Mutante zu beobachten war, trat auch bei der Lhca4-Nb1-Cb1-Mutante auf. Bei dieser Mutante bildeten sich verstärkt hohe Ausbeuten an Doppelheterodimeren mit dem Lhca1-WT. Anders als im Gel existierte nach Gradientenaufftrennung der Lhcb1-LLa4-H2a4-Rekonstitution keine Dimerbande mehr. Diese Beobachtung bekräftigt den Verdacht, dass die Bildung der Geldimere auf die Bildung unspezifischer Disulfidbrücken zurückzuführen war.

Die Auftrennung der Trimerrekonstitutionen im Dichtegradienten (Abb. 64B) brachte verglichen mit den Ergebnissen aus der Gelaufftrennung keine neuen Erkenntnisse über diese Mutanten, da weder die Lhcb1-LLa4-H2a4-Mutante, noch die zwei Lhca4-Mutanten dazu neigten, Trimerkomplexe auszubilden.

2.3 Übertragung der Oligomerisierungseigenschaften durch umfangreichen Domänentausch

Eine logische Folge der vorherigen Experimente war die Durchführung des Versuchs, alle für die Di- oder Trimerisierung verantwortlichen Proteinbereiche auf andere Proteine zu übertragen, welche die entsprechende Oligomerisierungsform nicht zustande bringen. Grundlage für die Generierung neuer Mutanten waren nicht nur die Einzeldomänenmutanten, sondern auch die Mutanten mit zwei substituierten Domänen, die eine methodisch bedingte Vorlage zu den abschließenden Transfermutanten darstellten.

Es wurden verschiedene Ansätze für die Herstellung der Mutanten gewählt. So wurden alle an einer Trimerbildung beteiligten Lhcb1-Bestandteile im Lhca4 und Lhcb4 ersetzt. Zusätzlich wurde eine Lhca4-Mutante generiert, die den C-Terminus des Lhcb1 enthielt, um den von dieser Domäne ausgehenden Stabilisierungseffekt für die Trimerbildung ausnutzen zu können.

Zum Transfer der Dimerisierungseigenschaften wurden die mit dem Lhca1 interagierenden Proteinbereiche des Lhca4 in den Lhcb1 und Lhcb4 transferiert. Außerdem wurden durch diese Lhca4-Bestandteile auch entsprechende Regionen im Lhca1 ersetzt, um die Idee eines mit sich selbst polymerisierenden Lhca1-Proteins zur Bildung einer LHC-Molekülkette zu verwirklichen.

2.3.1 Erzeugung einer Lhca1-Mutante mit Lhca4-Bestandteilen mit dem Ziel multimere LHCs zu rekonstituieren

Nachdem alle Domänen des Lhca4 auf ihre Beteiligung an der Heterodimerisierung mit dem Lhca1 getestet waren, konnte ein weiterer Versuch unternommen werden, um multimere Lhca1-Komplexe herzustellen. Da nicht nur die zweite Helix des Lhca4 ein essentieller Bestandteil für eine erfolgreiche Dimerisierung ist, sondern auch die luminal und stromal an die Helix 2 angrenzenden AS der Schleifenregionen wichtig oder sogar unentbehrlich für eine Dimerbildung sind, wurde eine Lhca1-Mutante generiert, in die alle diese Proteinregionen des Lhca4 integriert wurden.

Aufgrund der Beobachtungen, dass der Einfluss der luminalen Schleife nur auf das F84 beschränkt zu sein scheint (Kap. D2.1.3.1) und die 2. Hälfte dieser Schleife gegenüber der 1. Hälfte einen schwächer konservierten Charakter aufweist, wurden nur ca. 50% (5

AS) der luminalen Lhca4-Schleife in den Lhca1 transferiert, in welchem 19 AS der luminalen Schleife an entsprechender Position ersetzt wurden. Die zweite Helix des Lhca4 war wie schon zuvor (Kap. D2.1.5) ein weiterer Bestandteil der Lhca1-Mutante. Die stromale Schleife des Lhca4 wurde ebenfalls in den Lhca1 transferiert. Jedoch unterscheiden sich die 1. und 2. Hälfte dieser Schleifenregion in ihrer Sequenzidentität stark voneinander. Die an Helix 2 angrenzende Hälfte 1 ist nur an wenigen Positionen schwach konserviert, während die 2. Hälfte Richtung Helix 3 eine hoch konservierte Erkennungssequenz (L18-Region) und eine hoch konservierte Carotinoidbindungsstelle (L1) aufweist (Kap. D1.2). Um so wenig Lhca4-Bestandteile wie nötig in den Lhca1 zu übertragen, wurden mittels Quikchange Mutagenese Kit (Kap. C1.7.5) zwei Lhca1-Mutanten mit einem unterschiedlich hohen stromalen Lhca4-Anteil erzeugt. Die eine Mutante enthielt neben Hälfte 2 (50%) der luminalen Schleife und der Helix 2 des Lhca4, die komplette stromale Lhca4-Schleife (Lhca1-a4-total = Lhca1-a4^{½LL+H2+SL}), die andere nur Hälfte 1 (ca. 50%) der stromalen Lhca4-Schleife (Lhca1-a4-partiell = Lhca1-a4^{½LL+H2+½SL}).

Die Gelaufftrennung der Monomerrekonstitutionen (Abb. 65A) beider Lhca1-Mutanten offenbarte, dass die zwei neuen Lhca1-Mutanten genau wie die Lhca1-H2a4-Mutante zu einer geringen Monomerausbeute neigten. Da bei dieser Versuchsanordnung bereits mit multimeren Komplexen zu rechnen gewesen wäre, konnte davon ausgegangen werden, dass das gesteckte Ziel, die Generierung einer mit gleichen Lhc-Proteinen interagierenden Multimermutante durch intensiven Transfer von Lhca4-Bestandteilen in den Lhca1, nicht realisierbar war.

Die in der gleichen Abbildung dargestellten Auftrennungen der Dimerrekonstitutionen mit dem Lhca4-WT zeigen, dass die Lhca1-a4-partiell-, oder Lhca1-a4-total-Mutante nicht einmal mehr Heterodimere ausbilden konnte. Ob die mangelnde Ausbeute an Monomerkomplexen der Lhca1-Mutanten dazu führte, oder ob im Lhca1 Bestandteile die für eine Dimerisierung wichtig sind ersetzt wurden, blieb durch diese Versuchsanordnung ungeklärt.

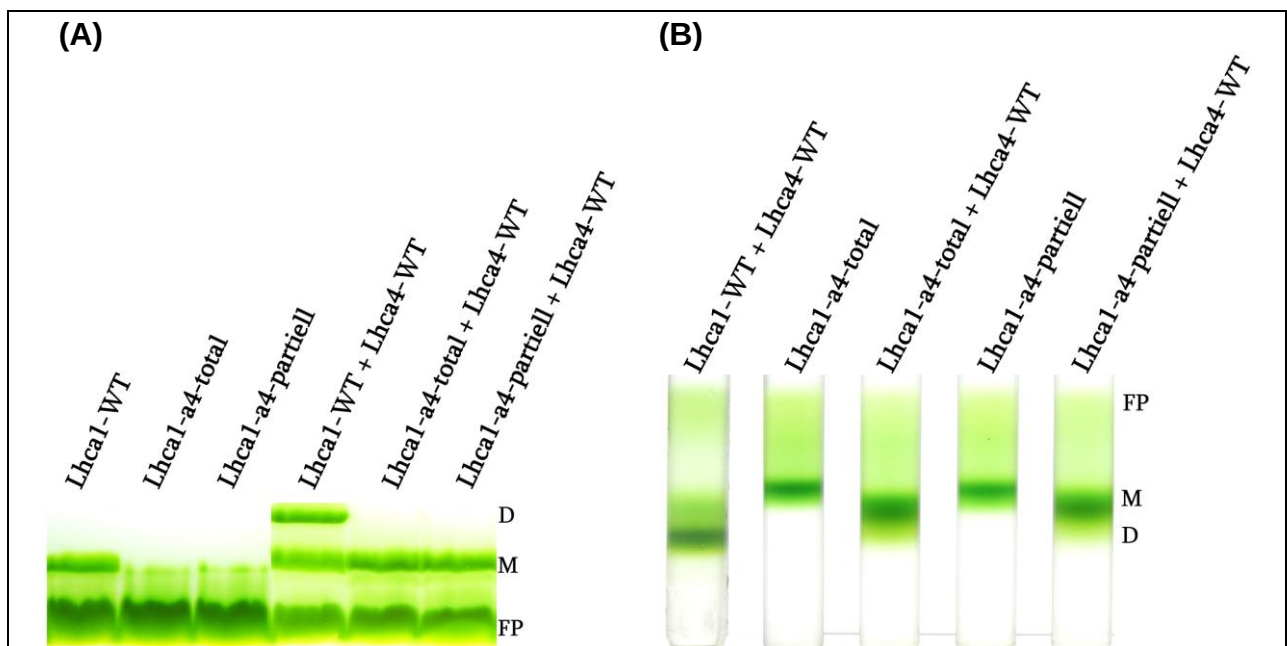


Abb. 65: Monomer - und Dimerrekonstitution von Lhca1-Mutanten mit ausgeprägten Substitutionen durch Lhca4-Domänene in den Bereichen luminal Schleife (50%), Helix 2 (100%) und stromale Schleife (50%: partiell, 100%: total), nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel (A) und Saccharosedichtegradienten (B). Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Monomerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Um auszuschließen, dass die harschen Trennbedingungen im Gel zu einer Verschleierung der Ergebnisse mit den Lhca1-Polymermutanten führten, wurden die Monomer- und Dimerrekonstitutionen auch per schonender SDG-Ultrazentrifugation separiert (Abb. 65B). Die Monomerkomplexe (M) der Lhca1-a4-total- und -partiell-Mutanten waren zwar deutlich zu erkennen, es bildeten sich aber auch unter diesen Bedingungen keine höhermolekularen Komplexbanden aus. Bei beiden Dimerrekonstitutionen (D) mit dem Lhca4-WT traten nur zerfallene Dimerkomplexe als Schlieren unterhalb der Monomerbande in Erscheinung. Es kam weder zur Bildung stabiler Heterodimere, noch konnte ein Nachweis von gemischten Multimerbanden erbracht werden.

2.3.2 Herstellung von Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit allen für eine Trimerisierung essentiellen Lhcb1-Bestandteilen

Nachdem alle für eine Trimerisierung wichtigen Lhcb1-Bestandteile identifiziert worden waren, konnte die Herstellung von Lhca4- und Lhcb4-Mutanten erfolgen, die alle wichtigen Lhcb1-Proteinabschnitte enthielten, um die Fähigkeit zur Trimerisierung zu transferieren.

Die Untersuchungen an den Einzeldomänenmutanten zeigten, dass im Lhcb1 in etwa die gleichen Abschnitte für eine Trimerisierung von Bedeutung sind wie im Lhca4 für die Dimerisierung. Da auch im Lhcb1 der 2. Teil der luminalen Schleife und der erste Teil der stromalen Schleife kaum konservierte AS beinhalten und außerdem die luminal Schleife nur wichtig und keinesfalls essentiell für eine erfolgreiche Trimerisierung ist, wurden für den Lhca4 und den Lhcb4 wie beim Lhca1 (Kap. D2.3.1) jeweils 2 Mutanten konzipiert, die entweder die komplette (total), oder nur 50% der stromalen Schleife enthielten (exakt). Allerdings war es notwendig, den für eine Trimerisierung notwendigen Lhcb1-N-Terminus ebenfalls in die neuen Lhca4- (Lhca4-b1-(total)^{N+½LL+H2+SL}, Lhca4-b1-(partiell)^{N+½LL+H2+½SL}) und Lhcb4-Mutanten (Lhcb4-b1-(total)^{N+½LL+H2+SL}, Lhcb4-b1-(partiell)^{N+½LL+H2+½SL}) zu integrieren, wodurch als Ausgangsmaterial für die anstehende Quikchange-PCR (Kap. C1.7.5) nur die Plasmid-DNA der N-terminalen Einzeldomänenmutanten in Frage kam.

Da der C-Terminus des Lhcb1 einen zusätzlich stabilisierenden Effekt auf das LHCII-Trimer ausübt, wurden neben den 4 oben erwähnten Mutanten 2 weitere auf Basis des Lhca4-Nb1-Cb1 generiert, die Lhca4-b1-total+C (Lhca4-b1^{N+½LL+H2+SL+C}) und Lhca4-b1-partiell+C (Lhca4-b1^{N+½LL+H2+½SL+C}) genannt wurden.

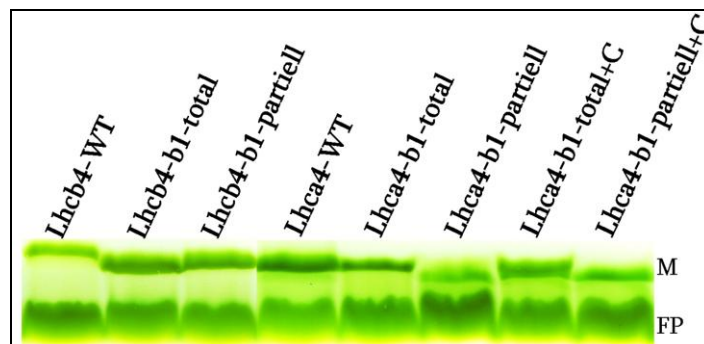


Abb. 66: Monomerrekonstitution von Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit ausgeprägten Substitutionen durch Lhcb1-Domänenen in den Bereichen luminal Schleife (50%), Helix 2 (100%), stromale Schleife (50%: partiell, 100%: total) und C-Terminus (+C), nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Zur Prüfung der Monomerstabilität wurden die Rekonstitutionsansätze der Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit integrierten Lhcb1-Proteinbestandteilen in einem schwach

denaturierenden Gel aufgetrennt (Abb. 66). Die Lhcb4-Mutanten erzielten höhere Monomerkomplexausbeuten als der Lhcb4-WT und wiesen zudem eine kürzere Laufstrecke auf, da der lange Lhcb4-N-Terminus ersetzt worden war. Auch die Lhca4-b1-total-Mutanten mit komplett substituierter stromaler Schleife bildeten Komplexe, deren Ausbeuten mit denen des Lhca4-WTs vergleichbar waren. Nur die Monomerbande der Lhca4-b1-partiell-Mutanten, bei welchen nur die 1. Hälfte der stromalen Schleife gegen die Lhcb1-Sequenz substituiert wurde, waren im Gel etwas instabiler und zerfielen desto stärker, je länger die Auftrennung andauerte.

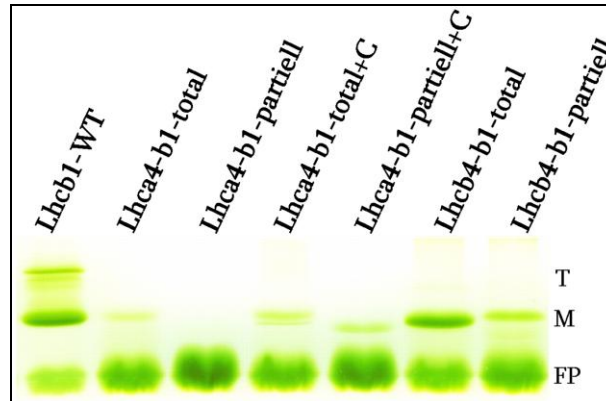


Abb. 67: Trimerrekonstitution von Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit ausgeprägten Substitutionen durch Lhcb1-Domänenen in den Bereichen luminaler Schleife (50%), Helix 2 (100%), stromale Schleife (50%: partiell, 100%: total) und C-Terminus (+C), nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. (T): Trimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Die per Gel aufgetrennten Trimerrekonstitutionsansätze sind in Abb. 67 dargestellt. Weder die Lhca4-Mutanten mit oder ohne Lhcb1-C-Terminus, noch die Lhcb4-Mutanten waren im Stande stabile Trimerkomplexe auszubilden. Die Monomerausbeuten nach Ni-Säulen-Reinigung waren bei den Lhcb4-Mutanten am höchsten und bei den zwei Lhca4-b1-total-Mutanten immerhin noch gut erkennbar. Anders sah die Sachlage bei den zwei Lhca4-b1-exakt-Mutanten mit nur teilweise getauschter stromaler Schleife aus. Nur bei der Lhca4-b1-exakt-Mutante konnten keine Pigment-Protein-Komplexe von der Säule eluiert werden, die im Gel nachweisbar gewesen wären. Die gleiche Mutante mit Lhcb1-C-Terminus bildete eine nur schwache und sehr weit laufende Monomerbande aus.

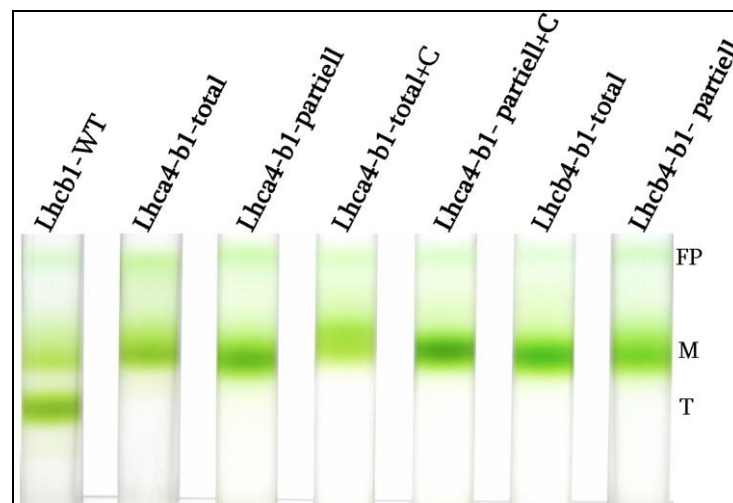


Abb. 68: Trimerrekonstitution von Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit ausgeprägten Substitutionen durch Lhcb1-Domänenen in den Bereichen luminaler Schleife (50%), Helix 2 (100%), stromale Schleife (50%: partiell, 100%: total) und C-Terminus (+C), nach 16-stündiger Auftrennung im Saccharosedichtegradienten. (T): Trimerbande; (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Um dem eventuell destabilisierenden Effekt der Gelaufentrennung aus dem Wege zu gehen, wurden die Trimerrekonstitutionsansätze auch im schonenden Verfahren der SDG-UZ aufgereinigt (Abb. 68). Doch auch durch Einsatz dieser Methode gelang kein Nachweis von Trimeren bei den 6 hergestellten Lhca4- und Lhcb4-Mutanten, die theoretisch alle für eine Trimerisierung essentiellen Lhcb1-Proteinbestandteile enthalten sollten. Alle Mutanten bildeten mehr oder weniger stabile monomere Pigment-Protein-Komplexe aus.

2.3.3 Erzeugung von Lhcb1- und Lhcb4-Mutanten mit allen für eine Heterodimerisierung essentiellen Lhca4-Bestandteilen

Die Erzeugung dieser Lhcb1- und Lhcb4-Mutanten erfolgte zum Versuch, die Dimerisierungsfähigkeit zu übertragen. Die Durchführung geschah analog zu den zwei vorhergehenden Kapiteln. Die in den Lhcb1 und Lhcb4 transferierten Lhca4-Bestandteile waren dieselben, die auch bei der Herstellung der multimerisierenden Lhca1-Mutante zur Bildung von LHC-Polymeren substituiert wurden (Kap. D2.3.1).

Folglich wurden auf Basis der Experimente mit Einzeldomänenmutanten und den zuvor angefertigten Sequenzalignments 2 Lhcb1- ($\text{Lhcb1-a4}^{\frac{1}{2}\text{LL}+\text{H2}+\text{SL}}$, $\text{Lhcb1-a4}^{\frac{1}{2}\text{LL}+\text{H2}+\frac{1}{2}\text{SL}}$) und 2 Lhcb4-Mutanten ($\text{Lhcb4-a4}^{\frac{1}{2}\text{LL}+\text{H2}+\text{SL}}$, $\text{Lhcb4-a4}^{\frac{1}{2}\text{LL}+\text{H2}+\frac{1}{2}\text{SL}}$) hergestellt. Entweder enthielten diese Mutanten die vollständige (total), oder nur die 1. Hälfte der stromalen Lhca4-Schleife (partiell). Der umfassende Domänenaustausch wurde mittels "Quikchange® II Site-Directed Mutagenesis Kit" (C1.7.5) bewerkstelligt.

Um die Monomerausbeuten der generierten Mutanten mit denen der Wildtypen zu vergleichen, wurden die Rekonstitutionsansätze in einem schwach denaturierenden Gel aufgetrennt (Abb. 69A). Die Lhcb4-a4-total- und Lhcb4-a4-partiell-Mutante bildeten nach Gelaufentrennung keine nachweisbaren Monomerbanden aus. Auch die beiden Lhcb1-Mutanten mit unterschiedlichem Anteil an stromaler Lhca4-Schleife waren nach Gelauftrennung nur zur Bildung schwacher Monomerbanden fähig, deren Ausbeuten weit hinter denen des Lhcb1-WTs zurücklagen.

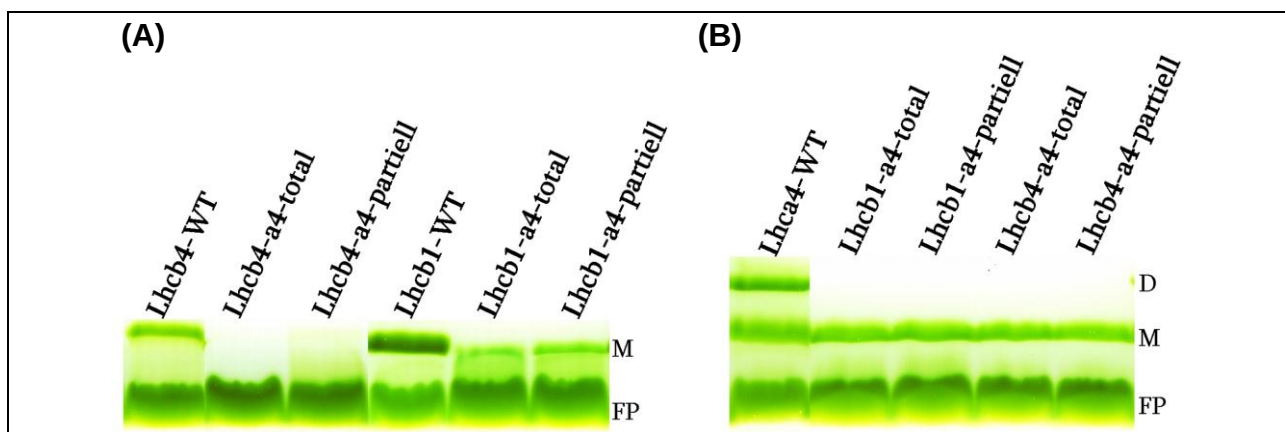


Abb. 69: Monomer (A)- und Dimerrekonstitution (B) von Lhcb1- und Lhcb4-Mutanten mit ausgeprägten Substitutionen durch Lhca4-Domänenen in den Bereichen luminaler Schleife (50%), Helix 2 (100%) und stromale Schleife (50%: partiell, 100%: total), nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel. Die Dimerrekonstitutionen erfolgten zusammen mit dem Lhca1-WT, bei den Monomerrekonstitutionen war nur das angegebene Apoprotein vorhanden. (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment.

Die Gelauftrennung der Dimerrekonstitutionen (Abb. 69B) aller Mutanten mit transferierten, für die Dimerisierung wichtigen, Lhca4-Domänen, offenbarte, dass weder die Lhcb1-, noch die Lhcb4-Mutanten in der Lage waren, nachweisbare heterodimere Komplexe mit dem Lhca1-WT auszubilden.

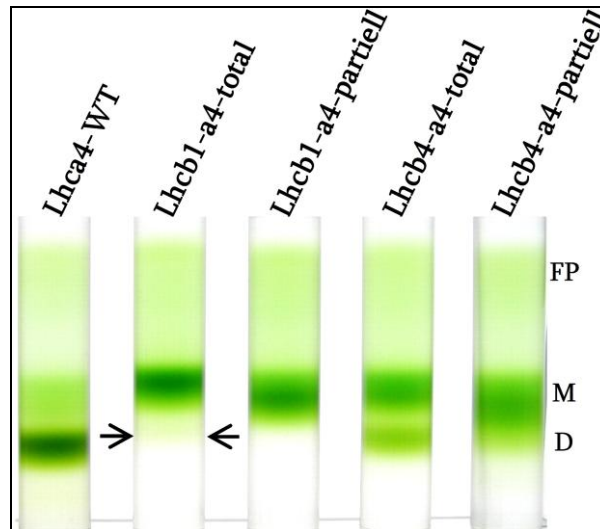


Abb. 70: Dimerrekonstitution von Lhcb1- und Lhcb4-Mutanten mit ausgeprägten Substitutionen durch Lhca4-Domänenen in den Bereichen luminale Schleife (50%), Helix 2 (100%) und stromale Schleife (50%: partiell, 100%: total), nach 24-stündiger Auftrennung im Saccharosedichtegradienten. (D): Dimerbande; (M): Monomerbande; (FP): freies Pigment. (→ ←): vermutliche Dimerbande.

Unter Verwendung der schonenden SDG-UZ-Auftrennungstechnik ergaben sich für die Dimerrekonstitutionen andere Resultate als nach der Gelaufentrennung (Abb. 70), die für einen Nachweis fragiler Pigment-Protein-Komplexe nicht geeignet war. Die deutlichste Dimerbande bildete sich nach Rekonstitution der Lhcb4-a4-total-Mutante mit dem Lhca1-WT, deren Intensität verglichen mit dem WT-Dimer nur etwas schwächer ausfiel. Anders als beim Lhcb4-a4-total war bei der Lhcb4-a4-partiell-Mutante die Grenze zwischen Monomer- und Dimerfraktion nicht so klar ausdifferenziert. Dennoch war auch bei dieser Mutante eine Dimerfraktion identifizierbar.

Spuren einer wohl ehemals existierenden bzw. im Zerfall befindlichen oder in der Bildung gehemmten Dimerbande ließen sich bei der Lhcb1-a4-total-Mutante entdecken (Pfeilmarkierung in Abb. 70). Nur beim Lhcb1-a4-partiell konnte keine Dimerbande oder deren Überbleibsel identifiziert werden. Die Monomerbande scheint etwas dicker als bei den übrigen Mutanten ausgeprägt zu sein und weist zudem eine etwas kürzere Laufstrecke auf.

Allgemein betrachtet scheinen hinsichtlich der Dimerbildung die Total-Mutanten zielführender als die Partiell-Mutanten zu sein. Alle mutmaßlichen Dimerbanden wurden entnommen und im Anschluss spektroskopisch untersucht bzw. einer Pigmentanalyse unterzogen.

2.3.3.1 Spektroskopische Eigenschaften und Pigmentbindung der heterodimerisierenden Lhcb1 und Lhcb4-Mutanten

In den folgenden Untersuchungen der isolierten mutmaßlichen Dimerkomplexe sollte zum einen belegt werden, dass in den abgezogenen Dimerfraktionen nicht nur Lhcb1- oder Lhcb4-Mutanten mit Lhca4-Bestandteilen enthalten waren, sondern auch Lhca1-WT-Komplexe aufzufinden sind. Ein nicht gezeigter Vergleich mit einer alleinigen Rekonstitution der Lhcb4-a4-total-Mutanten ohne den Lhca1-WT belegte, dass die Bildung von Homodimeren ausgeschlossen werden konnte.

Zum anderen sollte analysiert werden, ob durch den Transfer der Dimerisierungsfähigkeit auch die Übertragung besonderer Fluoreszenzeigenschaften einhergeht bzw. ob eine langwellige Fluoreszenzkomponente beobachtet werden kann, die charakteristisch für den Lhca4-WT ist. Die Messungen des Energietransfers dieser

Dimerkomplexe könnte entweder die Annäherung des Mutantendimerspektrums an das LHCI-730-Spektrum belegen, oder schlicht den Nachweis erbringen, dass der Lhca1-WT auch in diesen Fraktionen enthalten ist, da der Lhca1-WT im Vergleich zum Lhcb1 (682 nm) oder Lhcb4 (682 nm) sein Fluoreszenzmaximum bei 692 nm hat und dessen Fluoreszenzpeak etwas mehr in die Breite geht als die von Lhcb1 und Lhcb4. In beiden Fällen sollte eine Verschiebung der Fluoreszenz ins Langwellige detektierbar sein, die je nach Ausprägung der ersten oder zweiten beschriebenen Annahme zugeordnet werden könnte.

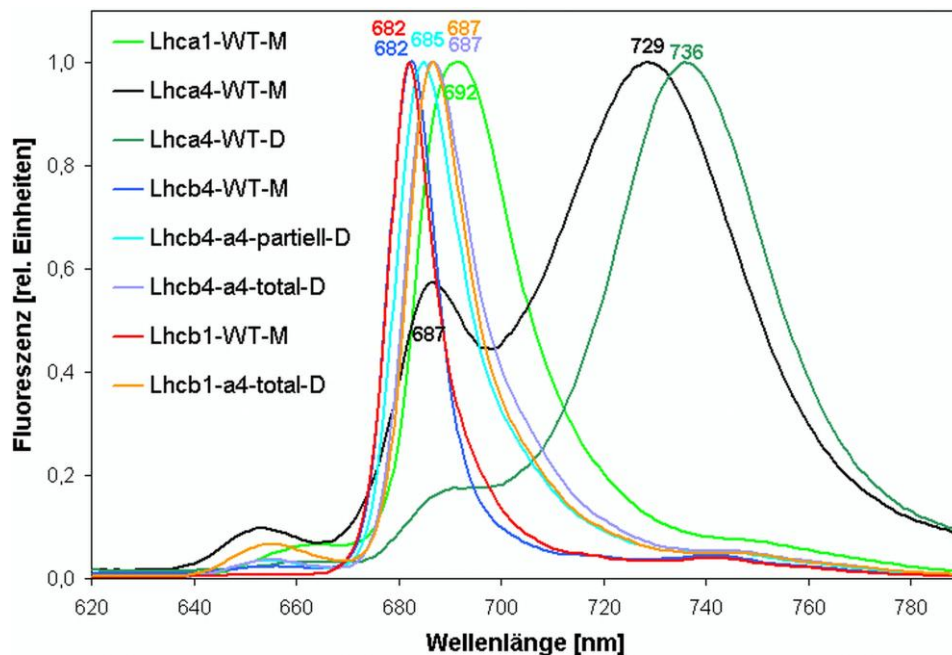


Abb. 71: Tieftemperaturfluoreszenzemissionsspektren rekonstituierter Dimerkomplexe von Lhcb4 und Lhcb1-Mutanten mit ausgeprägten Substitutionen durch Lhca4-Domänen in den Bereichen luminale Schleife (50%), Helix 2 (100%) und stromale Schleife (50%: exakt, 100%: total). Kurven wurden nach Chl *b*-Anregung bei 470 nm detektiert, sind aus 3 (Mutanten) und 4 (Wildtyp) Experimenten gemittelt und wurden auf gemeinsame Amplitude im Bereich des 685er-Peaks bzw. des 730er-Peaks (Lhca4-WT-M und Lhca4-WT-D) normiert. (M): Monomerkomplexe; (D): Dimerkomplexe aus Rekonstitutionen mit Lhca1-WT.

Bei Betrachtung der angefertigten Tieftemperaturemissionsspektren (Abb. 71) fiel auf, dass die mutmaßlichen Dimerfraktionen aus Lhcb1- und Lhcb4-Mutanten mit keinem bekannten WT-Spektrum in Einklang zu bringen waren. Während Lhcb1- und Lhcb4-WT-Monomerkomplexe ein Maximum bei 682 nm und recht schmale Peaks aufwiesen, war der Peak des Lhca1-WT-Spektrums an seiner Basis doppelt so breit und bei 692 nm lokalisiert. Die Maxima der isolierten Dimerkomplexe der Einzeldomänenmutanten lagen mit 685 nm (Lhcb4-a4-partiell) und 687 nm (Lhcb4-a4-total, Lhcb1-a4-total) genau dazwischen und besaßen an ihrer Basis zudem eine ca. 1,5 fache Verbreiterung des Peaks, deren Ursache wie beim Lhca1-WT eine Schulter in der abfallenden Flanke war. Auffallend war die unterschiedliche Lage der Maxima von Total- bzw. Partiell-Mutanten, welche an den Substitutionsgrad der stromalen Schleife gekoppelt waren.

Die gereinigten Dimerkomplexe der Lhcb1- und Lhcb4-Mutanten zeigten nicht die typischen langwelligeren spektralen Eigenschaften, wie sie für Lhca4-Monomerkomplexe oder Lhca1-Lhca4-Heterodimere charakteristisch sind. Die einzige Gemeinsamkeit zwischen Lhca4-WT-Monomere, WT-Heterodimer und den 3 Mutanten-Dimeren mit Lhca4-Bestandteilen bestand in der ähnlich gelagerten Lokalisation der 685er Fluoreszenz.

Nachdem die Fluoreszenzspektren der Heterodimere von Total-Partiell-Mutanten keine Lhca4-charakteristische langwellige Komponente aufwiesen, könnten Pigmentanalysen der Dimerfraktionen aus rekonstituierten mutierten Lhcb1- und Lhcb4-Proteinen mit dem Lhca1-WT belegen, dass die Anzahl der gebundenen Pigmente der Pigmentausrüstung eines Lhca1-Lhca4-Heterodimers entspricht.

Tabelle 34: Pigmentzusammensetzung rekonstituierter heterodimerer Komplexe von Lhcb4 und Lhcb1-Mutanten mit ausgeprägten Substitutionen durch Lhca4-Domänen in den Bereichen luminale Schleife (50%), Helix 2 (100%) und stromale Schleife (50%: exakt, 100%: total). Dimerrekonstitutionen erfolgten immer mit Lhca1-WT. Ergebnisse sind aus 3 (Mutanten) und 4 (Wildtyp) Experimenten gemittelt, auf je 2 Carotinoide pro einem Apoprotein bezogen und mit Standardabweichung (grau) dargestellt.

Dimere	Lhca4-WT	Lhcb4-a4 partiell	Lhcb4-a4 total	Lhcb1-a4 total
Chlorophyll <i>a/b</i> Verhältnis	2,45	2,32	2,27	2,53
±SA	0,11	0,08	0,02	0,23
Chlorophyll-total/2 Carotinoide	9,84	10,59	10,12	9,14
±SA	0,41	0,25	0,21	0,89
Chlorophyll <i>a</i> /2 Carotinoide	6,99	7,40	7,03	6,52
±SA	0,33	0,25	0,15	0,49
Chlorophyll <i>b</i> /2 Carotinoide	2,85	3,19	3,10	2,62
±SA	0,12	0,02	0,06	0,41
Lutein / 2 Carotinoide	1,34	1,29	1,25	1,30
±SA	0,05	0,05	0,08	0,14
Neoxanthin / 2 Carotinoide	0,10	0,09	0,09	0,21
±SA	0,03	0,01	0,01	0,15
Violaxanthin / 2 Carotinoide	0,31	0,42	0,39	0,37
±SA	0,04	0,01	0,01	0,04
β-Carotin / 2 Carotinoide	0,24	0,20	0,27	0,12
±SA	0,04	0,06	0,07	0,03
Carotinoide/10 Chlorophylle	2,04	1,89	1,98	2,21
±SA	0,08	0,05	0,04	0,23

Die Ergebnisse der HPLC-Pigmentanalysen rekonstituierter Heterodimere aus Lhca1-WT und Lhcb1- bzw. Lhcb4-Mutanten mit Lhca4-Bestandteilen sind in Tabelle 34 zusammengefasst. Interessanterweise waren nur der Chl *b*- und der Violaxanthin-Gehalt der Heterodimere mit dem Lhcb4-a4-partiell- oder –total-Protein bezogen auf 2 gebundene Carotinoide gegenüber dem WT-Heterodimer gering erhöht. Die Dimere mit Lhcb1-a4-total-Protein unterschieden sich nur aufgrund der minimaleren β-Carotin-Bindung vom Lhca1-Lhca4-WT-Heterodimer. Tendenziell schien die Lhcb4-a4-exakt Mutante ca. 0,5 Chlorophylle mehr als der WT im Dimerkomplex gebunden zuhaben. Ähnlich gelagert war die Beobachtung, dass der Chl-Gehalt im Lhcb1-a4-total-Heterodimer im Vergleich zum WT-Dimer schwach um ca. 0,5 Moleküle reduziert vorlag.

E DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Ursachen für das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten von Lichtsammelproteinen aufzuklären. Ca. 15% aller Proteine aus Kristallstrukturen (Stand 2004) sind als Oligomere organisiert (Mei et al., 2005). Trimere (10%) sind eher selten und Dimere stellen über 50% der Oligomere, wobei nur $\frac{1}{5}$ davon als Heterodimere vorliegen. Inzwischen konnten viele konservierte AS-Motive identifiziert werden, die eine Protein-Protein-Interaktion ermöglichen. Dazu gehören unter anderem das aus Glycophorin bekannte GG4- und GG7-Motiv (Russ und Engelman, 2000; Senes et al, 2000) und ein dem Leucin-Zipper ähnliches Alacoil-Motiv (Gernert et al., 1995), die für Helix-Helix-Interaktionen wichtig sind. TPR (tetratricopeptide repeat) Proteine, die bei Proteinfaltung, Zellzyklussteuerung und Transkriptionskontrolle beteiligt sind, wirken durch ein 34 AS umfassendes Motiv, dass auf zwei durch eine Schleife verbundene Helices verteilt ist (D'Andrea und Regan, 2003). Ein in diesem Zusammenhang prominentes Protein ist das Ycf3, das als eine Art Chaperon während der PSI-Assemblierung mit PsaA und PsaD wechselwirkt (Naver et al., 2001).

Um die speziellen, aber unterschiedlichen Assemblierungsformen der Lhc-Proteine zu charakterisieren, wurden Consensussequenzen aller bekannten Lhc-Proteine aus verschiedenen Species zusammengestellt, um schwach konservierte Domänen zu lokalisieren, die Ursprung für Dimer- oder Trimerisierung sein könnten. Anhand Monomer- (Lhcb4), Dimer- (Lhca1 und Lhca4) und Trimer-bildender (Lhcb1) Lhc-Proteine wurde der Beitrag nicht oder gering konservierter Domänen am jeweiligen Oligomerisierungsverhalten durch Austausch der entsprechenden Abschnitte ermittelt. Nach Identifikation aller für die Dimer- und Trimerisierung wichtigen Proteindomänen, wurde versucht die Fähigkeit zur Ausbildung einer speziellen Oligomerisierungsform durch Austausch der entsprechenden Proteindomänen auf die jeweils anderen Lhc-Proteine zu transferieren.

Zur Aufklärung der Interaktion von Lhca1 und Lhca4 bei der LHCI-730-Bildung, wurden in der Helix 2 sowie in der luminalen und stromalen Schleife von Lhca4 intensive Mutationsanalysen durchgeführt. Begleitend dazu wurden vom Kooperationspartner Homologie-Modellierungen des Heterodimers zur Veranschaulichung und besseren Interpretierbarkeit der biochemischen Analysen hergestellt, um Voraussagen über weitere Interaktionspunkte beider Untereinheiten treffen zu können.

1 Bedeutung schwach konservierter Domänen für die unterschiedlichen Oligomerisierungszustände

Lichtsammelkomplexe bestehen aus einem Lhc-Apoproteingerüst und nicht-kovalent gebundenen Pigmenten. Neben Unterschieden in ihren spektralen Eigenschaften, die vor allem auf ihren unterschiedlichen Pigmentzusammensetzungen beruhen, ist das differierende Oligomerisierungsverhalten ein Hauptunterscheidungsmerkmal. Die Ursachen für diese verschiedenen Oligomerisierungszustände müssen in den Sequenzen der Lhc-Proteine zu finden sein. Bereits Pichersky und Jansson (1996) ermittelten durch Sequenzvergleiche zwischen Lhc-Proteinen aus PSI und PSII eine Divergenz von nur 65%. Das bedeutet zwar nicht, dass 35% aller AS identisch sind, doch sind sie zumindest sehr ähnlich. Seit der Anfertigung von Hydropathie-Plots (Green et al., 1991), aber spätestens seit Existenz kryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen des LHCIIb (Kühlbrandt et al., 1994) geht man davon aus, dass alle Lichtsammelproteine höherer Pflanzen eine gemeinsame Monomere Struktur aufweisen (Kap. A4). Die Arbeitshypothese war folgende: Sind die konservierten Domänen der Lhc-Proteine für die Ausbildung einer ähnlichen monomeren Struktur verantwortlich, so sind schwach oder nicht konservierte Proteinbereiche vermutlich der Grund für deren unterschiedliches Oligomerisierungsverhalten.

Analog zu einem multiplen Sequenzalignment aus Arabidopsis-Proteinen (Jansson, 1999) wurde nach Generierung von Lhc-Consensussequenzen auf Datengrundlage vieler Species eine vergleichende Sequenzanalyse zwischen den Lhc-Proteinen angestellt. Dadurch konnten die stark konservierten Domänen Helix 1 und Helix 3, sowie die schwach konservierten Domänen N- und C-Terminus, luminale und stromale Schleifenregion und Helix 2 identifiziert werden.

Da in den schwach konservierten Bereichen die Informationen codiert sein sollten, die einem Lhc-Protein die Fähigkeit zur Ausbildung der spezifischen Oligomerisierungsform verleihen, wurden im ersten Abschnitt Domänentauschexperimente durchgeführt. Unter Verwendung Monomer- (Lhcb4), Heterodimer- (Lhca4) und Trimer-bildender (Lhcb1) Lhc-Proteine wurden schwach konservierte Domänen von einem Protein in die jeweils anderen beiden transferiert und deren Oligomerisierungsverhalten, Fluoreszenzeigenschaften und Pigmentbindung überprüft.

Im zweiten Abschnitt wurde versucht durch massiven Domänentausch die Fähigkeit zur Dimer- und Trimerisierung auf andere Lhc-Proteine zu übertragen, deren Wildtypen diese Oligomerisierungsform nicht ausbilden können. Zusätzlich wurde der Versuch unternommen eine mit sich selbst multimerisierende Lhca1-Mutante mit Lhca4-Bestandteilen zu erzeugen.

Nach elektrophoretischer Gelaufftrennung der rekonstituierten Pigment-Protein-Komplexe war oft eine reduzierte Monomerausbeute zu beobachten. Traten diese Verluste nach schonender Auftrennung der Rekonstitutionsansätze per SDG-UZ nicht mehr auf, war davon auszugehen, dass die Komplexe während der harschen Gelaufftrennung destabilisiert wurden. Blieben die Ausbeuten auch nach SDG-Auftrennung hinter denen der Wildtypen zurück, waren die Komplexe vermutlich bereits in ihrer Faltung beeinträchtigt.

1.1 Einfluss der N-terminalen Domäne auf das Oligomerisierungsverhalten

Die N-terminalen Domänen der verwendeten Lhc-Proteine von Arabidopsis variieren stark in ihren Längen. Während der Lhca4 nur 34 AS aufweist, sind es beim Lhcb1 53 AS und beim Lhcb4 sogar 97 AS (Jansson, 1999, Abb. 16). Der Lhcb1-N-Terminus ist für eine Trimerisierung essentiell (Hobe et al., 1996), während der Lhca4-N-Terminus

für die LHCI-730-Assemblierung nicht entscheidend ist (Schmid et al., 2002a). In jedem N-Terminus dieser 3 Lhc-Proteine befindet sich ein Bestandteil der L2-Carotinoid-Bindungsstelle (Pichersky und Jansson, 1996), aber keine der bisher veröffentlichten Kristallstrukturen zeigen aufgrund der Variabilität der N-Termini deren Konformation auf (Ben-Shem et al., 2003; Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005; Amunts et al., 2007).

1.1.1 N-Terminus ist unbedeutend für die Heterodimerisierung des Lhca4 mit Lhcb1

Monomerrekonstitutionen

Die Verwendung des Lhcb4-N-Terminus im Lhca4 führte zu einer leichten Reduktion der Monomerausbeute bei Gelaufftrennung (Abb. 19A), die sich aber nicht auf das Dimerisierungsexperiment übertrug (Abb. 19B; Abb. 21A). Im SDG konnten zwei unterschiedlich weit laufende Monomerbanden beobachtet werden, wobei in der oberen Bande nur halb so viele Chlorophylle und auch weniger Lutein pro Komplex gebunden waren (Tabelle 29). Vermutlich zerfielen die Komplexe während der Gelaufftrennung oder waren zum Teil nicht korrekt gefaltet, was die reduzierte Monomerausbeute erklären würde. Frühere Beobachtungen zeigen, dass, wie bei diesen Experimenten zu beobachten, Monomerinstabilitäten im Dimer wieder ausgeglichen werden (Schmid et al., 2002a; Corbet, 2004).

Der um das 3-fache längere Lhcb4-N-Terminus übt eventuell einen destabilisierenden Einfluss auf das Monomer aus. Im Gegensatz zum Lhca4 (GFDPL) und Lhcb1 (GWTDA), in welchen sich die Sequenz der N-terminalen L2-Bindungsstelle 5 AS vor der Helix 1 befindet, liegt im Lhcb4 (GDFPF) eine Distanz von 40 AS zwischen L2-Region und Helix 1 (Sandona et al., 1998; Bassi et al., 1999). Dadurch könnte sich eine Schleife ausbilden, und eine Situation eintreten, die sich zwar stabilisierend auf das Lhcb4-, aber destabilisierend auf das Lhca4-Monomer auswirkt. Eine sukzessive Deletion N-terminaler Lhca4-AS führte in früheren Untersuchungen nicht zu einer Beeinflussung der Monomerstabilität (Rupprecht et al., 2000), wobei aber auch keine neue L2-Bindungsstelle mit anderer Pigmentpräferenz integriert wurde (Tabelle 35). Ein längerer N-Terminus am Lhca4 scheint die Proteinfaltung mehr zu beeinträchtigen, als dessen Abwesenheit.

Tabelle 35: Besetzung der verschiedenen Carotinoid-Bindungsstellen in den verwendeten Lhc-Proteinen von Arabidopsis (falls erhältlich) aufgrund biochemischer Analysen und Kristallstrukturdaten, aufbauend auf Daten bezogen aus Bassi und Caffarri (2000). V1-Bindungsstelle ist aufgrund der verwendeten Auftrennungsmethode unbesetzt. (1) Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005; (2) Croce et al., 1999a; (3) Ruban et al., 1999; (4) Verhoeven et al., 1999; (5) Hobe et al., 2000; (6) Caffarri et al., 2007; (7) Croce et al., 2002.

Protein	L1-Bindestelle	L2-Bindestelle	N1-Bindestelle	V1-Bindestelle
Domänenanker	H3 und SL	NT und LL	Y in LL	PG und Chl b7
Lhcb1	100% Lutein ¹⁾⁴⁾	80% Lutein ¹⁾²⁾⁵⁾ 20% Violaxanthin	100% Neoxanthin ¹⁾²⁾⁵⁾	100% Violaxanthin ¹⁾³⁾⁴⁾
Lhcb4	100% Lutein	50% Violaxanthin ⁶⁾ 50% Neoxanthin	100% Neoxanthin ⁶⁾	---
Lhca1	100% Lutein	80% Lutein ⁷⁾ 10% Violaxanthin 10% Neoxanthin	100% Violaxanthin ⁷⁾	---
Lhca4	100% Lutein	50% Lutein ⁷⁾ 50% Violaxanthin	---	---

Pigmentzusammensetzung der Monomere

Kristallstrukturen und Analysen der Carotinoidzusammensetzung des LHCII zeigten, dass Carotinoide in den L1- und L2-Bindungsstellen das Helixkreuz stabilisieren (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005) und in der L1-Position immer Lutein, in der L2-Position aber auch Violaxanthin gebunden werden kann (Hobe et al., 2000). Trotz des durch Sequenzalignments belegten hohen Konservierungsgrads der Carotinoid-Bindungsstellen (Sandona et al., 1998; Jansson, 1999), sind die Präferenzen für Carotinoide in der L2-Position bei allen Lhc-Proteinen unterschiedlich. Die L1-Position ist hingegen immer mit Lutein besetzt ist (Tabelle 35).

Tabelle 36: Pigmentzusammensetzung monomerer, dimerer und trimerer LHCs. Vergleich zwischen Literaturdaten und Ergebnissen aus den durchgeführten Pigmentanalysen mit Lhca4-, Lhcb1- und Lhcb4-Proteinen. Daten sind auf 2 (LHCI und CP29) und 3 (LHCII) Carotinoide bzw. 10 (Arabidopsis LHCI) und 12 (Tomate LHCI) Chlorophylle pro Komplex normiert. a) Croce et al., 1999b; b) Bassi et al., 1999; c) Gastaldelli et al., 2003; d) Croce et al., 2002; e) Standfuss et al., 2005; f) Schmid et al., 2002b. Aus Experimenten vorliegender Arbeit entnommen: g) Tabelle 23; h) Tabelle 24; i) Tabelle 25; k) Tabelle 26; l) Tabelle 27.

Wildtyp-LHCs	Chl a+b	Chl a	Chl b	Σ Car	Lutein	Vio	Neo	β -Car
r-Lhcb1 (LHCII)	14 ^{e)}	8 ^{e)}	6 ^{e)}	3 ^{a)}	1,8 ^{a)}	0,1 ^{a)}	1 ^{a)}	-
Monomer ^{h)}	13,9	9,2	4,7	3	2	0,3	0,5	0,2
Trimer ^{l)}	13,5	7,2	6,4	3	2	0,05	0,95	-
r-Lhcb4 (CP29)	8 ^{c)}	6 ^{c)}	2 ^{c)}	2 ^{b)}	1 ^{b)}	0,5 ^{b)}	0,5 ^{b)}	- ^{b)}
Monomer ^{l)}	8	5,5	2,5	2	1,1	0,3	0,5	0,1
r-Lhca1 Arabidopsis^{d)}	10	8	2	3	1,8	1,1	0,1	-
Tomate ^{l)}	12	9,3	2,7	2,4	1,7	0,3	0,3	0,1
r-Lhca4 Arabidopsis^{d)}	10	7	3	2	1,5	0,5	-	-
Tomate ^{l)}	12	8,7	3,3	2	1,6	0,2	0,1	0,1
Monomer ^{g)}	10	7	3	2	1,5	0,2	0,15	0,15
r-LHCI-730 Arabidopsis^{d)}	10	7,5	2,5	2,5	1,2	0,8	0,1	0,4
Monomer ^{k)} (pro 2,5 Car)	12	8,5	3,5	2,5	1,7	0,4	0,1	0,3
Monomer ^{k)} (pro 2 Car)	10	7	3	2	1,35	0,3	0,1	0,25

Laut Pigmentanalyse (Tabelle 36) bindet der Lhca4-WT von Arabidopsis nicht nur Lutein, sondern auch Violaxanthin, Neoxanthin und β -Carotin. Diese Zusammensetzung entspricht eher der eines Tomaten-Lhca4 (Schmid et al., 2002b) als der eines Arabidopsis-Lhca4, in welchem weder Neoxanthin noch β -Carotin gefunden wurden (Croce et al., 2002). Da die Daten für den Tomaten-Lhca4 im gleichen Labor ermittelt wurden wie die Pigmentdaten des Arabidopsis-Lhca4 dieser Arbeit, ist davon auszugehen, dass die Abweichung von der Pigmentzusammensetzung des Arabidopsis-Lhca4 aus der Literatur, auf unterschiedlichen Rekonstitutionsrezepten und Aufreinigungsmethoden beruht. Nach Auftrennung der Lhca4-Nb4 Rekonstitution im SDG traten zwei Banden im Monomerbereich auf, wobei die untere Bande, wie die Lhca4-Nb1-Monomere eine dem Lhca4-WT ähnliche Pigmentzusammensetzung aufwies (Tabelle 29). Bei Betrachtung der Carotinoidzusammensetzung der oberen Monomerbande fällt auf, dass sich der Lutein-Gehalt bei gleichzeitiger Erhöhung des Neoxanthin-Gehalts erniedrigt hatte. Dies würde bedeuten, dass sich die Xanthophyll-Präferenz der L2-Position durch den Lhcb4-N-Terminus in Richtung Neoxanthin verschoben hat, weil laut Pigmentanalysen und Literatur im Lhcb4-WT mehr Neoxanthin, aber weniger Lutein als im Lhca4-WT gebunden ist (Caffarri et al., 2007). Da entweder kein oder nur wenig Neoxanthin in einem Lhca4-Monomer gebunden wird, ist eventuell nicht der lange Lhcb4-N-Terminus, sondern das Neoxanthin in L2-Position der Grund für die Beeinträchtigung. Anders als in rekonstituierten Lhca4-Komplexen wurde z.B. in nativen LHCI-730-Präparationen niemals Neoxanthin gefunden (Schmid

et al., 1997; Schmid et al., 2002b; Croce et al., 2002). Neoxanthin wird zwar unter natürlichen Bedingungen nicht eingebaut, kann aber durch die *in vitro* Faltung während der Rekonstitution doch in den Komplex integriert werden. Durch sterische Inkompatibilität im Lhca4 könnte es die Faltung oder Stabilisierung dieses LHCs behindern. Dies wird durch den starken Chlorophyll-Verlust der Lhca4-Nb4-Komplexe mit verstärkter Neoxanthin-Bindung bestätigt.

Fluoreszenzemission der Monomere

Die Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektren von Monomeren der Lhca4-Nb1- und -Nb4-Mutanten weichen voneinander ab (Abb. 57). Die Lhca4-Nb4-Komplexe der unteren Bande mit Lutein-Präferenz, weisen eine dem WT ähnliche langwellige Fluoreszenzkomponente auf (Schmid et al., 1997), die durch "rote Chlorophylle" verursacht werden, die typisch für den Lhca4 sind (Morosinotto et al., 2005). Bei Lhca4-Nb1-Komplexen und Lhca4-Nb4-Monomeren der oberen Bande mit Neoxanthin-Präferenz, war diese charakteristische Fluoreszenz stark reduziert. Falls die inneren Chlorophyll- und die zwei Carotinoid-Bindungsstellen L1 und L2 im Lhca4 wie im LHCII angeordnet sind, wovon aufgrund der starken Konserviertheit dieser AS ausgegangen werden kann, besteht die Möglichkeit, dass das L2-Carotinoid (Tabelle 35) und das Chl a5 im Lhca4 die gleiche Position zueinander einnehmen wie im LHCII (Standfuss et al., 2005). Carotinoide können in den Zuständen S_2 und S_1 Anregungsenergie auf Chlorophylle weiterleiten, wobei nur der S_2 -Zustand auf den Q_x -Zustand eines Chlorophylls überträgt (Polivka und Sundström, 2004). Bei diesem ultraschnellen Energietransfer zur Vermeidung von Energieverlusten wurde eine spektrale Überlappung, ein koplanarer Kontakt und eine vektorielle Anordnung des π -Elektronensystems vom L2-Carotinoid mit dem Q_x -System des Chl a5 beobachtet (Standfuss et al., 2005). Beim Lhca4 bildet das am N47 gebundene Chl a5 zusammen mit dem am E102 gebundenen Chl b5 ein Chlorophyll a-Dimer bildet, welches hauptverantwortlich für die langwellige Fluoreszenzkomponente ist (Morosinotto et al., 2005). Eine Erklärungen für die stark reduzierte langwellige Fluoreszenz, wie sie auch bei N-terminalen Deletionsmutanten des Lhca4 zu beobachten ist (Rupprecht, 2002), liegt eventuell in einem "verkantetem" Einbau des L2-Luteins. Anders als bei einer Substitution gegen den Lhcb4-N-Terminus, könnte dies durch den Austausch gegen den Lhcb1-N-Terminus verursacht werden, wodurch die Orientierung des Chl a5 beeinträchtigt werden könnte, wodurch die langwellige Fluoreszenz minimiert wird.

Dimerrekonstitutionen

Ein Austausch des Lhca4-N-Terminus gegen die entsprechenden Domänen aus Lhcb1 und Lhcb4 führte nicht zum Verlust der Dimerisierungsfähigkeit mit dem Lhca1 (Abb. 19B; Abb. 21A). Dies untermauert vorherige Beobachtungen an N-terminalen Lhca4-Deletionsmutanten, deren Dimerisierungsverhalten nach Verkürzung und vollständiger Deletion des N-Terminus beinahe unbeeinflusst blieb (Schmid et al., 2002a). Weder die Pigmentzusammensetzung (Tabelle 32), noch die Fluoreszenzemission (Abb. 60) der untersuchten Heterodimere zeigten nennenswerte Differenzen zum WT-Heterodimer auf.

Da N- und C-terminale Punkt- und Deletionsmutanten einer vorherigen Arbeit (Schmid et al., 2002a; Rupprecht, 2002) und die in dieser Arbeit durchgeführten Domänentauchexperimente keinen Hinweis darauf ergaben, dass der N-Terminus des Lhca4 mit dem Lhca1 interagiert und die verfügbaren Kristallstrukturen belegen, dass der unzureichend aufgelöste Lhca4-N-Terminus nicht in Richtung Lhca1 im LHCI-Gürtel orientiert ist (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007), ist eine Beteiligung der N-terminalen Lhca4-Domäne an der LHCI-730-Assemblierung äußerst unwahrscheinlich.

1.1.1.1 Der N-Terminus des Lhca4 verhindert die Bildung von Doppelheterodimeren

Dimerrekonstitutionen der Lhca4-Mutanten mit Lhcb1- oder Lhcb4-N-Terminus nach Auftrennung im SDG belegten eine verstärkte Bildung von Doppelheterodimeren (Abb. 21A). Diese tetrameren Komplexe unterschieden sich weder in der Pigmentzusammensetzung (Tabelle 32) noch in ihrem Fluoreszenzemissionsspektrum (Abb. 60) von ihren heterodimeren Formen oder vom WT-Heterodimer. So gesehen, verhindert der N-Terminus des Lhca4 sogar die Ausbildung höherer Oligomerisierungsformen. Die reine Abwesenheit des Lhca4-N-Terminus ist für die Ausbildung dieser Doppeldimere mit dem Lhca1 wahrscheinlich nicht ursächlich, da Untersuchungen an N-terminalen Deletionsmutanten des Lhca4 dieses Phänomen nicht bestätigen (Schmid et al., 2002a). Andererseits existieren keine Analysen über Dimerisierungsexperimente mit anschließender SDG-UZ (Rupprecht, 2002), da nur diese Trennmethode zur Entdeckung dieser Heterodimere führte.

Die Ursache könnte in Gemeinsamkeiten der N-terminalen Sequenzen von Lhcb1 und Lhcb4 zu finden sein. Auffällig ist, dass beide Lhcb-Sequenzen mit 53 AS (Lhcb1) und 97 AS (Lhcb4) deutlich länger sind als der Lhca4-N-Terminus (33 AS). Da die Bedeutung des Lhcb1-N-Terminus bzw. das darin enthaltene AS-Motiv (WYxxxR) für die Trimerisierung bekannt ist (Hobe et al., 1995), könnte dies der Grund für die Ausbildung der Doppeldimere sein. Dabei wäre allerdings völlig unklar, wie dieses Motiv die Assemblierung zweier Heterodimere bewirken könnte, da auch hochaufgelöste LHCI-Strukturen keine Darstellung der relevanten N-terminalen AS erlaubten (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005). Dieses Szenario erklärt nicht, weshalb der N-Terminus des lediglich monomerisierenden Lhcb4 den gleichen Effekt hervorrufen sollte, da in dessen N-Terminus höchstens ein WYxxxI-Motiv zu identifizieren wäre. Noch ist unklar welche Funktion der lange N-Terminus des Lhcb4 hat. Bei *Chlamydomonas reinhardtii* kommt ihm eine Bedeutung bei der Interaktion mit dem PsaH des PSI während der state transition zu (Kargul et al., 2005). Gleichzeitig soll dieses CP29 als Docking-Bindestelle zwischen PSI-Kernkomplex und dem LHCI dienen (Takahashi et al., 2006; Turkina et al., 2006). Allerdings weichen die AS-Sequenzen der Lhc-Proteine von *C. reinhardtii* teils deutlich von den Lhc-Sequenzen höherer Pflanzen ab (Elrad und Grossman, 2004; Koziol et al., 2007) und es müsste zunächst geklärt werden, ob der CP29 auch in höheren Pflanzen mit dem LHCI komigriert. Die Sequenzunterschiede im N-Terminus zwischen *C. reinhardtii* und höheren Pflanzen beschränken sich vor allem auf die N-terminalen 30 von 100 AS, die aber auch zwischen Lhcs höherer Pflanzen stark variieren. Zumindest *in vitro* begünstigt der Lhcb4-N-Terminus am Lhca4 eine Anlagerung zweier Heterodimere. Da nur Doppeldimere und keine höheren Oligomerisierungsformen auftreten, wechselwirken die N-Termini vermutlich direkt miteinander und nicht mit einem anderen Teil des Heterodimers.

1.1.1.2 Bildung unspezifischer Doppelheterodimere nach Gelelektrophorese

Nach Gelaufftrennung waren bei Dimerrekonstitutionen immer höhermolekulare Banden zu erkennen, die nicht auftraten, wenn die Rekonstitution nicht zur Heterodimerbildung führte. Die Analyse dieser hochmolekularen Gelbanden offenbarte, dass es sich aufgrund des Molekulargewichts ebenfalls um Doppelheterodimere handeln musste (Abb. 23). Da eine Auftrennung im SDG keine höhermolekularen Banden nach sich zog, wurde angenommen, es könnte sich, bedingt durch die Gelelektrophorese, um ein Artefakt oder eine Aggregation handeln. Eine Disulfidbrücke zwischen C47 zweier Lhca1-Proteine scheidet aus, da zum einen das Cystein inmitten der Helix 1 lokalisiert ist und damit schwer zugänglich sein dürfte und zum anderen in keinem Versuch jemals

ein Homodimer des Lhca1 beobachtet werden konnte. Der Grat zwischen unspezifischer Aggregation und spezifischer Anlagerung zweier Heterodimere, die *in vivo* nicht existieren, ist schmal.

Bisher wurde angenommen, dass die Gelaufftrennung die harsche und SDG-UZ die schonende Methode wäre. Vermutlich trifft das auch zu, wenn es um die Auftrennung instabiler Pigment-Protein-Komplexe geht. Die hier beobachteten WT-Doppeldimere und die in späteren Untersuchungen aufgetretenen Doppeldimere und höhermolekularen Banden einer Lhca1-Mutante mit der 2. Helix von Lhca4 (Abb. 39) deuten darauf hin, dass stabile Komplexe im Gel ihren Oligomerisierungszustand bewahren können (siehe auch Kap. E2.4), während er im Dichtegradienten nicht aufrechterhalten werden kann. Dazu passt die Beobachtung, dass allein rekonstituierte Monomere von Lhca1 und Lhca4 in der Geltasche vermischt Heterodimere bilden können. Aus Dichtegradienten isolierte Monomere können hingegen nicht wieder heterodimerisieren, was vermutlich an dem im Gradienten enthaltenen β -Dodecylmaltosid (DM) liegt, dass potentiell interagierende AS abschirmt (Schmid et al., 2002a). In den vorliegenden Fällen könnte das DM die zuvor schwach interagierenden Untereinheiten wieder voneinander trennen.

1.1.2 Bestätigung der Wichtigkeit des Lhcb1-N-Terminus für die Trimerisierung

Monomerrekonstitutionen

Lhcb1-Mutanten mit N-Termini von Lhca4 oder Lhcb4 bildeten stabile Pigment-Protein-Komplexe aus (Abb. 19A). Frühere Studien N-terminaler Deletionsmutanten am Lhcb1 (AB80) von Erbse zeigten, dass auch ohne N-Terminus noch monomere Komplexe ausgebildet werden können (Cammarata und Schmidt, 1992). Eine Beeinflussung der Monomerstabilität des Lhcb1 trat erst nach Deletion eines Glutamats ein, das zur Ausbildung einer internen Ionenbindung zwischen Helix 1 (E66) und Helix 3 (R181) benötigt wird (Kühlbrandt et al., 1994). Untersuchungen an N-terminalen Deletionsmutanten von Lhca1 und Lhca4, führten erst zum Verlust der Monomerbildung, nachdem die N-Termini beider Proteine nicht mehr vorhanden waren (Rupprecht et al., 2000). Da ein Verlust von AS die Monomerbildung nicht oder erst nach fortgeschrittener Deletion verhindern konnte, wird ersichtlich, warum eine Substitution des N-Terminus keinen Effekt auf die Lhcb1-Monomerisierung ausübte.

Anders als nach Gelaufftrennung konnten nach Aufreinigung im SDG zwei Banden im Bereich der Monomere mit Lhcb1-Nb4-Komplexen isoliert werden. Verglichen mit den Lhca4-Mutanten mit substituiertem N-Terminus, die beide nach Monomerrekonstitution Doppelbanden im SDG aufwiesen, scheinen nur dann 2 Fraktionen aufzutreten, wenn der N-Terminus gegen eine längere Sequenz ausgetauscht wird. Beim Lhcb1 mit Lhca4-N-Terminus und bei den beiden Lhcb4-Mutanten mit Lhca4- und Lhcb1-N-Terminus traten keine Doppelbanden nach Auftrennung einer Monomerrekonstitution im SDG auf.

Aktuelle Röntgenstrukturanalysen an LHCII-Kristallen konnten trotz hoher Auflösung (2,72 Å und 2,5 Å) nicht alle AS des N-Terminus genau lokalisieren, weswegen vermutet wurde, er könnte unterschiedliche Konformationen einnehmen (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005).

Pigmentzusammensetzung und Fluoreszenzemission der Monomere

Zur Stabilität des Lhcb1 tragen unter anderem 2 überkreuz angeordnete Xanthophylle bzw. Lutein-Moleküle bei, die in L1- und L2-Position gebunden werden (Hobe et al., 2000), und auch in den Kristallstrukturen als solche identifiziert wurden (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005). Beim Lhcb1 wird in dem Raum zwischen Helix 1/Helix 3-Kreuz

und der Helix 2 ein Neoxanthin in N1- Position gebunden. Des Weiteren befindet sich in V1-Position ein Violaxanthin, dass über ein PG und der Helix 1 koordiniert ist. Letzteres hat eine sehr geringe Bindungsaffinität (Ruban et al., 1999; Hobe et al., 2000) und geht für gewöhnlich während der Aufreinigungsprozedur verloren, weshalb in Untersuchungen am Lhcb1 in dieser Arbeit nur wenig Violaxanthin gefunden wurde (Tabelle 30). Pigmentanalysen zeigen, dass im WT-Monomer mehr Chl *a* als Chl *b* im Vergleich zur Kristallstruktur gebunden wurde (Standfuss et al., 2005), zudem war der Carotinoid-Gehalt ebenfalls abweichend von bisherigen Untersuchungen (Tabelle 36; Croce et al., 1999b). Die gleiche Pigmentzusammensetzung wurde auch für Monomerkomplexe der Lhcb1-Mutante mit Lhca4-N-Terminus beobachtet. Die im SDG unterschiedlich weit laufenden Monomerfraktionen der Lhcb1-Nb4-Mutante brachten es auf unterschiedliche Pigmentzusammensetzungen. Während die Monomere der oberen Bande bis zu 6 Chlorophylle weniger und kaum Neoxanthin gebunden hatten, offenbarte sich die Pigmentzusammensetzung der unteren Bande bei reduziertem Chlorophyll-Gehalt als beinahe typisch für einen WT-Lhcb1, bei welchem die V1-Bindungsstelle unbesetzt blieb (Croce et al., 1999b; Hobe et al., 2000). Der massive Chl-Verlust der Komplexe aus der oberen Bande deutet darauf hin, dass es sich um nur partiell gefaltete Proteine handeln könnte.

Da beide Lhcb1-Mutanten wie der WT zwei Luteine binden (Tabelle 35), lässt vermutlich die N-terminale L2-Carotinoid-Bindestelle im Lhca4 und Lhcb4 auch die Anlagerung von Lutein zu, was zumindest für den Lhcb4 noch nicht beobachtet wurde, da dort immer nur 1 Lutein gebunden wird (Bassi et al., 1999). Eventuell legen im Lhcb1 die luminale Bindedomäne und seine kompakte Faltungsstruktur fest, dass keine anderen Carotinoide in der L2-Position binden können. Trotz seiner Länge von 97 AS kann der Lhcb4-N-Terminus kaum Ursache für die verbesserte Neoxanthin-Bindung am Lhcb1 sein, da diese am luminalen Y111 und der Helix 2 und damit am entgegen gesetzten Ende des Monomers lokalisiert ist (Liu et al., 2004). Wahrscheinlich liegen die Lhcb1-WT-Monomere auch unterschiedlich gut gefaltet im SDG vor, können aber nicht voneinander getrennt werden, da sie zu geringe Laufunterschiede aufweisen.

Der Lhcb1-N-Terminus scheint auch unter Berücksichtigung der aufgenommenen Fluoreszenzemissionsspektren (Abb. 58) keine besondere Bedeutung für die Stabilität des Monomers zu haben.

Trimerrekonstitution

Substitutionen des Lhcb1-N-Terminus gegen entsprechende N-terminale Domänen aus Lhca4 und Lhcb4 verhindern die Trimerisierung dieser Lhcb1-Mutanten (Abb. 20; Abb. 21B). Bereits Nußberger et al. (1993) zeigten durch Proteaseverdau des LHCII, dass die AS 9-48 des N-Terminus wichtig für die Trimerstabilität sind. Die Anwendung von Phospholipase A hatte den gleichen Effekt und deutete auf die Beteiligung eines Phospholipids an der Trimerisierung hin. In späteren Untersuchungen gelang durch Herstellung N-terminaler Deletions- und Punktmutanten die Identifikation eines Trimerisierungsmotivs (WYxxxR) ab Position 16 des N-Terminus, von welchem alle drei AS für die LHCII-Assemblierung essentiell waren (Hobe et al., 1995). Trotz kryoelektronenmikroskopischer Aufnahmen (Kühlbrandt et al., 1994) und Röntgenstrukturanalysen (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005) gelang es bisher nicht die ersten 15 N-terminal lokalisierten AS aufzulösen. Das PG des LHCII ist laut Kristallstruktur (Liu et al., 2004) über Phosphodiesterbindungen an das Chl *b*2 (Chl 7) koordiniert und verhält sich damit ähnlich dem PG, das aus dem cyanobakteriellen PSI bekannt ist (Jordan et al., 2001). Zudem erfolgt dessen Koordination über Y44 (H-Brücke) des N-Terminus und über K182 (Ionenbindung) von Helix 3. Darüber hinaus erfolgt am Y44 auch die Bindung des Chl *a*4 (Chl 4), das zudem über W46 koordiniert

wird. Weder der Lhca4-, noch der Lhcb4-N-Terminus können das Trimerisierungsmotiv oder ein Tyrosin an Position 24 (im Lhcb1) aufweisen, das im Lhcb1 auch zur Koordination des Chl 9 dient (Standfuss et al., 2005). Nur im Lhcb4 befindet sich ab Position 26 ein ähnliches WYxxxi-Motiv, wobei das Ile (Jansson, 1999: Arabidopsis) nicht konserviert ist und sonst durch Lys ersetzt wird (Abb. 16), was nicht für eine Trimerisierung dieser Lhcb1-Mutante führt. Zudem ist der N-Terminus des Lhcb4 mit 97 AS fast doppelt so lang wie der des Lhcb1 (53 AS), was eventuell zu sterischen Problemen im Trimer führen könnte. Im Lhcb5 (CP26), einem minoren LHC des PSII (Yakushevskaya et al., 2003), ist dieses Trimerisierungsmotiv des Lhca1 ebenfalls über alle Spezies höherer Pflanzen hinweg konserviert (Abb. 16). Untersuchungen an Lhcb1/Lhcb2-Antisense Arabidopsis-Pflanzen, die keinen LHCI mehr synthetisieren konnten brachten den Beleg, dass auch CP26 als Homotrimer den LHCI ersetzen und auch in Mischtrimern mit dem Lhcb3 vorliegen kann (Ruban et al., 2003; Andersson et al., 2003; Ruban et al., 2006). Da bisher nur *in vitro* Homotrimere des Lhcb1 bekannt sind und die Monomere im Trimer eine große gemeinsame Oberfläche aufweisen, müssen weitere Proteindomänen an der Wechselwirkung der Untereinheiten beteiligt sein.

1.2 Einfluss der C-terminalen Domäne auf Oligomerisierungsverhalten

1.2.1 Die Übertragung des C-Terminus von Lhcb4 auf Lhca4 und Lhcb1 führt zu einer Beeinträchtigung der Monomerbildung

Monomerrekonstitutionen

Eine Substitution des C-Terminus, der bei diesen Untersuchungen alle AS bis zum Ende der Helix 3 mit einschließt, gegen die entsprechenden Lhcb4-AS, führte zu Reduktionen der Monomerausbeuten der Lhca4- und Lhcb1-Mutante und im Falle der Lhca4-Cb4-Rekonstitution zur Ausbildung von zwei Banden im Monomerbereich nach SDG-Auftrennung (Abb. 24A). Im Gegensatz dazu konnte die Lhcb4-Mutante mit gegen Lhcb1 getauschtem C-Terminus höhere Monomerausbeuten erzielen. Aus Deletions-experimenten am Lhca4 aus Tomate war bekannt, dass 12 AS am C-Terminus, inklusive eines Prolins am Ende der Helix 4, deletiert werden können bevor die Monomere instabil werden (Rupprecht et al., 2000). In derselben Studie konnten am Lhca1 zusätzlich 2 AS (insgesamt 20 AS) der Helix 4 deletiert werden ohne die Monomerstabilität zu beeinträchtigen. Für den Lhcb1-C-Terminus von Erbse gab es ähnliche Untersuchungen, die zunächst auf die für ein stabiles Lhcb1-Monomer unverzichtbaren AS P204 bis L212 hindeuteten (Cammarata und Schmidt, 1992). Andere Untersuchungen an Erbse zeigten, dass vor allem Tryptophan- und auch Serin-Reste, die bei Arabidopsis durch Alanin ersetzt sind, am C-Terminus für die Monomerstabilität verantwortlich sind (Paulsen und Hobe, 1992). Paulsen und Kuttkat (1993) konnten jedoch durch Punktmutation dieser AS keinen Beweis für deren stabilisierende Eigenschaften im Lhcb1 erbringen, wodurch vermutet wurde, dass auch weiter C-terminal liegende AS an der Monomerstabilisierung beteiligt sein müssen.

Die C-terminale Sequenz von Lhca4, Lhcb1 und Lhcb4 sind untereinander kaum konserviert. Dadurch wird die Erklärung schwierig, warum der C-Terminus des Lhcb4 destabilisierend wirkt, während nur der Lhcb1-C-Terminus auf den Lhcb4 stabilisierend wirkt. Eventuell könnte ein mehr an AS im Lhcb1 (33) als im Lhcb4 (28) für die Stabilisierung verantwortlich sein.

Pigmentzusammensetzung und Fluoreszenzemission der Monomere

Eine Substitution des Lhca4-C-Terminus gegen den entsprechenden Bereich des Lhcb1 führte veränderte die Pigmentausstattung der Lhca4-Cb1-Monomere (Tabelle 29) gegenüber dem WT nicht. Während beim Lhca4-WT von Arabidopsis in dieser Arbeit und bei vergleichbaren Untersuchungen nur 10 Chlorophylle bezogen auf 2 gebundene Carotinoide pro Komplex nachgewiesen werden konnten (Croce et al 2002), waren an das Lhca4-Cb1-Protein 12 Chlorophylle gebunden. Da mehr zusätzliches Chl *a* (1,5) als Chl *b* (0,5) gefunden wurde, könnte der C-Terminus des Lhcb1 einen stabilisierenden Einfluss auf die am Q170 (Helix 3) und H185 (Helix 4) gebundenen Chl *a*-Moleküle (Chl *a*3 und Chl *b*3 nach Kühlbrandt et al., 1997) des Lhca4 ausüben. Analog zu anderen Mutanten, die nach Auftrennung 2 Banden im Bereich der Monomere aufwiesen, war der Chlorophyllgehalt der vermutlich unvollständig gefalteten Lhca4-Cb4-Komplexe der oberen Bande reduziert, während die Monomere der unteren Bande einen erhöhten Chlorophyllgehalt aufwiesen (Tabelle 29). Analog dazu präsentierten sich die Fluoreszenzemissionsspektren, wobei nur die obere Lhca4-Cb4-Bande eine reduzierte langwellige Fluoreszenz aufwies (Abb. 57). Nach Abb. 72 ist eine direkte Beeinträchtigung langwelliger Chlorophylle, die im Lhca4 an anderer Position gebunden sind, auszuschließen (Morosinotto et al., 2005).

Obwohl die Lhcb4-Cb1-Mutante nach Gelaufftrennung höhere Ausbeuten bezüglich der Monomere zeigte (Abb. 24A), spiegelte sich die durch die intensive Monomerbande vermutete Stabilität nicht in der Pigmentzusammensetzung wider, da sowohl der Lhca4-, als auch der Lhcb1-C-Terminus im Lhcb4 zu einem Chl *b*-Verlust führten (Tabelle 31). Im Gegensatz dazu führte der Einbau des Lhcb4-C-Terminus in Lhca4 oder Lhcb1 immer zu einer leichten Erhöhung des Chl *b*-Gehalts (Tabelle 29; Tabelle 30). Rekonstitutionen von Lhcb4 und Lhcb1 mit unterschiedlichem Chl *a/b*-Angebot resultierten in unterschiedlichem Chlorophyll-*a/b*-Verhältnis der LHCs (Giuffra et al., 1997; Kleima et al., 1999). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass manche Chl-Bindungsstellen eher für Chl *a* und andere eher für Chl *b* spezifisch sind (Bassi et al., 1999). Dies würde im Falle der Chl *a*3 Bindungsstelle in Helix 4 bedeuten, dass im Lhcb1 (H212) und Lhca4 (H185) Chl *a* präferiert wird und im Lhcb4 (H242) Chl *b* den Vorzug findet. Warum die Carotinoidgehalte ebenfalls leicht schwanken ist durch die Nähe des C-Terminus zur L1-Bindestelle (Tabelle 35) am Ende der Helix 3 zu erklären. Für den Lhcb1 wurde nachgewiesen, dass auch diese Bindungsstellen promiskuitiv sind und *in vitro* von unterschiedlichen Carotinoiden besetzt werden können (Hobe et al., 2000).

1.2.2 Der C-Terminus beeinflusst weder die Heterodimerisierung noch die Trimerisierung

Dimerisierungsexperimente der Lhca4-Mutanten mit substituiertem C-Terminus zeigten, dass die C-terminale Domäne des Lhca4 im LHCI-730 nicht in Wechselwirkung mit dem Lhca1 tritt (Abb. 24B; Abb. 26A). Diese Beobachtung bestätigt vorherige Analysen an C-terminalen Deletionsmutanten des Lhca4, die trotz umfangreicher Deletion von bis zu 9 AS von Helix 3 immer noch mit dem Lhca1 dimerisierten (Schmid et al., 2002a). Im Lhca1 ließ sich in derselben Untersuchung das C-terminale W185 identifizieren, das mit dem Lhca4 in Wechselwirkung tritt. Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Strukturdaten des PSI, in welchen die N- und C-Termini des Lhca1 in Richtung Helix 2 des Lhca4 orientiert sind und sowohl der N- als auch der C-Terminus des Lhca4 zum Lhca2 ausgerichtet sind (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007). Die Fluoreszenzemissionsspektren der Heterodimere mit Lhca4-Mutanten weisen eine leicht erhöhte langwellige Komponente auf, die eventuell auf die im Monomer ebenfalls

erhöhte Chl *b*-Bindung zurückzuführen ist. Lhca4-Rekonstitutionsexperimente mit reinem Chl *a* ergaben, dass Chl *b* für die langwellige Fluoreszenz notwendig ist (Schmid et al., 2001), was am Chl *a5/b5*-Dimer liegt (Morosinotto et al., 2005).

Im Lhcb1 beeinflusst die Substitution des C-Terminus gegen die entsprechenden Domänen aus Lhca4 und Lhcb4 die Fähigkeit zur Trimerisierung nicht. Die Untersuchungen zeigten, dass ein Lhca4-C-Terminus zu mitunter höheren Trimerausbeuten führen kann (Abb. 25; Abb. 26B). Anhand bisheriger Untersuchungen wurde dem Lhcb1-C-Terminus und speziell dem W222 eine Trimer stabilisierende Funktion zugeschrieben (Kuttkat et al., 1996). Lhcb1-Deletionsmutanten, bei welchen mindestens 7 AS C-terminal deletiert worden waren, konnten keine stabilen Trimere mehr bilden. Allerdings konnten Mutanten mit genau 7 (Δ C-225) und 9 (Δ C-223) deletierten AS mittels Detergens-Lipid-Rekonstitution doch trimerisiert werden (Kuttkat et al., 1996), während dies durch Insertion der LHCs in eine Thylakoidmembran nicht gelang (Kuttkat et al., 1995). Die Hydrophobizität des substituierten W222 wurde in direkten Zusammenhang zur Trimerbildung gestellt werden, da theoretisch delokalisierte π -Elektronen vom W222 und H212 miteinander wechselwirken könnten (Kuttkat, 1997). Unterstützt wurde diese These durch Mutationsanalysen der Chl-Bindungsstelle H212 des Lhcb1 gegen Phe und Leu, wonach deutlich weniger Trimere gebildet wurden (Yang et al., 1999).

Eine mögliche Ursache, weshalb die C-terminalen Lhcb1-Domänentauschmutanten trotzdem trimerisierten, könnte in der Existenz einer Ersatz-AS zu finden sein, die sowohl im C-Terminus des Lhca4, als auch im Lhcb4 lokalisiert ist. Im Lhca4 befindet sich an Position 191 ebenfalls ein Trp, das zwar 5 AS näher an Helix 4 liegt als das W222 des Lhcb1, welches aber eine ähnliche Stabilisierung hervorrufen könnte. Im Lhcb4 befindet sich ein invertiertes Motiv (W239-H248), dass eventuell dieselbe Funktion erfüllen könnte, wie die H212-W222-Wechselwirkung im Lhcb1. Da die Chl-bindende AS (H242) genau dazwischen liegt, könnte dies zu sterischen Problemen bei der Chlorophyll *a*-Bindung führen, was am trimeren Lhcb1-Cb4 beobachtet werden konnte (Tabelle 31).

1.3 Der Einfluss der Schleifenregionen auf Monomerstabilität und die Oligomerisierung

1.3.1 Der Austausch der luminalen Domäne führt zur Bildung instabiler Monomere

Lhca4-Mutanten mit getauschter luminaler Schleifenregion (LLb1 und LLb4) wiesen nur geringe Monomerausbeuten nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel auf (Abb. 27A). Die Lhcb1-Mutante mit der luminalen Schleife des Lhca4 hatte hohe Monomerausbeuten, während der Einbau der luminalen Lhcb4-Schleife in den Lhcb1 zur Reduktion der Monomerausbeuten führte. Die Lhcb4-Mutanten mit der luminalen Schleife des Lhca4 oder Lhcb1 bildeten nach Gelauf trennung keine Monomere. Durch Auftrennung der Rekonstitutionsansätze per schonende SDG-UZ konnten jedoch Monomere isoliert werden.

Laut 'two stage model' (Popot und Engelman, 1990; 2000) falten sich Helices zunächst alleine und assemblieren anschließend zu höherer Struktur. Beobachtungen, dass die Bakteriorhodopsin-Faltung auch in Abwesenheit eines Chromophors abläuft, bestätigten diese Annahme (Booth et al., 1995). Eine Assemblierung war sogar dann möglich, wenn die Schleifenregionen zwischen den Helices nicht verbunden waren (Kahn und

Engelman, 1992; Marti, 1998). Außerdem ergaben Mutationsanalysen, dass AS-Substitutionen keine große Auswirkung auf die Komplexfaltung ausüben (Gilles-Gonzalez et al., 1991; Teufel et al., 1993). Diese Beobachtungen sind völlig konträr zu den hier durchgeführten Experimenten, in welchen der Austausch der luminalen Schleife zu Komplexinstabilitäten führte, obwohl diese in einem anderen Lhc-Protein die gleiche strukturelle Funktion ausübt. Für den Lhcb1 existieren Zufalls-Mutationsanalysen der luminalen Schleife, um den stabilisierenden Einfluss dieser Domäne zu untersuchen (Mick et al., 2004a). Es stellte sich heraus, dass vor allem hydrophile und saure AS für die Faltung und Stabilität des Lhcb1 verantwortlich sind und eine Wechselwirkung der Schleife mit anderen Proteinbestandteilen vorstellbar ist. Zudem wurde vermutet, dass die luminal Schleife aufgrund ihrer Protease-Zugänglichkeit eine wichtige Rolle bei Degradationsprozessen spielt (Mick et al., 2004b). Bei Untersuchungen der stromalen Schleife wurde eine Beteiligung dieser Domäne an der Proteinfaltung nachgewiesen (Heinemann und Paulsen, 1999). Die luminalen Schleifen von Lhca4 (17 AS), Lhcb1 (33 AS) und Lhcb4 (23 AS) unterscheiden sich stark in ihrer Sequenzlänge. Während im Lhcb1 die Existenz einer kurzen Helix (siehe Abb. 16: V95-S105), gefolgt von zwei kurzen antiparallelen, über Ionenbindung (D111-H120) stabilisierte Strukturen, relativ gut abgesichert ist (Liu et al., 2004), wurde für den Lhcb4 wie für den Lhcb5 bisher lediglich postuliert, dass eine Helix E, auch aufgrund der im Vergleich zum Lhcb1 konservierten N1-Bindungsstelle in der luminalen Schleife, möglich sein könnte (Caffarri et al., 2007). Für den Lhca4 ist wie für alle anderen Lhc-Proteine bekannt, dass in der 1. Hälfte der luminalen Schleife die konservierte Sequenz der L2-Carotinoidbindungsstelle existiert (Pichersky und Jansson, 1996; Bassi et al., 1997; Sandona et al., 1998).

Pigmentzusammensetzung und Fluoreszenzemission der Monomere

Die Substitution der luminalen Schleife führt in allen drei untersuchten Lhc-Proteinen zu einem deutlichen Chlorophyll-Verlust (Tabelle 23; Tabelle 24; Tabelle 25). Weder Kühlbrandt et al. (1994) noch spätere Röntgenstrukturanalysen an Kristallen konnten außer dem Chl 14, dass über das O-Atom des Val 119 koordiniert ist, keine weiteren konkreten Chl-Bindungsstellen in der luminalen Lhcb1-Schleife identifizieren (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005). Allerdings befinden sich auf der luminalen Seite eines Monomers 6 Chlorophylle, die 2 Cluster ausbilden. Neben einem Chl *a*-Dimer in der Nähe des C-Terminus (siehe E1.2.1), das durch eine Substitution der luminalen Schleife wahrscheinlich nicht beeinflusst wird, sind zwischen der Superhelix und der Helix 2 in Nähe der luminalen Schleife vier weitere Chlorophylle (3 Chl *b*, 1 Chl *a*) lokalisiert (siehe Kap. A5.2, Tabelle 1). Die massiven Chl-Verluste deuten darauf hin, dass ein Austausch der luminalen Schleife in nur teilweise gefalteten Pigment-Protein-Komplexen resultiert, wie sie auch schon bei N- und C-terminalen Domänentauschmutanten aufgetreten waren. Eine Verkürzung oder Verlängerung dieser luminalen Schleife könnte deshalb die gesamte Chl-Bindung des luminalen Chl-Clusters beeinflussen, da durch die fehlende kompakte Struktur viele Chlorophylle nur locker gebunden werden und während der Aufreinigung verloren gehen. In der Regel sind die Chl-Bindungsstellen zwar konserviert, doch vermutlich erfolgt die Koordination in jedem LHC aufgrund der Sequenzvariabilitäten in der Umgebung Chl-bindender AS etwas anders. Dass neben Chl *b*-Verlusten mit Ausnahme von Lhcb1-LLa4 auch Chl *a*-Verluste auftraten, zeigt, wie stark die Pigmente in diesem Cluster zusammenhängen. Die Lhca4-Mutanten weisen zudem eine deutlich reduzierte langwellige Fluoreszenz auf (Abb. 51). Ein ähnliches Erscheinungsbild liefern Mutanten mit mutierter Chl *b6*-Bindungsstelle (Morosinotto et al., 2005). Das Chl *b6* ist Teil dieses luminalen Clusters

und eines von vier Chlorophyllen im Lhca4, die für die langwellige Fluoreszenz verantwortlich gemacht werden (Abb. 72).

Weiterhin könnte von Bedeutung sein, dass durch Substitution der luminalen Schleifen, das Carotinoid an der L2-Stelle eventuell nicht oder nur lose binden kann, wodurch der gesamte Komplex und die daran gebundenen Chlorophylle destabilisiert werden könnten.

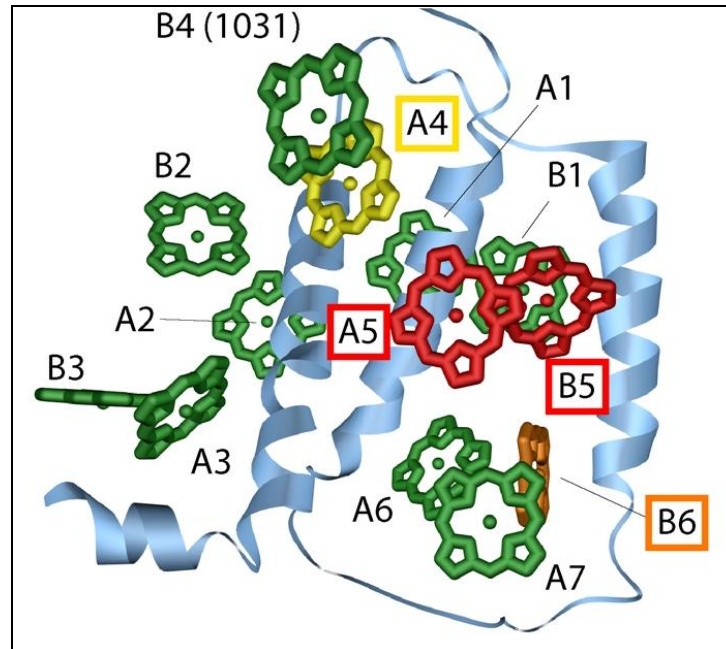


Abb. 72: Strukturmodell des Lhca4, entnommen aus Morosinotto et al., (2005). Dargestellt sind die am Lhca4 gebundenen Chlorophylle (nach Kühlbrandt et al. (1994) nummeriert). Chlorophylle, deren Verlust die langwellige Fluoreszenz stark (rot), mittel (orange) und schwach (gelb) beeinflussen sind hervorgehoben.

Im Lhcb4 befindet sich vermutlich wie im Lhcb1 eine N1-Bindungsstelle (Tabelle 35; Caffarri et al., 2007). Im LHCII wird die Polyenkette des Neoxanthins außer zum einen über AS der Helix 1- und Helix 2 (W71, L134, M135 und V138) und zum anderen mittels hydrophober Phytolreste von Chl 11 und Chl 13 koordiniert. Zur Fixierung der Epoxizyklohexan-Kopfgruppe dient neben dem Tetrapyrrolring des Chl auch eine H-Brücke zum Y112 der luminalen Schleife, das in Mutanten mit luminaler Lhca4-Schleife nicht enthalten ist. Reduzierte Neoxanthin-Werte (Tabelle 25) wurden aber nur bei den Lhcb4-Mutanten beobachtet, die außerdem einen hohen Anteil energetisch ungekoppelter Chlorophylle aufwiesen (Abb. 53), was auf nur partiell gefaltete Proteinkomplexe hindeutet. Die Substitution der luminalen Schleife im Lhcb1 hatte, im Gegensatz zu früheren Untersuchungen mit LHCII-CP29-Chimären, keine Verminderung des Neoxanthin-Gehalts zur Folge (Gastaldelli et al., 2003).

1.3.2 Der Austausch der stromalen Domäne führt zur Bildung instabiler Monomere

Die Lhca4-, Lhcb1- und Lhcb4-Mutanten mit substituierter stromaler Schleifenregion waren - vergleichbar mit den luminalen Schleifenmutanten – mehrheitlich kaum in der Lage zu falten oder stabile Monomere auszubilden, die nach einer Auftrennung noch im schwach denaturierenden Gel nachweisbar waren (Abb. 32). Auffällig beim Tausch dieser Domäne war die Auswirkung der Substitution der Lhca4-Schleife in den Lhcb1 oder Lhcb4, die dadurch erheblich reduzierte Monomerausbeuten aufwiesen. Auch der

Austausch der stromalen Schleife im Lhca4 gegen Lhcb-Schleifen resultierte in stark verminderten Monomerausbeuten. Die Lhcb1- und Lhcb4-Schleife konnten problemlos miteinander getauscht werden. Die stromale Lhcb1-Schleife im Lhcb4 führte sogar zu einer Erhöhung der Monomerausbeute. Eine frühere Mutationsanalyse der stromalen Lhcb1-Schleife wies darauf hin, dass diese Domäne einen starken Beitrag zur Monomerstabilität liefert (Heinemann und Paulsen, 1999). Versuche mit Helices vom Bakteriorhodopsins (BR), die nicht mehr über Schleifen verbunden waren, und BR-Helices mit synthetischen Schleifen, erreichten nicht die Stabilität der WT-Form (Allen et al., 2001; Kim et al., 2001). Untersuchungen an Schleifenregionen zeigten, dass auch ohne das restliche Apoprotein tertiäre Strukturen ausgebildet werden konnten (Bennett et al., 2004; Giragossian et al., 2004). Deshalb lag die Vermutung nahe, dass Schleifendomänen einen Proteinfaltungsprozess unterstützen können. Am Beispiel des grün fluoreszierenden Proteins wurde deutlich, dass einzelne AS der extern liegenden Schleifenregion die Fluoreszenz des Monomers stark beeinträchtigen können und somit auch in löslichen Proteinen Schleifenregionen strukturell wie funktionell an der Monomerstabilität beteiligt sind (Flores-Ramirez et al., 2007).

Die stromalen Schleifen der Lhc-Proteine weisen unterschiedliche Sequenzlängen auf. Während die Schleife des Lhca4 (38 AS) am längsten ist, kommen Lhcb1 und Lhcb4 auf 27 bzw. 24 AS. Die Variabilität der Sequenzlängen könnte auf eine unterschiedliche Tertiärstruktur der stromalen Schleifen hindeuten, worin sich vor allem Lhca- und Lhcb-Proteine unterscheiden könnten. Dadurch könnte vor allem der Faltungsprozess beeinträchtigt werden, da sich die übrigen Proteinstrukturen nicht wie gewohnt zueinander anordnen können.

Pigmentzusammensetzung und Fluoreszenzemission der Monomere

Ein Indiz für eine unkorrekte Faltung aufgrund unterschiedlicher Schleifenlängen liefern Fluoreszenzemissionsspektren, in welchen ein ungewohnt hoher Anteil ungekoppelter Chlorophylle bei den instabilen Mutanten Lhca4-SLb1, Lhca4-SLb4, Lhcb1-SLa4 und Lhcb4-SLa4 beobachtet werden konnte (Abb. 51, Abb. 52, Abb. 53). Vermutlich binden die Pigmente an das Apoprotein, können aber aufgrund interner Verschiebungen der Chl-bindenden Helices keine Energie mehr übertragen. Die Kinetik der LHCII-Faltung bzw. Pigmentbindung wurde untersucht und sowohl ein schneller (Chl *a*-Anlagerung), als auch ein langsamer Schritt (Chl *b*-Anlagerung) konnte identifiziert werden (Horn und Paulsen, 2004; Horn et al., 2007). Sollte die stromale Schleife an der Lhc-Proteinfaltung beteiligt sein, in welcher auch notwendigerweise Chlorophylle involviert sind, könnte eine Störung des Faltungsprozesses auch einen Chlorophyll-Verlust zur Folge haben (Tabelle 23, Tabelle 24, Tabelle 25). Obwohl laut Kristallstruktur beim LHCII 8 Chlorophylle zur stromalen Seite hin gebunden sind, wurde für diese Domäne nur eine einzige Chl-koordinierende Position beschrieben (Standfuss et al., 2007), die nur dann genutzt werden kann, wenn ein Chl *b* gebunden wird. Im Lhcb1 ist das Chl *b*1 (Chl 11) mit seiner Formylgruppe über eine H-Brücke mit dem N-Atom des L148 der stromalen Schleife verbunden. Der Ligand des Mg-Atoms befindet sich aber - über ein H₂O-Molekül koordiniert - in Helix 1 (O-Atom des V138) (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005). Aufgrund dessen wird der Verlust nur eines Chl *b* im Lhcb1-SLb4 verständlich, da das L148 wegen einer Lücke im Alignment beim Lhcb4 nicht existiert (Abb. 18B). Falls im Lhca4 ein Chlorophyll in dieser Position koordiniert sein sollte, könnte wegen dessen räumlicher Nähe (9,9 Å zum Chl *b*5 nach Morosinotto et al. (2005)) zum Chl *a*5-Chl *b*5-Dimer auch deren Koordinierung beeinflusst werden (Abb. 72), wodurch die starke Reduktion der langwelligen Fluoreszenz dieser Monomere erklärbar wäre (Abb. 51). In der Helix 3 und der stromalen Lhcb1-Schleife durchgeführte Mutagenesen deuten darauf hin, dass die Schleifenregion nicht nur der Monomerstabilität dient,

sondern ebenfalls an einer Stabilisierung der Pigmentbindung beteiligt ist (Heinemann und Paulsen, 1999).

Obwohl in der stromalen Schleife auch die konservierte L2-Bindungsstelle (Tabelle 35) lokalisiert ist und die drei untersuchten LHCs unterschiedliche Präferenzen in ihrer Carotinoid-Bindung aufweisen (Croce et al., 1999a; Hobe et al., 2000; Croce et al., 2002; Schmid et al., 2002b; Caffarri et al., 2007), konnten nur bei den Monomeren mit starken Chlorophyll-Verlusten Veränderungen im Carotinoid-Gehalt ermittelt werden. Diese sind vermutlich deshalb eher auf die unzureichend gefalteten Komplexe, als auf eine ausgetauschte L2-Bindungsstelle zurückzuführen.

1.3.3 Die Heterodimerisierung und die Trimerisierung werden durch die Schleifendomänen stark beeinflusst

Da sämtliche Lhca4-Mutanten mit substituierten Schleifendomänen unzureichend rekonstituierbar bzw. instabil nach Auftrennung im schwach denaturierenden Gel waren (Abb. 32), ist ungewiss, ob sich diese Effekte auf die Dimere übertragen, oder ob im Dimer mit Lhca1 eine Stabilisierung erfolgte. Fakt ist, dass keine Dimere mit Lhca4-Mutanten erzeugt werden konnten, die eine substituierte stromale Domäne trugen (Abb. 33; Abb. 35A). Auch die Lhca4-Mutanten mit getauschter luminaler Domäne waren lediglich nach SDG-UZ nachzuweisen (Abb. 27B; Abb. 29A). Die Lhcb1-Mutanten mit ausgetauschter stromaler Schleife trimerisierten nicht (Abb. 34; Abb. 35B) und Trimere von Lhcb1-Mutanten mit substituierte luminaler Schleife waren nur nach SDG-Auftrennung nachweisbar (Abb. 28; Abb. 29B), obwohl deren Monomere – bis auf die der Lhcb1-SLa4-Mutante – stabile Komplexe bildeten (Abb. 27A, Abb. 32). Vermutlich sind Teile der luminalen Lhca4- und Lhcb1-Schleife an der Di- oder Trimerisierung beteiligt, aber nicht unbedingt essentiell. Die stromale Domäne ist aber für eine erfolgreiche Oligomerisierung unverzichtbar.

Bei Erstellung der Consensussequenzen aus verschiedenen Arten (siehe Kap. A2) fiel auf, dass in der luminalen Schleife des Lhca4, im Gegensatz zur entsprechenden Lhcb1-Schleife, nur ein geringer Anteil der AS zwischen den Spezies identisch war. Von 17 AS des Lhca4 waren nur 9 identisch (57%), während von den 33 Lhcb1-AS 28 übereinstimmend waren (85%). In der stromalen Schleife waren sich Lhca4 und Lhcb1 mit 26 von 28 identischen AS (68%) und 20 von 27 identischen AS (74%) etwas ähnlicher. Gemäß der Vorstellung, dass alle an der Ausbildung einer speziellen Oligomerisierungsform beteiligten AS streng konserviert sein sollten, waren demnach fast die Hälfte der luminalen AS des Lhca4, aber nur wenige AS des Lhcb1, für die Untersuchungen nicht relevant. Im Lhca4 ist diesbezüglich vor allem die luminaire Region stark konserviert, die sich an die 2. Helix anschließt, wodurch ein Beitrag an der Dimerisierung der in diesem Bereich lokalisierten AS wahrscheinlicher wird. Generell wiesen ein Großteil der luminalen Schleife des Lhcb1, sowie weite Bereiche der stromalen Schleife von Lhca4 und Lhcb1, hohe Konservierungsgrade zwischen den untersuchten Arten auf. Dadurch war es nicht möglich, explizite Bereiche oder AS, die für das zustande kommen der unterschiedlichen Oligomerisierungszustände verantwortlich sind, nur aufgrund der verfügbaren Sequenzen zu identifizieren. Die Proteinalignments der Consensussequenzen zeigen (Abb. 16), dass nach einem Domänentausch nur sehr wenige dieser innerhalb eines Lhc-Proteins konservierten AS in der entstandenen Chimäre eine ähnliche Position aufwiesen, was vor allem auf die unterschiedlichen Schleifenlängen zurückzuführen ist.

Die PSI-Strukturen zeigen, dass der N- und C-Terminus des Lhca1 in Richtung Helix 2 und die sich anschließende luminaire und stromale Schleife des Lhca4 orientiert ist (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007). Mutationsanalysen an den Termini des

Lhca1 identifizierten das W4 im N-Terminus und das W185 im C-Terminus als vermutliche Interaktionspartner des Lhca4. Homologie-Modellierungen und dynamische Molekülsimulationen auf Basis der LHCII-Struktur ergaben, dass das W4 mit dem W106 am stromalen Ende der H2 des Lhca4 über π -Elektronen der aromatischen Seitenkette in Wechselwirkung treten könnte. Zudem könnte das C-terminale W185 mit dem F84 der luminalen Lhca4-Schleife interagieren. (Jolley et al., 2005; Corbet et al., 2007). Da das W106 in keiner Lhca4-Mutante entfernt wurde, erfolgt die Interaktion entweder direkt mit einer AS der stromalen Schleife, oder die Ursache für die ausbleibende Dimerbildung liegt vielleicht in den im Monomer eventuell unbesetzten Chl-Bindungsstellen (Chl *b1*, Chl *a5*, Chl *b5*), weshalb die Monomere keine langwellige Fluoreszenz mehr zeigten. Einzelpunktmutationen dieser Chl-bindenden AS (E102) führten selbst nach SDG-Aufreinigung nur zu wenigen Dimeren (D2.1.5.2).

Die stromale Schleife hat noch eine weitere Funktion, die zunächst weniger mit der Oligomerisierungsfähigkeit, sondern mit der posttranslationalen Zielsteuerung der kernkodierten Lhc-Proteine zu tun hat. Eine hydrophile L18-Domäne (18 AS) - nachgewiesen im Lhcb1 – dient den chloroplastidären Signalerkennungspartikeln cpSRP43 und cpSRP54 als Erkennungssequenz in der stromalen Schleife, wodurch der LHCP (Lhcb1 aus Erbse) mittels Cofaktoren (cpFtsY und GTP) und ALB3 in die Thylakoidmembran inseriert wird (Tu et al., 2000; Jonas-Straube et al., 2001; Schünemann, 2004). Deshalb ist die Sequenz aller Lhc-Proteine höherer Pflanzen im zweiten Abschnitt der stromalen Schleife stark konserviert. Da in dieser Region auch eine L2-Carotinoid-Bindungsstelle lokalisiert ist (Bassi et al., 1997), liegen die für eine Oligomerisierung verantwortlichen AS, wahrscheinlich nicht auch noch in diesem hoch konservierten Schleifenabschnitt (Abb. 16). Falls ein Chaperon dennoch am Zustandekommen der unterschiedlichen Oligomerisierungszustände beteiligt sein sollte, kann dies durch *in vitro* Rekonstitutionen nicht überprüft werden.

Laut LHCII-Kristallstrukturen sind keine AS-Seitenketten der luminalen oder stromalen Schleife direkt an der Monomer-Monomer-Interaktion im Trimer beteiligt (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005). Das einzige durch die Substitution direkt betroffene Chl *b1* (Chl 11) scheint an der Trimerisierung nicht involviert zu sein. Am Übergang zur H2, in einem Glycin- und Prolin-reichen Abschnitt (G145, G147, P148, G150) der stromalen Lhcb1-Schleife, bildet sich eine Haarnadelschleife heraus, die eine Trimerstabilisierende Funktion erfüllen könnte. Schleifenregionen unteerschiedlicher Proteine können auch getrennt von ihrem Apoprotein falten und bilden entsprechende Tertiärstrukturen aus (Yeagle et al., 1997; Katragadda et al., 2000; Bennett et al., 2004). Lhca4 und Lhcb4 besitzen diese AS nicht und damit keine vergleichbare Tertiärstruktur, deren Abwesenheit sich aber anscheinend nur im Trimer bemerkbar macht. Indirekt könnten beide Schleifen einen Einfluss auf die Trimerstabilität ausüben, wenn die Monomere durch substituierte längere oder kürzere Schleifen nicht in WT-Konformation vorliegen. Da einige Helix 2-AS und daran koordinierte Pigmente direkt an der Trimerisierung beteiligt sind, könnte eine leichte Kipp- oder Drehbewegung dieser Helix – hervorgerufen durch veränderte Schleifen – die Trimerisierung verschlechtern oder verhindern. In früheren Studien der Lhcb1-Pigmentbindungsstellen war nach Verlust eines Chlorophylls (E65, H68, G78, N183) auch der Verlust der Trimerisierungsfähigkeit beobachtet worden (Rogl und Kühlbrandt, 1999; Yang et al., 1999).

1.3.4 Die Existenz einer Helix 5 in der luminalen Schleife des Lhca1 ist wahrscheinlich

Abstandsmessungen im PSI-Modell verglichen mit der theoretischen Länge einer gestreckten luminalen Lhca1-Schleife (Tabelle 20), lassen die Existenz einer luminalen Helix im Lhca1 vermuten. Ähnliche Längendifferenzen ließen sich für die luminalen Schleife des Lhca3 und Lhcb1 ermitteln. In einem früheren Modell des LHCI-730 wurde aufgrund einer Sekundärstruktur-Vorhersage die Existenz einer kurzen α -Helix in der luminalen Lhca1-Schleife vorgeschlagen (Melkozernov und Blankenship, 2003). Laut Kristallstruktur befindet sich im Lhcb1 eine 10 AS umfassende amphiphile Helix in der luminalen Schleife (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005).

Der Lhca1 besitzt als weitere Gemeinsamkeit mit dem Lhcb1 in der luminalen Schleife ein Tyrosin (Abb. 18A), das im Lhcb1 zur Neoxanthin-Bindung benötigt wird (Tabelle 35). Nur Lhcb-Proteine (bis auf Lhcb6) enthalten diese potentielle Bindungsstelle (Caffarri et al., 2007), aber kein Lhca-Protein außer der rekombinante Lhca1 bindet signifikante Mengen Neoxanthin (Schmid et al., 2002b; Croce et al., 2002). Außerdem wird die der Helix 5 entsprechende Lhcb1-Sequenz im Lhca1 ebenfalls von einem Helix-brechenden Motiv (PGG) gefolgt (Jansson, 1999; Abb. 16). Im Alignment betrachtet fehlen im Gegensatz zum Lhcb1 beim Lhca1 alle AS, die eine Lhcb1-äquivalente Helix E von der 1. Helix trennen würden. Deshalb könnte entweder die Helix 1 des Lhca1 um die Helix E länger sein, oder Helix 1 endet früher, wodurch eine potentielle luminal Helix E folgen könnte. Neben dem Helix-brechenden Motiv wäre vor allem die mit dem Lhcb1 übereinstimmende Länge der luminalen Schleife, die alle anderen Lhc-Proteine nicht aufweisen, ein Indiz für die Existenz einer luminalen Helix beim Lhca1.

1.4 Die 2. Helix beeinflusst die Monomer-, Heterodimer- und Trimerbildung

Lhca4-Mutanten mit substituierter Helix 2 waren in ihrer Monomerisierung stark beeinträchtigt (Abb. 38). Dieser Domänentausch beeinflusst die Monomerstabilität stärker als bei früheren Experimenten, in welchen die H2 des Lhca4 gegen die H2 des Lhca3 getauscht, aber beinahe WT-ähnliche Monomerausbeuten erzielt wurden (Corbet, 2004). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Monomerexperimenten luminaler und stromaler Domänentauschmutanten des Lhca4 (Abb. 27A, Abb. 32), scheint sich außer beim Tausch der luminalen Lhca4-Schleife in den Lhcb1 ein allgemeines Lhca-Lhcb-Kompatibilitätsproblem anzudeuten. Interne Domänen konnten jedoch recht unproblematischer zwischen Lhcb1 und Lhcb4 getauscht werden. Strukturell (siehe Abb. 17) und wahrscheinlich auch evolutionär gesehen, haben Lhcb- bzw. Lhca-Proteine bezüglich AS-Zahl und AS-Typ mehr Sequenzgemeinschaften untereinander, als Lhcb- verglichen mit Lhca-Proteinen. Bezogen auf die Helix 2 sind die AS der Lhca-Proteine zu 50% konserviert (Abb. 17B), während bei gemeinsamem Vergleich der Lhca- und Lhcb-Proteine nur 25% der AS konserviert sind (Abb. 17A). Lhca4-Mutanten mit einer Helix 2 aus Lhcb-Proteinen bildeten weder Monomere noch Dimere (Abb. 39). Aus diesen Experimenten war nicht ersichtlich, ob die Dimerisierung selbst beeinträchtigt wurde, weil für die Dimerisierung notwendige AS fehlten, oder ob sich die Eigenschaft instabile Monomere auszubilden auf potentielle Dimere übertrugen, was wiederum zu einer Verminderung der Dimerausbeuten führte. Die Beteiligung der Helix 2 des Lhca4 an der Bildung des LHCI-730 ist aus zwei Gründen sehr wahrscheinlich. Zum einen konnte eine als Monomer stabile Lhca4-Mutante mit der 2. Helix des Lhca3 keine Dimere mit dem Lhca1 bilden (Corbet, 2004), und zum anderen liefern die zwei PSI-Kristallstrukturen einen deutlichen Hinweis auf eine Beteiligung der

2. Helix an einer Interaktion mit dem Lhca1 (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007).

Auch die Lhcb1-Mutanten mit substituierter 2. Helix monomerisierten schlechter als der WT, wobei der Einbau der H2 des Lhca4 sogar zu einer weniger starken Reduktion führte als der Austausch gegen die H2 des Lhcb4. Im Gegensatz dazu zeigten die Lhcb4-Mutanten eine WT-ähnliche Monomerausbeute und der Einbau der H2 des Lhcb1 erhöhte sogar die Ausbeute (Abb. 38). Vermutlich besteht ein direkter Zusammenhang zwischen den instabilen Monomeren, die nach einer Gelaufftrennung beobachtet wurden (SL und H2-Mutanten) und der extrem niedrigen Komplexausbeute, die nach der Ni-Säulen-Aufreinigung im Zuge der Lhcb1-Trimerisierung entsteht. Bereits instabile Komplexe könnten auf der Ni-Säule weiter destabilisiert werden, wodurch dann weder Monomere noch Trimere von der Säule eluiert werden konnten, denn keine Lhcb1-Mutante konnten via Ni-Säule trimerisiert werden (Abb. 40; Abb. 41B). Trotzdem ist die Helix 2 eine für die Trimerisierung essentielle Domäne. In der LHCII-Kristallstruktur wechselwirken im Trimer Seitenketten des W128 und V132 eines Monomers mit den anderen Monomeren (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005). W128 ist an dieser Position weder im Lhca4 (F), noch im Lhcb4 (I) zu finden. Auch eine dem V132 entsprechende AS ist in der H2 des Lhca4 (F) nicht vorhanden. Des Weiteren befindet sich an Position 138 im Lhcb4 ein Ile anstelle eines Val, das zur Koordinierung des Chl *b*1 (Chl 11) dient. Dieses ist wiederum in räumlicher Nähe zu den Chl *a*5 und *b*5 (Chl 5 und 12) lokalisiert ist, wobei Chl *a*5 drei der 6 Kernchlorophylle im Trimer stellt. Passend dazu existieren Studien des Lhcb1, in welchen nach Mutation des H68 (Chl *a*5-Bindungsstelle) keine Trimerisierung mehr möglich war (Rogl und Kühlbrandt, 1999; Yang et al., 1999).

Das Glycophorin A liegt als Homodimer vor und assembliert über ein in den Helices vorhandenes GxxxG-Motiv (Russ und Engelman, 2000; Curran and Engelman, 2003), das den van der Waals Kontakt zwischen den Helices zweier Untereinheiten intensiviert. Im Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3, Lhca2 und Lhca6 befindet sich in der 2. Helix zwischen G135 und G139 (Lhcb1-Nomenklatur) auch ein GxxxG-Motiv. Jedoch ist eine Interaktion zwischen Helices der betroffenen Lhc-Proteine aufgrund der vorliegenden Kristallstrukturen, die keinen Hinweis auf eine derartige Assemblierung via Helices liefern, weitestgehend auszuschließen.

2 Übertragung von Oligomerisierungseigenschaften auf andere Lhc-Proteine

2.1 Für den Transfer des Oligomerisierungsverhaltens sind mehr als zwei essentielle Domänen nötig

Am Beispiel der Einzeldomänenmutanten des Lhcb4 wurde deutlich, dass der Transfer einer für die Dimer- oder Trimerisierung essentiellen Domäne nicht ausreicht, um wie der Lhca4 mit dem Lhca1 zu dimerisieren, oder wie der Lhcb1 Trimere auszubilden (D2.1.1 bis D2.1.5). Es gelang auch nicht durch Austausch einzelner Domänen, den Lhca4 zum Trimerisieren oder den Lhcb1 zur Bildung von Heterodimeren zu bewegen. Der Grund für das Misslingen liegt offensichtlich darin, dass eine zweite oder dritte wichtige Domäne und somit alle damit assoziierten H-Brücken, hydrophoben Wechselwirkungen und Pigmentbindungsstellen ebenso fehlen oder durch zu lange bzw. kurze Schleifenregionen falsch gefaltet bzw. destabilisiert werden.

Auch ein Transfer von zwei essentiellen Domänen reichte demnach nicht aus, um Dimer- oder Trimerisierungseigenschaften zu übertragen. Die Lhca4-Nb1-SLb1-Mutante konnte vermutlich aufgrund der fehlenden Helix 2 und Teilen der luminalen Schleife nicht trimerisieren (Abb. 62B, Abb. 64A), während die Lhcb1- und Lhcb4-LLa4-H2a4-Mutanten wegen der fehlenden stromalen Schleife keine Heterodimere mit dem Lhca1 bildeten (Abb. 63, Abb. 64B). Ob ein Transfer der Oligomerisierungseigenschaften unter Berücksichtigung aller Einzeldomänenexperimente möglich ist, beschreiben die nachfolgenden Kapitel.

2.2 Die Fähigkeit zur Trimerbildung war trotz umfangreichem Domänen austausch nicht transferierbar?

Ein Austausch einzelner Domänen im Lhcb1 offenbarte die Beteiligung mehrerer Proteinbestandteile an der Trimerisierung/Stabilisierung (D2.1.1 bis D2.1.5). Neben 3 für die Trimerisierung essentiellen Bestandteilen (N-Terminus, Helix 2 und stromale Schleife) wurde mit der luminalen Schleife eine weitere Domäne identifiziert, nach deren Substitution sich die Trimerisierung verringerte. Lhca4- und Lhcb4-Mutanten mit diesen vier Lhcb1-Domänen, wobei nur die 2. Hälfte der luminalen Schleife - aufgrund des hohen Konservierungsgrads der 1. Hälfte (Abb. 18A) – getauscht wurde, konnten aber keine Trimere ausbilden (Abb. 67, Abb. 68). Wegen früherer C-terminaler Untersuchungen am Lhcb1, die ein für die Trimerisierung wichtiges W222 identifizieren konnten (Kuttkat et al., 1996), wurde zusätzlich der C-Terminus des Lhcb1 in die Lhca4-Mutante transferiert. Aber auch das führte nicht zur Trimerisierung (Abb. 67; Abb. 68), obwohl diese Lhca4-Mutante eher ein Lhcb1 als ein Lhca4 war. Nur die stark konservierten Helices 1 und 3, sowie die 1. Hälfte der luminalen Schleife waren noch Lhca4-Bestandteile. Trotzdem verhindert das Fehlen dieser Domänen eine Trimerisierung des chimären Proteins. Eventuell liegt es an der Herangehensweise selbst, da die restlichen Lhca4-Bestandteile inkompatibel zu den Lhcb1-Domänen sind und immer noch eine monomere Lhca4-Reststruktur existiert, die eine Trimerisierung unterbindet.

Eine mögliche Ursache für das Fehlschlagen der Trimerisierung könnte die unvollständig getauschte luminal Schleife sein. Aufgrund der umfangreichen Domänensubstitutionen ist nicht nachvollziehbar, ob dies der Grund für die mangelnde Monomerbildung/Stabilität der Lhca4-Mutanten war (Abb. 66A), während die Lhcb4-Mutanten hohe Monomerausbeuten aufwiesen. Jedoch scheint es nachvollziehbar, dass durch die Teilung der luminalen Schleife auch 7 AS der Lhcb1-spezifischen Helix

E (10 AS) nicht in den Mutanten enthalten waren (Liu et al., 2004), wodurch diese spezielle Faltungsstruktur zerstört werden könnte. Die destabilisierenden Auswirkungen von Mutationen auf die Stabilität dieser luminalen Lhcb1-Struktur, und damit der Lhcb1-Monomere, wurden bereit eingehend analysiert (Mick et al, 2004a; Mick et al, 2004b). In diesen Untersuchungen wurden viele konservierte AS mutiert, die wie das W97 zum Teil in der Helix E liegen. Von AS, die im 2. Teil der luminalen Lhcb1-Schleife substituiert wurden existieren keine entsprechenden AS im Lhca4. Deshalb sind diese Mutanten nicht direkt mit den Domänentauschmutanten vergleichbar, zeigen aber die Bedeutung einzelner luminaler AS für die LHC-Faltung/Stabilität. Auch von anderen Proteinen ist bekannt, dass Schleifenregionen – auch getrennt vom Protein – spezielle Tertiärstrukturen ausbilden können (Yeagle et al., 1997; Katragadda et al., 2000; Giragossian et al., 2004).

Eine weitere Möglichkeit, weshalb die Fähigkeit zur Trimerisierung nicht auf den Lhcb4, oder Lhca4 übertragbar war, könnte in der Koordinierung der gebundenen Pigmente zu suchen sein. In den chimären LHCs sind viele Pigmente an H1 und H3 gebunden, die aber auch durch andere Pigmente und Seitenketten anderer Domänen koordiniert werden, welche aber durch die umfangreichen Domänensubstitutionen teilweise nicht mehr existieren oder anders orientiert sein könnten. In der Lhca4-Mutante entspricht die Chl-Bindungsstelle H68 vom Lhcb1 dem N47. Am Lhcb1 und Lhcb2 belegen zahlreiche AS-Substitutionen (A, R, L und F) die Bedeutung des Histidins für die Bildung stabiler Trimere (Kohorn, 1990; Rogl und Kühlbrandt, 1999; Yang et al., 1999). N47 in der Lhca4-Mutante ist zwar eine Chl-bindende AS, doch führte bei Versuchen, die langwellige Fluoreszenzkomponente des Lhca4 zu übertragen, eine Substitution des Histidins, das sich beim Lhcb1 an Position 68 befindet, im Lhca1 und Lhca2 zu Chlorophyllverlusten und beim Lhca2 sogar zu instabilen Monomeren (Morosinotto et al., 2003). Laut Autoren wurde dadurch vermutlich die Distanz zwischen Chl a5 und Chl b5 verkürzt. Da beide Chlorophylle an der Trimerisierung beteiligt sind (Liu et al., 2004), könnte eine falsche Orientierung oder ein Wegfall dieser Pigmente der Grund für die fehlende Trimerisierung sein.

Eine Ursache liegt eventuell auch darin, dass nicht bei allen Lhc-Proteinen nur eine der beiden Ionenbindungen für die Superhelix-Stabilisierung wie beim Lhcb1 (Kühlbrandt et al., 1994) oder Lhca4 (Remelli et al., 1999) verantwortlich ist. Im Lhca3 sind beide Ionenbindungen von gleicher Bedeutung, was den Schluss nahe legt, dass sogar in hoch konservierten Regionen trotz ähnlicher Lhc-Faltung ein struktureller Unterschied vorliegen könnte (Mozzo et al., 2006). Vom Lhcb4 liegen keine Strukturdaten vor, aber eine luminale Helix E wie im Lhcb1 ist laut Sequenzalignments schwer vorstellbar (Abb. 18A; Jansson, 1999).

Eine weitere Ursache für die ausbleibende Trimerisierung der Lhca4-Chimäre könnte das Fehlen der ersten PG-Bindungsstelle Y44 am N-Terminus darstellen. In der Lhca4-Mutante existiert auch die zweite Bindungsstelle nicht, da anstelle des K182 in der 3. Helix des Lhcb1 (Liu et al., 2004) im Lhca4 an entsprechender Position ein Alanin lokalisiert ist. In allen anderen LHCs befindet sich an entsprechender Position wie im Lhcb1 ein Lysin (Abb. 16; Jansson, 1999), das zur Ausbildung einer Ionenbindung mit dem PG benötigt wird (Liu et al., 2004). Da eine PG-Bindung essentiell für die Trimerisierung ist (Nußberger et al., 1993), konnten die Lhca4-Mutanten auch nicht trimerisieren.

Die Suche nach für die Trimerisierung relevanten Lhcb1-AS kann auf die nicht konservierten luminalen und stromalen Bereiche der Helices 1 und 3 ausgedehnt werden. Lhcb1-Proteine verschiedener Arten zeigen in den entsprechenden Regionen zwar eine lückenlose Sequenzidentität, aber es konnten bis auf das T57 zu Beginn der Helix 1 keine unigenen AS gefunden werden. Diese AS existiert ansonsten nur noch im

Lhcb2 an entsprechender Position, was aber auch als Voraussetzung für eine an der Trimerisierung beteiligten AS gelten könnte, da der Lhcb2 alleine und mit dem Lhcb1 Trimere bilden kann (Standfuss und Kühlbrandt, 2004). Das luminale Ende der Helix 1 weist zwar wie der N-Terminus in die Mitte des Trimer, aber in der Kristallstruktur war trotz guter Auflösung keine Beteiligung des T57 an der Trimerisierung zu erkennen (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005).

2.3 Lhcb4- und Lhcb1-Chimären dimerisieren mit dem Lhca1

Im Lhca4 befinden sich, laut Untersuchungen mit Mutanten, die nur eine substituierte Domäne trugen, drei an der LHCI-730-Assemblierung beteiligte Proteinabschnitte. Helix 2 (Abb. 39; Abb. 41A) und die stromale Schleife (Abb. 33; Abb. 35A) waren für die Dimerisierung essentiell und eine getauschte luminale Schleife führte zu stark reduzierten Dimerausbeuten (Abb. 27B; Abb. 29A). Die Lhcb4-Mutante (total) mit diesen Lhca4-Bestandteilen, und der im Gegensatz zur 1. Hälfte schwach konservierten 2. Hälfte der luminalen Lhca4-Schleife, bildete nach SDG-Auftrennung deutliche Dimere mit dem Lhca1 (Abb. 70). Die Ausbeute war niedriger als beim WT-Dimer, aber höher als bei der Lhcb4-Mutante (partiell), die nur die schwach konservierte 1. Hälfte der stromalen Schleife des Lhca4 beinhaltete. Bei der Lhcb1-Mutante (total) waren nur Spuren einer Bande auf Höhe der Dimerbande zu erkennen. Pigmentanalysen der Dimere offenbarten lediglich einen leichten Anstieg des Chl *b*-Gehalts bei beiden Lhcb4-Mutanten (Tabelle 34). Alle anderen Dimere zeigten eine dem WT ähnliche Pigmentzusammensetzung.

Der Transfer der Dimerisierungseigenschaft auf Lhcb4 und erst recht auf Lhcb1 war keinesfalls perfekt, da weder die Dimerausbeuten, noch die für den LHCI-730 charakteristische Fluoreszenz übertragen werden konnten. Außerdem waren die Komplexe instabil, dass der Nachweis auf Dimerisierung nicht per Gel, sondern nur nach Auftrennung via schonende SDG-UZ erfolgreich war. Die Gründe hierfür sind ähnlich gelagert wie beim Versuch die Trimerisierungseigenschaft zu übertragen. Im Allgemeinen dürfte die geteilte luminale Schleife und deren spezielle Tertiärstruktur destabilisierend auf die Monomere gewirkt haben (Abb. 69A), die auch durch den Lhca1 nicht wieder stabilisiert werden konnten. Im speziellen führen eine Halbierung der luminalen Lhcb1-Schleife auch zur Halbierung der luminalen Helix E. Vermutlich reichen 6 bzw. 4 AS anstelle von 10 nicht aus, um eine helicale Struktur auszubilden. Dieser Sachverhalt wurde bereits ausführlich diskutiert (E1.3.1; E2.2).

Die fehlende langwellige Fluoreszenz (Abb. 71) könnte seine Ursache in Helix 1 der Lhcb1- und Lhcb4-Mutanten haben, da dort ein Histidin und kein Asparagin wie in der entsprechenden Position 47 im Lhca4 lokalisiert ist. Mutationen im Lhca4, die eine derartige Substitution hervorriefen, bewirkten ein Ausbleiben der charakteristischen langwelligen Fluoreszenz (Morosinotto et al., 2003). Es war lediglich eine leichte Verschiebung ins Langwellige zu beobachten, die auch auf die Anwesenheit des Lhca1-WT in den Dimeren zurückzuführen sein könnte, da in früheren Untersuchungen drei Komponenten langwelliger Fluoreszenzemission (685 nm, 690 nm und 701 nm) beim Lhca1 identifiziert werden konnten (Morosinotto et al., 2002a).

Neben den schwach konservierten Domänen existieren mit Helix 1 und Helix 3 stark konservierte Domänen, die aber im Alignment (Abb. 16) betrachtet auch schwach konservierte AS aufweisen, die einen Beitrag zur Di- oder Trimerisierung leisten könnten. Im Allgemeinen betrachtet sind die Helices im Kern hoch konserviert, während die AS 3-10 am Anfang von Helix 1 und die AS 1-10 zu Beginn der Helix 3 nicht konserviert sind. Auch die letzten 6 AS der 1. Helix und 7 der letzten AS der 3. Helix sind nicht konserviert. Allerdings kommen diese Bereiche im Lhca4 aus drei Gründen nicht

für eine Interaktion in Betracht: Viele dieser AS sind auch in mehreren Lhca4-Arten (Anhang 2) unterschiedlich. Die AS sind nicht unique, sondern kommen auch in anderen Lhc-Proteinen vor (Abb. 16). Die LHCI-Struktur zeigt, dass Helix 1 oder Helix 3 keinesfalls direkt mit dem Lhca1 interagieren können (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007).

2.4 Kann eine Lhca1-Mutante multimere LHCs bilden

Ein Domänentransfer zwecks Übertragung der Dimerisierungseigenschaften wurde auch im Lhca1 vollzogen. Dass der Lhca1 in der Lage ist, Heterodimere mit dem Lhca4 zu bilden (Schmid et al., 1997) und seine N- und C-terminale Domäne an der Untereinheiten-Interaktion beteiligt sind, wurde durch Mutationsanalysen belegt (Schmid et al., 2002a) und durch zwei PSI-Kristallstrukturen bestätigt (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007). Theoretisch könnte es möglich sein, multimere LHCs aus Lhca1-Chimären zu rekonstituieren, da Lhca1 und Lhca4 über unterschiedliche Proteinbestandteile miteinander wechselwirken. Dieses Experiment ist durchaus vergleichbar mit dem physiologischen „domain swapping“ aus der Proteinevolution, in welchem die Domäne einer Untereinheit den Platz der Domäne einer zweiten Untereinheit einnimmt (und umgekehrt), wodurch stabilere Dimere und auch neue oder modifizierte Funktionen entstehen können (Bennett et al., 1994).

Monomere einer Lhca1-Mutante mit H2 des Lhca4 sind im Gel instabil (Abb. 39A), bilden aber mit dem Lhca4-WT Doppeldimere (Abb. 39B; Abb. 41A). Die Monomere konnten durch den Lhca4 stabilisiert werden. Diese Beobachtung wurde bereits mit einer instabilen Lhca1-Mutante gemacht, die H2 des Lhca3 trug (Corbet, 2004). Wie in einem vorherigen Kapitel bereits gezeigt wurde (E1.1.1.2), sind die Ausbeuten der Doppeldimere, verglichen mit den Dimeren nach Gelaufentrennung, höher, als nach Auftrennung im SDG. Im Gel waren zudem höhermolekulare Banden zu erkennen, die nach SDG-UZ nicht auftraten, wodurch sich der Verdacht erhärtet, dass der SDG einer Oligomerisierung entgegenwirkt. Es ist allerdings unklar, ob das Doppeldimer aus zwei aneinander gereihten Heterodimeren besteht, oder ob es sich um eine andere Interaktionsform handelt, denn die Bildung von Doppeldimeren wurde auch bei N-terminalen Lhca4-Mutanten beobachtet (E1.1.1.1). Laut Einzeldomänen-Tauschexperimenten reichte die zweite Helix des Lhca4 nicht aus, um die Dimerisierungsfähigkeit auf andere Lhc-Proteine zu übertragen, da keine der Lhca4-Schleifenregionen in den Mutanten enthalten waren (E2.1).

Versuche, die Fähigkeit zur Dimerisierung durch Austausch von Lhca1-Domänen gegen alle für eine Dimerisierung wichtigen Lhca4-Bestandteile zu transferieren, scheiterten. Diese Lhca1-Chimäre wäre sollte theoretische mit sich selbst bzw. mit weiteren Molekülen des gleichen Proteins interagieren, so wie Lhca1 und Lhca4 assemblieren. Dadurch wären multimere LHCs entstanden, da sich ein Molekül immer an die bereits bestehende LHC-Kette hätte anschließen können. Neben instabilen Monomeren bildeten diese Lhca1-Mutanten (total + partiell) aber weder Multimere, noch Heterodimere mit dem Lhca4-WT (Abb. 65). Es gibt viele mögliche Ursachen, weshalb die Experimente nicht zum gewünschten multimerisierenden LHC, sondern nur zu instabilen Lhca1-Chimären führten. Alleine die Helix 2 des Lhca1 scheint ein für das Monomer wichtiges Strukturelement darzustellen. Ob die Schleifen des Lhca1 auch einen Einfluss auf dessen Dimerisierungsverhalten ausüben wurde zwar bis dato noch nicht untersucht, sie könnten aber eine ähnlich stabilisierende Funktion wie die Schleifen anderer LHCs haben (Heinemann und Paulsen, 1999; Mick et al., 2004a) und außerdem mittels ihrer Seitenketten ebenfalls Pigmente und Carotinoide koordinieren. Ein Unterschied zum Lhca4 ist vermutlich die Bindung eines Violaxanthins in der N1-

Bindungsstelle des Lhca1, was für Arabidopsis (Croce et al., 2002), aber nicht für Tomate nachgewiesen wurde (Schmid et al., 2002b). Laut LHCII-Struktur (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005) wird das dort gebundene Neoxanthin über ein Tyrosin in der luminalen Schleife koordiniert, das an dieser Position alle Lhcb-Proteine außer dem Lhcb6 und nur der Lhca1 besitzen (Caffarri et al., 2007), und durch den Domänentausch nicht mehr vorhanden ist.

3 Lhca1-Lhca4-Interaktion im LHCI-730

Die 2. Helix ist nach dem N- und C-Terminus und neben den Schleifendomänen, der Proteinabschnitt mit dem geringsten Konservierungsgrad bei den Lhc-Proteinen (Jansson, 1999 und Abb. 17). Die Ergebnisse von Corbet (2004), die durchgeführten H2-Domänentauschexperimente am Lhca4 dieser Arbeit (D2.1.5) in Kombination mit den zwei existierenden PSI-Kristallstrukturen (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007) zeigen, dass die 2. Helix des Lhca4 ein wichtiger Faktor bei der Assemblierung zum LHCI-730 ist. Die Experimente zur detaillierten Aufklärung der Lhca1-Lhca4-Interaktion werden im Kontext der verfügbaren PSI-Kristallstrukturen und –Homologie-Modellierungen (Jolley et al., 2005, Corbet et al., 2007) diskutiert.

3.1 Identifikation der mit dem Lhca1 interagierenden Aminosäuren der 2. Helix des Lhca4

Der Austausch der Helix 2 des Lhca4 gegen entsprechende Lhca3-, Lhcb1- und Lhcb4-Bereiche in Lhca4-Chimären stellte die Bedeutung dieser Domäne für die Heterodimerisierung klar heraus. Rekonstitutionsversuche mit Lhca1-Mutanten (Schmid et al., 2002a), Docking-Experimente beider Untereinheiten (Melkozernov und Blankenship, 2003) und die PSI-Kristallstrukturen (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007) ließen die Vermutung zu, dass der C-Terminus des Lhca1 mit der luminalen Schleife interagiert. Auch ein PSI-Modell, dessen Grundlage die PSI-Kristallstruktur war (Ben-Shem et al., 2003) kam zu dem Schluss, dass das W4 am N-Terminus des Lhca1 mit dem W106 am Übergang der 2. Helix des Lhca4 zur luminalen Schleife über π -Elektronen der aromatischen Seitenketten wechselwirkt (Jolley et al., 2005).

Experimente dieser Arbeit konnten drei AS-Bereiche (86-88, 93-96 und 98-103) in Helix 2 des Lhca4 identifizieren, deren Substitution gegen AS, die beim Lhca3 an entsprechender Position sind, zu einer Reduktion der Dimerausbeute führte (Abb. 43). Mutationsanalysen einzelner AS dieser Cluster offenbarten, dass mit S88, F95 und H99 jeweils eine AS jeden Clusters eine besondere Bedeutung für die Bildung stabiler Dimere mit dem Lhca1 hat (Abb. 44). Um die Beteiligung dieser AS zu belegen, wurden Rücktauschexperimente von Lhca4-AS in die Lhca4-Mutante mit der 2. Helix des Lhca3 durchgeführt, was im Fall Lhca4-H2a3-**99-103** (4 AS) zur partiellen und im Fall Lhca4-H2a3-**86-88+99-103** (7 AS) beinahe zur vollständigen Wiederherstellung der Dimerisierungsfähigkeit führte (Abb. 47). Im Alignment in Abb. 17 wird die unique Stellung des S88 im Lhca4 verdeutlicht, während das F95 nur im Lhca1 auch an entsprechender Position zu finden ist. Hydrophobe AS (W128 und V132) der 2. Helix des Lhcb1 sind auch in der LHCI-Kristallstruktur als wichtige Monomer-Monomer-Interaktionspartner identifiziert worden, wobei V132 (Lhcb1) und das F95 (Lhca4) gleich positioniert sind.

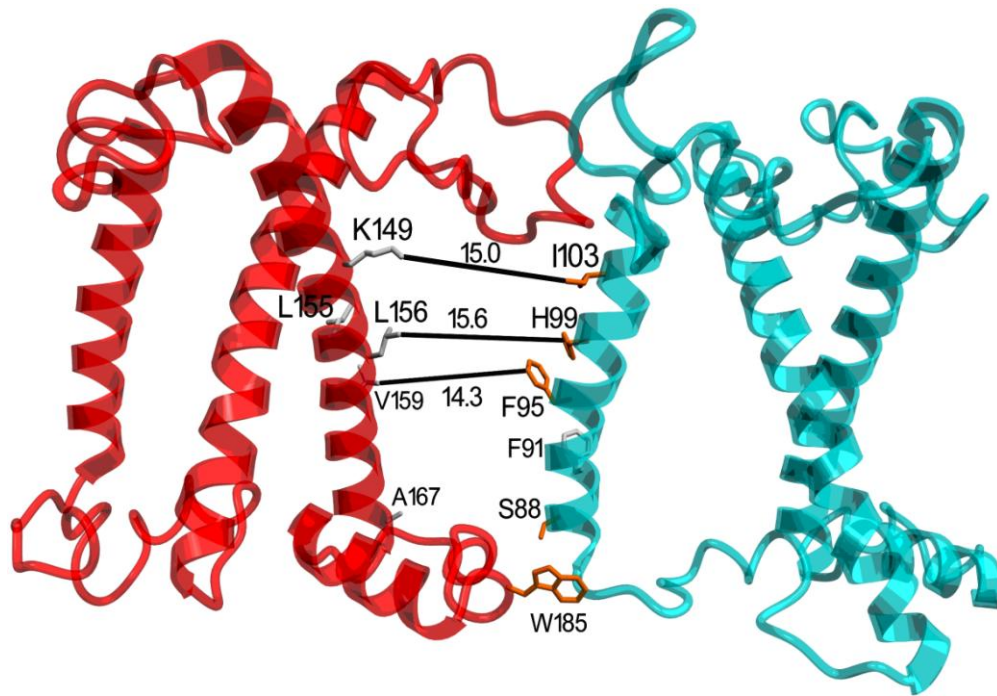


Abb. 73: Strukturmodell des LHCI-730 aus Corbet et al. (2007). Homologiemodellierung auf Basis der LHCII-Kristallstruktur, die auf die PSI-Kristallstruktur projiziert wurde. Die jeweils kürzesten Distanzen (Å) zwischen den beteiligten Lhca1- und Lhca4-AS sind eingezeichnet. (orange): AS, die an der Dimerisierung beteiligt sind; (grau): potentiell interagierende AS.

Mögliche Interaktionen, die von AS an den Positionen 98-103 des Lhca4 ausgehen

Die Homologie-Modelle des LHCI-730 (Abb. 73) und des PSI (Jolley et al., 2005) zeigen, dass aufgrund der großen Distanzen, eine direkte Interaktion mit dem Lhca1 via Seitenketten von H99 (14,3 und 13,7 Å) und F95 (15,6 und 17,1 Å) nicht in Betracht kommt. Alignments (Abb. 16) belegen allerdings, dass sich in der dem Lhca4 zugewandten Helix 3 zwei AS (L155 und V159) befinden, die nur im Lhca1 zu finden sind (Abb. 73). Diese Seitenketten könnten nur dann an einer Interaktion beider Untereinheiten beteiligt sein, wenn keine direkte Wechselwirkung zur 2. Helix des Lhca4 vorliegen würde, sondern ein Kontakt indirekt über Pigmente oder Lipide hergestellt werden könnte, wie es in einer PSI-Modellierung vermutet wurde (Jolley et al., 2005). In der jüngsten PSI-Struktur wurden für Lhca1 und Lhca4 jeweils 14 Chlorophylle identifiziert (Amunts et al., 2007), und damit genau so viele wie in der LHCII-Struktur (Standfuss et al., 2005). Das sind bedeutend mehr als nach Rekonstitutionsversuchen festgestellt werden konnten, wodurch wie bei Schmid et al. (1997) der Verdacht entsteht, dass bei der Dimerisierung zusätzliche Chlorophylle gebunden werden könnten, um die Distanzen zwischen den Untereinheiten zu verkürzen. Melkozernov und Blankenship (2003) postulierten als erste, dass am H99 des Lhca4 ein Chlorophyll gebunden sein könnte. Bei darauf folgenden Mutationsanalysen von Corbet (2004), entpuppte sich das H99 tatsächlich als Chl-bindende AS und wurde von Jolley et al. (2005) in ein PSI-Modell integriert. Interessanterweise ist dieses Chlorophyll auch im Monomer nachweisbar (Tabelle 21) und eine Mutation des His verhindert die Bindung im Dimer nicht (Tabelle 22), was ein Hinweis darauf sein könnte, dass eine zweite Koordinierungsstelle über den Phytolrest eventuell im Lhca1 lokalisiert ist. Eine weitere Koordinierungsstelle am Lhca4 könnte auch über den Porphyrinring erfolgen, welcher mit den Seitenketten von F95 oder I103 wechselwirken könnte, die ebenfalls Richtung Lhca1 orientiert sind (Abb. 73). Interaktionsmodi über Chlorophylle und Lipide werden im nächsten Kapitel ausführlich diskutiert.

Im Bereich 98-103 der Helix 2 wirken sich Mutationen von F98 und I103 ebenfalls auf die Dimerausbeuten aus (Abb. 44). Addiert man die Ausbeutenreduktionen aller 3 Mutationen dieses Abschnitts zusammen, ergibt dies exakt die Reduktion an Dimerausbeute, die für den Austausch des gesamten Abschnitts ermittelt wurde (Abb. 43). I103 ist ebenfalls Richtung Lhca1 orientiert, wodurch eine Wechselwirkung mit noch unbekannten Faktoren möglich wäre. Sowohl I103, als auch F98 sind im Alignment betrachtet unique AS, die nur im Lhca4 zu finden (Abb. 17). F98 kann aber durch die Orientierung seiner Seitenkette im Modell nicht direkt an der Dimerisierung beteiligt sein.

Mögliche Interaktionen, die von AS an den Positionen 93-96 des Lhca4 ausgehen

Im mittleren Bereich der 2. Helix konnte das für die Dimerisierung wichtige F95 identifiziert werden (Abb. 44). Dieses Phenylalanin existiert ansonsten nur im Lhca1 an äquivalenter Position. Aufgrund der hohen Distanz zum Lhca1, sind Wechselwirkungen über van der Waals Kräfte oder Wasserstoffbrücken nicht möglich. Allerdings könnte F95 vergleichbar mit dem I103 einen Effekt auf bis dato unbekannte Cofaktoren (Chlorophylle, PG) ausüben, die laut Jolley et al. (2005) zwischen Lhca1 und Lhca4 lokalisiert sind. Im gleichen Abschnitt ist das nicht als Einzelmутante untersuchte F91 lokalisiert (Abb. 17). Diese Position wird im Lhcb1 durch W128, einer ebenfalls aromatischen AS ausgefüllt, welche durch Ausbildung einer hydrophoben Umgebung wichtig für die Lhcb1-Trimerisierung ist (Liu et al. 2004). Da im Lhca3, nicht aber im Lhca1, auch ein F an dieser Position lokalisiert ist, könnten aromatische AS in dieser Region generell hydrophobe Interaktionen zwischen zwei LHCs ermöglichen. Das Lipid PG ist für die Trimerisierung des LHCII essentiell (Nußberger et al., 1993; Hobe et al., 1994). Ein PG befindet sich zwischen H2 und H3 zweier benachbarter Lhcb1-Monomere, steht aber mit W128 nicht in Kontakt (Liu et al., 2004). Auch im LHCI-730 wurde die Beteiligung von PG an der Dimerisierung experimentell bestätigt (Schmid et al., 1998) und dessen Lokalisierung zwischen Lhca1 und Lhca4 in einem PSI-Modell berücksichtigt (Jolley et al., 2005), mit welchem vermutlich die vom Lhca1 weiter entfernt liegenden Lhca4-Seitenketten (F95, H99 und I103) in Wechselwirkung treten können. Im LHCII könnte ein Violaxanthin an V1-Position (Tabelle 35) eine ähnliche Rolle übernehmen. Allerdings ist das Violaxanthin sehr locker gebunden und geht auch bei Trimer-Aufreinigungen leicht verloren (Tabelle 33). Da außerdem im Lhca1 keine V1-Bindungsstelle zu existieren scheint (Morosinotto et al., 2002b; Wehner et al., 2004), ist dessen Einfluss auf die Oligomerisierung von LHCs eher unwahrscheinlich.

Mögliche Interaktionen, die von AS an den Positionen 86-88 des Lhca4 ausgehen

Drei Serine am luminalen Ende der Helix 2 könnten anders als die AS der zwei oberen Abschnitte aufgrund der geringen Entfernung direkt mit dem Lhca1 und speziell mit dessen C-Terminus interagieren, dessen Beteiligung an der Dimerisierung bereits nachgewiesen wurde (Schmid et al., 2002a). Einzelmутationen der Serine 86, 87 und 88 beeinträchtigten sowohl die Dimerisierung, als auch die Monomerisierung (Abb. 44). Deshalb war zunächst unklar, ob die Reduktion der Dimerausbeute der alleinige Effekt der reduzierten Lhca1-Lhca4-Interaktionsfähigkeit war. Die S86-88D-Mutante, bei welcher alle 3 Serine gegen 3 Aspartate getauscht waren, zeigte im Gegensatz zur S86-88Y-Mutante, deren Serine gegen Lhca3-AS (D, N und Y) getauscht waren und wie der WT dimerisierte, eine reduzierte Monomerausbeute. Da diese Mutante aber denselben Effekt auf die Dimerisierung zeigte wie die S86-88Y-Mutante, wurde die Dimerisierungsfähigkeit der Einzelmутanten nicht negativ durch deren instabile Monomere beeinflusst. Ähnlich einer Lhca1-Mutante mit substituierter Helix 2 (Corbet,

2004) oder bei C-terminalen Lhca4-Deletionsmutanten (Schmid et al., 2002a), könnte im Dimer mit Lhca1 diese Instabilität wieder ausgeglichen worden sein.

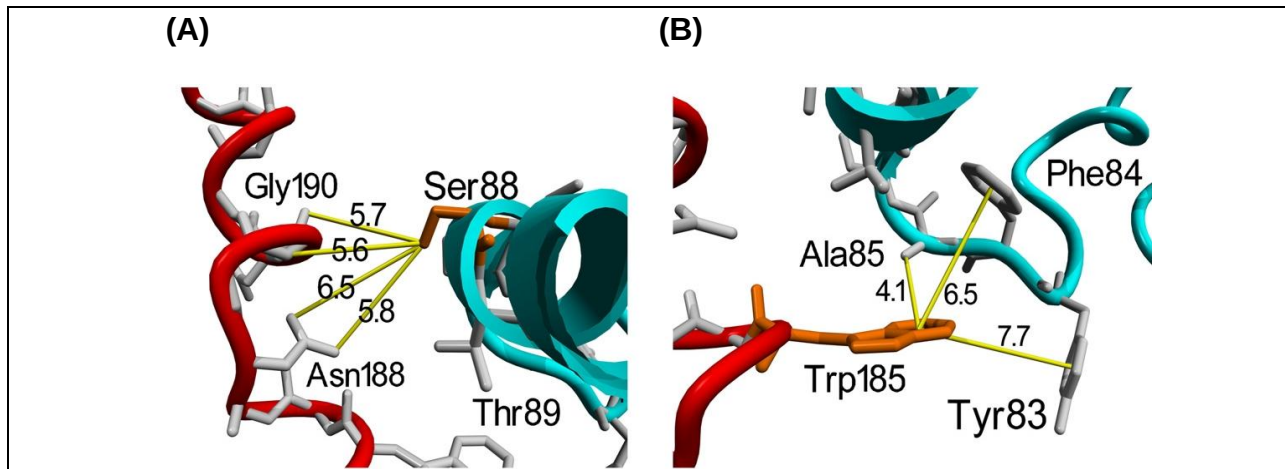


Abb. 74: Ermittlung der nächsten Nachbarn von S88 (A) und W185 (B) in der jeweils anderen Untereinheit, entnommen aus Corbet et al. (2007). Abstände sind in Å angegeben. (rot): Lhca1 C-Terminus; (blau): Lhca4 Helix 2 (A) und luminale Schleife (B); (orange): AS, deren Beteiligung an der Dimerisierung experimentell nachgewiesen wurde.

Auch der Rücktausch von Lhca4-AS in die Lhca4-H2a3-Mutante zeigte, dass nicht die Monomerisierung, sondern nur die Dimerisierung durch die Serine beeinträchtigt wurde (Abb. 46). Weder die Lhca4-99-103-Mutante, noch die Lhca4-H2a3-86-88+99-103-Mutante waren in der Monomerstabilität/Bildung beeinträchtigt. Die Zunahme der Dimerausbeute bei fortschreitendem Rücktausch von Lhca4-AS im Vergleich zur Lhca4-H2a4-Mutante einerseits und dem Lhca4-WT andererseits, belegte die Bedeutung einzelner AS dieser Abschnitte für die Dimerisierung.

Die Beeinträchtigung der Dimerisierung durch Substitution des gesamten Abschnitts 86-88 fällt höher aus als nach Einzelmutteration des S88. Eventuell kann zusätzlich eine Wechselwirkung mit dem Lhca1 über das benachbarte, im Lhca4 lokalisierte S87 erfolgen (Abb. 17), das aber eine schwächere Bindung mit dem Lhca1 eingeht, als das S88. Durch die geringe Distanz zwischen der Seitenkette des S88 und dem C-Terminus des Lhca1 ist dies die einzig mögliche direkte Interaktionsmöglichkeit der 2. Helix des Lhca4 mit dem Lhca1.

Bis auf die Substitution des S88 bewirkt keine Mutation einer in Richtung Lhca1 orientierten AS (F95, H99 und I103) eine Destabilisierung des Monomers (Abb. 44). Aber alle Mutationen an AS, deren Seitenketten in Richtung Lhca4-Inneres (zwischen H2 und H1/H2-Superhelix) weisen (E94, F98, V101 und E102), beeinträchtigten die Monomerisierung (Abb. 44; Abb. 45). Diese AS stabilisieren den Komplex vermutlich durch Wechselwirkung mit weiteren Seitenketten, oder durch Koordination von Pigmenten, wie z. B. das an E94 gebundene Chl *b*6 und das an E102 gebundene Chl *b*5, die für die Bildung eines stabile Monomers notwendig sind (Morosinotto et al., 2005).

3.2 Einfluss von Chlorophyllen und Lipiden auf die Heterodimerisierung

In der 2. Helix des Lhca4 befinden sich mit E94, H99 und E102 mindestens 3 Chl-Bindungsstellen, die durch Punktmutationen bezüglich Pigmentbindung und spektraler Eigenschaften hin untersucht wurden (Lago-Places, 2000; Thomé, 2000; Rautenberg, 2002; Corbet, 2004; Morosinotto et al., 2005). Da die 2. Helix des Lhca4 ein essentieller Bestandteil für die Dimerisierung mit dem Lhca1 ist, wurde versucht die Beteiligung der

Chlorophylle an der Dimerisierung herauszustellen. Monomerrekonstitutionen zeigten (Abb. 45 oben), dass einige rekonstituierte E94- und vor allem die E102-Mutanten im Gel nicht stabil sind, und nur via SDG-UZ aufgereinigt werden können. Diese Beobachtung machte bereits Rupprecht (2002). Mutationen des H99 und E94 beeinträchtigen die Monomerisierung nicht, wie sich anhand der Gelaufftrennung zeigte. Die Analyse der Monomere offenbarte, dass am E102 (S, L) und H99L bis zu drei Chlorophylle und am E94 (S, L) bis zu zwei Chlorophylle verloren gingen (Tabelle 21). Ein einzelner Chl-Verlust war nur bei der H99G- und E94Q-Mutante feststellbar. Bei Untersuchungen der Chl-Bindungsstelle E166 des Lhcb4, das im Lhca4 dem E94 entspricht, gingen nach Substitution gegen Valin 2 Chlorophylle verloren, wohingegen bei einem Austausch gegen Glutamin kein Chl-Verlust verzeichnet wurde (Bassi et al., 1999). Auch Morosinotto et al. (2005) beobachteten bei Mutationsanalysen des E94 im Lhca4 den Verlust von einem Chlorophyll. Eine kombinierte E102-R105-Mutante verlor sogar 4 Chlorophylle. Diese Ergebnisse waren analog zu Mutationen an der entsprechenden Position E139-R142 im Lhcb1, wo eine Kappung der Ionenbindung am oberen Ende der Helix 2 deren Tertiärstruktur zerstörte (Remelli et al., 1999). Bei Weiteren Mutationsanalysen der Bindungsstellen E65, H68, G78 und N183 des LHCII wurde zusätzlich zum Chl-Verlust auch das Ausbleiben der Trimerisierung beobachtet (Rogl und Kühlbrandt, 1999; Yang et al., 1999). Chl *a*5 (Chl 5) bildet mit den beiden entsprechenden Chl aus den anderen Untereinheiten den Chl-Kern des Trimers. Während die E94-Mutanten keine beeinträchtigte Dimerisierung aufwiesen, waren die E102- und H99-Mutanten in ihrer Heterodimerisierung stark reduziert (Abb. 45 unten). Waren Einbußen der Dimerausbeute von E102-Mutanten, hervorgerufen durch massive Chl-Verluste, eher auf die Monomerinstabilität zurückzuführen, könnten Mutationen am H99 direkt die Heterodimerisierung beeinflusst haben.

Den Untersuchungen nach zu urteilen scheint H99 sowohl an der Chl-Bindung, als auch an der Dimerisierung beteiligt zu sein. Da die Distanz zur nächsten Lhca1-Seitenkette L156 zu groß ist (Abb. 73), muss die Interaktion über das Chl vermittelt werden. Eine Koordination des Porphyrins über beide Untereinheiten scheidet aus, da über das Mg-Ion zwar eine sechste koordinative Bindung möglich wäre, aber auch über ein dazwischen liegendes H₂O-Molekül (3 Å), die Distanz zum L156 immer noch ca. 10 Å betragen würde. Die Bindung könnte auch über den Phytolrest des Chlorophylls erfolgen, der zwar in der PSI-Struktur nicht aufgelöst ist (Ben-Shem et al., 2003), aber laut hochaufgelöster LHCII-Struktur (Liu et al., 2004) und cyanobakteriellem PSI (Jordan et al., 2001) auch geknickt vorliegen kann. Es wäre vorstellbar, dass der Phytolrest des an H99 gebundenen Chlorophylls entweder mit einer hydrophoben Seitenkette des Lhca1 interagiert (L155, L156), oder mit dem Phytolrest eines anderen Chlorophylls wechselwirkt. Laut PSI-Modell von Jolley et al. (2005), die auf Grundlage der PSI-Struktur (Ben-Shem et al., 2003) auch ein PG zwischen Lhca1 und Lhca4 modelliert haben, gibt es dadurch weitere Interaktionsmöglichkeiten: (1) Der Porphyrinring des am H99 gebundenen Chl 1032 interagiert mit einer PG-Fettsäure. Die zweite Fettsäure wechselwirkt mit Porphyrin von Chl 11023, dessen Phytolrest mit dem am Q164 des Lhca1 gebundenen Chl 11013 interagiert. (2) Das am E44 des Lhca1 gebundene Chl 11014 bindet über den Phytolrest an Porphyrinring oder Phytolrest des Chl 1032 (H99 des Lhca4). Alternativ dazu wäre bedingt durch den geringen Abstand auch eine direkte Porphyrin-Porphyrin Wechselwirkung via Ring 2 bzw. über eine H-Brücke zwischen Methyl- (Chl *a*) und Aldehydgruppe (Chl *b*) möglich. (3) Aufgrund der Stellung der Seitenkette des I103 (Lhca4) könnte das Isoleucin die unter (2) beschriebene mögliche Phytol-Phytol-Interaktion durch Verstärkung der hydrophoben Umgebung erleichtern. (4) Analog dazu könnte das F95 (Lhca4) welches, ebenso wie

das I103, nachweislich die Dimerisierung unterstützt, in der hydrophoben Schnittstelle zwischen den beiden Untereinheiten, mit einer Fettsäure des PG wechselwirken.

3.3 Identifikation des Interaktionspartners von Tryptophan 185 im Lhca1

Frühere Untersuchungen an C-terminalen Punkt- und Deletionsmutanten belegten die Involvierung des W185 im Lhca1 an der LHCI-730-Assemblierung (Schmid et al., 2002a). PSI-Strukturen (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007) zeigen, dass der C-Terminus des Lhca1 in Richtung luminaler Bereich der Helix 2 orientiert ist. Ein PSI-Modell prognostiziert eine Interaktion zwischen einer luminalen hydrophoben Tasche des Lhca4 und dem W185 von Lhca1 (Jolley et al., 2005). Da S88 einen starken Einfluss auf die Dimerisierung ausübte (Abb. 44 unten) wurde die Lhca1-Mutante (W185H) mit der Lhca4-Mutanten (S88D) rekonstituiert, um die Interaktion beider Untereinheiten über diese AS nachzuweisen. Die Verwendung der Lhca1-Mutante, oder der Lhca4-Mutante mit dem jeweils anderen WT-Protein sollte zur gleichen Reduktion der Dimerausbeuten führen, wie wenn beide Mutanten miteinander rekonstituiert würden. Da eine gemeinsame Rekonstitution zu einer Reduktion der Ausbeute führte (Abb. 48), die doppelt so stark ausfiel wie nach Rekonstitution von nur einer Mutante, war von einem additiven Effekt beider Mutationen auszugehen. Aufgrund dessen ist nicht von der Existenz eines gemeinsamen Interaktionspunkts zwischen S88 und W185 auszugehen. Vielmehr musste ein zweiter Interaktionspunkt am Lhca4 existieren, der nach Heranziehen eines LHCI-730-Modells eventuell in der luminalen Schleife selbst zu finden ist (Abb. 74B). Das S88 könnte laut Modell (Abb. 74A) mit dem Glycin 190 des Lhca1 interagieren, da Glycine häufig in der Schnittstelle zwischen zwei Membranproteinen lokalisiert sind (Walters und Degrado, 2005).

Mutationsanalysen an der an die 2. Helix angrenzenden luminalen Schleife führten zur Identifikation des F84 als potentiellen Interaktionspartner von W185 des Lhca1 (Abb. 30). Die Wechselwirkung könnte über die π -Elektronen der Aromaten stattfinden. Sequenzalignments zeigten, dass ein Aromat in dieser Position bei allen Lhca-Proteinen hoch konserviert ist (Abb. 18A). Trotzdem verschlechtert ein Tryptophan (Lhca1, Lhca3) anstelle eines Phenylalanins (Lhca2, Lhca4, Lhca5) die Assemblierung beider Untereinheiten. Aromatische AS sind auch bei Interaktionen zwischen wasserlöslichen Proteinen beteiligt (Ponstingl et al., 2005). In Membranproteinen sind Tryptophane in der Lage H-Brücken mit Lipid-Kopfgruppen oder dem Carbonylsauerstoff des Proteingerüsts zu bilden, da sie als „Membrananker“ oft in der hydrophil-hydrophoben Übergangsregion lokalisiert sind (Schiffer et al., 1992). In den dimeren LH1-Untereinheiten ($\alpha\beta$, $\beta\beta$) führten Substitutionen von Tryptophan gegen Phenylalanin zu viel geringeren Assoziationskonstanten (Kehoe et al., 1998). Dieser umgekehrte Fall zeigt, dass es mitunter entscheidend ist, welcher aromatische AS an einer Schlüsselposition lokalisiert ist, und dass W und F nicht als gleichwertige Substituenten zu betrachten sind.

3.4 Lhca1-Species beeinflusst Dimerausbeute: Arabidopsis versus Tomate

Der C-Terminus des Lhca1 ist bei allen Lhc-Proteinen nur sehr schwach konserviert (Abb. 16). Berücksichtigt man, dass der C-Terminus (W185) an der Dimerisierung mit dem Lhca4 beteiligt ist (Schmid et al., 2002a), die Länge des C-Terminus von Species zu Species variiert (Anhang A2) und darüber hinaus ein Hexahistidyl-Tag am C-terminalen Proteinende hängen kann, könnten diese Unterschiede auch zu einem abweichenden Dimerisierungsverhalten führen. Bei einer Rekonstitution des Lhca1-WT von Tomate mit der F84W-Mutante des Lhca4 aus Arabidopsis fiel kein Unterschied in

der Dimerausbeute zum WT-Dimer von Tomaten auf (Abb. 31). Wurden hingegen nur Arabidopsis-Proteine verwendet, war ein deutlicher Verlust in der Ausbeute detektierbar. Bei Variation der Lhca4-Species stellte sich heraus, dass sie keinen Einfluss auf die Dimerisierung hatte. Ein His-tag von 6 Histidinen am C-Terminus des Lhca1 bewirkte eine deutliche Verschlechterung der Dimerisierung. Wurde die Lhca1-Species variiert, konnte unabhängig von der Lhca4-Spezies, mit dem Lhca1 von Tomate eine viel höhere Dimerausbeute erzielt werden als mit dem Lhca1 von Arabidopsis. Bei Sequenzvergleichen fällt auf, dass von den letzten 6 AS (KGIFPN) in Tomate nur 2 AS (FN) in Arabidopsis existieren (Anhang A2). Der C-Terminus von Arabidopsis ist verkürzt, wodurch er seine Interaktionsfähigkeit mit dem Lhca4 teilweise einbüßen könnte. Ein Hinweis liefert eine C-terminale Deletionsmutante des Tomaten-Lhca1, bei welcher 8 AS fehlten und nur 50% Dimerausbeute gegenüber dem WT-Dimer erreicht wurde (Rupprecht, 2002 Abb. 4.3-2). Falls die Ausbeute nach jeder AS-Deletion linear abnimmt, könnte eine Deletion von 4 AS zu einer theoretischen Reduktion der Ausbeute von 25% betragen. Verglich man His-tag-freie Tomaten- und Arabidopsisdimer, war die Dimerausbeute von letzterem tatsächlich 20% niedriger. Im vorherigen Kapitel (E3.3) wurde vermutet, dass ein im Lhca4 an Position 88 lokalisiertes Serin mit dem G190 des C-Terminus von Lhca1 wechselwirken könnte (Abb. 74A). Bei diesem Vorgang scheint der C-Terminus des Lhca1 in die hydrophobe Membrenumgebung der Helix 2 eindringen zu müssen. Mit einem positiv geladenen His-tag ist dies sicherlich nur schwer möglich, und einem verkürzten C-Terminus fehlen zumindest *in vitro* eventuell die nötigen AS, um eine für die Interaktion mit S88 des Lhca4 geeignete C-terminale Tertiärstruktur auszubilden. Dass es kleinere Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies geben kann, belegen auch die beiden LHCII-Strukturen von Spinat (Liu et al., 2004) und Erbse (Standfuss et al., 2005), in welchen neben dem Chl a7, auch die Kopfgruppen der vier Carotinoide um bis zu einem Å verschoben waren.

3.5 Die Bedeutung der stromalen Lhca4-Schleife für die Heterodimerisierung

Die stromale Lhca4-Schleife ist für eine Heterodimerisierung essentiell (E1.3.2) und im ersten Abschnitt nur schwach konserviert (Abb. 18B). Da dieser Bereich sich an die mit dem Lhca1 interagierende Helix 2 anschließt und der N-Terminus des Lhca1 mit dem Lhca4 interagiert (Schmid et al., 2002a), könnte eine Interaktion über die stromale Schleife stattfinden. In einem PSI-Modell (Jolley et al., 2005) wurde eine π -Elektronen Wechselwirkung zwischen dem W4 am N-Terminus des Lhca1 und dem W106, der letzten stromalen AS der 2. Helix des Lhca4 vorhergesagt. Eine W106F-Mutante des Lhca4 konnte aber unbeeinträchtigt mit dem Lhca1 rekonstituieren (Abb. 44 unten), was eine W4-W106-Interaktion ausschließen würde. Allerdings ist das dem Lhca3 entnommene Phenylalanin auch eine aromatische AS, die eine dem Tryptophan ähnliche Funktion erfüllen könnte. Da sich laut PSI-Kristallstrukturen (Ben-Shem et al., 2003; Amunts et al., 2007) der Lhca3 zum Lhca2 in einer ähnlichen Position befindet wie der Lhca4 zum Lhca1, ist eine Dimerisierung über entsprechende Interaktionspunkte denkbar. Mutationsanalysen am N-terminalen W4 des Lhca1, das den Untersuchungen zur Folge mit dem Lhca4 interagiert, zeigten, dass durch eine Substitution gegen Phenylalanin an Position 4 keine Beeinträchtigung der Dimerisierungsfähigkeit entstand (Rupprecht, 2000; Schmid et al., 2002a). Erst ein Austausch gegen die hydrophoben AS Alanin und Glycin, oder gegen ein Histidin, verhinderte die Dimerisierung. Eventuell interagieren W4 des Lhca1 und W106 des

Lhca4, wie durch Jolley et al. (2005) angenommen, über die π -Elektronen der aromatischen Seitenketten.

Nach einer Doppelmutation in der Lhca4-Schleife (I109W+K110Y) konnten nur noch Spuren einer Dimerbande nachgewiesen werden (Abb. 36B). Nur nach Auftrennung im Gradienten konnte eine eindeutige Dimerbande identifiziert werden (Abb. 37). Ein vergleichbarer Rückgang der Dimerausbeute konnte bei N-terminalen W4-Mutanten des Lhca1 nach Gelaufftrennung festgestellt werden (Schmid et al., 2002a). Eventuell bildet das W4 eine H-Brücke zum I109 aus, oder zwischen W4 und K110 entsteht eine Ionenbindung.

Simultane Mutationen von 4-8 AS im Bereich 115-122 der stromalen Lhca4-Schleife destabilisierten bei Gelaufftrennung die Dimere mit dem Lhca1 (Abb. 36B). Wurden die Komplexe via SDG-UZ aufgereinigt, konnten mehrere LHC-Fraktionen unterschiedlicher Größe beobachtet werden (Abb. 37). Vermutlich handelte es sich bei den höhermolekularen Banden um Doppel- und Dreifachdimere, die durch Assemblierung oder Aggregation von 2 oder 3 Heterodimeren entstanden waren. Vergleichbare Doppeldimere waren bereits nach Substitution des Lhca4-N-Terminus gegen entsprechende Lhcb1- und Lhcb4-Bereiche aufgetreten (Abb. 21A) und der Austausch der 2. Helix des Lhca1 gegen die 2. Helix des Lhca4 führte auch zur Bildung von Doppeldimeren (Abb. 41A). In sich anschließenden 2. Hälfte der stromalen Schleife des Lhca4 befinden sich die konservierte L1-Bindungsstelle für Carotinoide und die ebenfalls hoch konservierte L18-Domäne zur Anlagerung des chloroplastidären Signalerkennungspartikels (Schünemann, 2004). Weshalb bei einer Mutation der stromalen Schleife Doppel- und Dreifachdimere entstehen können ist unklar und wahrscheinlich nur eine *in vitro* Erscheinung. Eventuell interagieren die Schleifenregionen über hydrophile Wechselwirkungen miteinander, da durch die eingefügten AS neue Tertiärstrukturen der stromalen Schleife möglich werden. Zufallsmutationsanalysen an einzelnen AS der stromalen Lhcb1-Schleife führten in allen 4 Fällen zu instabilen Monomeren (Heinemann und Paulsen, 1999), was beim gezielten Tausch gegen Lhca3-AS im Lhca4 nicht zu beobachten war.

4 Ausblick

Durch diese Arbeit konnten im Lhca4 und Lhcb1 schwach konservierte Domänen identifiziert werden, die verantwortlich für deren unterschiedliches Oligomerisierungsverhalten sind. Der Versuch die Dimer- und Trimerisierungseigenschaften durch massiven Domänentransfer auf andere Lhc-Proteine zu übertragen war nur teilweise erfolgreich. Es konnten Lhcb4-Mutanten erzeugt werden, die erfolgreich mit dem Lhca1 dimerisierten. Lhcb1-Mutanten dimerisierten hingegen unzureichend. Der Transfer der Trimerisierungsfähigkeit auf Lhca4 und Lhcb4 war nicht möglich.

Ausgehend von den zwei Mutanten Lhcb4-a4-total- und Lhcb1-a4-total (jeweils 50% LLa4, 100% H2a4 und 100% SLa4) sollte versucht werden, nach und nach mehr Lhca4-Bestandteile in diese Mutanten zu integrieren, bis sie dem Lhca4-WT ähnliche Dimerausbeuten aufweisen. Zu Beginn sollte die luminal Schleife komplett ausgetauscht werden. Nachfolgend könnte eine Substitution des langen Lhcb4-N-Terminus gegen den N-Terminus des Lhca4 zu einer weiteren Ausbeutensteigerung der Lhcb4-Mutante beitragen. Eventuell wäre in der 1. Helix der Lhcb1- und Lhcb4-Mutante auch durch Austausch des Histidins gegen Asparagin an der Chl a5 Bindungsstelle, die Dimerisierung zu verbessern, da sich die Chlorophyllbindung auch als relevanter Faktor bei der Monomer- und Dimerbildung erwiesen hat. Ein Nebeneffekt könnte die Herstellung der für den Lhca4 charakteristischen langwelligen Fluoreszenz sein.

Die mit Lhcb1-Domänen versehenen Lhca4- (100% N-Terminus, 50% LL, 100% H2, 100% SL, 100% C-Terminus) und Lhcb4-Mutanten (100% N-Terminus, 50% LL, 100% H2, 100% SL) konnten trotz des umfangreichen Domänentauschs nicht trimerisieren. Um die Trimerisierungseigenschaft des Lhcb1 auf den Lhca4 und Lhcb4 übertragen zu können, müssen weitere Lhcb1-Bestandteile in die bestehenden Mutanten transferiert werden. Zunächst sollte die luminal Schleife vollständig durch die Lhcb1-Sequenz ersetzt werden. Im Lhcb4 sollte zusätzlich der Lhcb1-C-Terminus zur Stabilisierung des Monomers integriert werden. Um die Trimerisierungsfähigkeit auf den Lhca4 oder Lhcb4 zu transferieren, könnten weitere Mutationen in den nicht so gut konservierten luminal und stromal orientierten Abschnitten der ansonsten hoch konservierten Helices 1 und 3 notwendig sein. Das für eine Trimerisierung essentielle H68 in Helix 1, welches ein Chlorophyll koordiniert, das in der Kernregion des Trimers positioniert ist, sollte ebenso eingefügt werden, wie das in der Helix 3 des Lhcb1 lokalisierte K182, das gemäß der LHCII-Kristallstruktur für die PG-Bindung erforderlich ist.

Um eine Lhca1-Mutante zu generieren, die auch mit sich selbst multimere Komplexe bildet, sollte aufbauend auf der Lhca1-Mutante mit Lhca4-Bestandteilen (50% LL, 100% H2, 100% SL) die luminal Lhca4-Schleife vervollständigt werden. Falls diese Mutante ebenfalls unzureichend monomerisiert, könnte auch ein alternativer Ansatz basierend auf dem Lhca4 erfolgen, in welchem N- und C-terminale Bereiche des Lhca1 transferiert werden. Durch bisherige Versuche ist bekannt, dass eine simultane Substitution der N- und C-terminalen Domäne im Lhca4 durch die entsprechenden Bereiche des Lhcb1 keine Verschlechterung der Dimerausbeute mit sich bringt. Es ist allerdings bis jetzt noch nicht klar, ob im Lhca1 noch Aminosäuren in anderen Domänen außer dem N- und C-Terminus existieren, die für eine Interaktion mit dem Lhca4 wichtig sind.

Die stromale Schleifenregion des Lhca4 ist bis jetzt in Zusammenhang mit der Lhca1-Interaktion noch nicht detailliert untersucht worden. Alle bisher angefertigten Mutanten bilden weniger Monomere als der WT. Drei von vier Mutanten bilden aber multimere Komplexe mit dem Lhca1 aus. Es existiert bis jetzt eine Doppelmutante, und zwei

Clustermutanten, die erst einen relativ kleinen Teil der Sequenz abdecken. Um die Bedeutung der stromalen Lhca4-Schleife bezüglich Heterodimerisierung systematisch zu untersuchen, sollten zunächst wie in Experimenten mit der Helix 2 Bereichsmutanten generiert werden, um große AS-Regionen gegen Lhca3-AS zu tauschen. Anschließend sollten Einzelmутanten in den als wichtig identifizierten Bereichen, zu denen die schwach konservierte, an die 2. Helix angrenzende Region gehören könnte, diese Analyse abrunden. In Hinblick auf das theoretische PSI-Modell, in welchem eine mögliche Wechselwirkung hinsichtlich des W106 mit dem N-terminalen W4 des Lhca1 beschrieben wurde, sollte nochmals eine densitometrische Auswertung von Dimerrekonstitutionen der Lhca4-W106F-Mutante in Betracht gezogen werden. Außerdem sollte eine Substitution des W106 gegen nicht aromatische AS stattfinden, um eine Wechselwirkung über die π -Elektronen beider Seitenketten ausschließen zu können.

Die LHCI-730-Assemblierung bzw. die Interaktion der beiden Untereinheiten Lhca1 und Lhca4 über die Helix 2 des Lhca4 wurde in dieser Arbeit umfangreich untersucht. Jedoch war keine abschließende Aussage darüber möglich, ob eine Chl-Bindung am H99 an der Wechselwirkung beider Untereinheiten beteiligt ist. Um die Bedeutung von Phytolresten zu untersuchen, könnte ein rekonstituierter Lhca4 mit Chlorophyllase, die den Phytolrest abspaltet, inkubiert werden, und mit rekonstituiertem Lhca1 vor und nach Behandlung von Chlorophyllase einer Dimerisierungsreaktion unterzogen werden. Alternativ dazu könnte auch nativer oder rekonstituierter LHCI-730 in An- oder Abwesenheit von Chlorophyllase inkubiert werden, um ihn anschließend per SDG-UZ aufzutrennen.

F ZUSAMMENFASSUNG

Lichtsammelproteine höherer Pflanzen sind in der Lage unterschiedliche Oligomerisierungsformen auszubilden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des PSII und Kristallstrukturen des LHCII belegen die Existenz von 6 Lhc-Proteinen, die entweder die monomeren LHCs CP24 (Lhcb6), CP26 (Lhcb5) und CP29 (Lhcb4) oder den trimeren LHCII (Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3) bilden. An der Peripherie des Photosystem I sind laut Kristallstruktur vier Lhc-Proteine lokalisiert, die als Heterodimere organisiert vorliegen. Während sich der LHCI-730 aus Lhca1 und Lhca4 zusammensetzt, wird das andere Dimer durch Lhca2 und Lhca3 gebildet. Um in dieser Arbeit das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten der Lhc-Proteine genauer zu untersuchen, wurden der monomerisierende Lhcb4, der mit dem Lhca1 dimerisierende Lhca4 und der Trimere bildende Lhcb1 verwendet.

Hinsichtlich der Struktur ist bislang der trimere LHCII am besten untersucht. Dabei zeigte sich folgende Struktur für jedes Monomer: Neben drei α -helicalen Transmembrandomänen existieren zwei Schleifendomänen, welche die Helices miteinander verbinden. Die nicht vollständig aufgelösten N- und C-terminalen Domänen begrenzen die Proteine, wobei in Letzterer eine amphiphile, der Thylakoidmembran angelagerte, kurze Helix integriert ist. Bislang verfügbare Strukturdaten, AS-Sequenzübereinstimmungen und Hydropathieplots deuten darauf hin, dass alle LHCs höherer Pflanzen eine ähnliche monomere Struktur aufweisen.

Frühere Sequenzalignments von Arabidopsis-Proteinen und eigens für diese Arbeit generierte Consensussequenzalignments der verschiedenen Lhca- und Lhcb-Proteine vieler Arten unterstützen die Folgerung, dass den LHCs eine gemeinsame Monomerstruktur zu Grunde liegt. Die Helices 1 und 3 weisen weitgehend sehr hohe Sequenzidentitäten auf, während die N- und C-Termini, die zwei Schleifenregionen und die Helix 2 nur schwach konserviert sind. Falls die Bereiche mit hoher Sequenzübereinstimmung für das Zustandekommen ähnlicher monomerer LHC-Strukturen verantwortlich sind, könnten in den variablen bzw. nur schwach konservierten Domänen die Ursachen für das unterschiedliche Oligomerisierungsverhalten lokalisiert sein, die im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden sollten.

Zur Herstellung chimärer Lhca4-, Lhcb1- und Lhcb4-Proteine, wurde prinzipiell eine schwach konservierte Domäne gegen die entsprechende Domäne der beiden anderen Proteine ersetzt. Auf diesem Weg konnten die für eine Assemblierung des heterodimeren LHCI-730 (Lhca1+Lhca4) und trimeren LHCII (Lhcb1) wichtigen Domänen separat identifiziert werden. Im Lhca4 konnten mit der Helix 2 und der stromalen Schleife zwei für eine Heterodimerisierung essentielle Domänen gefunden werden. Im Lhcb1 waren neben dem N-Terminus auch die 2. Helix und die stromale Schleifendomäne unentbehrlich für eine Trimerisierung. Zusätzlich war sowohl die Dimerisierung als auch die Trimerisierung nach Austausch der luminalen Schleife beeinträchtigt. Ein geringer Beitrag zur Lhcb1-Trimerisierung konnte auch für den C-Terminus belegt werden. Eine Substitution des N-Terminus von Lhca4 gegen die entsprechende Lhcb1- und Lhcb4-Domäne hatte die Bildung von Doppelheterodimeren zur Folge. Ungeklärt blieb, ob die Abwesenheit des Lhca4-N-Terminus oder die Anwesenheit der äquivalenten Lhcb1- bzw. Lhcb4-Domäne zur Ausbildung dieser Oligomerisierungsform führte. Am Beispiel des Lhcb4 wurde deutlich, dass der Transfer

von nur einer Domäne, zur Übertragung der Oligomerisierungsfähigkeit nicht ausreichend war.

Unter Berücksichtigung der durch den Tausch einzelner Domänen gewonnenen Erkenntnisse, wurde versucht, durch umfangreiche Domänensubstitutionen, die Fähigkeit zur Trimerisierung auf Lhca4 und Lhcb4 zu übertragen und die Dimerisierungsfähigkeit auf Lhcb1, Lhcb4 und Lhca1 zu transferieren. Während der Transfer der Trimerisierungsfähigkeit auf Lhca4 und Lhcb4 scheiterte, konnte eine Lhcb4-Mutante mit mehreren Lhca4-Bestandteilen (50% luminale Schleife, 100% Helix 2 und 100% stromale Schleife) mit dem Lhca1 Dimere bilden. Die Lhcb1-Mutante mit Lhca4-Abschnitten, die zur Dimerisierung notwendig sind, war hingegen nicht im Stande Heterodimere auszubilden. Eine Lhca1-Mutante mit allen für eine Dimerisierung essentiellen Domänen (50% luminale Schleife, 100% Helix 2 und 100% stromale Schleife) von Lhca4 sollte durch Interaktion einzelner Moleküle untereinander multimere LHCs bilden. Die Mutanten waren jedoch bereits in ihrer Monomerisierung beeinträchtigt und konnten weder mit sich selbst, noch mit dem Lhca4 Oligomere bilden. Im Gegensatz dazu, war eine Lhca1-Mutante, die nur die 2. Helix des Lhca4 enthielt, in der Lage mit dem Lhca4-WT zu Doppelheterodimeren zu assemblieren. In allen Mutanten, die in diesem Absatz erwähnt wurden, waren nur 50% der luminalen Schleife ausgetauscht. Insbesondere jene Mutanten, die luminale Lhcb1-Bestandteile enthielten, konnten keine luminale Helix E bilden, was sich vermutlich negativ auf die Faltung des mutierten Proteins oder die Stabilität des entstandenen LHCs ausgewirkt hat.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es die LHCI-730-Dimerisierung im Detail zu untersuchen. Dies sollte durch Substitution von AS der Helix 2 des Lhca4 gegen entsprechende AS des Lhca3 geschehen, da der Lhca3 mit dem Lhca1 keine Dimere bilden kann. Eine Teilung der Helix 2 in drei zu untersuchende Abschnitte brachte mehrere wichtige AS-Bereiche zu Tage. Einzelmutationsanalysen bestätigten den Einfluss der aus früheren Untersuchungen bekannten AS Isoleucin 103 und Histidin 99. Letzteres geht möglicherweise durch sein gebundenes Chlorophyll eine Interaktion mit dem Lhca1 ein. Das Phenylalanin 95 stellte sich ebenfalls als ein wichtiger Interaktionspartner heraus und könnte in Wechselwirkung mit einem zwischen Lhca1 und Lhca4 lokalisierten Phosphatidylglycerin treten. Ein Serinrest an Position 88 des Lhca4 könnte direkt mit dem am Lhca1-C-Terminus lokalisierten Glycin 190 interagieren. Durch Rücktausch von AS des Lhca4 in die nicht dimerisierende Lhca4-Mutante mit der Helix 2 des Lhca3 konnte die Bedeutung der einzelnen Helix 2-Abschnitte bezüglich ihrer Interaktion mit dem Lhca1 gezeigt werden.

Zudem konnten einige für die LHCI-730-Bildung bedeutende AS in den Schleifenregionen identifiziert werden. In der luminalen Lhca4-Schleife wurde ein Phenylalanin an Position 84 lokalisiert, dessen Mutation zu einer verringerten Dimerausbeute führte. Laut einem theoretischen PSI-Modell und den Ergebnissen dieser Arbeit zur Folge, steht das Phenylalanin 85 in direkter Verbindung zum Tryptophan 185 im C-Terminus von Lhca1, welches in früheren Mutationsanalysen als wichtig für die Dimerisierung identifiziert werden konnte. Der simultane Austausch des Isoleucins 109 und Lysins 110 in der stromalen Schleife des Lhca4, in unmittelbarer Nähe zur Helix 2, konnten den Einfluss, den diese AS auf die Dimerisierung haben, belegen. Mutationen weiter von der Helix 2 entfernter AS resultierten zusätzlich in der Bildung von mutmaßlichen Doppel- und Dreifachheterodimeren, deren Entstehung vermutlich nur auf eine *in vitro*-spezifische Assemblierung zurückzuführen ist.

Für eine vollständige Aufklärung aller an der Lhca1-Lhca4-Interaktion beteiligten AS, müssten umfangreiche Mutationsanalysen in der stromalen Lhca4-Schleife durchgeführt werden. Auf diesem Weg sollte es gelingen, den Interaktionspartner des für die Dimerisierung wichtigen Tryptophan 4 am N-Terminus von Lhca1 zu identifizieren. Eine weitere Möglichkeit die an der LHCI-730-Bildung beteiligten AS zu identifizieren, könnte durch die Untersuchung der entsprechenden Lhca1-AS gelingen, die vor allem in der Helix 3 lokalisiert sind und durch ihr uniques Vorkommen potentielle Interaktionspartner des Lhca4 sein könnten.

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, schwach konservierte Domänen hinsichtlich ihrer Beteiligung am unterschiedlichen Oligomerisierungsverhalten der Lhc-Proteine im Allgemeinen und die LHCI-730-Assemblierung im Speziellen zu untersuchen. Eine Übertragung der Oligomerisierungsfähigkeit auf andere Proteine durch massiven Domänentransfer gestaltete sich schwierig. Vermutlich lag dies daran, dass im mutierten, chimären Protein immer noch ursprüngliche Tertiärstrukturanteile enthalten sind, die nicht mit den transferierten Proteinbestandteilen kompatibel sind. Bei zukünftigen Experimenten zur Klärung der Transferierbarkeit der Oligomerisierungseigenschaften sollten deswegen neben dem 1. Teil der luminalen Schleife auch wenig konservierte AS in der 1. und 3. Helix berücksichtigt werden. Darüber hinaus sollten auch AS, die für die Chlorophyll-, Carotinoid- und Phosphatidylglycerin-Bindung von Bedeutung sind, mit in die Überlegungen einbezogen werden.

G LITERATUR

- Allen, J. F.** (1992). Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1098**, 275 – 33.
- Allen, J. F. und Forsberg J.** (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *TIPS* **6**, 317 – 326.
- Allen, S., Kim, J.-M., Khorana, H. G., Lu, H. und Booth, P.** (2001) Structure and function in bacteriorhodopsin: the effect of the interhelical loops on the protein folding kinetics. *J Mol Biol.* **308**, 423-435.
- Amunts, A., Drory, O., and Nelson, N.** (2007) The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 resolution. *Nature* **477**, 58-63.
- Andersson, J., Wentworth, M., Walters, R. G., Howard, C. A., Ruban, A. V., Horton, P., Jansson, S.** (2003b) Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II – effects on photosynthesis, grana stacking and fitness. *Plant. J.* **35**, 350-381.
- Andersson, U., Heddad, M., Adamska, I.** (2003a) Light stress-induced one-helix protein of the chlorophyll a/b-binding family associated with photosystem I. *Plant Physiol.* **132**, 811-20.
- Bassi, R. and Caffari, S.** (2000) Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light-harvesting function by xanthophylls. *Photosynth. Res.* **64**, 243-256.
- Bassi, R. und Simpson, D.J.** (1987) Chlorophyll-protein complexes of barley Photosystem I. *Eur. J. Biochem.* **163**, 221-230.
- Bassi, R., Croce, R., Cugini, D., Sandonà, D.** (1999) Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides identification of chromophores bound into multiple sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10056-10061.
- Bennett, M., Yeagle, J.A., Maciejewski, M., Ocampo, J., Yeagle, P.L.** (2004) Stability of loops in the structure of lactose permease. *Biochemistry* **43**, 12829-37.
- Bennett, M.J., Choe, S., Eisenberg, D.** (1994) Domain swapping: entangling alliances between proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 3127-31.
- Ben-Shem, A., Frolow, F., Nelson, N.** (2003) Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* **426**, 630-635.
- Ben-Shem, A., Frolow, F., Nelson, N.** (2004) Light-harvesting features revealed by the structure of plant photosystem I. *Photosynth Res.* **81**, 239-50.
- Berg, L., Tymoczko, J. L., Stryer, L.** (2003) *Biochemie*. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Bergauer, V.** (2000) Heterologe Expression und in vitro Rekonstitution der Lichtsammelproteine Lhca2 und Lhca3 des Photosystem I. Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- Berkower, C. und Michaelis, S.** (1991) Mutational analysis of the yeast a-factor transporter STE6, a member of the ATP binding cassette (ABC) protein superfamily. *EMBO J.* **10**, 3777-85.

- Boekema**, E. J., Van Roon, H., Van Breemen, J. F., Dekker, J.P. (1999) Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Eur J Biochem.* **266**, 444-52.
- Booth**, P.J., Flitsch, S.L., Stern, L.J., Greenhalgh, D.A., Kim, P.S., Khorana, H.G. (1995) Intermediates in the folding of the membrane protein bacteriorhodopsin. *Nat Struct Biol.* **2**, 139-43.
- Bradford**, M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 1029-1036.
- Branden**, C. und **Tooze**, J. (1991) *Introduction to Protein Structure*. London: Garland Publishing.
- Büchel**, C. (2003) Fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatoms: 18 and 19 kDa subunits assemble into different oligomeric states. *Biochemistry* **42**, 13027-34.
- Bujard**, H., Gentz, R., Lancer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahim, I., Haeuptle, M.-T., Dobberstein, B. (1987) A T5-Promotor-based transcription-translation system for the analysis of protein expression *in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymol.* **155**, 416-433.
- Burke**, J.J., Ditto, C.L., Arntzen, C.J. (1978) Involvement of the light-harvesting complex in cation regulation of excitation energy distribution in chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **187**, 252-263.
- Cammarata**, K. V. und **Schmidt**, G. W. (1992). In Vitro Reconstitution of a Light-Harvesting Gene Product: Deletion Mutagenesis and Analysis of Pigment Binding. *Biochemistry* **31**, 2779-2789.
- Castelletti**, S., Morosinotto, T., Robert, B., Caffari, S., Bassi, R., Croce, R. (2003) Recombinant Lhca2 and Lhca3 Subunits of the Photosystem I Antenna System. *Biochemistry* **42**, 4226-4234.
- Chen**, B. and **Przbyla**, A.E. (1994) An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *BioTechniques* **17**, 657-659.
- Chen**, H. und **Zhou**, H.-X. (2005) Prediction of interface residues in protein-protein complexes by a consensus neural network method: test against NMR data. *Proteins*, **61**, 21-35.
- Chen**, H., Zhang, D., Guo, J., Wu, H., Jin, M., Lu, Q., Lu, C., Zhang, L. (2006) A Psb27 homologue in *Arabidopsis thaliana* is required for efficient repair of photodamaged photosystem II. *Plant Mol Biol.* **61**, 567-75.
- Chin**, C. N., Sachs, J. N., Engelman, D. M. (2005) Transmembrane homodimerization of receptor-like protein tyrosine phosphatases. *FEBS Lett.* **579**, 3855-8.
- Conte**, L., Chothia, C., Janin, J. (1999) The atomic structure of protein-protein recognition sites. *J Mol Biol.* **285**, 2177-98.
- Corbet** D. (2004) Mutationsanalyse zur Untersuchung der Interaktionen des heterodimeren Lichtsammelkomplexes LHCI-730. Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg Universität, Mainz.

- Corbet**, D., Schweikardt, T., Paulsen, H., Schmid, V.H. (2007) Amino acids in the second transmembrane helix of the Lhca4 subunit are important for formation of stable heterodimeric light-harvesting complex LHCI-730. *J. Mol. Biol.* **370**, 170-82.
- Croce**, R., Morosinotto, T., Castelletti, S., Breton, S., Bassi, R. (2002) The Lhca antenna complexes of higher plants Photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1556**, 29-40.
- Croce**, R., Remelli, R., Varotto, C., Breton, J., Bassi, R. (1999a) The neoxanthin binding site of the major light harvesting complex (LHCII) from higher plants. *FEBS Lett.* **456**, 1-6.
- Croce**, R., Weiss, S., Bassi, R. (1999b) Carotenoid-binding Sites of the Major Light-harvesting Complex II of Higher Plants. *J. Biol. Chem.* **274**, 29613-29623.
- Crowley**, P. B. und **Golovin**, A. (2005) Cation- π interactions in protein-protein interfaces. *Proteins*, **59**, 231-239.
- Curran**, A. R. and **Engelman**, D. M. (2003) Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol.* **13**, 412-7.
- D'Andrea**, L.D. und **Regan**, L. (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci.* **28**, 655-62.
- de Vries**, S. J. and **Bonvin**, A. M. (2006) Intramolecular surface contacts contain information about protein-protein interface regions. *Bioinformatics.* **22**, 2094-8.
- Durnford**, D.G., Aebersold, R., Green, B.R. (1996) The fucoxanthin-chlorophyll proteins from a chromophyte alga are part of a large multigene family: structural and evolutionary relationships to other light harvesting antennae. *Mol Gen Genet.* **253**, 377-86.
- Elrad**, D. und **Grossman**, A.R. (2004) A genome's-eye view of the light-harvesting polypeptides of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* **45**, 61-75.
- Engelman**, D. M., Chen, Y., Chin, C. N., Curran, A. R., Dixon, A. M., Dupuy, A. D., Lee, A. S., Lehnert, U., Matthews, E. E., Reshetnyak, Y. K., Senes, A., Popot, J. L. (2003) Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett.* **555**, 122-5.
- Fischer**, N., Boudreau, E., Hippler, M., Drepper, F., Haehnel, W., Rochaix, J. D. (1999) A large fraction of PsaF is nonfunctional in photosystem I complexes lacking the PsaJ subunit. *Biochemistry* **38**, 5546-5552
- Flores-Ramirez**, G., Rivera, M., Morales-Pablos, A., Osuna, J., Soberon, X., Gaytan, P. (2007) The effect of amino acid deletions and substitutions in the longest loop of GFP. *BMC Chem Biol.* **7**:1.
- Forsberg**, J. and **Allen**, J. F. (2001) Protein tyrosine phosphorylation in the transition to light state 2 of chloroplast thylakoids. *Photosynth Res.* **68**, 71-9.
- Fromme**, P., Jordan, P., Krauss, N. (2001) Structure of photosystem I. *Biochim Biophys Acta.* **1507**, 5-31.
- Fromme**, P., Melkozernov, A., Jordan, P., Krauss, N. (2003) Structure and function of photosystem I: interaction with its soluble electron carriers and external antenna systems. *FEBS Lett.* **555**, 40-44.

- Gal**, A., Hauska, G., Herrmann, R., Ohad, I. (1990) Interaction between light harvesting chlorophyll-a/b protein (LHCII) kinase and cytochrome b6/f complex. In vitro control of kinase activity. *J Biol Chem.* **265**, 19742-9.
- Gastaldelli**, M., Canino, G., Croce, R., Bassi, R. (2003) Xanthophyll binding sites of the CP29 (Lhcb4) subunit of higher plant photosystem II investigated by domain swapping and mutation analysis. *J Biol Chem.* **278**, 19190-8.
- Gernert**, K. M., Surles, M. C., Labean, T. H., Richardson, J. S., Richardson, D. C. (1995) The Alacoil: a very tight, antiparallel coiled-coil of helices. *Protein Sci.* **4**, 2252-60.
- Gilles-Gonzalez**, M. A.; Engelman, D. M. und Khorana, H. G. (1991). Structure-Function Studies of Bacteriorhodopsin XV. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 8545-8550.
- Giragossian**, C., Schaschke, N., Moroder, L., Mierke, D. F. (2004) Conformational and molecular modeling studies of beta-cyclodextrin-heptagastrin and the third extracellular loop of the cholecystokinin 2 receptor. *Biochemistry* **43**, 2724-31.
- Giuffra**, E., Cugini, D., Croce, R., Bassi, R. (1996) Reconstitution and pigment-binding properties of recombinant CP29. *Eur J Biochem.* **238**, 112-20.
- Giuffra**, E., Cugini, D., Croce, R., Bassi, R. (1996) Reconstitution and pigment-binding properties of recombinant CP29. *Eur. J. Biochem.* **238**, 112-120.
- Gobets**, B. and van **Grondelle**, R. (2001) Energy transfer and trapping in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta.* **1507**, 80-99.
- Green**, B.R. and **Pichersky**, E. (1994) Hypothesis for the evolution of three-helix Chl *a/b* and Chl *a/c* light-harvesting antenna proteins from two-helix and four-helix ancestors. *Photosynth. Res.* **39**, 149-162.
- Green**, B.R., Pichersky, E., Kloppstech, K. (1991) The chlorophyll *a/b*-binding light-harvesting antennas of green plants: The story of an extend gene family. *TIBS* **16**, 181-186.
- Haldrup**, A., Naver, H., Scheller, H.V., (1999) The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic *Arabidopsis* plants lacking the PSI-N subunit of photosystem I. *Plant J.* **17**, 689-698.
- Haldrup**, A., Simpson, D.J., Scheller, H.V. (2000) Down-regulation of the PSI-F Subunit of Photosystem I (PSI) in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **275**, 31211-31218.
- Hanahan**, D. (1983) Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hankamer**, B., Morris, E., Nield, J., Gerle, C., Barber, J. (2001) Three-dimensional structure of the photosystem II core dimer of higher plants determined by electron microscopy. *J. Struct. Biol.* **135**, 262-269.
- Heddad**, M. und **Adamska**, I. (2000) Light stress-regulated two-helix proteins in *Arabidopsis thaliana* related to the chlorophyll *a/b*-binding gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3741-6.

- Heinemann, B. und Paulsen, H.** (1999). Random Mutations Directed to Transmembrane and Loop Domains of the Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Protein: Impact on Pigment Binding. *Biochemistry* **38**, 14088-14093.
- Heldt, Hans-W.** (2003) Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Henrysson, T., Schröder, W. P., Spangfort, M., Akerlund, H.-E.** (1989) Isolation and characterization of the chlorophyll *ab* protein complex CP29 from spinach. *Biochim. Biophys. Acta* **977**, 301-308
- Hobe, S., Förster, R., Klingler, J., 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**, 10224-10228.
- Hobe, S., Niemeier, H., Bender, A., Paulsen, H.** (2000) Carotenoid binding sites in LHCIIb: Relative affinities towards major xanthophylls of higher plants. *Eur. J. Biochem.* **267**, 616-624.
- Hobe, S., Prytulla, S., Kühlbrandt, W., Paulsen, H.** (1994) Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *EMBO J.* **13**, 3423-3429.
- Horn, R. und Paulsen, H.** (2004) Early Steps in the Assembly of Light-harvesting Chlorophyll *a/b* Complex, Time-Resolved Fluorescence Measurements. *JBC* **279**, 44400 – 44406.
- Horn, R., Grundmann, G., Paulsen, H.** (2007) Consecutive binding of chlorophylls *a* and *b* during the assembly in vitro of light-harvesting chlorophyll-*a/b* protein (LHCIIb). *J. Mol. Biol.* **366**, 1045-1054.
- Ihalainen, J.A., Gobets, B., Sznee, K., Brazzoli, M., Croce, R., Bassi, R., van Grondelle, R., Korppi-Tommola, J.E.I., Dekker, J.P.** (2000) Evidence for Two Spectroscopically Different Dimers of Light-Harvesting Complex I from Green Plants. *Biochemistry* **39**, 8625-8631.
- Ikeuchi, M., Hirano, A., Inoue, Y.** (1991) Correspondence of apoproteins of light-harvesting chlorophyll *a/b* complexes associated with photosystem I to *cab* genes: Evidence for a novel type IV apoprotein. *Plant Cell Physiol.* **32**, 103-112.
- Jansson, S.** (1994) The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1184**, 1-19.
- Jansson, S.** (1999) A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **4**, 236-240.
- Jansson, S., Andersen, B., Scheller, H.V.** (1996) Nearest-neighbor analysis of higher-plant photosystem I holocomplex. *Plant Physiol.* **112**, 409-420.
- Jensen, P. E., Bassi, R., Boekema, E. J., Dekker, J. P., Jansson, S., Leister, D., Robinson, C., Scheller, H. V.** (2007) Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochim Biophys Acta.* **1767**, 335-52.
- Jensen, P.E., Gilpin, M., Knoetzel, J., Scheller, H.V.** (2000) The PSI-K subunit of photosystem I is involved in the interaction between light-harvesting complex I and the photosystem I reaction center core. *J. Biol. Chem.* **275**, 24701-24708.
- Jolley, C., Ben-Shem, A., Nelson, N., Fromme, P.** (2005) Structure of plant photosystem I revealed by theoretical modeling. *J. Biol. Chem.* **280**, 33627-33636.

- Jonas-Straube**, E., Hutin, C., Hoffman, N. E., Schunemann, D. (2001) Functional analysis of the protein-interacting domains of chloroplast SRP43. *J Biol Chem.* **276**, 24654-60.
- Jones**, S. und **Thornton**, J. M. (1997) Prediction of protein-protein interaction sites using patch analysis. *J Mol Biol.* **272**, 133-43.
- Jordan**, P., Fromme, P., Klukas, O., Witt, H.T., Saenger, W., Kraus, N. (2001) Three-Dimensional Structure of cyanobacterial Photosystem I at 2,5 Å Resolution. *Nature* **411**, 909-917.
- Kahn**, T. W. und Engelman, D. M. (1992). Bacteriorhodopsin Can Be Refolded from Two Independently Stable Transmembrane Helices and the Complementary Five-Helix Fragment. *Biochemistry* **31**, 6144-6151.
- Kahn**, T. W., Sturtevant, J. M., Engelman, D. M. (1992) Thermodynamic measurements of the contributions of helix-connecting loops and of retinal to the stability of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **31**, 8829-39.
- Kargul**, J., Turkina, M.V., Nield, J., Benson, S., Vener, A.V., Barber, J. (2005) Light-harvesting complex II protein CP29 binds to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* under State 2 conditions. *FEBS J.* **272**, 4797-4806.
- Kashino**, Y., Lauber, W. M., Carroll, J. A., Wang, Q., Whitmarsh, J., Satoh, K., Pakrasi, H. B. (2002) Proteomic analysis of a highly active photosystem II preparation from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 reveals the presence of novel polypeptides. *Biochemistry* **41**, 8004-12.
- Katragadda**, M., Alderfer, J. L., Yeagle, P. L. (2000) Solution structure of the loops of bacteriorhodopsin closely resembles the crystal structure. *Biochim Biophys Acta.* **1466**, 1-6.
- Kehoe**, J. W., Meadows, K. A., Parkes-Loach, P. S., Loach, P. A. (1998) Reconstitution of core light-harvesting complexes of photosynthetic bacteria using chemically synthesized polypeptides. 2. Determination of structural features that stabilize complex formation and their implications for the structure of the subunit complex. *Biochemistry.* **37**, 3418-28.
- Keren**, N., Ohkawa, H., Welsh, E. A., Liberton, M., Pakrasi, H. B. (2005) Psb29, a conserved 22-kD protein, functions in the biogenesis of Photosystem II complexes in *Synechocystis* and *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **17**, 2768-81.
- Keuchel**, R. (2003) Untersuchungen zur Lokalisierung langwelliger Chlorophylle in Lichtsammelkomplexen. Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- Kim**, J.-M., Booth, P. J., Allen, S. J. und Khorana, H. G. (2001). Structure and Function in Bacteriorhodopsin: The Role of the Interhelical Loops in the Folding and Stability of Bacteriorhodopsin. *J Mol Biol* **308**, 409-422.
- Kirsch**, R.D. and **Joly**, E. (1998) An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes. *Nucleic. Acids. Res.* **26**, 1848-1850.

- Kleima**, F. J., Hobe, S., Calkoen, F., Urbanus, M. L., Peterman, E. J., van Grondelle, R., Paulsen, H., van Amerongen, H. (1999) Decreasing the chlorophyll a/b ratio in reconstituted LHCII: structural and functional consequences. *Biochemistry* **38**, 6587-96.
- Klimmek**, F., Ganeteg, U., Ihalainen, J. A., van Roon, H., Jensen, P. E., Scheller, H. V., Dekker, J. P., Jansson, S. (2005) Structure of the higher plant light harvesting complex I: in vivo characterization and structural interdependence of the Lhca proteins. *Biochemistry* **44**, 3065-73.
- Klimmek**, F., Sjödin, A., Noutsos, C., Leister, D., Jansson, S. (2006) Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants. *Plant Physiol.* **140**, 793-804.
- Knoetzel**, J., Svendsen, I., Simpson, D.J. (1992) Identification of the photosystem I antenna polypeptides in barley. Isolation of three pigment-binding antenna complexes. *Eur. J. Biochem.* **206**, 209-215.
- Kohorn**, B. D. (1990) Replacement of Histidines of Light Harvesting Chlorophyll a/b Binding Protein II Disrupts Chlorophyll-Protein Complex Assembly. *Plant Physiol.* **93**, 339-342.
- Kosemund**, K. (1999) Die Biogenese von Chlorophyll a/b-bindenden Lichtsammelkomplexen: Topographie des Apoproteins bei der Thylakoidinsertion. Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- Kouril**, R., Zygadlo, A., Arteni, A. A., de Wit, C. D., Dekker, J. P., Jensen, P. E., Scheller, H. V., Boekema, E. J. (2005) Structural characterization of a complex of photosystem I and light-harvesting complex II of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry*. **44**, 10935-40.
- Kozioł**, A.G., Borza, T., Ishida, K., Keeling, P., Lee, R. W., Durnford, D. G. (2007) Tracing the evolution of the light-harvesting antennae in chlorophyll a/b-containing organisms. *Plant Physiol.* **143**, 1802-16.
- Kruse**, O. (2001) Light-induced short-term adaption mechanisms under redox control in the PS II-LHCII supercomplex: LHCII state transition and PS II repair cycle. *Naturwissenschaften* **88**, 284 – 292.
- Kühlbrandt**, W., Thaler, T., Wehrli, E. (1983) The structure of membrane crystals of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex. *J. Cell. Biol.* **96**, 1414-1424.
- Kühlbrandt**, W., Wang, D.N., Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**, 614-621.
- Kuttkat**, A. (1997) Untersuchungen zur Insertion und Assemblierung des Chlorophyll a/b-bindenden Lichtsammelproteins an isolierten Thylakoidmembranen höherer Pflanzen. Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilian-Universität München.
- Kuttkat**, A., Grimm, R., 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**, 1267-76.

- Kuttkat**, A., Hartmann, A., Hobe, S., Paulsen, H. (1996) The C-terminal domain of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein is involved in the stabilisation of trimeric light-harvesting complex. *Eur. J. Biochem.* **242**, 288-292.
- Laemmli**, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lago-Places**, E. (2000) Untersuchung der Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Chlorophyllbindung und die spektralen Eigenschaften des rekombinanten Lhca4. Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- Lam**, E., Ortiz, W., Malkin, R., (1984) Chlorophyll *a/b* proteins of Photosystem I. *FEBS Lett.* **168**, 10-14.
- Liao**, M. J., London, E., Khorana, H. G. (1983) Regeneration of the native bacteriorhodopsin structure from two chymotryptic fragments. *J Biol Chem.* **258**, 9949-55.
- Lichtarge**, O., Bourne, H. R., Cohen, F. E. (1996) An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *J Mol Biol.* **257**, 342-58.
- Liu**, Y., Engelman, D. M., Gerstein, M. (2002) Genomic analysis of membrane protein families: abundance and conserved motifs. *Genome Biol.* **3**(10):research0054.
- Liu**, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., Chang, W. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428**, 287-292.
- Lucinski**, R., Schmid, V. H., Jansson, S., Klimmek, F. (2006) Lhca5 interaction with plant photosystem I. *FEBS Lett.* **580**, 6485-8.
- Lunde**, C., Jensen, P. E., Haldrup, A., Knoetzel, J., Scheller, H. V. (2000) The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature* **408**, 613-615.
- Ma**, B. and **Nussinov**, R. (2007) Trp/Met/Phe hot spots in protein-protein interactions: potential targets in drug design. *Curr Top Med Chem.* **7**, 999-1005.
- Madigan**, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2000) Brock Mikrobiologie (Goebel, W., Hrsg.) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Marti**, T. (1998). Refolding of Bacteriorhodopsin from Expressed Polypeptide Fragments. *J Biol Chem* **273**, 9312-9322.
- Mei**, G., Di Venere, A., Rosato, N., Finazzi-Agro, A. (2005) The importance of being dimeric. *FEBS J.* **272**, 16-27.
- Melkozernov**, A.N. and **Blankenship**, R.E. (2003) Structural modeling of the Lhca4 subunit of LHCI-730 peripheral antenna in photosystem I based on similarity with LHCII. *J. Biol. Chem.* **278**, 44542-44551.
- Mick**, V., Eggert, K., Heinemann, B., Geister, S., Paulsen, H. (2004a) Single amino acids in the luminal loop domain influence the stability of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *Biochemistry* **43**, 5467-73.

- Mick**, V., Geister, S., Paulsen, H. (2004b) The folding state of the luminal loop determines the thermal stability of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. *Biochemistry* **43**, 14704-11.
- Morosinotto**, T., Baroni, R., Bassi, R. (2002b) Dynamics of chromophore binding to Lhc proteins in vivo and in vitro during operation of the xanthophyll cycle. *J. Biol. Chem.* **277**, 36913-36920.
- Morosinotto**, T., Breton, J., Bassi, R., Croce, R. (2003) The nature of a chlorophyll ligand in Lhca proteins determines the far red fluorescence emission typical of Photosystem I. *J. Biol. Chem.* **278**, 49223-49229.
- Morosinotto**, T., Castelletti, S., Breton, J., Bassi, R., Croce, R. (2002a) Mutation Analysis of Lhca1 Antenna Complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 36253-36261.
- Morosinotto**, T., Mozzo, M., Bassi, R., Croce, R. (2005) Pigment-pigment interactions in Lhca4 antenna complex of higher plants photosystem I. *J. Biol. Chem.* **280**, 20612-20619.
- Mosavi**, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C., Peng, Z. Y. (2004) The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* **13**, 1435-48.
- Moseley**, J. L., Allinger, T., Herzog, S., Hoerth, P., Wehinger, E., Merchant, S., Hippler, M. (2002) Adaption to Fe-deficiency requires remodeling of the photosynthetic apparatus. *EMBO J.* **21**, 6709-6720.
- Mozzo**, M., Morosinotto, T., Bassi, R., Croce, R. (2006) Probing the structure of Lhca3 by mutation analysis. *Biochim Biophys Acta.* **1757**, 1607-13.
- Naver**, H., Boudreau, E., Rochaix, J. D. (2001) Functional studies of Ycf3: its role in assembly of photosystem I and interactions with some of its subunits. *Plant Cell.* **13**, 2731-45.
- Neuvirth**, H., Raz, R., Schreiber, G. (2004) ProMate: a structure based prediction program to identify the location of protein-protein binding sites. *J Mol Biol.* **338**, 181-99.
- Nußberger**, S., Dörr K., Wang, D.N. and Kühlbrandt, W. (1993) Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J. Mol. Biol.* **234**, 347-356.
- Oudot-Le Secq**, M. P., Grimwood, J., Shapiro, H., Armbrust, E. V., Bowler, C., Green, B. R. (2007) Chloroplast genomes of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*: comparison with other plastid genomes of the red lineage. *Mol Genet Genomics* **277**, 427-39.
- Pascal**, A., Gradinaru, C., Wacker, U., Peterman, E., Calkoen, F., Irrgang, K. D., Horton, P., Renger, G., van Grondelle, R., Robert, B., van Amerongen, H. (1999) Spectroscopic characterization of the spinach Lhcb4 protein (CP29), a minor light-harvesting complex of photosystem II. *Eur. J. Biochem.* **3**, 817-823.
- Paulsen**, H. Finkenzeller, B., Kühlein, N. (1993) Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **215**, 809-816.
- Paulsen**, H. und **Hobe**, S. (1992) Pigment-binding properties of mutant light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein. *Eur J Biochem.* **205**, 71-6.

- Paulsen, H. und Kuttkat, A.** (1993) Pigment complexes of light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein are stabilized by a segment in the carboxyterminal hydrophilic domain of the protein. *Photochem Photobiol.* **57**, 139-42.
- Pichersky, E. and Jansson, S.** (1996) The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding polypeptides and their genes in angiosperm and gymnosperm species. In: *Oxygenic Photosynthesis: The light reactions* (Ort, D.R. and Yocum, C.F., Hrsg.), 507-521. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Piserchio, A., Bisello, A., Rosenblatt, M., Chorev, M., Mierke, D. F.** (2000) Characterization of parathyroid hormone/receptor interactions: structure of the first extracellular loop. *Biochemistry* **39**, 8153-60.
- Plumley, G. F. and Schmidt, G. W.** (1987) Reconstitution of chlorophyll *a/b* light-harvesting complexes: xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 146-150.
- Polivka, T. and Sundström, V.** (2004) Ultrafast dynamics of carotenoid excited States-from solution to natural and artificial systems. *Chem. Rev.* **104**, 2021-2071.
- Ponstingl, H., Kabir, T., Gorse, D., Thornton, J. M.** (2005) Morphological aspects of oligomeric protein structures. *Prog Biophys Mol Biol.* **89**, 9-35.
- Popot, J. L. and Engelman, D. M.** (1990) Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry* **29**, 4031-7.
- Popot, J. L., Gerchman, S. E., Engelman, D. M.** (1987) Refolding of bacteriorhodopsin in lipid bilayers. A thermodynamically controlled two-stage process. *J Mol Biol.* **198**, 655-76.
- Popot, J.-L. and Engelman, D.M.** (2000) Helical Membrane Protein Folding, Stability and Evolution. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 881-922.
- Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedermann, 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.
- Rautenberg, D.** (2001) Analyse der Chlorophyllbindung durch Rekonstitution des punktmutierten Lichtsammelproteins Lhca4. Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- Remelli, R., Varatto, C., Sandonà, D., Croce, R., Bassi, R.** (1999) Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 33510-33521.
- Rogl, H and Kühlbrandt, W.** (1999) Mutant trimers of light-harvesting complex II exhibit altered pigment content and spectroscopic features. *Biochemistry* **38**, 16214-16222
- Rogl, H., Kosemund, K., Kühlbrandt, W., Collinson, I.** (1998) Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Lett.* **432**, 21-6.
- Roose, J. L., Wegener, K. M., Pakrasi, H. B.** (2007) The extrinsic proteins of Photosystem II. *Photosynth Res.* **92**, 369-87.

- Ruban**, A. V., Lee, P. J., Wentworth, M., Young, A. J., Horton, P. (1999) Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes. *J. Biol. Chem.* **274**, 10458-10465.
- Ruban**, A. V., Solovieva, S., Lee, P. J., Iliaia, C., Wentworth, M., Ganeteg, U., Klimmek, F., Chow, W. S., Anderson, J. M., Jansson, S., Horton, P. (2006) Plasticity in the composition of the light harvesting antenna of higher plants preserves structural integrity and biological function. *J Biol Chem.* **281**, 14981-90.
- Ruban**, A. V., Wentworth, M., Yakushevskaya, A. E., Andersson, J., Lee, P. J., Keegstra, W., Dekker, J. P., Boekema, E. J., Jansson, S., Horton, P. (2003) Plants lacking the main light-harvesting complex retain photosystem II macro-organization. *Nature* **421**, 648-52.
- Rupprecht**, J. (2002) Bedeutung N- und C-terminaler Aminosäuren für die Monomer- und Dimerbildung von Lichtsammelproteinen des Photosystem I. Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- Rupprecht**, J., Paulsen, H., Schmid, V.H.R. (2000) Protein Domains required for formation of stable monomeric Lhca1- and Lhca4-complexes. *Photosynth. Res* **63**, 217-224.
- Russ**, W.P., **Engelman**, D.M. (2000) The GxxxG-Motiv: A framework for transmembrane helix-helix association. *J. Mol. Biol.* **296**, 911-919.
- Sambrook**, J., Russel, D. W. (2004) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Vol. 1-3, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY, USA).
- Sandona**, D., Croce, R., Pagano, A., Crimi, M., 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**, 207-214.
- Schiffer**, M., Chang, C.-H., Stevens, F.J. (1992) The functions of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Engineering* **5** (No. 3), 213-214.
- Schmid**, V., Beutelmann, P., Schmidt, G. W., Paulsen, H. (1998) Ligand requirement for LHCI reconstitution. in: Garab, G. (ed.), *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, **Vol I**: 425-428. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL.
- Schmid**, V.H.R. and Schäfer, C. (1994) Alterations of the chlorophyll-pattern in chronically photoinhibited *Cenophobium rubrum* cells. *Planta* **192**, 473-479.
- Schmid**, V.H.R., Cammarata, K.V., Bruns, B.U., Schmidt, G.W. (1997) *In vitro* reconstitution of the photosystem I light-harvesting complex LHCI-730: Heterodimerization is required for antenna pigment organisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7667-7672.
- Schmid**, V.H.R., Paulsen, H., Rupprecht, J. (2002a) Identification of N- and C-terminal Amino Acids of Lhca1 and Lhca4 Required for Formation of the Heterodimeric Peripheral Photosystem I Antenna LHCI-730. *Biochemistry* **41**, 9126-9131.
- Schmid**, V.H.R., Potthast, S., Wiener, M., Bergauer, V., Paulsen, H., Storf, S.

(2002b) Pigment Binding of Photosystem I Light-harvesting Proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 37307-37314

Schmid, V.H.R., Thomé, P., Rühle, W., Paulsen, H., Kühlbrandt, W., Rogl, H. (2001) Chlorophyll *b* is involved in long-wavelength spectral properties of light-harvesting complexes LHCI and LHCII. *FEBS Lett.* **499**, 27-31.

Schünemann, D. (2004) Structure and function of the chloroplast signal recognition particle. *Curr Genet.* **44**, 295-304.

Sedgwick, S. G. and Smerdon, S. J. (1999) The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci.* **24**, 311-6.

Senes, A., Gerstein, M., Engelman, D. M. (2000) Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol.* **296**, 921-36.

Senes, A., Ubarretxena-Belandia, I., Engelman, D. M. (2001) The Calpha ---H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 9056-61.

Spangfort, M. and **Andersson**, B. (1989) Subpopulations of the main chlorophyll *ab* light-harvesting complex of Photosystem II—isolation and biochemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* **977**, 163-170.

Standfuss, J. und **Kühlbrandt**, W. (2004) The three isoforms of the light-harvesting complex II: spectroscopic features, trimer formation, and functional roles. *J Biol Chem.* **279**, 36884-91.

Standfuss, J., Terwisscha van Scheltinga, A.C., Lamborghini, M., Kühlbrandt, W. Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* **24**, 919-928.

Storf, S., Jansson, S., Schmid, V. H. (2005) Pigment binding, fluorescence properties, and oligomerization behavior of Lhca5, a novel light-harvesting protein. *J Biol Chem.* **280**, 5163-8.

Taiz, L. und **Zeiger**, E. (2007) *Plant Physiology*. Spektrum Akademischer Verlag.

Takahashi, H., Iwai, M., Takahashi, Y., Minagawa, J. (2006) Identification of the mobile light-harvesting complex II polypeptides for state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **103**, 477-482.

Teufel, M., Pompejus, M., Humbel, B., Friedrich, K., Fritz, H. J. (1993) Properties of bacteriorhodopsin derivatives constructed by insertion of an exogenous epitope into extra-membrane loops. *EMBO J.* **12**, 3399-408.

Thomé, P. (2000) Mutagenese potentieller Chlorophyllbindungsstellen: Effekt auf die Chlorophyllbindung und die spektralen Eigenschaften von LHCI. Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg Universität, Mainz.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673–4680.

Tu, C. J., Peterson, E. C., Henry, R., Hoffman, N. E. (2000) The L18 domain of light-

harvesting chlorophyll proteins binds to chloroplast signal recognition particle 43. J Biol Chem. **275**, 13187-90.

Turkina, M.V., Kargul, J., Blanco-Rivero, A., Villarejo, A., Barber, J., Vener, A.V. (2006) Environmentally modulated phosphoproteome of photosynthetic membranes in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol. Cell. Proteomics. **5**, 1412-1425.

Wehbi, H., Rath, A., Glibowicka, M., Deber, C. M. (2007) Role of the extracellular loop in the folding of a CFTR transmembrane helical hairpin. Biochemistry **46**, 7099-106.

Wehner, A., Storf, S., Jahns, P., Schmid V. H. R. (2004) De-epoxidation of violaxanthin in light-harvesting complex I proteins. J. Biol. Chem. **279**, 26823-9.

Xu, Q. und **Bricker**, T. M. (1992) Structural organization of proteins on the oxidizing side of photosystem II. Two molecules of the 33-kDa manganese-stabilizing proteins per reaction center. J Biol Chem. **267**, 25816-21.

Yakushevskaya, A. E., Keegstra, W., Boekema, E.J., Dekker, J.P., Andersson, J., Jansson, S., Ruban, A.V., Horton, P. (2003) The structure of photosystem II in *Arabidopsis*: localization of the CP26 and CP29 antenna complexes. Biochemistry **42**, 608-13.

Yang, C., Kosemund, K., Cornet, C., Paulsen, H. (1999) Exchange of pigment-binding amino acids in light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. Biochemistry **38**, 16205-16212.

Yeagle, P. L., Alderfer, J. L., Salloum, A. C., Ali, L., Albert, A. D. (1997) The first and second cytoplasmic loops of the G-protein receptor, rhodopsin, independently form beta-turns. Biochemistry **36**, 3864-9.

Yu, H., Kono, M., McKee, T. D., Oprian, D. D. (1995) A general method for mapping tertiary contacts between amino acid residues in membrane-embedded proteins. Biochemistry **34**, 14963-9.

Zen, K. H., McKenna, E., Bibi, E., Hardy, D., Kaback, H. R. (1994) Expression of lactose permease in contiguous fragments as a probe for membrane-spanning domains. Biochemistry **33**, 8198-206.

Zhang, S. und **Scheller**, H. V. (2004) Photoinhibition of photosystem I at chilling temperature and subsequent recovery in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. **45**, 1595-602.

Zhang, Z. H., Mayes, S. R., Barber, J. (1990) Nucleotide sequence of the *psbK* gene of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. Nucleic Acids Res. **18**, 1284.

Zhou, H. X. and **Qin**, S. (2007) Interaction-site prediction for protein complexes: a critical assessment. Bioinformatics **23**, 2203-9.

Zhou, H. X. and **Shan**, Y. (2001) Prediction of protein interaction sites from sequence profile and residue neighbor list. Proteins **44**, 336-43.

Zolla, L., Rinalducci, S., Timperio, A. M. (2007) Proteomic analysis of photosystem I components from different plant species. Proteomics **7**, 1866-76.

Zuber, H. (1986) Primary structure and function of light-harvesting polypeptides

from cyanobacteria, red algae and purple photosynthetic bacteria. In: Photosynthesis III: Photosynthetic Membranes and Light-Harvesting Systems (Staehein, L.A., Arntzen, C.J., Hrsg.), New Series Vol. **19**, 238-251. Encyclopedia of Plant Physiol., Springer, Berlin.

Zuber, H. and **Cogdell**, R.J. (1995) Structure and Organization of Purple Bacterial Antenna Complexes. In: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria (Blankenship, R.E., Madigan, M.T., Baur, C.D., Hrsg.), Chapter **16**, 315-348. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

ANHANG

A1 Hergestellte Mutanten mit Primersequenzen

Tabelle 37: Zusammenstellung aller Domänentauschmutanten mit zugehörigen Primern. Ist für die 1. PCR nur ein Primer angegeben, wurde zusätzlich der entsprechende WT-Gegenprimer (vorwärts bzw. rückwärts) verwendet. Gegenprimer für die 2. PCR war immer das Produkt der 1. PCR. Ein Klon mit zwei mutierten Bereichen entstand durch Verwendung einer bereits einfach mutierten Matrizen-DNA, weshalb diese Klone nicht noch einmal aufgelistet wurden. Alle Primer sind in 5'-3'-Richtung dargestellt.

Klon	Primer Domänentauschmutanten
Lhca1-WT	a1-At-dXho-fw: GGA CCC CAA GAA GCT GGA GGA ATT GAA AG Lhca1-At-fw: TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATG ATG GCT GCT CAC TGG ATG C Lhca1-At-rv+his: GCT AGT CTC GAG GTT GAA AGG GAT AAC AAT ATC Lhca1-At-rv-his: GCT AGT CTC GAG TCA TTA GTT GAA AGG GAT AAC AAT ATC
Lhca4-WT	Lhca4-At-fw: CAA GGT TCA TAT GAA GAA AGG AGA ATG GTT GCC Lhca4-At-rvll+his: GCT AGT CTC GAG GTT GAA GGT TTG GAC AAT AG
Lhcb1-WT	Lhcb1-At-fw: CGT GTG CAT ATG AGG AAG ACT GTT GCC Lhcb1-At-rv+his: GCT AGT CTC GAG CTT TCC GGG AAC AAA GTT GG
Lhcb4-WT	Lhcb4-At-fw: CGG TCC CAT ATG GTG TTC GGT TTC GG Lhcb4-At-rv+his: GCT AGT CTC GAG AGA TGA GGA GAA GGT ATC G
Lhca4-Nb1	1. PCR a: Lhca4-N-blunt-rv: ATC CTC TGC TAG ACC CAA CGG GTC 1. PCR b: Lhcb1-blunt-H1-fw: CCC GAG ACA TTC GCA AGG AAC CGT GAG C
Lhca4-Nb4	1. PCR a: Lhca4-N-blunt-rv: ATC CTC TGC TAG ACC CAA CGG GTC 1. PCR b: Lhcb4-blunt-H1-fw: GTG TTC GGA ATC CAG AGA TTC AGG
Lhcb1-Na4	1. PCR: Lhcb1-N-ÜH-a4-rev: GAC GAA CCA TTT CAA GTT CTC TGG GTC AGC GGA TAG ACC AGC TGT G
Lhcb1-Nb4	1. PCR: Lhcb1-N-ÜH-b4-rev: CCT GAA TCT CTG GAT TCC GAA CAC GTC AGC GGA TAG ACC AGC TGT G
Lhcb4-Na4	1. PCR: Lhcb4-N-ÜH-a4-rev: GAC GAA CCA TTT CAA GTT CTC TGG CTC ACT GTA CGG CTG AAA CGG
Lhcb4-Nb1	1. PCR: Lhcb4-N-ÜH-b1-rev: CAC GGT TCC TTG CGA ATG TCT CGG GCT CAC TGT ACG GCT GAA ACG
Lhca4-Cb1	Lhca4-C-ÜHb1-fw: GGA TTC TTC GTT CAA GCC ATC GTG ACT GGA AAA GGA CCA TTT GAG
Lhca4-Cb4	Lhca4-C-ÜHb4-fw: GGA TTC GCG GTT CAA GCG GCT GTG ACT GGA AAA GGA CCA TTT GAG
Lhcb1-Ca4	Lhcb1-C-ÜHa4-fw: GGG TTT GTG GTT CAA CAC AAT GTC ACT GGT AAG GGA CCG ATA GAG
Lhcb1-Cb4	Lhcb1-C-ÜHb4-fw: GGA TTC GCG GTT CAA GCG GCT GTC ACT GGT AAG GGA CCG ATA GAG
Lhcb4-Ca4	Lhcb4-C-ÜHa4-fw: GGG TTT GTG GTT CAA CAC AAT GCA ACA GGT AAA GGT CCA CTC AAC
Lhcb4-Cb1	Lhcb4-C-ÜHb1-fw: GGA TTC TTC GTT CAA GCC ATC GCA ACA GGT AAA GGT CCA CTC AAC
Lhca4-LLb1	1. PCR: H1a4-LLb1-rev: CCA AAC TGC CTC TCC AAA CTT GAC TCC GAT CTT GGT GAA AAC TTC CG TC 2. PCR: LLb1-H2a4-rev: GAT CAC GAA CAA TGT CGA CGA CGA CTG AGC GTG AAC CAA GCT AGG GTT
Lhca4-LLb4	1. PCR: H1a4-LLb4-rev: CTC CAC CTT GCC AGC GTC TTG CCA TCC GAT CTT GGT GAA AAC TTC CG GG 2. PCR: LLb4-H2a4-rev: GAT CAC GAA CAA TGT CGA CGA CGA GAA AGG TAA TGG CTG CCC CAA GTA
Lhcb1-LLa4	1. PCR: H1b1-LLa4-rev: GTA CCA CTC AGG AAC ATT TAT GAT TCC GTT CCT GGC CAA AAG CTC AGG C 2. PCR: LLa4-H2b1-rev: GTG TGG CCC AAA TGG CCA AAA TGC TTG CAA AAT ACT GCT CTT TCC CAG
Lhcb1-LLb4	1. PCR: H1b1-LLb4-rev: CTC CAC CTT GCC AGC GTC TTG CCA TCC GTT CCT GGC CAA AAG CTC AGG AG 2. PCR: LLb4-H2b1-rev: GTG TGG CCC AAA TGG CCA AAA TGC TGA AAG GTA ATG GCT GCC CCA AGT
Lhcb4-LLa4	1. PCR: H1b4-LLa4-fw: CGT CGA ATG GCT TAC CGG CGT TAC AAT CAT AAA TGT TCC TGA GTG GTA C 2. PCR: LLa4-H2b4-fw: GCT GGG AAA GAG CAG TAT TTT GCA TCG ATC TCG ACA TTG ATA TGG ATC G
Lhcb4-LLb1	1. PCR: H1b4-LLb1-fw: CGT CGA ATG GCT TAC CGG CGT TAC AGT CAA GTT TGG AGA GGC AGT TTG G TC 2. PCR: LLb1-H2b4-fw: GAA ACC CTA GCT TGG TTC ACG CTC AGT CGA TCT CGA CAT TGA TAT GGA
Lhca4-SLb1	1. PCR: H2a4-SLb1-fw: CAT TAC GTT GAG ATC AGA CGG TGG GCA GGA AAT GGG CCA TTG GGA GAG G 2. PCR: SLb1-H3a4-fw: GAC CCA TTG GGT TTG GCT ACC GAC CCT ACG CAA GAG GCC AAG GAG AAA
Lhca4-SLb4	1. PCR: H2a4-SLb4-fw: CAT TAC GTT GAG ATC AGA CGG TGG GCC GAG CTT GAT TCG GAG AAG CG G 2. PCR: SLb4-H3a4-fw: GAC CCG CTA GGT TTA GCG GCT GAC CCT ACG CAA GAG GCC AAG GAG AAA
Lhcb1-SLa4	1. PCR: H2b1-SLa4-fw: GGA GCC GTT GAA GGT TAC AGA GTC CAA GAC ATC AAG AAC CCA GGA AGT G 2. PCR: SLa4-H3b1-fw: GAA TCT TTA ACC CGC TTA ACT TTG CTC CAG AGG CCT TCG CTG AGT TG

Lhcb1-SLb4	1.PCR: H2b1-SLb4-fw: GGA GCC GTT GAA GGT TAC AGA GTC GCC GAG CTT GAT TCG GAG AAG CG 2. PCR: SLb4-H3b1-fw: GAC CCG CTA GGT TTA GCG GCT GAC CCA GAG GCC TTC GCT GAG TTG AAG G
Lhcb4-SLa4	1.PCR: H2b4-SLa4-fw: GGC TAC ATC GAG TTC CAG CGC AAC CAA GAC ATC AAG AAC CCA GGA AGT G 2. PCR: SLa4-H3b4-fw: GAA TCT TTA ACC CGC TTA ACT TTG CTC CGG AGA AGA CTG CTC AAC TTC
Lhcb4-SLb1	1.PCR: H2b4-SLb1-fw: GGC TAC ATC GAG TTC CAG CGC AAC GCA GGA AAT GGG CCA TTG GGA GAG 2. PCR: SLb1-H3b4-fw: GAC CCA TTG GGT TTG GCT ACC GAC CCG GAG AAG ACT GCT CAA CTT CAG
Lhca1-H2a4	1. PCR: LLa1-H2a4-fw: CTT GGG AAA CCC AGT CCC GTG GGG TTC GTC GTC GAC ATT GTT CGT GAT C 2. PCR: H2a4-SLa1-fw: CAT TAC GTT GAG ATC AGA CGG TGG ATG GAG AAA GAC CCT GAG AAG AAG
Lhca4-H2b1	LLa4-H2b1-fw: GCT GGG AAA GAG CAG TAT TTT GCA AGC ATT TTG GCC ATT TGG GCC H2b1-SLa4-rv: CAC TTC CTG GGT TCT TGA TGT CTT GGA CTC TGT AAC CTT CAA CGG C
Lhca4-H2b4	LLa4-H2b4-fw: GCT GGG AAA GAG CAG TAT TTT GCA TCG ATC TCG ACA TTG ATA TGG H2b4-SLa4-rv: CAC TTC CTG GGT TCT TGA TGT CTT GGT TGC GCT GGA ACT CGA TGT AG
Lhcb1-H2a4	LLb1-H2a4-fw: GAA ACC CTA GCT TGG TTC ACG CTC AGT CGT CGT CGA CAT TGT TCG TG H2a4-SLb1-rv: CTC TCC CAA TGG CCC ATT TCC TGC CCA CCG TCT GAT CTC AAC GTA ATG
Lhcb1-H2b4	LLb1-H2b4-fw: GAA ACC CTA GCT TGG TTC ACG CTC AGT CGA TCT CGA CAT TGA TAT GG H2b4-SLb1-rv: CTC TCC CAA TGG CCC ATT TCC TGC GTT GCG CTG GAA CTC GAT GTA GCC
Lhcb4-H2a4	LLb4-H2a4-fw: CTA CTT GGG GCA GCC ATT ACC TTT CTC GTC GTC GAC ATT GTT CGT G H2a4-SLb4-rv: CGC TTC TCC GAA TCA AGC TCG GCC CAC CGT CTG ATC TCA ACG TAA TG
Lhcb4-H2b1	LLb4-H2b1-fw: CTA CTT GGG GCA GCC ATT ACC TTT CAG CAT TTT GGC CAT TTG GGC C H2b1-SLb4-rv: CGC TTC TCC GAA TCA AGC TCG GCG ACT CTG TAA CCT TCA ACG GC
Lhca1-a4 Total	LLa1-5LLa4-fw: GGA AAC TGG GTT AAG GCT CAG GAA GAG CAG TAT TTT GCA TCG TCG TCG AC SLa4-H3a1-rv: CTT TCA ATT CCT CCA GCT TCT TGG GAG CAA AGT TAA GCG GGT TAA AG
Lhca1-a4 Partiiell	LLa1-5LLa4-fw: GGA AAC TGG GTT AAG GCT CAG GAA GAG CAG TAT TTT GCA TCG TCG TCG AC 21SLa4-SLa1-rv: CCG GGT ACT TCT TCT TCT CAG GTA AGC TGT ATT GCT TAA AGA TAG G
Lhca4-b1 Total	LLa4-20LLb1-fw: CCT GAG TGG TAC GAT GCT GGG AAA CAG ATC TTC AGC GAT GGA GGG CTC G SLb1-H3a4-rv: CTT TCT CCT TGG CCT CTT GCG TAG GGT CGG TAG CCA AAC CCA ATG GGT C
Lhca4-b1 Partiiell	LLa4-20LLb1-fw: CCT GAG TGG TAC GAT GCT GGG AAA CAG ATC TTC AGC GAT GGA GGG CTC G 8SLb1-SLa4-rv: CCA GGG TAA CCA ACT TCA CCC TTC TCT CCC AAT GGC CCA TTT CCT GC
Lhcb1-a4 Total	LLb1-5LLa4-fw: CAG TTT GGT TCA AGG CTG GTT CAG AGC AGT ATT TTG CAT CGT CGT CGA C SLa4-H3b1-rv: CTT CAA CTC AGC GAA GGC CTC TGG AGC AAA GTT AAG CGG GTT AAA G
Lhcb1-a4 Partiiell	LLb1-5LLa4-fw: CAG TTT GGT TCA AGG CTG GTT CAG AGC AGT ATT TTG CAT CGT CGT CGA C 21SLa4-SLb1-rv: CGG GGT AAA GCA AGT CCT CGG CAG GTA AGC TGT ATT GCT TAA AGA TAG
Lhcb4-b1 Total	LLb4-20LLb1-fw: GTT ACA TGG CAA GAC GCT GGC AAG CAG ATC TTC AGC GAT GGA GGG CTC G SLb1-H3b4-rv: CTG AAG TTG AGC AGT CTT CTC CGG GTC GGT AGC CAA ACC CAA TGG GTC
Lhcb4-b1 Partiiell	LLb4-20LLb1-fw: GTT ACA TGG CAA GAC GCT GGC AAG CAG ATC TTC AGC GAT GGA GGG CTC G 8SLb1-SLb4-rv: CTC CGG GGT ATA AAC GCT TCT CCG ACT CTC CCA ATG GCC CAT TTC CTG C
Lhcb4-a4 Total	LLb4-5LLa4-fw: GTT ACA TGG CAA GAC GCT GGC AAG GAG CAG TAT TTT GCA TCG TCG TCG AC SLa4-H3b4-rv: CTG AAG TTG AGC AGT CTT CTC CGG AGC AAA GTT AAG CGG GTT AAA G
Lhcb4-a4 Partiiell	LLb4-5LLa4-fw: GTT ACA TGG CAA GAC GCT GGC AAG GAG CAG TAT TTT GCA TCG TCG TCG AC 21SLa4-SLb4-rv: CCG GGG TAT AAA CGC TTC TCC GAA GGT AAG CTG TAT TGC TTA AAG ATA G

Tabelle 38: Auflistung aller Punkt- und Bereichsmutanten mit zugehörigen Primern. Ist für die 1. PCR nur ein Primer angegeben, wurde zusätzlich der entsprechende WT-Gegenprimer (vorwärts bzw. rückwärts) verwendet. Gegenprimer für die 2. PCR war immer das Produkt der 1. PCR. Ein Klon mit zwei mutierten Bereichen entstand durch Verwendung einer bereits einfach mutierten Matrizen-DNA, weshalb diese Klone nicht noch einmal aufgelistet wurden. Alle Primer sind in 5'-3'-Richtung dargestellt.

Klone	Primer Punkt- und Bereichsmutanten
Lhca4-S86-88Y	Lhca4-II-86+87+88-rv: GAG TAC TTT GCA GAC AAT TAC ACC CTG TTT GTG ATC GAG TTC a4-AT-86-88-rv: CAC GAA CAA TGT GTA GTT GTC TGC CCA ATA CGT GTA TG
Lhca4-S86-88D	Lhca4-86-88-rv: GAT CAC AAA CAG GGT GTC GTC GTC TGC AAA GTA CTC TG
Lhca4-I93-96A	Lhca4-93-96-rv: CGT AGT GGA ACA AGG CCA TCT CGA GCA CAA AGA GGG TGG
Lhca4-F98-103H	Lhca4-98-103-rv: GAT CGA GTT CAT CTT GAT GGG CTT CGC CGA GCA CAG AAG GTG GCA AGA C
Lhca4-K80-84W	a4-LL-K80-84W-rv: GTC GAC GAC GAT GCC CAA TAC GTG TAT GTC CCA GCA TCG TAC C
Lhca4-K80T+E81Y	a4-LL-K80+81Y-rv: CGA TGC AAA ATA CTG GTA TGT CCC AGC ATC GTA CC
Lhca4-K80T	a4-LL-K80T-rv: GCA AAA TAC TGC TCT GTC CCA GCA TCG TAC
Lhca4-E81Y	a4-LL-E81Y-rv: CGA TGC AAA ATA CTG GTA TTT CCC AGC ATC
Lhca4-Q82T	a4-LL-Q82T-rv: CGA CGA TGC AAA ATA CGT CTC TTT CCC AGC
Lhca4-F84W	a4-LL-F84W-rv: GTC GAC GAC GAT GCC CAA TAC TGC TCT TTC CC
Lhca4-S86D	Lhca4-S86D-rv: GGG TGG ATG AGT CTG CAA AGT ACT C
Lhca4-S87D	Lhca4-S87N-rv: CAA ACA GGG TGG AGT CTG ATG CAA AGT AC
Lhca4-S88D	Lhca4-S88Y-rv: CAC AAA CAG GGT GTC TGA TGA TGC AAA G
Lhca4-F95M	Lhca4-F95M-rv: GTG GAA CAA GAT CAT CTC GAT CAC AA
Lhca4-F98M	Lhca4-F98M-rv: CGA GTT CAT CTT GAT GCA CTA CGT CGA G
Lhca4-H99G	Lhca4-H99G-rv: CAT CTT GTT CGG CTA CGT CGA GAT C
Lhca4-Y100F	Lhca4-Y100F-rv: CTT GTT CCA CTT CGT CGA GAT CAG
Lhca4-V101A	Lhca4-V101A-rv: CCA CTA CGC CGA GAT CAG AAG G
Lhca4-W106F	Lhca4-W106F-rv: GAT CAG AAG GTT CCA AGA CAT TAA G
Lhca4-H2a3-86-88	a4-H2a3-rv-D86-88S-rv: GAA CAA ACA ATG TGG AAG AGG ATG CAA AGT ATT CGA ACT TGC C
Lhca4-H2a3-99-103	Lhca4-H2a3-II-Motiv-rv: GGC ACT CAT GCA CTA TGT TGA GAT CAG ACG CTG GCA AGA CAT TAA G
Lhca4-I109W+K110Y	a4-SL-I109+110Y-fw: GAC GGT GGC AAG ACT GGT ATA ACC CAG GAA GTG TG
Lhca4-V115-118Q	a4-V115-118Q-fw: CCA GGA AGT ATG GGC AAA CAG CCT ATC TTT AAG CAA TAC
Lhca4-P119-122G	a4-Q119-122G-fw: GTG AAC CAA GAC TAT TTC CTT GGG CAA TAC AGC TTA CC
Lhca4-V115-122G	a4-V115-122G-fw: CCA GGA AGT ATG GGC AAA CAG TAT TTC CTT GGG CAA TAC AGC TTA CC
Lhca4-SLb1-A107-112P	a4SLb1-A107-111P-fw: GAG ATC AGA CGG TGG CAA GAC ATT AAG AAC CCG GGA GAG GCC GAG GAC

A2 Proteinsequenzalignments mehrerer Arten

Lhca1

[illegible][illegible][illegible]

Consensus

[illegible]

	702	710	720	730	740	750	760	770	780	790
<i>Arabidopsis thaliana</i>		S								N
<i>Helianthus annuus</i>		G	T					E		
<i>Hordeum vulgare</i>	M									
<i>Lulium temulentum</i>	M									
<i>Solanum lycopersicum</i>	A									
<i>Malus x domestica</i>	S	G								
<i>Nicotiana benthamiana</i>	A									
<i>Oryza sativa</i>		X								
<i>Petunia hybrida</i>		X								
<i>Pinus abies</i>		X	A		N					
<i>Pinus sylvestris</i>		T	X	S						
<i>Pinus taeda</i>		T	X							
<i>Pisum sativum</i>			X	S						
<i>Solanum tuberosum</i>										
<i>Zea mays</i>	M		G	I	N	G				

[illegible]

Consensus

[illegible][illegible][illegible]

Consensus

[illegible]

Consensus	90	100	110	120	130	140	150	160	170
<i>Malus x domestica</i>			V						
<i>S. lycopersicum cab 11</i>	R				L		A		
<i>S. lycopersicum cab 12</i>	R	I			L	S	S		
<i>Arabidopsis thaliana</i>				K	L	G			
<i>Helianthus annuus</i>						E			
<i>Solanum tuberosum</i>		I			L		S		
<i>Zea mays</i>	R	Y		I	J	G	S		
<i>Nicotiana tabacum</i>			V		J	C	E		
<i>Oryza sativa</i>		R			J	A	T		
<i>Pinus sylvestris</i>	S	Y			J	G	V		
<i>Pisum sativum</i>	R			J	L	A	E	S	

Consensus	P	E	L	E	K	X	S	L	P	a	n	e	v	G	P	g	i	n	F	L	n	e	a	p	:	X	E	A	K	E	K	E	I	A	N	G	R	L	A	M	L	A	F	L	a	F	i	V	G	H	N	V	i	a	G	P	F	D	I	N	L	C	H	I	S	D	R	M	H	N	T	I	I	G	T	I	a	G	X																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
Morus x domestica	C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							</

[illegible][illegible]

Consensus	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
-----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Consensus	X Y P S G A F D P L G L A D P e i a E K N K E I K N S P L A I S N E E F F C A I N T E X P I E N L I D H X A D P V A N N A S A T I V E P S K
-----------	--

[illegible]

	00	10	20	30	40	50	60	70	80	90
A. thaliana 2.1	-	-	T	-	-	-	V	-	I	-
A. thaliana 2.2	-	-	T	-	-	-	V	-	I	-
A. thaliana 2.3	-	-	T	-	-	-	O	-	I	-
A. thaliana 2.4	-	-	-	-	-	-	O	-	-	-
Hellianthus paradoxus	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-
Hordeum vulgare	R	-	-	I	-	V	O	-	-	-
S. lycopersium	R	-	-	-	-	V	O	-	-	-
Maltus x domestica	R	-	-	-	-	V	O	-	-	-
Nicotiana benhamiana	R	-	G	-	-	S	-	-	-	-
Oryza sativa	R	-	-	-	-	V	-	J	-	-
Pisum sativum	R	-	T	-	-	V	T	-	-	-
Solanum tuberosum	R	-	J	E	-	-	O	-	-	-
Zea mays	R	-	-	-	-	-	S	-	-	-
Prunus persica	R	-	-	T	-	V	-	-	-	-
Gossypium hirsutum	-	S	-	-	-	V	O	-	-	-
Pinus taeda	-	G	J	-	-	V	O	J	-	-

[illegible]

Consensus

A. thaliana	-	-	MAS	T	E	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-------------	---	---	-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190
A. thaliana										
Hellianthus annuus										
Hordeum vulgare	r									
S. lycopersium										
Nicotiana benthamiana										
Oryza sativa	r									
Pisum sativum										
Solanum tuberosum										
Zea mays	r									
Daucus carota										
Vigna radiata										
Brassica napus	x	i	y							

[illegible]

Contents
LEVELLING
ECRPI
IDEPR
IPGSI
XEDPI
IGLAD
OKK
!UOLAE
IKHAG
AM/SE
UJEA
CAAT
TKSP
IONW
IN
IS
DI
INT
IT
IX
DI
EX
AS

A. thaliana 4.1	-	AATSA	A	S	IAGSTRVAPG	ET	V	X	..	A	SA	KTVT							
A. thaliana 4.2	-	MAATSTA	S	IAGTRVAPG	IS	N	S	ET	T	..	AS	.A	KTIVS	E	S				
A. thaliana 4.3	-	M TTT	A	GIF I IC	P	RPGT	VC	SESK	PAP	P	SCVQDGS	LV	E	N	M	MI	F		
Hellianthus annuus	-	LITIM SST	S	FIIG V	P	LH N	VT	X	..	Ap Ap	XATXILTS								
S. lycopersium	-	M T	T	S IT	P	EH G	VC	G	..	A	AA KQIP								
Matis x domestica	-	ATT A A	S	FIIGRLPT	AV	N	VC	.	..	TKK	XT ETEF					M			
N. benthamiana	-	LTLA M T	T	S IT	MEIH GA	VC		.	..	A	AP PQIP								
Oryza sativa	-	M SSV	A	T L T	A PAPC	IV				GG	XAA X	AAQSAFT	E	V	D				
Solanum tuberosum	-	M T	T	S I T	P	EH GA	VC			A	AA KQIP					S			
Zea mays	-	M SSV	A	T L T	A PAPCN	IV				LGG	A P	VA TSTS	E	V	D				
Vigna radiata	-	MAT T T	T	S M T	L AH G	IC				X AP	KVS KGS					M			
Pinus taeda	-	QLXAEKNVSR	IYAR	SFGG	KKKAKAAVAP	KSKXTA	AP	.	..	SK	EXE	PAP	G	L					

Consensus	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	193
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T										

[illegible]

Consensus: **EGAEYNT+NGCIIQK+TPGCPGEOGLA+QDCAI+XWEI+NGRLAF+IIGED+CAVTE+SPVENL+X+HUSOEGNNILTMV+X+GER+ET**

[illegible][illegible]

	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	295
A. thaliana											A T A
Helianthus annuus	I	E	G	E		A		X	S	N I V	A
Hordeum vulgare		E F D		T			C		C A	S A V S	
S. lycopersium	I				I		D		A	G A S V	
Malus x domestica		E						S X	S X	C S I A	
N. benthamiana					I	A	L		A	A T A	
Oryza sativa	I			S				X	S X	S A T S	
S. tuberosum	I				I				A	C A S V	
Zea mays				S				X	X	A T S	
Brassica juncea		E	G		I			S X	X	A T A	
Pinus sylvestris	A	N E D					L	A		L G S L A	
Consensus	IGGAETYYRIIT	NSGLDIDEDIKLHPSGPFDPILQILA	KPDICAAIILNWKELLKNGRLAFAF	MIOGFII	CAVYTGSGSPVENLS	XHLSDPFGSNLLTMIIX	GAERXP	PILL			

Consensus

	10	20	30	40	50	60	70	80
A. thaliana	-	M	V	S	G	-	-	-
Hellianthus annuus	-	A	T	S	T	-	-	-
Hordeum vulgare	-	-	M	A	L	A	S	T
S. lycopersicum	-	T	S	A	T	-	-	-
Malus x domestica	-	T	G	A	V	L	N	G
N. benthamiana	-	M	T	S	A	-	-	-
Oryza sativa	-	-	-	M	A	L	A	S
S. tuberosum 6.1	-	T	S	A	-	-	-	-
S. tuberosum 6.2	-	M	T	S	A	-	-	-
Zea mays	-	-	M	A	R	A	H	R
Brassica rapa	-	-	V	T	E	-	-	-
Vigna radiata	-	A	T	S	G	-	-	-
Spinacia oleracea	A	-	S	A	T	I	V	-

[illegible]

Consensus	180	190	200	210	220	230	240	250	260
<i>A. thaliana</i>		Y	D						
<i>Helianthus annuus</i>		Y		G	K				
<i>Hordeum vulgare</i>	R	E		G	I				
<i>S. lycopersicum</i>		E		G	T				
<i>Malus x domestica</i>		S		G	L				
<i>N. benthamiana</i>		S		G	S				
<i>Oryza sativa</i>	C	E		G	L				
<i>S. tuberosum</i> 6.1	R	Q		G	T				
<i>S. tuberosum</i> 6.2		S		G	R				
<i>Zea mays</i>		E		A	L				
<i>Brassica rapa</i>	R	E		A	L				
<i>Vigna radiata</i>	R	Y	D	G	S				
<i>Spinacia oleracea</i>	R	S		G	I				

Consensus	
MATPNSKTAENFANXTGAGGYPGGKFFDPLXIAG:XXdgyxPDIEKLRLIKIELKHRIIAIALLIFVEAAGGKTPLGALGLD	

A3 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen von Arabidopsisproteinen

Lhca4

NdeI

HisMetLysLysGlyGluTrpLeuProGlyLeuAlaSerProAspTyrLeuThrGlySerLeuAlaGlyAspAsn
CATATGAAGAAAGGAGAATGGTTGCCCGGTTTGGCATCGCCTGATTATCTCACCGGCAGTCTTGCCGGTGACAAAT
 * * 25 * * 50 * * 75

DpnI

GlyPheAspProLeuGlyLeuAlaGluAsp**ProGluAsnLeuLysTrpPheValGlnAlaGluLeuValAsnGly**
 GGGTTTGACCCGTTGGGTCTAGCAGAG**GATC**CAGAGAACTTGAAATGGTTCGTCCAGGCAGAGCTGGTCAACGGA
 * * 100 * * 125 * * 150

DpnI

ArgTrpAlaMetLeuGlyValAlaGlyMetLeuLeuProGluValPheThrLysIleGlyIleIleAsnValPro
CGATGGGCTATGCTCGGTGTCGCTGGGATGCTTTTGCCGGAAGTTTTCCACCAAGATCGGAATCATAAATGTTCCCT
 * * 175 * * 200 * * 225

SalI **DpnI**

GluTrpTyrAspAlaGlyLysGluGlnTyrPheAla**SerSerSerThrLeuPheValIleGluPheIleLeuPhe**
 GAGTGGTACGATGCTGGGAAAGAGCAGTATTTTGCAT**TCGTCGTCGACATTGTTTCGTGATCGAGTT**CATATTGTTT
 * * 250 * * 275 * * 300

DpnI

HisTyrValGluIleArgArgTrpGlnAspIleLysAsnProGlySerValAsnGlnAspProIlePheLysGln
CATTACGTTGAGATCAGACGGTGGCAAGACATCAAGAACCCAGGAAGTGTGAACCAAGACCCTATCTTTAAGCAA
 * * 325 * * 350 * * 375

TyrSerLeuProLysGlyGluValGlyTyrProGlyGlyIlePheAsnProLeuAsnPheAla**ProThrGlnGlu**
 TACAGCTTACCTAAGGGTGAAGTTGGTTACCCTGGTGAATCTTTAACCGCTTAACCTTTGCT**CCTACGCAAGAG**
 * * 400 * * 425 * * 450

AlaLysGluLysGluLeuAlaAsnGlyArgLeuAlaMetLeuAlaPheLeuGlyPheValValGlnHisAsnVal
GCCAAGGAGAAAGAGCTAGCAAACGGGAGGTTGGCGATGTTGGCATTCTTAGGGTTTGTGGTTCAACACAATGTG
 * * 475 * * 500 * * 525

ThrGlyLysGlyProPheGluAsnLeuLeuGlnHisLeuSerAspProTrpHisAsnThrIleValGlnThrPhe
 ACTGGAAAAGGACCATTGAGAATCTGTTGCAGCACTTGTCTGACCCATGGCACAACACTATTGTCCAAACCTTC
 * * 550 * * 575 * * 600

XhoI Vektorsequenz

AsnLeuGluHisHisHisHisHisHis *
 AAC**CTCGAGCACCACCACCACC**ACTAA
 * * 625 *

Lhcb1

NdeI | | **DpnI**
 HisMetArgLysThrValAlaLysProLysGlyProSerGlySerProTrpTyrGlySerAspArgValLysTyr
CATATCAGGAAGACTGTTGCCAAGCCAAAGGTCCATCAGGCAGCCCATGGTACGG**GATC**CGACCGAGTCAAGTAC
 * * 25 * * 50 * * 75
 LeuGlyProPheSerGlyGluSerProSerTyrLeuThrGlyGluPheProGlyAspTyrGlyTrpAspThrAla
 TTGGGTCCATTCTCTGGCGAGTCACCCAGCTACCTTACCGGAGAGTTCCTTGAGACTACGGATGGGACACAGCT
 * * 100 * * 125 * * 150
 GlyLeuSerAlaAsp**ProGluThrPheAlaArgAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAlaMetLeu**
 GGTCATCCGCTGAC**CCCAGACATTCGCAAGGAACCGTGAGCTAGAAAGTTATCCACAGCAGGTGGGCCATGCTC**
 * * 175 * * 200 * * 225
GlyAlaLeuGlyCysValPheProGluLeuLeuAlaArgAsnGlyValLysPheGlyGluAlaValTrpPheLys
GGAGCCCTAGGCTGCGTCTTCCCTGAGCTTTTGCCAGGAACGGAGTCAAGTTTGAGAGGCAGTTTGGTTCAAG
 * * 250 * * 275 * * 300
 | **DpnI**
 AlaGlySerGlnIlePheSerAspGlyGlyLeuAspTyrLeuGlyAsnProSerLeuValHisAlaGln**SerIle**
 GCTGGTTCACAG**GATC**TTTCAGCGATGGAGGGCTCGATTACTTGGGAAACCCTAGCTTGTTTCACGCTCAG**AGCATT**
 * * 325 * * 350 * * 375
 | **SfiI**
LeuAlaIleTrpAlaThrGlnValIleLeuMetGlyAlaValGluGlyTyrArgValAlaGlyAsnGlyProLeu
TTGGCCATTTGGGCCACACAAGTTATTTTGATGGGAGCCGTTGAAGGTTACAGAGTCGCAGGAAATGGGCCATTG
 * * 400 * * 425 * * 450
 GlyGluAlaGluAspLeuLeuTyrProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaThrAsp**ProGluAlaPhe**
 GGAGAGCCGAGGACTTGCTTTACCCGGTGGCAGTTTCGACCCATTGGGTTTGCTACCGAC**CCAGAGGCCCTTC**
 * * 475 * * 500 * * 525
AlaGluLeuLysValLysGluLeuLysAsnGlyArgLeuAlaMetPheSerMetPheGlyPhePheValGlnAla
GCTGAGTTGAAGGTAAAGGAGCTCAAGAACGGAAGATTGGCTATGTTCTCTATGTTTGGATTCTTCGTTCAAGCC
 * * 550 * * 575 * * 600
 | **DpnI**
IleValThrGlyLysGlyProIleGluAsnLeuAlaAspHisLeuAlaAspProValAsnAsnAsnAlaTrpAla
ATCGTCACTGGTAAGGGACCGATAGAGAACCTTGCTGACCATTGGCCGATC**CAGTCAACAACAACGCTTGGGCC**
 * * 625 * * 650 * * 675
 | **XhoI** | Vektorsequenz |
 PheAlaThrAsnPheValProGlyLysLeuGluHisHisHisHisHisHis *
 TTTGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAG**CTCGAG****CACCACCACCACCACCACTAA**
 * * 700 * * 725

Lhcb4

NdeI
 |
 HisMetValPheGlyPheGlyLysLysLysAlaAlaProLysLysSerAlaLysLysThrValThrThrAspArg
CATATGGTGTTTCGGTTTTCGGAAGAAGAAGGCAGCTCCCAAAAAGAGTGCCAAAAGACGGTGACTACGGACCGG
 * * 25 * * 50 * * 75

ProLeuTrpTyrProGlyAlaIleSerProAspTrpLeuAspGlySerLeuValGlyAspTyrGlyPheAspPro
 CCTCTTTGGTACCCAGGCGCCATTTCTCTGACTGGCTTGATGGTTCCTTGGTTGGAGATTACGGTTTT**GATCCC**
 * * 100 * * 125 * * 150

PheGlyLeuGlyLysProAlaGluTyrLeuGlnPheAspIleAspSerLeuAspGlnAsnLeuAlaLysAsnLeu
 TTCGGTTTAGGCAAACCGGCCGAGTATCTTCAATTCGATATCGATTCACTAGACCAGAATCTGGCTAAGAACTTG
 * * 175 * * 200 * * 225

DpnI
 |
 AlaGlyAspValIleGlyThrArgThrGluAlaAlaAspAlaLysSerThrProPheGlnProTyrSerGlu**Val**
 GCGGAGACGT**GATC**GGAACCCGTACGGAAGCTGCCGACGCCAAATCGACGCCGTTTACGCCGTACAGTGAG**GTG**
 * * 250 * * 275 * * 300

PheGlyIleGlnArgPheArgGluCysGluLeuIleHisGlyArgTrpAlaMetLeuAlaThrLeuGlyAlaLeu
TTCGGAATCCAGAGATTACGGGAATGCGAACTCATCCACGGACGGTGGGCGATGCTCGCTACTCTCGGCGCTCTC
 * * 325 * * 350 * * 375

SerValGluTrpLeuThrGlyValThrTrpGlnAspAlaGlyLysValGluLeuValAspGlySerSerTyrLeu
TCCGTCGAATGGCTTACCGGCGTTACATGGCAAGACGCTGGCAAGGTGGAGCTTGATAGTG**GATC**GTCTCTACTTG
 * * 400 * * 425 * * 450

DpnI **DpnI** **DpnI**
 | | |
 GlyGlnProLeuProPhe**SerIleSerThrLeuIleTrpIleGluValLeuValIleGlyTyrIleGluPheGln**
 GGGCAGCCATTACCTTT**TCGATCTCGACATTGATATGGATCGAGGTGTTAGTGATCGGCTACATCGAGTTCCAG**
 * * 475 * * 500 * * 525

ArgAsnAlaGluLeuAspSerGluLysArgLeuTyrProGlyGlyLysPhePheAspProLeuGlyLeuAlaAla
CGCAACGCCGAGCTTGATTCCGAGAAGCGTTTATACCCCGGAGGCAAGTTCTTTGACCCGCTAGGTTTAGCGGCT
 * * 550 * * 575 * * 600

DpnI
 |
 Asp**ProGluLysThrAlaGlnLeuGlnLeuAlaGluIleLysHisAlaArgLeuAlaMetValAlaPheLeuGly**
 GAC**CCGGAGAAGACTGCTCAACTTCAGTTAGCTGAGATCAAGCATGCACGCTTGCGATGGTCGCCTTCTTGGGA**
 * * 625 * * 650 * * 675

DpnI
 |
PheAlaValGlnAlaAlaAlaThrGlyLysGlyProLeuAsnAsnTrpAlaThrHisLeuSerAspProLeuHis
TTTCGGGTTCAAGCGGCTGCAACAGGTAAAGGTCCACTCAACAATTGGGCTACTCACCTCAGT**GATCC**ACTCCAC
 * * 700 * * 725 * * 750

XhoI Vektorsequenz
 | |
 ThrThrIleIleAspThrPheSerSerSerLeuGluHisHisHisHisHisHis *
 ACCACCATCATCGATACCTTCTCTCAT**CTCTCG**AGCACCACCACCACCACCACTAA

Lhca1**NdeI**

HisMetAlaAlaHisTrpMetProGlyGluProArgProAlaTyrLeuAspGlySerAlaProGlyAspPheGly
CATATGGCTGCTCACTGGATGCCTGGCGAGCCACGACCAGCTTACCTTGACGGTTCTGCTCCTGGTGACTTTGGG
 * * 25 * * 50 * * 75

 PheAspProLeuGlyLeuGlyGluVal**ProAlaAsnLeuGluArgTyrLysGluSerGluLeuIleHisCysArg**
 TTTGACCCACTTGGACTTGGAGAAGTT**CCAGCGAACCTTGAGAGATACAAAGAGTCAGAGCTCATCCACTGTAGA**
 * * 100 * * 125 * * 150

TrpAlaMetLeuAlaValProGlyIleLeuValProGluAlaLeuGlyTyrGlyAsnTrpValLysAlaGlnGlu
TGGGCTATGCTCGCTGTTCTCTGGGATTTTGGTACCAGAAGCATTAGGATATGGAACTGGGTAAAGCTCAGGAA
 * * 175 * * 200 * * 225

 TrpAlaAlaLeuProGlyGlyGlnAlaThrTyrLeuGlyAsnProValProTrpGly**ThrLeuProThrIleLeu**
 TGGGCAGCACTACCAGGGGTCAAGCCACTTACTTGGGAAACCCAGTCCCGTGGGGT**ACTTTGCCACAATCTTG**
 * * 250 * * 275 * * 300

AlaIleGluPheLeuAlaIleAlaPheValGluHisGlnArgSerMetGluLysAspProGluLysLysLysTyr
GCCATTGAGTTCTTAGCCATTGCATTTGTTGAGCACCAGAGAAGTATGGAGAAAGACCCCTGAGAAGAAGAAGTAC
 * * 325 * * 350 * * 375

DpnI

ProGlyGlyAlaPheAspProLeuGlyTyrSerLysAsp**ProLysLysLeuGluGluLeuLysValLysGluIle**
 CCGGAGGGCGCATTTGACCCTCTTGATACTCGAAGGAC**CCCAAGAAGCTGGAGGAATTGAAAGTTAAAGAGATC**
 * * 400 * * 425 * * 450

LysAsnGlyArgLeuAlaLeuLeuAlaPheValGlyPheCysValGlnGlnSerAlaTyrProGlyThrGlyPro
AAGAACGGCGCGCTTGCGCTGTTGGCGTTTGTAGGATTCTGTGTGCAACAGTCGGCTTACCCGGGGACAGGACCA
 * * 475 * * 500 * * 525

DpnI**XhoI**

LeuGluAsnLeuAlaThrHisLeuAlaAspProTrpHisAsnAsnIleGlyAspIleValIleProPheAsnLeu
 TTGGAGAACTTGGAACCTCACTTGGCG**GATCC**CATGGCACAACAACATTGGCGATATTGTTATCCCTTTCAAC**CTC**
 * * 550 * * 575 * * 600

Vektorsequenz

GluHisHisHisHisHisHis *
GAGCACCACCACCACCACCACTAA
 * *

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Mainz,

Dominik Corbet