

# Der Lichtsammelkomplex LHCI-730 des Photosystems I höherer Pflanzen

Untersuchungen zur molekularen Assemblierung der  
Lichtsammelproteine Lhca1 und Lhca4 aus Gerste (*Hordeum  
vulgare*, L.) und Tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat.-

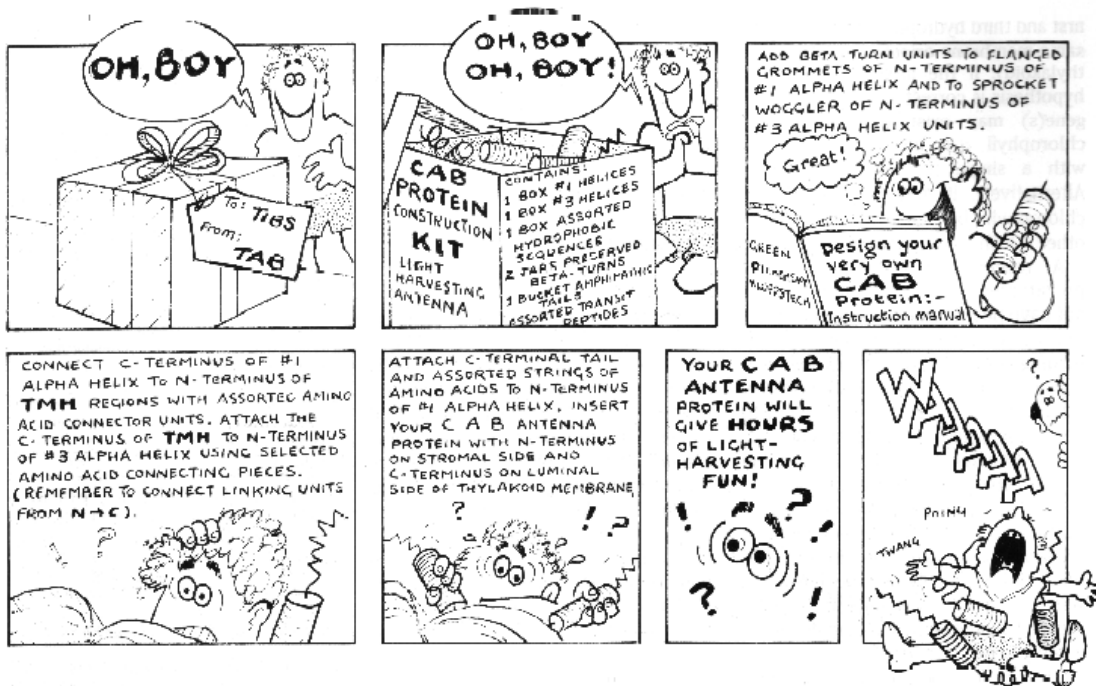
dem Fachbereich Biologie/Chemie  
der Universität Bremen vorgelegt von

Frank Klimmek

Dezember 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. L. Horst Grimme, Bremen
2. Gutachter: PD Dr. Jürgen Knötzel, Kopenhagen

Tag des öffentlichen Kolloquiums: 8. Februar 2002



aus GREEN et al. (1991)



# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Zum Stand der Forschung</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Lichtabsorption durch Pigmente</b>	<b>3</b>
2.1.1 Pigmente in photoautotrophen Organismen	4
2.1.2 Die langwellig fluoreszierenden Chlorophylle	5
2.1.3 Carotinoide	7
<b>2.2 Pigmentbindende Proteine</b>	<b>9</b>
2.2.1 Pigmentbindende Proteine der Kernkomplexe	9
2.2.2 Antennenproteine und Antennensysteme	10
2.2.3 ELIPs, LILs, HLIPs, SPCs und PsbS	11
<b>2.3 Chlorophyll a/b- bindende Proteine</b>	<b>12</b>
2.3.1 Struktur und Funktion	12
2.3.2 Biogenese	13
2.3.2.1 Expression und Translation	13
2.3.2.2 Import in Chloroplasten	14
2.3.2.3 Assemblierung	15
2.3.3 Phylogenetische Entwicklung	16
2.3.3.1 Evolution von LHC-Antennen	16
2.3.3.2 Differenzierung in LHCI und LHCII	17
2.3.4 Rekonstitution	18
<b>2.4 Das Photosystem I höherer Pflanzen</b>	<b>20</b>
2.4.1 PSI-Kern	22
2.4.1.1 Dimer und primäre Akzeptoren	23
2.4.1.2 Die innere Antenne	24
2.4.2 Organisation des LHCI	25
2.4.3 Die langwellige 77 K-Fluoreszenz des PSI	26
2.4.4 Interaktion von PSI mit LHCII	28
<b>2.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit</b>	<b>29</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Isolierung der kodierenden Sequenzen für Lhca1 und Lhca4</b>	<b>31</b>
3.1.1 Primer	31
3.1.2 PCR-Amplifikationen	31
3.1.3 Gelelektrophorese von Plasmiden und DNA-Fragmenten	32
3.1.4 Isolierung und Aufreinigung von Plasmiden und DNA-Fragmenten	32
3.1.5 Bestimmung von RNA- und DNA-Konzentrationen	32
<b>3.2 RNA-Screening</b>	<b>33</b>
3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gerste	33
3.2.2 Amplifikation der kodierenden Sequenzen aus RNA	33
3.2.2.1 Reverse Transkription und PCR-Amplifikation	33
3.2.2.2 Restriktionsschnitt	35

<b>3.3 cDNA-Screening</b>	<b>36</b>
3.3.1 Amplifikation der cDNA-Bibliothek ( <i>barley</i> - $\lambda$ gt11)	36
3.3.1.1 Vorbereitung	36
3.3.1.2 Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten vor der Amplifikation	36
3.3.1.3 Ausplattieren der Phagenbibliothek	37
3.3.1.4 Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten nach der Amplifikation	37
3.3.2 Screening der cDNA-Bank	38
3.3.2.1 Isolierung von $\lambda$ -DNA	38
3.3.2.2 PCR-Amplifikation von Lhca1	38
3.3.2.3 PCR-Amplifikation von Lhca4	43
3.3.2.4 Auswertung der DNA-Sequenzen	45
<b>3.4 Klonierung</b>	<b>46</b>
3.4.1 Expressionssystem	46
3.4.2 Anzucht von <i>E. coli</i> (JM101)	46
3.4.2.1 Stammkulturen	47
3.4.2.2 Kompetente Zellen	47
3.4.3 Konstruktion der Expressionsvektoren	48
3.4.3.1 Isolierung von Vektor-DNA	48
3.4.3.2 Linearisierung und Aufreinigung	48
3.4.3.3 Ligation	48
3.4.3.4 Transformation	49
3.4.4 Screening auf positive Rekombinante	49
3.4.4.1 Screening durch Restriktionsanalyse	49
3.4.4.2 PCR-Screening	49
3.4.5 Sequenzierung	50
<b>3.5 Proteinexpression</b>	<b>51</b>
3.5.1 Anzucht und Induktion der Zellen	51
3.5.1.1 Vorkultur	51
3.5.1.2 Rückstellproben	51
3.5.1.3 Induktion	51
3.5.2 Isolierung rekombinanter Proteine	51
3.5.2.1 Isolierung nach PAULSEN et al. (1990)	52
3.5.2.2 Isolierung mit <i>B-PER</i> <sup>TM</sup>	53
3.5.3 Proteinbestimmung	53
3.5.3.1 Neuhoff-Assay	53
3.5.3.2 Bradford-Assay	53
3.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
3.5.5 Färben von Gelen	54
3.5.5.1 Coomassie-Färbung	54
3.5.5.2 Silberfärbung	55
3.5.6 Immunodetektion	55
3.5.6.1 Blotting	55
3.5.6.2 Antikörperdetektion	56
3.5.6.3 Antikörper gegen Lhca4	56
<b>3.6 Präparation von Pigment/Protein-Komplexen und Pigmentextrakten</b>	<b>58</b>
3.6.1 Isolierung von PSI-Komplexen	58
3.6.2 Herstellung von Pigmentextrakten	59
<b>3.7 Rekonstitution</b>	<b>60</b>
3.7.1 Rekonstitution und Auftrennung in der ND-PAGE	60
3.7.2 Rekonstitution und Auftrennung im Saccharose-Dichtegradienten	61
3.7.3 Untersuchung von Pigment/Proteinkomplexen	62
3.7.3.1 Chlorophyllkonzentrationen	62
3.7.3.2 Tieftemperatur-Fluoreszenzspektroskopie	62

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>63</b>
<b>4.1 Isolierung der kodierenden Sequenzen für Lhca1 und Lhca4</b>	<b>63</b>
4.1.1 Lhca1 mit vollständigem Transitpeptid	63
4.1.2 Lhca4 mit unvollständigem Transitpeptid	63
<b>4.2 Klonierung in Expressionsvektoren</b>	<b>65</b>
<b>4.3 Expression</b>	<b>68</b>
4.3.1 Expression von Lhca1	68
4.3.2 Expression von Lhca4	70
<b>4.4 Rekonstitution</b>	<b>73</b>
<b>5 Diskussion</b>	<b>81</b>
<b>5.1 Analyse der Proteinsequenzen von Lichtsammelproteinen angiospermer Pflanzen</b>	<b>81</b>
5.1.1 Die ermittelten Sequenzen für Lhca1 und Lhca4 der Gerste unterscheiden sich von bereits veröffentlichten Sequenzen	82
5.1.2 Die Längen der Transitpeptide und der reifen Proteine angiospermer Pflanzen vom Lhca- und Lhcb-Typ sind deutlich unterschiedlich	83
5.1.3 Die Sequenzen reifer LHC-Proteine aus angiospermen Pflanzen sind grundsätzlich stärker konserviert als die ihrer Transitpeptide	86
5.1.4 Die Transitpeptide von Lhca1 aus Gerste und Reis sind auffällig ähnlich	90
5.1.5 Die Transitpeptide einiger Typen von Lhcb-Proteinen sind in Monokotyledonen stärker konserviert als die Sequenzen ihrer reifen Proteine	92
5.1.6 In einem Vergleich der kürzesten LHC-Transitpeptide läßt sich ein konserviertes Motiv identifizieren, das auch in den übrigen LHC-Transitpeptiden vollständig oder teilweise konserviert ist	94
<b>5.2 Rekonstitution von LHC-Komplexen</b>	<b>96</b>
5.2.1 Die rekonstituierten Lhca1-Monomere aus Gerste und Tomate weisen leichte Unterschiede auf	96
5.2.2 Die rekonstituierten heterologen Dimere (Gerste/Tomate) sind vergleichbar mit nativen oder rekonstituierten LHCI-730-Komplexen aus Tomate	97
5.2.3 Rekonstituierte Monomere und Heterodimere des LHCI binden im Vergleich zu nativen PSI-200-Komplexen weniger Pigmente als erwartet	98
5.2.4 Durch welche Faktoren wird die molekulare Interaktion von Lhca1 und Lhca4 vermittelt ?	100
5.2.4.1 Der LHCI wird ebenfalls durch molekulare Interaktion von Lhcb-Proteinen konstituiert	100
5.2.4.2 Die N-terminalen Bereiche von Lhca1 und Lhca4 sind für die Rekonstitution stabiler Monomere und Dimere entbehrlich	101
5.2.4.3 Möglicherweise sind geladene Aminosäuren der Stroma-Loops von Lhca1 und Lhca4 an der molekularen Interaktion beteiligt	102
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
<b>7 Literatur</b>	<b>109</b>
<b>8 Anhang</b>	<b>121</b>

Danksagung





## Abkürzungsverzeichnis

<b>1-TP</b>	Lhca1 mit Transitpeptid	<b>LW Chls</b>	langwellig fluoreszierende Chlorophylle
<b>4-TP</b>	Lhca4 mit Transitpeptid	<b>MW</b>	Mittelwert
<b>A<sub>0</sub></b>	Kofaktor PSI (Chl a)	<b>NADP</b>	Nikotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat
<b>A<sub>1</sub></b>	Kofaktor PSI (Phyllochinon)	<b>NBT</b>	Nitroblau-Tetrazolium
<b>ACS</b>	Aminocaprinsäure	<b>ND-PAGE</b>	nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat	<b>nLhca1/4</b>	natives Lhca1/4
<b>AS</b>	Aminosäure(n)	<b>OEP</b>	<i>outer envelope protein</i> (des Importkomplexes)
<b>BAM</b>	Benzamidin	<b>OG</b>	Octylglykosid
<b>BCIP</b>	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat	<b>Ox</b>	Oxidation
<b>bidest.</b>	doppelt destilliert	<b>P700</b>	Reaktionszentrum PSI
<b>bp</b>	Basenpaare	<b>PAR</b>	<i>photoactive radiation</i>
<b>cab</b>	chlorophyll a/b	<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
<b>CAC</b>	<i>Chl a/c-binding protein</i>	<b>PC</b>	Plastocyanin
<b>Chl a</b>	Chlorophyll a	<b>pfu</b>	<i>plaque forming units</i>
<b>Chl b</b>	Chlorophyll b	<b>PG</b>	Phosphatidylglycerol
<b>CP</b>	<i>chlorophyll (binding) protein</i>	<b>PSI-n</b>	Protein des Photosystem I
<b>cp</b>	chloroplastidär	<b>PSII-n</b>	Protein des Photosystem II
<b>CyB</b>	Cyanobakterium	<b>PSI</b>	Photosystem I
<b>DEPC</b>	Diethylpyrokarbonat	<b>PSII</b>	Photosystem II
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>DTT</b>	Dithiothreitol	<b>Pwo</b>	<i>Pyrococcus woesei</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure	<b>Red</b>	Reduktion
<b>EK</b>	Endkonzentration	<b>rLhca1/4</b>	rekombinantes Lhca1/4
<b>ELIP</b>	<i>early-light-inducible-protein</i>	<b>rpm</b>	<i>revolution per minute</i>
<b>ESTs</b>	<i>expressed sequence tags</i>	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>ET</b>	Elektronentransfer	<b>RZ</b>	Reaktionszentrum
<b>ETBr</b>	Ethidiumbromid	<b>SCPs</b>	<i>small cab-like proteins</i>
<b>FCP</b>	<i>fucoxanthin-chlorophyll protein</i>	<b>SDS</b>	Natrium-Dodecylsulfat
<b>Fd</b>	Ferredoxin	<b>SDS-PAGE</b>	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>FNR</b>	Fd-NADP-Oxidoreduktase	<b>SMP</b>	<i>skummet mælk powder</i> (Milchpulver dänischer Provenienz)
<b>F<sub>x</sub>, F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub></b>	Kofaktoren PSI (Eisen-Schwefelzentren)	<b>sPCP</b>	<i>soluble peridin-chlorophyll protein</i>
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat	<b>SPP</b>	<i>stromal processing peptidase</i>
<b>HLIP</b>	<i>high-light-inducible-Protein</i>	<b>STAB</b>	Standardabweichung
<b>HSP</b>	Hitzeschockprotein	<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>iPCP</b>	<i>intrinsic peridin-chlorophyll protein</i>	<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
<b>IPTG</b>	Isopropylthiogalaktosid	<b>TIC/TOC</b>	<i>translocon of the inner /outer envelope complex</i>
<b>IR</b>	infrarot	<b>Tris</b>	Trishydroxymethylaminomethan
<b>K</b>	Reaktionskonstante	<b>UV</b>	ultraviolett
<b>kD</b>	<i>kilo-dalton</i>	<b>VF</b>	Verdünnungsfaktor
<b>kn</b>	Kern		
<b>LD</b>	<i>loading dye</i>		
<b>LHC</b>	<i>light-harvesting complex</i>		
<b>LHCI</b>	Lichtsammelkomplex I		
<b>LHCII</b>	Lichtsammelkomplex II		
<b>LiDS</b>	Lithium-Dodecylsulfat		
<b>LIL</b>	<i>light-harvesting like (protein)</i>		



# 1 Einleitung

Die Fähigkeit von Organismen, aus sich selbst heraus differenzierte Strukturen zu entwickeln und aufrecht zu erhalten, ist zweifellos eines der grundlegendsten und faszinierendsten Phänomene der belebten Natur. Dinge, die wachsen, lassen sich in der Regel deutlich abgrenzen gegenüber solchen, die das offensichtlich nicht tun. Die Suche nach den Ursachen hierfür, die Frage nach der *vis vitalis* ist zu allen Zeiten ein zentrales Thema der frühen Natur-, „Beobachtung“ und „-Erforschung“ - heute „-Wissenschaften“ - gewesen. Stand zunächst die bloße Anschauung, der makroskopische Befund, im Mittelpunkt einer beschreibenden und beobachtenden „Erfahrungs“-Forschung, so läßt sich historisch unschwer eine Entwicklung belegen, bei der eine fortschreitende Erweiterung der Fragestellungen zusammen mit der Verbesserung und Verfeinerung der verfügbaren Methoden einen immer tieferen und detaillierteren Einblick ermöglicht hat in das, was „das Leben“ ausmacht oder auch nur auszumachen scheint<sup>1</sup>.

Der frühe Befund, daß grüne Pflanzen augenscheinlich lediglich mit Licht, Luft und Wasser wachsen können, führte letztendlich zu der Erkenntnis, daß es sich hierbei um Organismen handelt, die unter Nutzung der Sonnenenergie Biomasse aufbauen, d.h. imstande sind, *photoautotroph* zu wachsen. Mit dem erheblichen Anwachsen der Gruppe der zur Nutzung der Lichtenergie fähigen Organismen wuchs nicht zuletzt auch das Verständnis für die enge Kopplung der einzelnen, mit der Zeit immer besser beschreibbaren Teilreaktionen. Diese sind als gesamtorganismische Leistung unter dem Begriff *Photosynthese* zusammenzufassen, auch wenn dabei *primär* lichtabhängige von *sekundär* lichtunabhängigen Reaktionen differenziert werden können.

Für die lichtabhängigen Reaktionen konnte an grünen Pflanzen gezeigt werden, daß diese offenbar eng mit den in subzellulären Organellen (den *Chloroplasten*) lokalisierten Farbstoffen (den *Chlorophyllen*) assoziiert sind. Innerhalb der Chloroplasten sind diese Chlorophylle in membrangebundenen Multiproteinkomplexen organisiert, die im weiteren als *Photosysteme* charakterisiert werden konnten. Es zeigte sich, daß derartige Komplexe ebenfalls aus den Plasmamembranen photoautotropher Prokaryoten isoliert werden können. Seit der ersten grundlegenden Aufklärung der molekularen Struktur dieser Komplexe an Reaktionszentren von Purpurbakterien können Funktion und Struktur der Photosysteme immer besser experimentell und theoretisch verknüpft werden.

Bei der Erforschung biologischer Phänomene werden die beiden o.g. grundsätzlich verschiedenen experimentellen Herangehensweisen<sup>1</sup> häufig ergänzend verwendet: Durch Fraktionierung und Separation mit klassischen molekular- und zellbiologischen Methoden werden funktionelle Prozesse bis zur Ebene kleinster beobachtbarer (z.B. mikroskopisch oder physiologisch) bzw. beschreibbarer Einheiten untergliedert und untersucht. Die Erweiterung um die molekulargenetischen Methoden ermöglicht darüber hinaus die gezielte

---

<sup>1</sup> Bei dieser „Suche“ ist der zunächst überwiegend *beschreibende* Ansatz in den Naturwissenschaften immer stärker durch einen *manipulativen* Ansatz ergänzt bzw. stellenweise sogar vollständig ersetzt worden. Dieser sucht die gewonnenen Teilbefunde in Beanspruchung vollständiger Beherrschung von Natur möglichst rasch in nutzbare produktorientierte Entwicklungen zu verwerten. Forschung ist in diesem Kontext ungeachtet der häufig reklamierten grundgesetzlich garantierten Freiheit daher selten Selbstzweck sondern oft abhängig von (Dritt-) Mitteln und politischen Vorgaben.

Manipulation einzelner Komponenten dieser funktionellen Prozesse (beispielsweise über die Deletion oder Mutation einzelner Aminosäuren in Proteinen). In der Nachbildung biologischer Strukturen oder Prozesse werden einzelne Phänomene oder Objekte einer experimentellen Untersuchung erst zugänglich (beispielsweise die Charakterisierung von Zellfraktionen, die mit klassischen zell- und molekularbiologischen Techniken nur schwer oder überhaupt nicht fraktioniert bzw. aufgereinigt werden können) aber auch für technische Anwendungen nutzbar (z.B. genetisch modifizierte Bakterien zur Veränderung von Lebensmitteln).

In dieser Arbeit werden Untersuchungen von *in vitro* rekonstituierten Komplexen von Lichtsammelproteinen höherer Pflanzen dargestellt, damit liegt der experimentelle Schwerpunkt auf der Nachbildung biologischer funktionaler Strukturen. Es sollte dabei nicht vergessen werden, daß es sich bei den hierbei erzeugten Untersuchungsobjekten um *künstliche* und nicht um *natürliche* Strukturen handelt, deren Eigenschaften je nach Art der verwendeten Modelle zwar mehr oder weniger gut auf die *natürlichen* Strukturen übertragbar sind (im Einzelfall sogar sehr gut), diese aber nicht vollständig abzubilden vermögen.

Die hier vorgestellten Untersuchungsergebnisse können nur kontextbezogen, d.h. innerhalb der gegenwärtigen Vorstellungen (Modelle) interpretiert werden. Daher werden vor dem Hintergrund des derzeitigen Standes der Forschung zunächst eine Reihe zentraler Prinzipien für die Lichtabsorption durch Pigmente, für die Ladungstrennung und den Elektronentransport (Abschnitt 2.1) sowie für die pigmentbindenden Proteine und ihre Organisation zu Kern- und Antennenkomplexen der Photosysteme phototropher Organismen (Abschnitt 2.2) formuliert. Eine Einführung in die Antennenproteine phototropher Eukaryoten (Abschnitt 2.3) sowie die molekulare Struktur und Funktion des PSI (Abschnitt 2.4) dient als Grundlage der entwickelten Fragestellung (Abschnitt 2.5).

## 2 Zum Stand der Forschung

### 2.1 Lichtabsorption durch Pigmente

Wir charakterisieren Licht als elektromagnetische Welle durch seine Energie (Frequenz) bzw. Wellenlänge nach der Beziehung

$$\gamma \text{ (Frequenz [s}^{-1}\text{])} \cdot \lambda \text{ (Wellenlänge [nm])} = c \text{ (Lichtgeschwindigkeit)}.$$

Das für die Photosynthese wirksame Licht (*photoactive radiation*, PAR) stellt dabei innerhalb des gesamten elektromagnetischen Strahlungsspektrums nur einen Ausschnitt vom langwelligeren ultravioletten (UV; >290 nm) bis zum nahen infraroten Licht (IR; bis ~1000 nm) dar (SCHEER 1999).

Pigmente (im folgenden auch als *Chromophore* bezeichnet) weisen ausgedehnte Systeme konjugierter Doppelbindungen auf und besitzen zunächst durch die Molekülstruktur bedingte unterschiedliche Absorptionseigenschaften. Bei entsprechender Übereinstimmung (*Resonanz*) eines von der Molekülstruktur her möglichen Elektronenübergangs mit dem Energiegehalt eines eingestrahlteten Photons kann das Molekül diesen Energiebetrag absorbieren und dabei von seinem Grundzustand in einen „angeregten Zustand“ übergehen. Der absorbierte Energiebetrag ist dann in Form von „Anregungsenergie“, die analog zu der gequantelten Lichtenergie (Photon) auch als *Exciton*<sup>2</sup> bezeichnet wird, gespeichert und kann in unterschiedlicher Form wieder freigesetzt oder mit anderen energetischen Prozessen verknüpft werden. Diese Möglichkeiten können als *Jablonski-Diagramm* (Abb. 2-1) dargestellt werden.

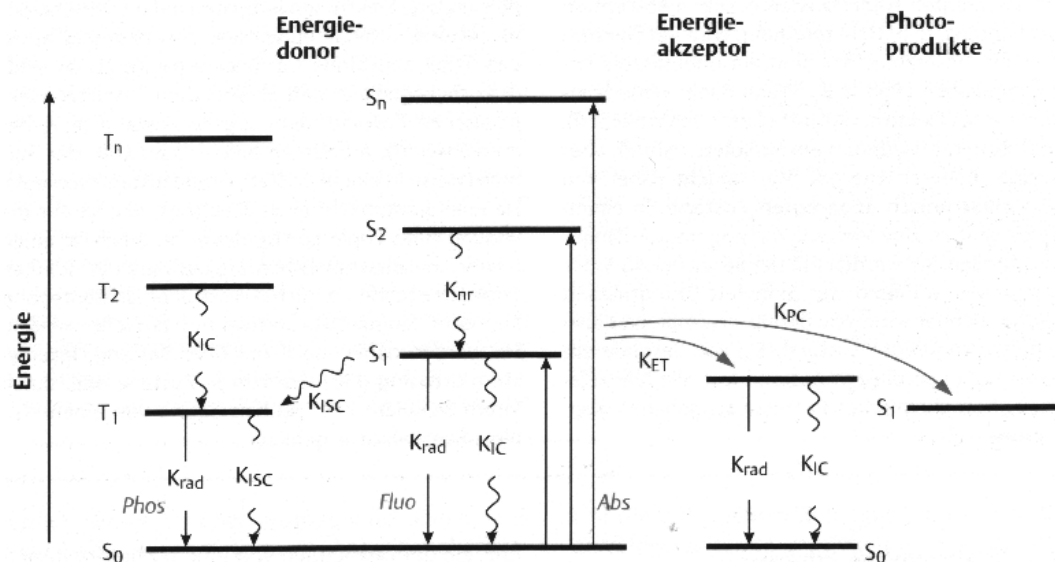


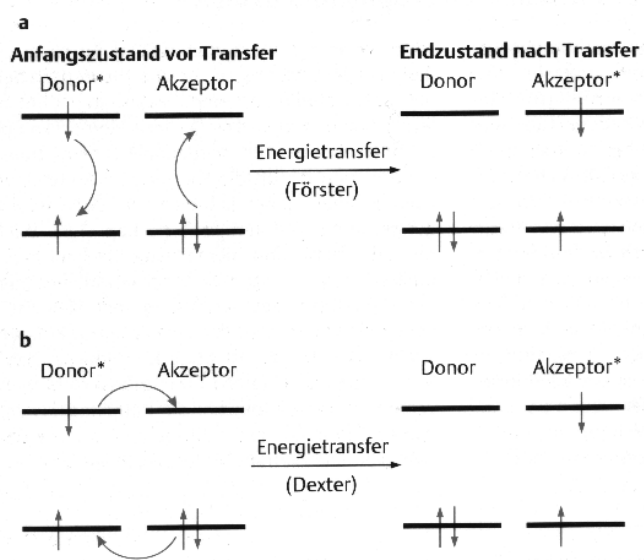
Abb. 2-1 Darstellung der relevanten elektronischen Zustände eines Moleküls (Singulett-Zustände  $S_0 \dots S_n$  und Triplett-Zustände  $T_1 \dots T_n$  als horizontale Striche) sowie der Strahlungsprozesse (Abs = Absorption, Phos = Phosphoreszenz und Fluo = Fluoreszenz; gerade Pfeile) und strahlungslosen Prozesse (IC = interne Konversion und ISC = intersystem crossing; gewellte Pfeile) mit Geschwindigkeitskonstanten  $k_{nr}$  und  $k_{rad}$  bzw.  $k_{IC}$  und  $k_{ISC}$  sowie der photochemischen Prozesse und des Elektronentransfers mit den Geschwindigkeitskonstanten  $k_{ET}$  bzw.  $k_{PC}$ ; aus HOLZWARTH (1999).

<sup>2</sup> Ein Exciton entspricht dabei einem „Quant Anregungsenergie“.

Für die photophysikalischen und photochemischen Primärprozesse der Photosynthese sind dabei vor allem die Organisation von Elektronendonoren und -akzeptoren in Red/Ox-Ketten sowie die energetische Kopplung von Pigmenten von Bedeutung. In einem Photosystem sind ~100-300 Chlorophyllmoleküle energetisch mit einem Reaktionszentrum gekoppelt. Es ist daher unwahrscheinlich, daß die Pigmente des Reaktionszentrums direkt angeregt werden. Die Anregungsenergie muß vielmehr über Distanzen von mehreren 100 Å auf diese transferiert werden. Die Weiterleitung von Anregungsenergie kann grundsätzlich nach dem *Förster-* oder *Dexter-Mechanismus* erfolgen (Abb. 2-2), wobei der überwiegende Teil der Energieübertragungsprozesse in photosynthetischen Antennen nach dem Förster-Mechanismus erfolgt.

Dieser ist bei einem entsprechenden Überlappungsintegral des Fluoreszenzspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors über vergleichsweise große Entfernungen möglich (bis zu 100 Å), während die Geschwindigkeitskonstante des Dexter-Mechanismus exponentiell mit dem Abstand sinkt und dieser daher nur bei entsprechend dicht benachbarten Chromophoren möglich ist. Dabei kann es bei sehr kleinen Abständen zwischen gleichartigen Chromophoren zu einer sehr starken Wechselwirkung kommen, die als *excitonische Kopplung* bezeichnet wird (HOLZWARTH 1999).

**Abb. 2-2** Im Energietransfer nach dem Förster-Mechanismus („Förster-Resonanztransfer“) (a) wird die Kopplung durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der Chromophoren bewirkt, dabei werden keine Elektronen zwischen Donor und Akzeptor ausgetauscht.  
Im Dexter-Energietransfer (b) wechselt ein angeregtes Elektron des Donors in einen angeregten Zustand des Akzeptors, der dafür ein Elektron des Grundzustandes auf den Donor überträgt („Austauschmechanismus“), dies erfordert eine direkte Überlappung der elektronischen Wellenfunktionen; aus HOLZWARTH (1999).



### 2.1.1 Pigmente in photoautotrophen Organismen

In phototrophen Organismen können zwei wichtige Hauptgruppen von Pigmenten unterschieden werden, die z.T. unterschiedliche Funktionen haben:

- variabel substituierte zyklische Tetrapyrrole mit Mg- oder Zn-Zentralatom und unpolare Kohlenwasserstoffkette (*Bakterio-/Chlorophylle*),
- langkettige unpolare Tetraterpene (*Carotinoide*) ohne (*Carotine*) oder mit Sauerstoff-Gruppe (*Xanthophylle*).

Die Absorptionseigenschaften von Pigmenten werden nicht nur durch ihre chemische Struktur, sondern gleichzeitig auch durch die Proteinumgebung sowie Wechselwirkungen mit benachbarten Pigmenten bzw. Kofaktoren determiniert (SUNDSTRÖM & VAN GRONDELLE

1995; FROMME et al. 2001). Die nicht-kovalente Bindung und Orientierung der Pigmente wird dabei überwiegend über Wechselwirkungen des  $Mg^{2+}$ -Zentralatoms mit benachbarten Aminosäureseitenketten koordiniert<sup>3</sup>.

Die Modifikation der Absorptionsmaxima chemisch identischer Moleküle bewirkt eine Verbreiterung des Absorptionsspektrums. Typische Absorptionsmaxima für Chlorophylle in Antennensystemen können im roten Bereich der PAR beispielsweise zwischen 660-730 nm variieren (HOLZWARTH 1999), Bakteriochlorophylle absorbieren dagegen im langwelligeren Bereich des IR (800-1000 nm). Zusammen mit den Carotinoiden (Absorption zwischen 450-660 nm) wird so beinahe der gesamte Bereich des auf der Erdoberfläche verfügbaren Sonnenlichtes (~300-1600 nm) abgedeckt (SCHEER 1999)<sup>4</sup>.

Die Koordination durch die Proteine vermittelt neben der Modifikation der Absorptionseigenschaften gleichzeitig die Bedingungen (Abstand, Orientierung, Überlappungsintegrale) für eine energetische Wechselwirkung der Pigmente. Diese ist die Voraussetzung für eine Energieübertragung von einem angeregten Pigment auf ein benachbartes und wird auch als *energetische Kopplung*, die Weiterleitung der Anregungsenergie als *Excitonenenergie transfer* bezeichnet. Obwohl es sich dabei um eine strahlungslose Form von Energieübertragung handelt, werden die beteiligten Pigmente anhand ihrer Fluoreszenzemissionsmaxima charakterisiert. Diese Emissionsmaxima sind gegenüber den Absorptionsmaxima ca. 8-15 nm in den langwelligen Bereich verschoben, da ein Teil der Energie während des Transfers als Wärme abgestrahlt wird und somit verloren geht. Das Emissionsmaximum des Akzeptors ist daher immer etwas langwelliger als das Emissionsmaximum des Donors (HOLZWARTH 1999).

Die das Reaktionszentrum bildenden Pigmente des *special pairs* (vergl. Abschnitt 1.2.1) weisen gegenüber den übrigen Pigmenten eines Photosystems das niedrigste Absorptionsmaximum auf. Über die Kopplung von Pigmenten mit entsprechend absteigend längerwelligeren Absorptionsmaxima kann Energie so effizient und gerichtet zu den Reaktionszentren transferiert werden (*trapping*). Sowohl *in vivo* als auch in isolierten Präparationen von Photosystemen bzw. Fraktionen von Photosystemen lassen sich allerdings Chlorophylle mit gegenüber dem Reaktionszentrum deutlich langwelligeren Emissionsmaxima identifizieren (TRISSEL 1993; GOBETS et al. 1998; KOCHUBEY & SAMOKHVAL 2000). Diese werden auch als *langwellige Chlorophylle* (*long-wavelength-chlorophylls* oder *far red pigments*) bezeichnet.

### 2.1.2 Die langwellig fluoreszierenden Chlorophylle

Die Evolution von Chlorophyllen, die bei Wellenlängen unterhalb des Absorptionsmaximums des Reaktionszentrums absorbieren und emittieren, erscheint zunächst physiologisch wenig sinnvoll (TRISSEL 1993) und beeinträchtigt das gängige energetische Modell von Antennen und Reaktionszentren, nach dem absorbierte Lichtenergie gerichtet auf das Reaktionszentrum, d.h. auf Chromophore mit dem langwelligsten Absorptionsmaximum, transferiert wird.

Gleichwohl können solche Pigmente in vielen Gruppen phototropher Organismen detektiert werden und zwar sowohl innerhalb von Kernkomplexen von Pro- und Eukaryoten (BUTLER et al. 1979; GOEDHEER 1981; WITTMERSHAUS et al. 1992; TURCONI 1994; VAN GRONDELLE et al.

<sup>3</sup> Vor allem durch Histidin, Asparagin oder Glutamin (GREEN & PICHERSKY 1994).

<sup>4</sup> Weniger gut abgedeckt ist der Bereich ab 900-1000 nm (erste starke Absorptionsbande des Wassers), der allerdings auch nur einen geringen Anteil des verfügbaren Lichtspektrums umfasst (SCHEER 1999).

1994; KARAPETYAN et al. 1997; GILL & WITTMERSHAUS 1999; KOEHNE et al. 1999) als auch von unterschiedlichen Typen von Antennensystemen (HOLT & CLAYTON 1965; KNOETZEL et al. 1998; MELKOZERNOV et al. 2000b; IHALAINEN et al. 2000). In den Chl *a/b*-Antennen phototropher Eukaryonten werden sie allerdings ausschließlich in den mit PSI assoziierten LHCI-Antennen gefunden (SCHMID et al. 2001; vergl. Abschnitt 1.4.3).

Als Ursachen für die Verschiebung des Absorptionsmaximums werden beschrieben: excitonische und elektronische Wechselwirkungen mit den Kofaktoren (SUNDSTRÖM & VAN GRONDELLE 1995) und Proteinseitenketten (ALTMANN et al. 1992), von einer planaren Konformation abweichende „Biegungen“ des Porphyrinringes (GUDOWSKI-NOWAK et al. 1990) sowie Ladungseffekte (ECCLES & HONIG 1983). Hinsichtlich der Funktion dieser Chlorophylle (im folgenden als LW Chls bezeichnet) gibt es eine Reihe, z.T. gegensätzlicher Vermutungen und Aspekte:

- (1) Die LW Chls sind nicht essentiell für den Excitonenenergietransfer, sondern erfüllen eine Schutzfunktion vor Schädigung der Photosysteme bei „geschlossenen“<sup>5</sup> Reaktionszentren (STAHL et al. 1989; JENNINGS et al. 1996), indem sie überschüssige Anregungsenergie in Form von Wärme und/oder Fluoreszenz ableiten.
- (2) Die LW Chls verbinden den Großteil der Antennenchlorophylle energetisch mit dem Reaktionszentrum und erhöhen die Quantenausbeute durch Anreicherung von Excitonen in der Nähe des Reaktionszentrums (MUKERJI & SAUER 1993; TRISSL 1993). Dabei ist allerdings umstritten, ob die LW Chls die Rate der vom Reaktionszentrum absorbierten Excitonen (*trapping rate*) erhöhen (MUKERJI & SAUER 1993) oder vermindern (JENNINGS et al. 1998; RIVADOSSI et al. 1999).
- (3) Die Evolution langwellig absorbierender Pigmente ist durch die Anpassung an Lichtbedingungen („chromatische Adaptation“; TRISSL 1993)<sup>6</sup> induziert worden, in denen einzelne Spektralbereiche nicht verfügbar (Schattenadaptation) und/oder abgeschirmt sind (JENNINGS et al. 1998; RIVADOSSI et al. 1999). Unter Schattenlicht-Bedingungen könnten die LW Chls bei eukaryotischen Phototrophen darüber hinaus gemeinsam mit der Veränderung der LHCI-Verteilung zwischen PSI und PSII (vergl. Abschnitt 1.4.4) an der Regulation der Energieverteilung zwischen PSI und PSII beteiligt sein (RIVADOSSI et al. 1999).
- (4) Bei der Interaktion einzelner Proteine oder Proteinkomplexe können sich die Emissionsmaxima z.T. noch weiter in den langwelligen Bereich verschieben. Im Cyanobakterium *Spirulina platensis* fluoreszieren die trimeren Formen des PSI bei 760 nm, während die Monomere bei 730 nm fluoreszieren (SHUBIN et al. 1992; KARAPETYAN et al. 1997). Ähnliches gilt für die PSI-Antenne von *Chlamydomonas* (BASSI et al. 1992). Für das PSI von Gerste konnte gezeigt werden, daß sich die Fluoreszenz des LHCI-730 bei Assoziation mit dem PSI-Kern ebenfalls in den langwelligen Bereich verschiebt (CROCE et al. 1996; KNOETZEL et al. 1998).

---

<sup>5</sup> D.h. im oxidierten Zustand, z.B. bei hohen Lichtintensitäten und/oder nicht verfügbaren oxidierten Akzeptoren.

<sup>6</sup> So enthält das Reaktionszentrum von *Rhodospseudomonas viridis* z.B. Antennenpigmente, die mit einem Absorptionsmaximum von 1015 nm an die Absorption von Wellenlängen oberhalb des Transmissionsmaximums des Wassers adaptiert sind (TRISSEL 1993).



Die signifikante Beteiligung der energetisch unterhalb des Reaktionszentrums absorbierenden LW Chls an der Gesamtabsorption stellt das Modell des gerichteten direkten Energie-transfers zu den Reaktionszentren nach dem Bild einer „tiefen“ Energiefalle in Frage. Möglicherweise ist diese Falle „flacher“. So ist z.B. für das PSI vermutlich das Reaktionszentrum P700 mit seiner Antenne energetisch nahezu gleichzusetzen (CROCE et al. 1996).

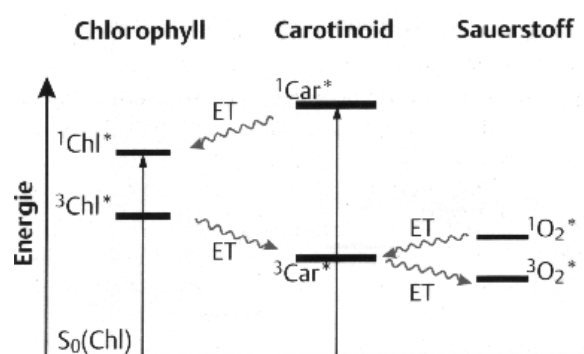
### 2.1.3 Carotinoide

Die Carotinoide gliedern sich in die linearen oder zyklischen *Carotine* mit 1 oder 2 Ionon- ringen und deren oxygenierte Derivate, die *Xanthophylle*. In beiden Fällen handelt es sich um langkettige (in der Regel C40) Isoprenderivate (Tetraterpene), die durch Kondensation zweier Geranylgeranylpyrophosphatuntereinheiten gebildet werden. Aus dem so entstandenen Phytoen wird durch Einführung konjugierter Doppelbindungen Lycopin gebildet, dessen Zyklisierung zum  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Carotin führt. Über Hydroxylierungen und Epoxidierungen können dann u.a. die Xanthophylle gebildet werden (SCHEER 1999). Die an der Synthese der Carotinoide beteiligten Enzyme sind in der Hüllmembran der Chloro- bzw. Chromoplasten lokalisiert (JOYARD et al. 1998). Während aus Cyanobakterien und Algen eine große Anzahl häufig spezifischer Carotinoide isoliert werden kann, ist die Anzahl der allgemein verbreiteten Carotinoide in höheren Pflanzen relativ gering. Neben  $\beta$ -Carotin sind es vor allem die Xanthophylle Lutein, Neoxanthin sowie Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin, die am Xanthophyllzyklus (s.u.) beteiligt sind (YOUNG 1993; GREEN & DURNFORD 1996).

Für die Carotinoide werden mindestens 5 verschiedene Funktionen beschrieben (DEMMING-ADAMS et al. 1996; FRANK & COGDELL 1996; FROMME et al. 2001). Zunächst weisen sie ein gegenüber den Chlorophyllen abweichendes Absorptionsspektrum auf. Die von ihnen absorbierte Lichtenergie wird in Form von Excitonen sehr schnell und effizient auf Chlorophyll a übertragen (HOLZWARTH 1999). Damit verringern sie die sog. „Grünlücke des Chlorophylls“ und fungieren als Antennenpigmente.

Eine zweite, wesentlich wichtigere Funktion der Carotinoide ist jedoch die Verhinderung der Bildung reaktiven Singulett-Sauerstoffs ( $^1O_2^*$ ) bzw. seine Überführung in den ungefährlichen Grundzustand ( $^3O_2$ ) (Abb. 2-3). Beide Reaktionen laufen nach dem Dexter-Mechanismus ab (vergl. Abschnitt 2.1). Reaktiver Singulett-Sauerstoff wird durch vergleichsweise langlebige Chlorophylle im Triplettzustand gebildet. Dieser  $^1O_2^*$  geht mit fast allen organischen Molekülen effiziente Oxidationsreaktionen ein und führt damit zur oxidativen Zerstörung von Pigmenten und Proteinen (HOLZWARTH 1999).

**Abb. 2-3** Carotinoide können sowohl Excitonen auf Chlorophylle transferieren (ET) als auch Excitonen von Chlorophyllen im Triplettzustand übernehmen (linke Seite), gleichzeitig überführen Carotinoide im Triplettzustand Singulett-Sauerstoff in den Grundzustand (rechte Seite). Aufgenommene Energie, die nicht an Chl weitergegeben wird, wird als Wärme abgestrahlt; aus HOLZWARTH (1999).



Diese Schutzfunktion wird in höheren Pflanzen, Chloro- und Phaeophyceen über einen durch den lumenalen pH-Wert regulierten Zyklus vermittelt, in dem Violaxanthin über Antheraxanthin zu Zeaxanthin deepoxidiert wird (*Xanthophyllzyklus*). Der Triplettzustand des Carotinoide Zeaxanthin liegt energetisch unterhalb des Triplettzustands des Chlorophylls, was die Übernahme von Anregungsenergie und die Überführung des Chlorophylls in den Grundzustand ermöglicht (HOLZWARTH 1999). Die hierbei übernommene Energie wird bei Rückkehr des Xanthophylls in den Grundzustand als Wärme abgeleitet. Diese strahlungslose Konversion wird auch als *non-photochemical quenching* bezeichnet und sorgt vor allem bei hohen Lichtintensitäten für eine schadlose Ableitung überschüssiger Excitonenenergie. In Pflanzen spielen die *cab*-Proteine Lhcb4 (CP29) und Lhcb5 (CP26) sowie Lhcb6 (CP24) eine zentrale Rolle bei diesem Prozeß (RUBAN et al. 1996; FRANK et al. 2001).

Schließlich haben Carotinoide als obligate integrale Bestandteile von Kernkomplexen und Antennenproteinen stabilisierende und konformationsvermittelnde Funktion. Gleichzeitig sind sie in der Lage, Elektronen von freien Radikalen zu übernehmen (EDGE et al. 1997) und so u.a. die Peroxidation von Lipiden zu verhindern (ANDERSON & KRINSKY 1973; PACKER 1993). In Chromoplasten gebildete Carotinoide dienen darüber hinaus der Anlockung bestäubender Insekten und Tiere (BARTLEY & SCOLNIK 1995).

## 2.2 Pigmentbindende Proteine

Photosensitive Pigmente sind *in vivo* an Proteine gebunden, die ihre korrekte Orientierung in gekoppelten Excitonen- bzw. Elektronentransportketten sicherstellen. Nach der Funktion der gebundenen Pigmente lassen sich diese Proteine in zwei wesentliche Gruppen unterteilen:

- (a) Proteine, die die an der Ladungstrennung beteiligten Pigmente (Reaktionszentrum) und Kofaktoren der Elektronentransportkette binden oder integraler bzw. peripherer Bestandteil dieser Komplexe sind (**Proteine der Kernkomplexe**, Abschnitt 1.2.1)
- (b) mit den Kernkomplexen assoziierte akzessorische Proteine (**Antennenproteine**, Abschnitt 1.2.2), deren gebundene Pigmente nicht an der Ladungstrennung und Ladungsweiterleitung beteiligt sind, sondern deren absorbierte Lichtenergie entweder
  - im Excitonenenergieübertrag zu den Reaktionszentrums-Pigmenten weitergeleitet oder
  - zur Erhaltung der physiologischen Leistungsfähigkeit der Photosysteme bei hohen Lichtintensitäten (u.a. im Xanthophyllzyklus) in Form von Wärme abgeleitet wird.

Daneben sind eine Reihe pigmentbindender Proteine beschrieben, die z.T. nicht mit den Reaktionszentren assoziiert sind und/oder deren Funktion z.T. noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Abschnitt 1.2.3).

### 2.2.1 Pigmentbindende Proteine der Kernkomplexe

Die Anregung von Chromophoren eines Photosystems kann zu einer gerichteten Übertragung der Anregungsenergie auf ein Pigmentpaar im Reaktionszentrum führen, das im Gegensatz zu allen übrigen Pigmenten nicht nur angeregt wird, sondern von dem aus ein Elektron durch Oxidation auf einen benachbarten Akzeptor übertragen werden kann. Bei diesen Pigmenten handelt es sich um Chlorophylle (in eukaryotischen Phototrophen: Chl *a*) in einer konservierten Konfiguration, die auch als *Dimer* oder *special pair* bezeichnet wird.

Dieser Dimer wird in der Regel von zwei (großen) Proteinuntereinheiten gebunden und bildet mit diesen den wesentlichen (symmetrisch aufgebauten) Kern eines Photosystems. Bei der Oxidation des Dimers werden Elektronen zunächst auf einen sogenannten *primären Akzeptor* und von diesem auf weitere *sekundäre Akzeptoren* übertragen. Die primären Akzeptoren werden ebenfalls von den beiden großen Kernuntereinheiten gebunden, im weiteren können aber auch andere Proteinuntereinheiten beteiligt sein. Aufgrund der chemischen Struktur der primären und sekundären Akzeptoren werden grundsätzlich zwei verschiedene Typen von Reaktionszentren unterschieden (PIERSON & OLSON 1987; SCHUBERT et al. 1998):

- Sind die Akzeptoren überwiegend Eisen-Schwefelzentren ([Fe-S] oder [4Fe-4S]), so handelt es sich um einen *Eisen-Schwefel-Typ* (auch als „Typ I“ bezeichnet).
- Im *Phaeophytin-Chinon-Typ* („Typ II“) sind die primären Akzeptoren Chinone sowie (Bakterio-)Phaeophytin.

So wie die Elektronen auf unterschiedliche Akzeptoren übertragen werden können, erfolgt auch die Reduktion der Reaktionszentren durch die Oxidation unterschiedlicher Moleküle. Der mit Abstand größte Teil der photoautotrophen Organismen verwendet das Wasser als primären Elektronendonator. Die Entwicklung der Fähigkeit zur Spaltung des Wassers unter Freisetzung von molekularem Sauerstoff (*oxygen* Photosynthese) ist dabei mit der Zusam-

menführung der beiden Photosystem-Typen in einer Membran verknüpft und vor ca. 3.5 Mrd. Jahren offensichtlich erstmals in Organismen realisiert worden, die den heutigen Cyanobakterien ähnlich sind (BLANKENSHIP 1992). Die Bezeichnungen *Photosystem I (PSI)* und *Photosystem II (PSII)* werden lediglich bei Cyanobakterien und phototrophen eukaryotischen Organismen verwendet, bei denen die Differenzierung zweier verschiedener Photosysteme sinnvoll möglich ist. Diese Organismen betreiben *oxygene* Photosynthese. Bei den heute bekannten Photosystemen prokaryotischer phototropher Organismen, die *anoxygene* Photosynthese betreiben, spricht man dagegen vom Typ I oder Typ II (Abb. 2-4).

	Typ I Reaktionszentrum			Typ II Reaktionszentrum		
	anoxygen		oxygen	anoxygen		
<b>Gruppe</b>	Helio- bakterien	grüne Schwefel- bakterien	Cyanobakterien Prochlorophyten eukaryotische Algen höhere Pflanzen	Purpur- bakterien	grüne fädige Bakterien	
<b>RZ</b>	PSH	PSC	PSI	PSII	PbRC	GbRC
<b>RZ-Proteine</b>	(PshA)	(PscA)	PsaA/B	D1/D2	L/M	L/M
<b>Antennen- proteine</b>	(PshA)	(PscA)	PsaA/B	CP43/47	keine	keine

**Abb. 2-4** Übersicht über die derzeit bekannten unterschiedlichen Typen von Reaktionszentren (RZ) mit Angabe der konstituierenden Proteinuntereinheiten sowie der Antennenkomplexe; bei den PSI-Komplexen ist die innere Antenne integraler Bestandteil der Reaktionszentrumsproteine; nach SCHUBERT et al. (1998).

Aufgrund der weitreichenden Übereinstimmungen in der DNA- und AS-Sequenz der beiden großen Untereinheiten der Kernkomplexe des PSI und des PSII wird angenommen, daß sämtliche rezente Typen von Photosystemen auf einen gemeinsamen Grundtyp zurückzuführen sind, der infolge einer Genduplikation entwickelt wurde (SCHUBERT et al. 1998). Diese Annahme wird durch Befunde unterstützt, nach denen die Kernuntereinheiten der Reaktionszentren von Purpurbakterien, sowie PSI- und PSII-Komplexen weitreichende Homologien in ihrer AS-Sequenz und eine konservierte Anordnung der  $\alpha$ -Helices aufweisen (RHEE et al. 1998). Neueste phylogenetische Analysen deuten darauf hin, daß sich PSII-Reaktionszentren möglicherweise durch Duplikation und Modifikation von PSI-Zentren entwickelt haben (BAYMANN et al. 2001). Aus der Analyse konservierter AS innerhalb der Reaktionszentren wird deutlich, daß die molekulare Anordnung der an der Ladungstrennung und am Elektronentransfer beteiligten Kofaktoren anschließend getrennt für Typ I- und Typ II-Reaktionszentren (weiter-)entwickelt worden ist (MULKIDJANIAN & JUNGE 1997).

### 2.2.2 Antennenproteine und Antennensysteme

Die Quantenausbeute der Kernkomplexe ist im Verlauf der phylogenetischen Entwicklung durch Assoziation mit weiteren pigmentbindenden Proteinen und damit einhergehend mit der Entwicklung einer Reihe ganz unterschiedlicher *äußerer Antennensysteme* erheblich vergrößert worden. Neben den pigmentbindenden Kernkomplexen finden sich assoziiert mit Photosystemen weitere Gruppen pigmentbindender Proteine, die aufgrund dieser Lichtsammel-Funktion als *Antennenproteine* bezeichnet werden.

Auch hier lassen sich grundsätzlich unterschiedliche Typen unterscheiden (SCHEER 1999):

- *membranintrinsische* Proteine und Proteinkomplexe (Chlorophyll *a/b*- und *a/c*-bindende Proteine eukaryotischer Algen, Moose und Pflanzen; LH1- und LH2-Komplexe von Purpurbakterien; Peridin/Chl *a/c*-Komplexe - iPCPs - von Dinoflagellaten)
- *membranextrinsische* Proteinkomplexe (Phycobilisomen von Cyanobakterien und Rotalgen; Chlorosomen von grünen Bakterien).

Die Antennenproteine der Photosysteme höherer Pflanzen, die Chlorophyll *a/b*-bindenden Proteine (*cab*-Proteine), werden in Abschnitt 2.3 detailliert behandelt.

### 2.2.3 ELIPs, LILs, HLIPs, SPCs und PsbS

Aus phototrophen Pro- und Eukaryoten sind neben den bisher genannten eine Reihe weiterer pigmentbindender Proteine mit 1-4 transmembranen Helices isoliert worden. Ihre Homologien zu den *cab*-Proteinen deuten auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung hin (vergl. Abschnitt 1.3.3.1). Möglicherweise binden diese Proteine während der Degradation oder Bildung von Photosystemen bzw. Antennen übergangsweise freie Chlorophylle. Für ELIPs und HLIPs und PsbS wird darüber hinaus eine Beteiligung bei der Ableitung überschüssiger Anregungsenergie postuliert (ADAMSKA 1997; MONTANÉ & KLOPPSTECH 2000).

Aus etiolierten Gerstenkeimlingen wurde ein 17 kDa-Protein (1 Helix) isoliert, das mit einsetzender Belichtung ungewöhnlich schnell transkribiert wird und daher als *early-light-inducible protein* (**ELIP**) bezeichnet wurde (MEYER & KLOPPSTECH 1984). Dieses bindet möglicherweise 5 Chl *a* und 2 Xanthophylle (GREEN & KÜHLBRANDT 1995). Die Expression kann durch Starklicht und niedrige Temperaturen induziert werden (MONTANÉ et al. 1997). Aus der Analyse von ESTs aus *Arabidopsis* konnten Proteine (1-2 Helices) identifiziert werden, die Ähnlichkeiten mit den bekannten ELIP-Proteinen aufweisen. Es ist vorgeschlagen worden, diese Proteine als *light-harvesting-like proteins* (**LILs**) zusammenzufassen (JANSSON 1999).

Aus dem Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 ist ein 8 kDa-Protein (1 Helix) mit Übereinstimmungen zur 1. bzw. 3. Helix der ELIPs und *cab*-Proteine isoliert worden (DOLGANOV et al. 1995; GREEN & KÜHLBRANDT 1995). Da die Transkription des Proteins durch Starklicht induziert werden kann, wird es als *high-light-inducible protein* (**HLIP**) bezeichnet. Eine Deletion des *hliA*-Gens hat keinen Effekt auf das Wachstum bzw. den Phänotyp. Für das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 konnten 5 Gene identifiziert werden, die signifikante Übereinstimmungen mit den Genen für *cab*-Proteine und dem *hliA*-Gen aus *Synechococcus* aufweisen. Vier dieser Gene kodieren ebenfalls für kleine Proteine (1 Helix), deren Expression aber nicht durch Starklicht induziert wird. Sie sind deshalb nicht als HLIPs sondern als *small cab-like proteins* (**SCPs**) bezeichnet worden (FUNK & VERMAAS 1999).

Das 22 kDa-Protein **PsbS** (CP22) des PSII besitzt 4 Helices, von denen drei Homologien zu den *cab*-Proteinen und ELIPs aufweisen (GRIMM et al. 1989), und bindet neben Carotinoiden 5 Chlorophylle (*a* und *b*), die allerdings energetisch nicht miteinander gekoppelt sind. Im Gegensatz zu den *cab*-Proteinen ist es aber auch in Abwesenheit von Chlorophyllen stabil (LJUNGBERG et al. 1984; FUNK et al. 1995).

## 2.3 Chlorophyll *a/b*- bindende Proteine

Bei den eukaryotischen Organismen werden die äußeren Antennen der Photosysteme durch eine Gruppe Chlorophyll-*a/b* bindender Proteine (*cab-Proteine*)<sup>7</sup> gebildet, die in ihrer Gen- und Aminosäuresequenz weitreichende Übereinstimmungen aufweisen und demzufolge auch als Gen/Protein-Familie bezeichnet werden. Seit der ersten Beschreibung (THORNBER 1975) wurden 10 verschiedene Typen von *cab*-Proteinen isoliert, von denen 6 dem Photosystem II und 4 dem Photosystem I zugeordnet werden. Ihre Gene werden entsprechend ihrer Zuordnung zu den Photosystemen als Lhcb1-6 (für das Photosystem II) bzw. Lhca1-4 für das Photosystem I bezeichnet (JANSSON et al. 1992). Die ursprünglich dem PSII zugeordneten Genprodukte von Lhcb1/2 (möglicherweise auch Lhcb3) bilden einen mobilen Antennenkomplex (LHCII), der auch in PSII-freien Präparationen von PSI nachgewiesen werden kann, und offensichtlich auch *in vivo* mit PSI assoziiert ist (vergl. Abschnitt 1.4.4). Für *Arabidopsis* sind zwei weitere Proteine vom Lhca-Typ (Lhca5 und Lhca6) beschrieben worden (JANSSON 1999).

### 2.3.1 Struktur und Funktion

Die *cab*-Proteine sind in der reifen Form<sup>8</sup> ca. 200-270 AS lang [entsprechend 21-28 kDa] und weisen vier konservierte  $\alpha$ -helicale Domänen auf, von denen drei die Thylakoidmembran durchspannen. Die vierte kürzere Helix liegt im Lumen. Aufgrund der weitreichenden Übereinstimmungen der Gen- und AS-Sequenzen wird die für Lhcb1 vorliegende Kristallstruktur (KÜHLBRANDT et al. 1994) als Modell zur Beschreibung der Struktur aller *cab*-Proteine verwendet. In dieser Kristallstruktur konnten bei einer Auflösung von 3.4 Å die Lage der drei membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices, sowie von 2 Xanthophyllen (Lutein) und 12 Chlorophyllen<sup>9, 10</sup> ermittelt werden (Abb. 2-5).

Die *cab*-Proteine vermitteln über die Orientierung der von ihnen gebundenen Pigmente deren energetische Koppelung und damit die gerichtete Weiterleitung der Anregungsenergie (sowohl innerhalb der Antennenproteine als auch über die inneren Antennen der Photosysteme zu ihren Reaktionszentren). Hierdurch vergrößern sie die physiologische Leistungsfähigkeit der mit ihnen assoziierten Kernkomplexe.

Gleichzeitig ermöglichen *cab*-Proteine über die stöchiometrische Variation der jeweiligen Antennengröße der Photosysteme eine rasche physiologische Adaptation an wechselnde Lichtverhältnisse sowie die energetische Balancierung zwischen den Photosystemen (vergl. Abschnitt 1.4.4). Die *cab*-Proteine vermitteln außerdem über die von ihnen gebundenen Carotinoide (vergl. Abschnitt 1.1.3) zentrale Schutzfunktionen bei hohen Lichtintensitäten.

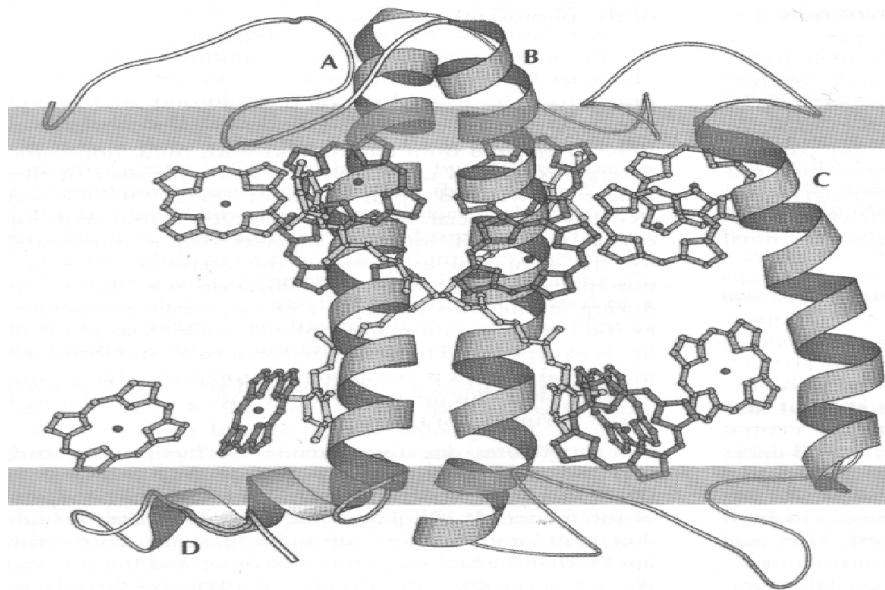
---

<sup>7</sup> Entsprechend ihrer Organisation zu LHC-Komplexen in der Thylakoidmembran der Chloroplasten werden sie auch als LHC-Proteine bezeichnet. Da diese Proteine gleichzeitig häufig Carotinoide binden, wird von einigen Autoren auch die Bezeichnung *chlorophyll-carotenoid proteins* verwendet (GREEN & DURNFORD 1996).

<sup>8</sup> Nach Abspaltung des Transitpeptids und Integration in die Thylakoidmembran.

<sup>9</sup> Bei dieser Auflösung können Chl *a* und Chl *b* nicht differenziert werden. Es wird aber vermutet, daß es sich bei den 7 in der Nähe der Carotinoide gebundenen Chlorophyllen um Chl *a* handelt, da deren enge räumliche Assoziation eine Voraussetzung für den Dexter-Mechanismus bei der Löschung der langlebigen Chl *a*-Triplet-Zustände durch die Carotinoide ist (vergl. Abschnitt 1.1.3).

<sup>10</sup> Die Anzahl gebundener Chlorophylle ist für die *cab*-Proteine nicht identisch. Während ein LHCII-Monomer (Lhcb1/2) 12-14 Chlorophylle bindet, sind es z.B. für Lhcb4 nur 8 (BASSI et al. 1999) und für Lhca1 bzw. Lhca4 nur 7 (SCHMID et al. 1997).



**Abb. 2-5** Übersicht über die Kristallstruktur von Lhcb1 in der Thylakoidmembran; dargestellt sind die drei membrandurchspannenden Helices (Helix A-C), die C-terminale Helix D befindet sich auf der Lumenseite. Ein Monomer bindet voraussichtlich ~12 Chlorophylle, wobei die 7 Chl *a*-Moleküle (dunkel) in der Nähe der linearen Luteine im Zentrum des Monomers lokalisiert sind; nach KÜHLBRANDT et al. (1994).

### 2.3.2 Biogenese

Die für die *cab*-Proteine kodierenden Gene sind im Verlauf der phylogenetischen Entwicklung zum Kerngenom transferiert worden. Die Anzahl der Gene (1 bis zu 16) für ein einzelnes *cab*-Protein ist ebenso wie die Anzahl der Introns (0 bis 2) variabel. Während einige der Proteine nur durch ein Gen (*single-copy*-Gen) kodiert werden, liegen für andere zwei oder mehr<sup>11</sup> Gene vor, die z.T. auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, und unabhängig voneinander transkribiert werden (GRAY 1996; JANSSON 1999). Die Proteine werden mit einer N-terminalen Transitpeptidsequenz (TP), die den Transport in den Chloroplasten vermittelt, im Cytosol translatiert und anschließend in den Chloroplasten importiert.

#### 2.3.2.1 Expression und Translation

Die Expression der *cab*-Gene erfolgt lichtabhängig über eine Phytochrom-vermittelte (WHITE et al. 1992; KELLMANN et al. 1993; ANANDAN et al. 1993) Regulation der Transkriptions-Initiation (SILVERTHORNE & TOBIN 1984), deren Signal-Transduktionsweg bisher nur teilweise verstanden ist (CHORY 1993). Die Transkription oszilliert dabei gleichzeitig mit der „inneren Uhr“ (PAULSEN & BOROGRAAD 1988; BRUNNER & RÜDIGER 1995). Für die LHCII-Gene ist gezeigt worden, daß diese Initiation durch Belichtung etiolierter Keimlinge mit rotem Licht innerhalb von 2 min vollständig induziert werden kann (MORISHIGE & PREISS 1995). Erste RNA-Transkripte können nach ca. 2 h detektiert werden, innerhalb von 8 h erreichen ihre Gehalte den Gleichgewichtszustand im Dauerlicht. Die Proteine können nach 4 h erstmals

<sup>11</sup> Dabei ist die Anzahl der Gene für das Lhcb1-Protein des LHCII mit Abstand am höchsten: sie variiert zwischen 5 (z.B. in *Arabidopsis*; MCGRATH et al. 1992) und 16 (z.B. in *Ruellia* sp.; DUNSMUIR 1985).

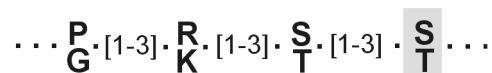
immunologisch detektiert werden, ihr Gehalt steigt innerhalb von 18 h kontinuierlich an und erreicht dann den Gleichgewichtszustand im Dauerlicht (MORISHIGE & PREISS 1995). Dabei gibt es Hinweise auf eine zeitverzögerte Expression der Lhca-Gene nach den Lhcb-Genen (ANANDAN et al. 1993; DREYFUSS & THORNER 1994a, 1994b). Die Synthese der *cab*-Proteine ist möglicherweise mit der Synthese von Pigmenten gekoppelt (PLUMLEY & SCHMIDT 1995). Es ist allerdings noch unklar, wie diese Koordination zwischen cytosolischer Translation der *cab*-Proteine und der in der Chloroplastenhüllmembran lokalisierten Pigmentsynthese reguliert werden könnte. Allerdings gibt es Hinweise darauf, daß die Synthese chloroplastenkodierter chlorophyllbindender Proteine mit der Chlorophyllsynthese gekoppelt ist (EICHACKER et al. 1992). Dabei wird eine parallele Interaktion der beteiligten Enzyme mit teilweise gefalteten Proteinen sowie den Substraten der Pigmentsynthese postuliert, die eine mögliche schädigende Wirkung freier Chlorophylle verhindert (PLUMLEY & SCHMIDT 1995).

### 2.3.2.2 Import in Chloroplasten

Der Import der *cab*-Präproteine erfolgt nach einem für alle in den Chloroplasten importierten Proteine einheitlichen Weg (SOLL & TIEN 1998; SCHLEIFF & SOLL 2000). Dabei wird das Präprotein durch Interaktion mit cytosolischen Chaperonen vom HSP-Typ in eine importkompetente Form gefaltet und interagiert mit dem in der äußeren Hüllmembran lokalisierten Importkomplex (TOC). Das Präprotein wird dann nach Eintritt in einen Proteinkanal der äußeren Hüllmembran (OEP75) unter GTP-Hydrolyse gleichzeitig durch beide Chloroplastenhüllmembranen importiert, wobei neben TOC gleichzeitig der Importkomplex der inneren Hüllmembran (TIC) passiert wird. Bereits während oder unmittelbar im Anschluß an den Import wird das TP durch eine Metalloendopeptidase (*stromal processing peptidase*, SPP) entfernt (VAN DER VERE et al. 1995).

Die Transitpeptide der *cab*-Präproteine haben eine Länge von ~20-120 AS. Ihr N-terminaler Bereich weist keine positiv geladenen AS oder Glycin und Prolin auf, während die zentrale Region mehrere hydroxylierte AS (Serin und Threonin) besitzt. Der C-terminale Bereich bildet eine  $\beta$ -Faltblattstruktur (SOLL & TIEN 1998). Vor der Interaktion mit OEP86 des TOC-Komplexes ist die Phosphorylierung eines Serins oder Threonins in einem konservierten Motiv (Abb. 2-6) erforderlich (WAEAGEMANN & SOLL 1996). Aus einem Vergleich der AS-Sequenzen der z. Zt. bekannten TPs von chloroplasten-translozierten Proteinen sind bisher keine durchgängig konservierten Domänen bzw. Motive identifiziert worden. Die Information wird vielmehr möglicherweise durch die Konformation der Sekundär- oder Tertiärstruktur der Proteine vermittelt. In hydrophober Umgebung bilden die Transitpeptide ein bzw. zwei  $\alpha$ -helicale Domänen am N- und/oder C-Terminus aus. Diese könnten im Kontakt mit der Chloroplastenhüllmembran als „*silent recognition elements*“ ein Erkennen durch den Import-rezeptor und die Initiation des Imports in den Chloroplasten induzieren (BRUCE 2000, DABNEY-SMITH et al. 1999).

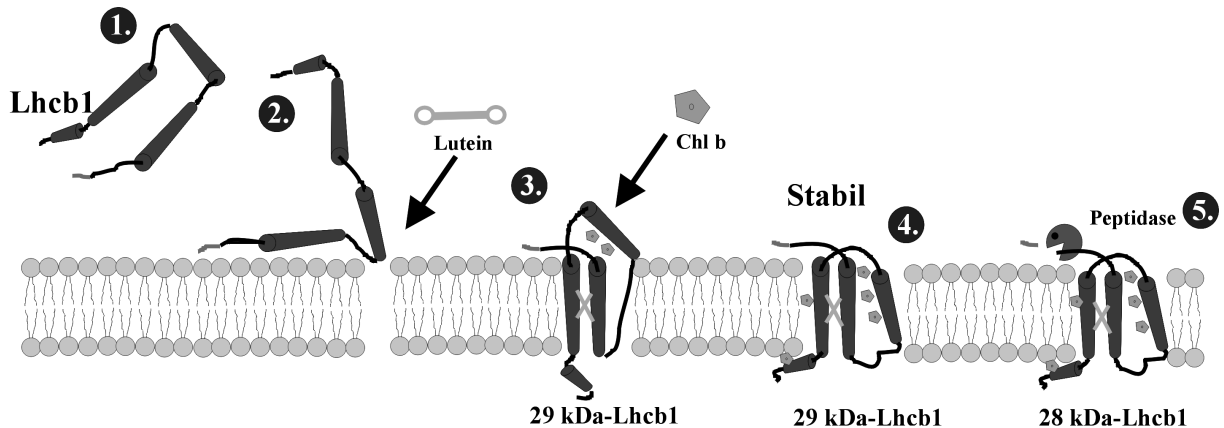
**Abb. 2-6** Konserviertes Motiv für die Phosphorylierung innerhalb der Transitpeptide Chloroplasten-translozierter Proteine nach WAEAGEMANN & SOLL (1996); grau unterlegt: die zu phosphorylierende AS (Serin oder Threonin).





### 2.3.2.3 Assemblierung

Nach dem Import in den Chloroplasten erfolgt die Bindung der Pigmente und die Integration in die Thylakoidmembran. Während die Anwesenheit von Chl *b* für einige *cab*-Proteine (z.B. Lhcb1 und Lhcb6 sowie Lhca4; BOSSMANN et al. 1997) eine unabdingbare Voraussetzung für die stabile Integration zu sein scheint (Abb. 2-7), ist für andere nachgewiesen, daß sie auch in Chl *b*-defizienten Mangelmutanten in die Membran eingebaut werden können.



**Abb. 2-7** Die stabile Integration von Lhcb1 in die Thylakoidmembran erfolgt nach BOSSMANN et al. (1999) in 5 Schritten: nach Abspaltung der Transitpeptidsequenz (1) erfolgt eine Interaktion mit der Membran, wobei zunächst die beiden Lutein-Moleküle die Faltung einleiten (2). Die Anwesenheit von Chl *b* ist unabdingbar für die korrekte Faltung und stabile Integration in die Membran (4). Durch eine Peptidase wird der Monomer zu seiner endgültigen Form (28 kDa) prozessiert (5); Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Björn Bossmann.

Dies entspricht Ergebnissen, nach denen die konservierten Bindestellen für Chlorophylle möglicherweise nicht alle bzw. nicht in allen *cab*-Proteinen obligat zwischen Chl *a* und Chl *b* diskriminieren (ROS et al. 1998; SCHMID et al. 2001). Sowohl Lhca- als auch Lhcb-Proteine werden zunächst als Monomere in der Thylakoidmembran nachgewiesen, bevor sie mit den Reaktionszentren interagieren bzw. höhermolekulare Komplexe (LHCII, LHCI-730) bilden (DREYFUSS & THORNER 1994a, 1994b). Für die vollständige Insertion der Proteine Lhcb1 und Lhcb6 in die Thylakoidmembran ist zudem eine Beteiligung des Stromaproteins CP54 nachgewiesen worden (CLINE & HENRY 1996).

Auf welche Art und Weise nach der stabilen Integration die korrekte molekulare Interaktion der monomeren *cab*-Proteine mit den entsprechenden „richtigen“ Photosystemen bzw. Partnern in oligomeren LHC-Komplexen vermittelt wird, ist noch unklar. Möglicherweise weisen die spezifischen Unterschiede in den stroma- und lumen-exponierten Peptidabschnitten der *cab*-Proteine auf eine Beteiligung dieser nicht unmittelbar an der Bindung der Pigmente beteiligten Domänen an einer solchen Interaktion hin (DURNFORD et al. 1999). Für Lhca-Proteine ist ein „PSI-spezifisches“ Erkennungsmotiv postuliert worden, das eine spezifische Interaktion mit PSI-Kernkomplexen vermitteln soll (SCHWARTZ et al. 1991). Für die LHCII-Trimere ist ein N-terminales „Trimerisierungsmotiv“ identifiziert worden, dessen Entfernung eine Trimerisierung der Lhcb1/2-Untereinheiten verhindert (HOBE et al. 1995; KUTTKAT et al. 1995).

### 2.3.3 Phylogenetische Entwicklung

Alle photosynthetischen Eukaryoten<sup>12</sup> besitzen Lichtsammelproteine mit drei membrandurchspannenden Helices (DURNFORD et al. 1999). In Cyanobakterien sind solche membranintrinsicen Proteine vom LHC-Typ bislang nicht nachgewiesen worden<sup>13</sup>. Es wird daher angenommen, daß sämtliche LHC-Proteine auf eine gemeinsame Form zurückgehen, die vor der getrennten Entwicklung der Rot- und Grünalgen entstanden ist (Abb. 2-8). Ob diese Proteine bereits in Cyanobakterien entwickelt wurden, ist unklar. Allerdings wird nicht ausgeschlossen, daß diese entweder in rezenten Spezies bisher noch nicht entdeckt oder im Verlauf der phylogenetischen Entwicklung wieder verloren worden sind (DURNFORD et al. 1999). Die 10 verschiedenen Typen von *cab*-Proteinen sind seit mindestens 345 Mio. Jahren konserviert (JANSSON & GUSTAFSSON 1991). Es wird daher vermutet, daß jedes dieser Proteine eine eigene spezifische Funktion aufweist, die in rezenten eukaryotischen Algen, Moosen und Pflanzen in der späteren Entwicklung nicht ohne weiteres verloren werden konnte (JANSSON et al. 1997).

#### 2.3.3.1 Evolution von LHC-Antennen

Aufgrund der Homologie zwischen der 1. und 3. transmembranen Helix der *cab*-Proteine sowie und des PsbS-Proteins sind Modelle entwickelt worden, nach denen sich durch wiederholte Duplikation und Fusion der Gene für HLIP-ähnliche Proteine (1 Helix) über ELIP-ähnliche Proteine (2 Helices) Proteine von PsbS-Typ (4 Helices) entwickelt haben, aus denen durch Reduktion einer Helix die *cab*-Proteine (3 Helices) hervorgegangen sind (GREEN & PICHERSKY 1994; MONTANÉ & KLOPPSTECH 2000).

Die postulierte Funktion der HLIPs und ELIPs in der Ableitung überschüssiger Anregungsenergie (vergl. Abschnitt 1.3.3.1) stimmt mit einem darüber hinausgehenden Modell überein, nach dem sich diese Proteine von einem ursprünglichen Protein mit 11 transmembranen Helices ableiten lassen, das gleichzeitig Vorstufe der Reaktionszentren der Photosysteme gewesen sein könnte. Grundlage hierfür sind Beobachtungen, nach denen sich die homologen Helices der *cab*-Proteine nicht nur von den ELIPs bzw. HLIPs herleiten lassen, sondern gleichzeitig Übereinstimmungen mit zwei Helices der Untereinheiten des Photosystems I (vergl. Abschnitt 1.4.1) aufweisen.

Für das Protein mit 11 transmembranen Helices wird eine ursprüngliche Schutzfunktion vor UV-Licht postuliert. Diese soll zunächst vor allem durch zahlreiche aromatische AS vermittelt worden sein, die im UV-Bereich absorbieren und in rezenten *cab*-Proteinen z.T. als Bindestellen der Chlorophylle konserviert geblieben sind. Durch Bindung von Pigmenten könnte diese Funktion der dissipativen Energieableitung sekundär verbessert worden sein. Erst danach seien bei Verlust von Pigmenten freiwerdende Bindestellen durch an der Ladungstrennung beteiligte Kofaktoren (z.B. Fe-S-Zentren) ersetzt und damit Reaktionszentren - zunächst vom Typ I - konstituiert worden (MULKIDJANIAN & JUNGE 1997).

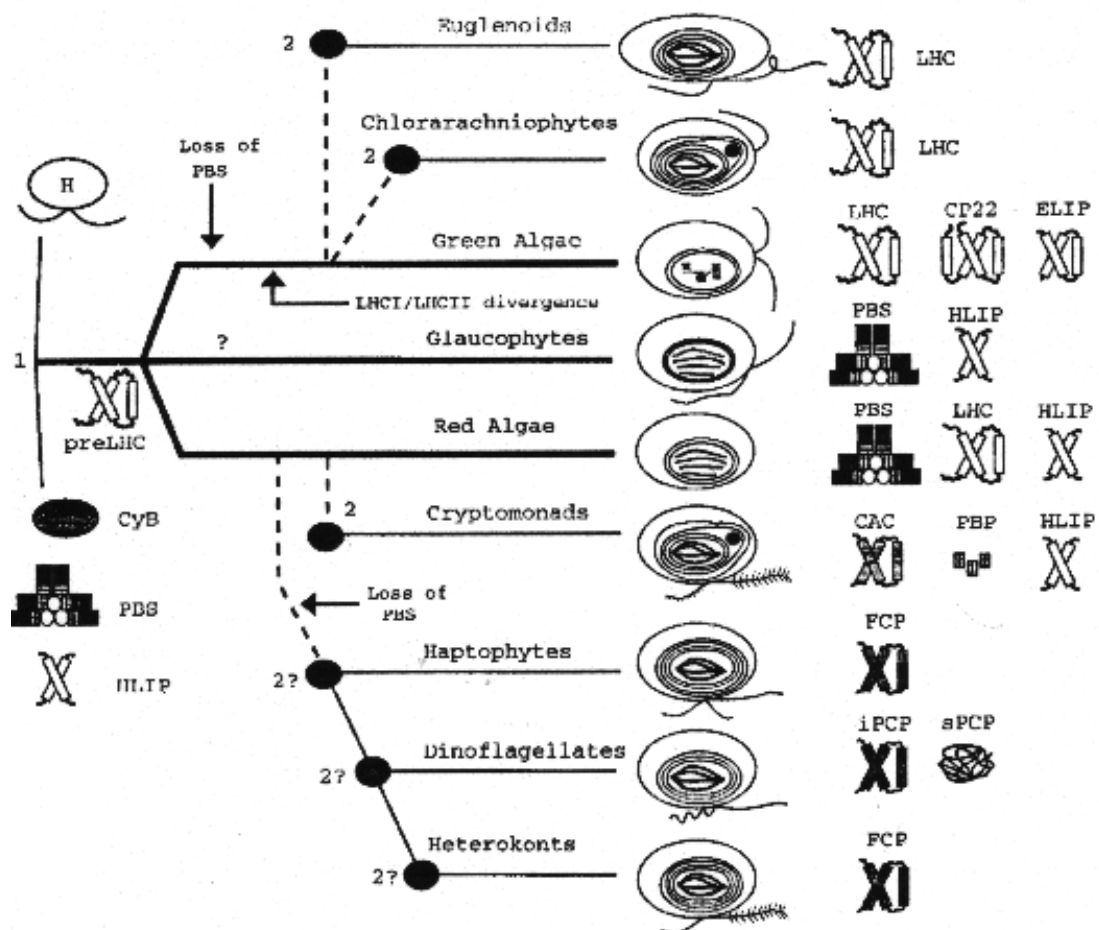
---

<sup>12</sup> Für die Glaukophyten liegen bislang keinerlei Informationen über die An- oder Abwesenheit von LHC-Proteinen vor (DURNFORD et al. 1999).

<sup>13</sup> In PSI-Präparationen aus dem Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus* sind in elektronenmikroskopischen Aufnahmen kürzlich Komplexe identifiziert worden, die möglicherweise membranintrinsic chlorophyllbindende Proteine vom LHC-Typ darstellen (MANGELS 2001).

### 2.3.3.2 Differenzierung in LHCI und LHCII

Die LHCs in Rotalgen sind spezifisch mit PSI assoziiert (MARQUARDT & RHIEL 1997). Daher wird angenommen, daß membranintrinsic LHC-Antennen zunächst nur mit PSI assoziiert waren (DURNFORD et al. 1999). Aufgrund der deutlich höheren Unterschiede zwischen den Proteinen vom LHCI-Typ wird gleichzeitig vermutet, daß ihre Differenzierung in die unterschiedlichen Typen vor der Entwicklung der LHCII-Proteine begonnen hat. Dies wird unterstützt durch die Ähnlichkeiten zwischen Lhcb6 (CP24) bzw. Lhcb4 (CP29) mit den LHCI-Proteinen (HWANG & HERRIN 1993).



**Abb. 2-8** Modell zur phylogenetischen Entwicklung von LHC-Proteinen und Plastiden (aus DURNFORD et al. 1999): Nach der primären Endosymbiose (1) zwischen einer nicht-photosynthetischen Zelle (H) und einem Cyanobakterium (CyB) mit Phycobilisomen (PBS) und durch Starklicht induzierbaren Proteinen (HLIPs) wird ein frühes LHC-ähnliches Lichtsammelprotein (preLHC) entwickelt, aus dem in der Folge sämtliche intrinsischen LHC-Antennen (ELIPs = *early-light-inducible proteins*, FCP = Fucoxanthin/Chl-Proteine, iPCP = Peridin/Chl-Proteine, CAC = Chl *a/c*-bindende Proteine) entwickelt werden. Ein lateraler Plastidentransfer, möglicherweise in einer sekundären Endosymbiose (2), wird durch gestrichelte Linien angedeutet. sPCP = lösliche Peridin/Chl-Proteine, • = Nucleomorph nach sekundärer Endosymbiose.

### 2.3.4 Rekonstitution

Durch experimentelle Re-Assemblierung zuvor präparierter lipid- und pigmentfreier Proteine aus Thylakoidmembranen mit Pigmentextrakten aus Spinat konnten PLUMLEY & SCHMIDT (1987) erstmals funktionelle LHCII-Proteine *in vitro* rekonstituieren, deren Eigenschaften vergleichbar mit den Eigenschaften nativer LHCII-Komplexe waren. Neben einer spezifischen Assoziation von Chl *a* und *b* mit den Bindungsstellen konnte bereits in dieser Arbeit eine essentielle Beteiligung von Xanthophyllen an der Faltung stabiler Komplexe nachgewiesen werden. Mit dieser Methode der „*in vitro* Rekonstitution“ konnten später auch in *E. coli* überexprimierte rekombinante *cab*-Polypeptide mit Pigmentextrakten rekonstituiert werden (PAULSEN et al. 1990; PAULSEN et al. 1993). In einem modifizierten Rekonstitutionsprotokoll sind rekombinante LHCII-Proteine mit einem His-Tag in einer Ni<sup>+</sup>-Affinitäts-Chromatographie mit Pigmenten rekonstituiert und aufgereinigt worden (ROGL et al. 1998).

Damit wurde ein experimentelles Modellsystem etabliert, in dem durch gezielte Variation von eingesetzten Pigmenten bzw. Lipiden zunächst einzelne spezifische molekulare Interaktionen der *cab*-Proteine mit ihren Chromophoren untersucht werden konnten (Paulsen et al. 1993; KLEIMA et al. 1999). Darüber hinaus konnten über die Mutation bzw. Deletion einzelner AS bzw. Peptidabschnitte funktionelle Domänen für die Pigmentbindung bzw. Proteininteraktion identifiziert werden (PAULSEN & HOBE 1992; PAULSEN & KUTTKAT 1993; HOBE et al. 1995, 1994; KUTTKAT et al. 1996; REMELLI et al. 1999; ROGL & KÜHLBRANDT 1999; HEINEMANN & PAULSEN 1999;).

Die für die Rekonstitution von Proteinen des LHCII entwickelte Methode wurde im weiteren auch erfolgreich für die Rekonstitution der minoren *cab*-Proteine des PSII, Lhcb4/CP29 (GIUAFFRA et al. 1997; BASSI et al. 1999; SIMONETTO et al. 1999; PASCAL et al. 2001), Lhcb5/CP26 (ROS et al. 1998; FRANK et al. 2001) und Lhcb6/CP24 (GIUAFFRA et al. 1995) sowie für Proteine des LHCI (SCHMID et al. 1997, 1998, 2001; MELKOZERNOV et al. 2000b; RUPPRECHT et al. 2000) eingesetzt. Unter Einbeziehung der Analyse der Peptidsequenzen sowie der verfügbaren Daten aus der Kristallstruktur des LHCII (KÜHLBRANDT et al. 1994) konnten dabei insbesondere konservierte chlorophyll-bindende AS innerhalb der *cab*-Proteine identifiziert werden. Für einzelne *cab*-Proteine (z.B. Lhcb4/CP29) sind auf dieser Basis detaillierte molekulare Modelle (Abb. 2-9) zur Bindung von Chl *a* und *b* sowie zu ihrer exakten Anordnung mit den daraus resultierenden Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften vorgelegt worden (BASSI et al. 1999).

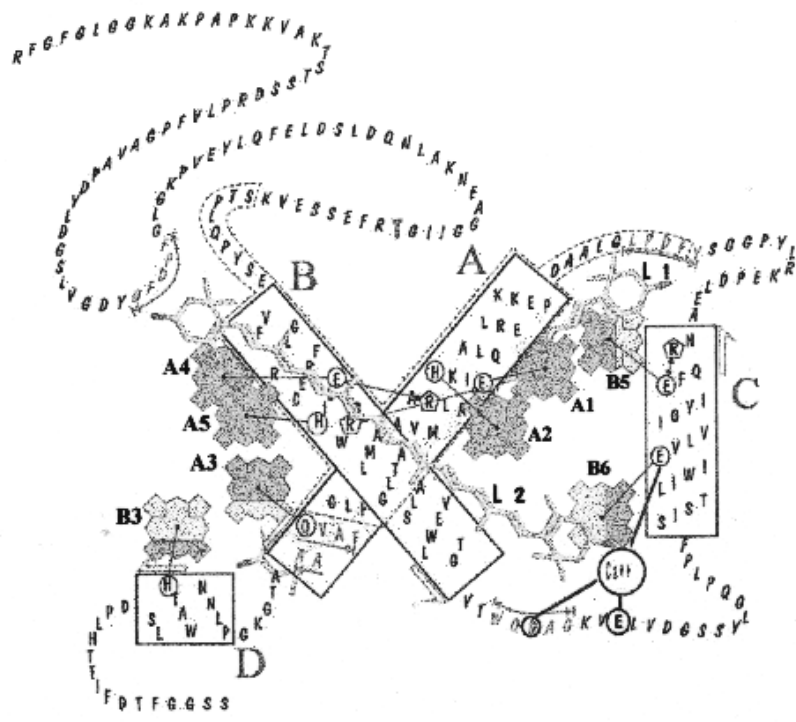
Dabei konnte gezeigt werden, daß einzelne Typen von *cab*-Proteinen spezifisch unterschiedliche Typen und Mengen von Pigmenten binden. Die Proteine des LHCII (Lhcb1/Lhcb2) binden demnach 12-14 Chlorophylle (7-8 Chl *a* und 5-6 Chl *b*) sowie 2-3 Xanthophylle (2 Luteine, ein Neoxanthin sowie substöchiometrische Mengen von Violaxanthin). Demgegenüber binden die LHCI-Proteine (Lhca1 bis Lhca4) erheblich weniger Chlorophylle (6-8) sowie lediglich ein Lutein und substöchiometrische Mengen Violaxanthin (SCHMID et al. 2001)<sup>14</sup>.

---

<sup>14</sup> Daten bezogen auf einen Monomer.

Die spektroskopischen Eigenschaften rekonstituierter Komplexe entsprechen den Eigenschaften der isolierten nativen Proteine (PETERMAN et al. 1996; PASCAL et al. 2001). Dies ermöglicht Untersuchungen zu den molekularen Bedingungen, unter denen einzelne Chlorophylle der LHCI-Antennen eine charakteristische langwellige Absorption und Fluoreszenz aufweisen (LW Chls; vergl. Abschnitt 1.1.2). In spektroskopischen Untersuchungen konnten diese LW Chls in Übereinstimmung mit Untersuchungen von nativen LHCI-Komplexen auf Lhca4 lokalisiert werden. Rekonstituiertes Lhca4 zeigt bei 77 K sowohl als Monomer als auch im Heterodimer (LHCI-730) mit Lhca1 die charakteristische F730-Fluoreszenz (SCHMID et al. 1997). Es ist allerdings noch unklar, ob diese Fluoreszenz von einem excitonisch stark gekoppelten Chl *a*-Dimer (GOBETS et al. 1994; IHALAINEN et al. 2000) emittiert wird oder ob spezifisch von Lhca4 gebundenes Chl *b* zur langwelligen Fluoreszenzemission beiträgt (SCHMID et al. 2001).

Neben den LW Chls des LHCI-730 sind kürzlich weitere langwellig fluoreszierende Chlorophylle identifiziert wurden, die möglicherweise von den Proteinen des LHCI-680 (Lhca2/Lhca3) gebunden werden (IHALAINEN et al. 2000). Dabei weisen Untersuchungen von Lhca2- und Lhca3-Antisensemutanten von *Arabidopsis* auf eine Beteiligung dieser Proteine an der langwelligen Fluoreszenzemission von PSI/LHCI-Komplexen *in vivo* hin (GANETEG et al. 2001). Eine Fluoreszenz im Bereich von 730 nm ist für isolierte LHCI-680 Komplexe bisher aber nicht beobachtet worden<sup>15</sup>.



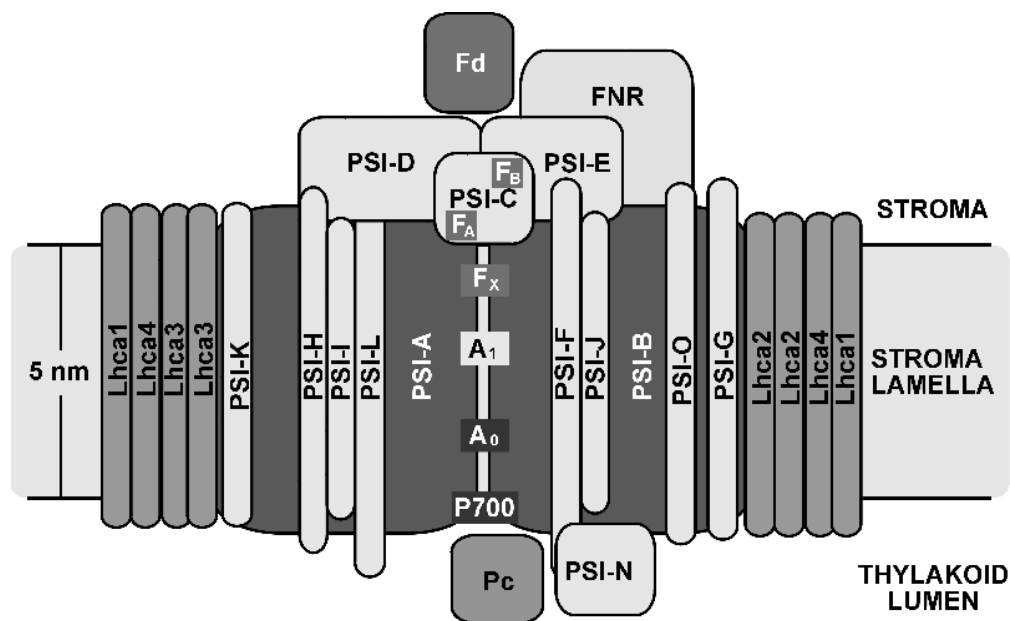
**Abb. 2-9** Molekulares Modell für Lhcb4 (CP29) mit Angabe der Chlorophyll (A1 bis A5 sowie B3, B5 und B6)-bindenden AS sowie Xanthophyll (L1 und L2)-bindenden Regionen (unterstrichen). Die Bindestellen A1, A2, A4 und A5 binden selektiv Chl *a*, während die übrigen Bindestellen sowohl Chl *a* als auch Chl *b* binden können (aus BASSI et al. 1999).

<sup>15</sup> Allerdings konnten IHALAINEN et al. (2000) in isolierten LHCI-680-Komplexen langwellig fluoreszierende Chlorophylle im Bereich von 702 nm identifizieren.

## 2.4 Das Photosystem I höherer Pflanzen

Das Photosystem I ist bei eukaryotischen photoautotrophen Organismen in der Thylakoidmembran der Chloroplasten lokalisiert. Der Multiproteinkomplex (Abb. 2-10) katalysiert die Übertragung von Elektronen von Plastocyanin auf Ferredoxin und kann daher formal als *Plastocyanin-Ferredoxin-Oxidoreduktase* bezeichnet werden<sup>16</sup>. Innerhalb der Elektronentransportkette der Thylakoidmembran ist PSI sowohl am *linearen* als auch am *zyklischen Elektronentransport* beteiligt<sup>17</sup>.

Der Komplex umfaßt in höheren Pflanzen bis zu 18 verschiedene Proteine von denen 14 (PSI-A bis PSI-N) den PSI-Kern (*core complex*) und 4 (Lhca1 bis Lhca4) die äußere Antenne (*LHCI*) bilden. Während die Kernuntereinheiten in jedem Komplex jeweils nur einmal vorhanden sind, sind es bei den Antennenproteinen von jedem Typ jeweils zwei. Letztere lassen sich in zwei weitere Subkomplexe (LHCI-680 und LHCI-730) untergliedern (Abschnitt 1.4.2). In Abhängigkeit von den Anzucht- und Präparationsbedingungen können mit PSI-Komplexen zusätzlich variable Mengen von LHCII-Trimeren isoliert werden, die unter bestimmten Bedingungen *in vivo* mit dem PSI assoziiert sind (vergl. Abschnitt 1.4.4).



**Abb. 2-10** Schematisches Modell (nach Scheller et al. 2001) zur Anordnung der PSI-Proteinuntereinheiten (PSI-A bis PSI-N sowie PSI-O) sowie der Antennenproteine des LHCI (Lhca1 bis Lhca-4) in Eukaryoten; FNR = Ferredoxin-NADPH-Oxidoreduktase, Fd = Ferredoxin, PC = Plastocyanin. Zur Beschreibung der Kofaktoren der Elektronentransportkette (P700, A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, F<sub>X</sub>, F<sub>A</sub> und F<sub>B</sub>) vergl. Abschnitt 1.4.1.1.

<sup>16</sup> In Cyanobakterien ist PSI in der Plasmamembran lokalisiert. Anstelle von Plastocyanin kann hier Cytochrom c<sub>6</sub> als Elektronendonator, anstelle von Ferredoxin Flavodoxin als Akzeptor fungieren (MÜHLENHOFF et al. 1996). Gleichzeitig wird für cyanobakterielles PSI *in vivo* eine trimere Form beobachtet, die über die Untereinheit PSI-L vermittelt wird. Diese ist im eukaryotischen PSI möglicherweise durch die in Cyanobakterien nicht vorhandene Untereinheit PSI-H abgeschirmt (KRUUP et al. 1994, 1997).

<sup>17</sup> Im *linearen Elektronentransport* werden die bei der Oxidation des Wassers am PSII freigesetzten Elektronen über den Cytochrom b<sub>6</sub>f-Komplex auf Plastocyanin und von dort über PSI und Fd auf NADP<sup>+</sup> übertragen. Im *zyklischen Elektronentransport* werden Elektronen von Fd über den Cytochrom b<sub>6</sub>f-Komplex und von dort zurück zum PSI transferiert. In beiden Fällen werden bilanzmäßig Protonen über die Thylakoidmembran transportiert.

Tabelle 1-1 Übersicht über PSI-Untereinheiten höherer Pflanzen (nach SCHELLER et al. 2001, ergänzt nach FROMME et al. 2001 und KNOETZEL et al. 2001) mit Angaben zur Lokalisation<sup>a</sup> des Gens (cp = im Chloroplasten, kn = im Kern) und der mit den Genprodukten assoziierten Kofaktoren (Erläuterung s. Abschnitt 1.4.1.1). Die molekularen Massen<sup>b</sup> für PSI-A und PSI-B stammen aus Mais, für PSI-M aus Pinie, für PSI-O aus *Arabidopsis*, für alle übrigen Untereinheiten aus Gerste.

Protein	Gen	Ort <sup>a</sup>	[kDa] <sup>b</sup>	Kofaktoren	Funktion
PSI-A	<i>PsaA</i>	cp	83.2	~ 79 Chl <i>a</i> , ~ 22 $\beta$ -Carotin	Antennenfunktion, Ladungstrennung, Elektronentransport
PSI-B	<i>PsaB</i>	cp	82.4	P700, A <sub>0</sub> , A <sub>1</sub> , F <sub>x</sub>	
PSI-C	<i>PsaC</i>	cp	8.8	F <sub>A</sub> , F <sub>B</sub>	Elektronentransport
PSI-D	<i>PsaD</i>	kn	17.6	-	Bindung von Ferredoxin und PSI-C
PSI-E	<i>PsaE</i>	kn	10.8	-	Bindung von Ferredoxin und FNR, beteiligt am zyklischen Elektronentransport
PSI-F	<i>PsaF</i>	kn	17.5	-	Bindung von Plastocyanin und LHCI-730
PSI-G	<i>PsaG</i>	kn	10.8	Chl <i>a</i> ?	Bindung von LHCI-680
PSI-H	<i>PsaH</i>	kn	10.2	Chl <i>a</i> ?	Bindung von LHCII ( <i>state-transitions</i> ), Stabilisierung von PSI-D
PSI-I	<i>PsaI</i>	cp	4.0	-	Stabilisierung von PSI-L
PSI-J	<i>PsaJ</i>	cp	5.0	3 Chl <i>a</i>	Stabilisierung von PSI-F
PSI-K	<i>PsaK</i>	kn	9.0	2 Chl <i>a</i>	Bindung von LHCI-680
PSI-L	<i>PsaL</i>	kn	18.0	3 Chl <i>a</i>	Stabilisierung von PSI-H
PSI-M	<i>PsaM</i>	cp	3.3	1 Chl <i>a</i>	- in Angiospermen nicht vorhanden -
PSI-N	<i>PsaN</i>	kn	9.8	-	Interaktion mit Plastocyanin
PSI-O	<i>PsaO</i>	?	10.1	?	?

PSI-Komplexe mit vollständiger LHCI-Antenne binden ohne assoziierte LHCII-Trimere ~200 Chlorophyll pro Reaktionszentrum und weisen in Abhängigkeit von den gewählten Präparationsbedingungen Chl *a/b*-Verhältnisse von ~6.1 bis ~7.7 auf (JANSSON et al. 1997). Im wesentlichen können zwei Subtypen differenziert werden, die in der Thylakoidmembran heterogen verteilt sind:

- PSI $\alpha$ -Komplexe binden neben dem vollständigen LHCI bis zu vier LHCII-Trimere (Lhcb1/Lhcb2<sup>18</sup>) und sind in den Randbereichen der Granastapel lokalisiert; innerhalb der inneren Bereiche der Granastapel gibt es eine zweite PSI $\alpha$ -Population, die kein Lhca1 und nur sehr wenig Lhca4 besitzt. Stattdessen binden diese Komplexe möglicherweise weitere LHCII-Trimere (JANSSON et al. 1997; KITMITTO et al. 1997).
- PSI $\beta$ -Komplexe binden neben einem vollständigen LHCI einen LHCII-Trimer (Lhcb1/Lhcb2) und sind in den Stromabereichen der Thylakoiden lokalisiert.

Es wird angenommen, daß die unterschiedlichen PSI-Subtypen entsprechend ihrer Lokalisation entweder vorwiegend am linearen (PSI $\alpha$ ) oder zyklischen (PSI $\beta$ ) Elektronentransport beteiligt sind (JANSSON et al. 1997).

<sup>18</sup> Möglicherweise bindet PSI $\alpha$  auch LHCII-Trimere, die Lhcb3 enthalten. Diese werden allerdings während der Isolierung relativ leicht abgelöst (JANSSON et al. 1997)

Der überwiegende Teil der PSI-Proteinuntereinheiten wird bei eukaryotischen Organismen im Kerngenom kodiert (Tabelle 2-1) und nach cytosolischer Translation über den in Abschnitt 1.3.2.2 beschriebenen Weg in den Chloroplasten importiert. Über die an der Assemblierung der PSI-Komplexe beteiligten Faktoren ist bisher wenig bekannt. In *Chlamydomonas* und Tabak ist eine Beteiligung der *ycf3*- und *ycf4*-Genprodukte beschrieben, die gleichzeitig die Transkription nicht beeinflusst (BOUDREAU et al. 1997; RUF et al. 1997). Die Gersten-Mutante *viridis-zb*<sup>63</sup> enthält weniger als 5 % des Wildtyp-Gehaltes an PSI, verfügt aber über eine vollständige LHCI-Ausstattung auf Wildtyp-Niveau (NIELSEN et al. 1996). Die Faktoren dieser ungewöhnlichen Assemblierung der LHCI-Antenne ohne vorhandenes Reaktionszentrum sind auch hier nicht aufgeklärt (SCHELLER et al. 2001).

Liegen die terminalen Elektronenakzeptoren (Fd bzw. NADP) der Elektronentransportkette vollständig in reduzierter Form vor (z.B. bei hohen Lichtintensitäten), so werden Elektronen am PSI auf O<sub>2</sub> übertragen. Die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies schädigen zunächst die von PSI-C gebundenen terminalen [4Fe-4S]-Cluster. Damit einhergehend wird ein Abbau von PSI-Untereinheiten wie PSI-B (SONOIKE 1996) und PSI-A (TJUS et al. 1999) beobachtet. In einigen temperatursensitiven Pflanzenspezies wird der PSI-Komplex bei niedrigen Temperaturen (>0°C bis ~10°C) bereits bei moderaten Lichtintensitäten in einer Form geschädigt, die der für das PSII beschriebenen Photoinhibition bei hohen Lichtintensitäten entspricht (SONOIKE 1998; TERASHIMA et al. 1998; TJUS et al. 1999). Während das PSII innerhalb weniger Stunden in einem mittlerweile gut aufgeklärten Reparaturzyklus wiederhergestellt wird (LONG et al. 1994), erfordert die Reparatur photoinhibierter PSI-Komplexe mehrere Tage (TEICHER et al. 2000; TJUS et al. 1998). Da somit eine kurzzeitige Exposition bei entsprechend ungünstigen Licht-/Temperatur-Bedingungen über die Schädigung des PSI die Photosynthesekapazität nachhaltig beeinträchtigt, ist die Photoinhibition von PSII möglicherweise auch als Schutzfunktion für das nach einer Inhibition nur langsam regenerierbare PSI zu interpretieren (SCHELLER et al. 2001).

#### 2.4.1 PSI-Kern

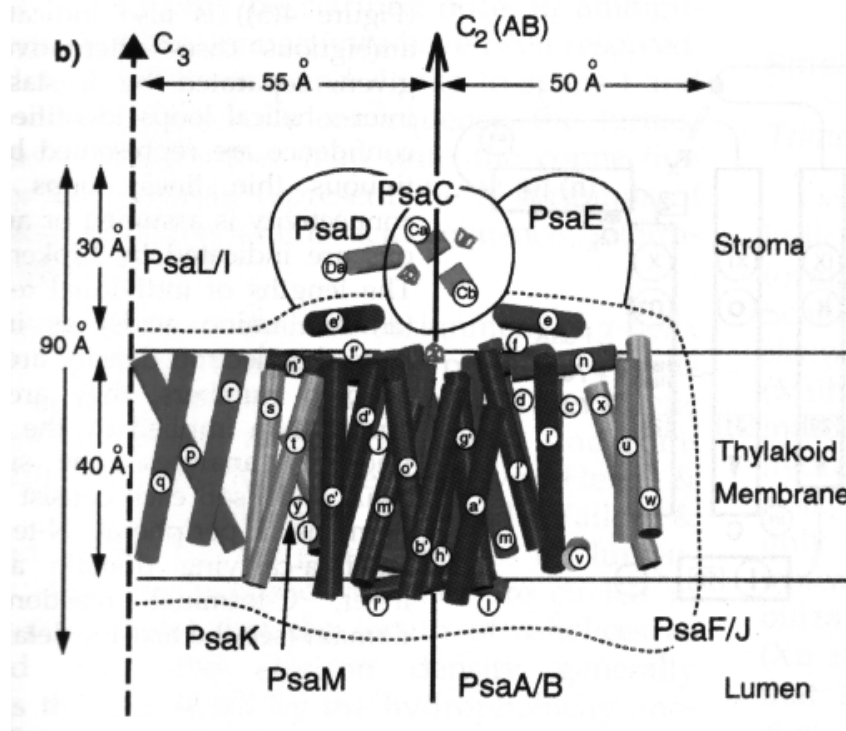
Von den 17 bzw. 18 Untereinheiten des PSI-Kernkomplexes (vergl. Tabelle 2-1), die aus eukaryotischen phototrophen Organismen isoliert werden können, werden drei (PSI-G, PSI-H und PSI-N) ausschließlich in Chlorophyten gefunden. Die Untereinheit PSI-M ist darüber hinaus bisher nicht in Angiospermen sondern lediglich in Gymnospermen, Moosen und Grünalgen nachgewiesen worden. Alle übrigen Untereinheiten werden dagegen auch in Cyanobakterien gefunden (SCHELLER et al. 2001). Aufgrund dieser Übereinstimmungen lassen sich experimentelle Befunde, die für cyanobakterielles PSI vorliegen, auf das PSI höherer Pflanzen übertragen. Für cyanobakterielles PSI aus *Synechococcus elongatus* liegt ein Modell auf der Grundlage von Kristallstrukturen vor (SCHUBERT et al. 1997; JORDAN et al. 2001), in denen ein großer Teil der gebundenen Pigmente und Kofaktoren der Elektronentransportkette bei Auflösungen von 2.5 und 4 Å lokalisiert werden konnte. Dieses Modell dient auch als Grundlage der Beschreibung der Struktur eukaryotischer PSI-Komplexe. Elektronenmikroskopische Aufnahmen kristallisierter PSI-Komplexe aus *Spinacia* (KITMITTO et al. 1997, 1998) deuten darauf hin, daß eukaryotisches PSI mit 15-16 x 11-12.5 nm etwas größer ist, als der cyanobakterielle PSI-Monomer mit 13 x 10 nm (BOEKEMA et al. 1990) bzw. 13 x 10.5 nm (SCHUBERT et al. 1997).



### 2.4.1.1 Dimer und primäre Akzeptoren

Der Kernkomplex des PSI wird durch zwei große Proteinuntereinheiten (PSI-A und PSI-B) mit homologer AS-Sequenz gebildet, die mit jeweils 11 Helices die Membran durchspannen (Abb. 2-11). Zusammen mit der zum Stroma orientierten Untereinheit PSI-C binden diese sämtliche an der Ladungstrennung und Weiterleitung der Elektronen beteiligten Kofaktoren. Dabei werden P700 sowie die Kofaktoren  $A_0$ ,  $A_1$  und  $F_X$  von den 5 C-terminalen Helices von PSI-A und PSI-B, die beiden  $[4Fe-4S]$ -Cluster  $F_A$  und  $F_B$  von PSI-C gebunden (FROMME et al. 2001).

Nach Anregung des Reaktionszentrums P700 (ein Chl *a* -Dimer<sup>19</sup>) wird die damit induzierte Bildung eines Radikalpaares durch Reduktion des primären Akzeptors  $A_0$  (Chl *a*) stabilisiert. Das oxidierte P700 wird durch Plastocyanin reduziert. Zwischen P700 und  $A_0$  kann in der Röntgenstruktur ein weiteres Chl *a* lokalisiert werden, das möglicherweise ebenfalls an der Weiterleitung beteiligt ist. Von  $A_0$  werden die Elektronen über  $A_1$  (ein Phyllochinon) an  $F_X$  (ein  $[4Fe-4S]$ -Cluster) weitergegeben. Aller Voraussicht nach werden die Elektronen von  $F_X$  über  $F_B$  nach  $F_A$  weitergeleitet, so daß Ferredoxin (Fd) über  $F_A$  reduziert wird (FROMME et al. 2001). In Abhängigkeit von der Verfügbarkeit oxidierten NADPs können die Elektronen von Fd entweder im *linearen* Elektronentransport über FNR auf NADP oder im *zyklischen* Elektronentransport auf Plastochinon am Cytochrom  $b_6/f$ -Komplex übertragen werden.



**Abb. 2-11** Schematische Übersicht über die Anordnung der Helices der Proteinuntereinheiten des Kernkomplexes von Photosystem I aus *Synechococcus elongatus* mit Angabe der räumlichen Ausdehnungen innerhalb der Thylakoidmembran (aus SCHUBERT et al. 1997).

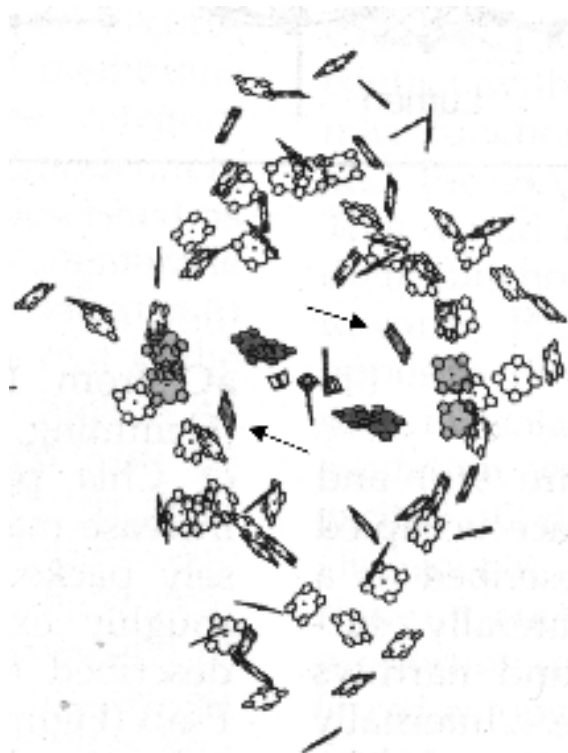
<sup>19</sup> Eines dieser beiden Chlorophylle kann in der 2.5 Å-Kristallstruktur eindeutig als C13<sup>2</sup>-Epimer (Chl *a*') identifiziert werden (FROMME et al. 2001), was lange umstrittene Befunde aus Chlorophyll-Extraktions-Experimenten bestätigt (WANTANBE et al. 1985; MAROC & TREMOLIERES 1990; MAEDA et al. 1992).

Die übrigen Untereinheiten des Kernkomplexes sind nicht direkt an der Orientierung der Kofaktoren des Elektronentransports beteiligt. Sie haben jedoch wichtige Funktionen bei der Stabilisierung der Assemblierung einzelner Untereinheiten des Kernkomplexes, der Orientierung von Pigmenten (FROMME et al. 2001) sowie bei der Interaktion mit stromalen oder luminalen Partnern der Redoxkette (Ferredoxin und Plastocyanin) bzw. mit den Antennenkomplexen (LHCI und LHCII; vergl. Tabelle 2-1).

#### 2.4.1.2 Die innere Antenne

Neben den 6 unmittelbar an der Ladungstrennung und Weiterleitung der Elektronen beteiligten Chlorophyllen bindet der PSI-Kern 90 weitere Chl *a* sowie 22  $\beta$ -Carotine, die überwiegend von PSI-A und PSI-B koordiniert werden (SCHUBERT et al. 1997; FROMME et al. 2001)<sup>20</sup>. Für Reaktionszentren von *Synechococcus elongatus* ist ein Verhältnis von  $96 \pm 5$  Chl *a*/P700 spektroskopisch bestimmt worden (FLEMMING 1996), von denen in der Kristallstruktur bereits in der 4 Å-Auflösung 89 lokalisiert werden konnten (Abb. 2-12). Von diesen Chlorophyllen haben 60 direkten Kontakt zu den Carotinoiden (FROMME et al. 2001). Zwei dieser Chlorophylle verbinden möglicherweise als „connecting chlorophylls“ die radiärsymmetrisch angeordnete innere Antenne energetisch mit dem Reaktionszentrum (SCHUBERT et al. 1997). Die Mehrzahl der Chlorophylle der inneren Antenne absorbiert in einer breiten Bande mit einem Maximum von ~680 nm (GOBETS & VAN GRONDELLE 2001).

**Abb. 2-12** Anordnung der 89 Chlorophylle, die in der 4 Å-Kristallstruktur von *Synechococcus elongatus* lokalisiert werden können (in der Aufsicht von der Stromaseite; verändert aus SCHUBERT et al. 1997). Im Zentrum befinden sich die parallel orientierten Porphyrinringe des P700-Dimers mit den darüberliegenden würfelförmigen [4Fe-4S]-Zentren. Der Abstand zum nächsten benachbarten Chlorophyll innerhalb der inneren Antenne beträgt jeweils maximal 16 Å. Die beiden Chlorophylle, die möglicherweise die innere Antenne mit dem Reaktionszentrum verbinden, sind gekennzeichnet (→).



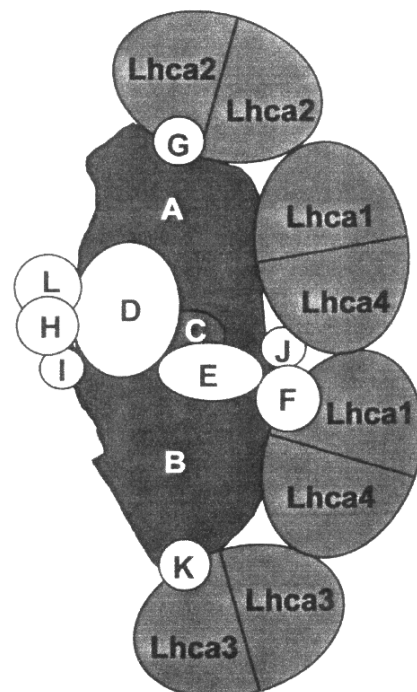
<sup>20</sup> Dabei werden lediglich 48 der 79 von PSI-A und PSI-B koordinierten Chlorophylle in den transmembranen Helices gebunden, die verbleibenden 30 sind in den Loop-Regionen von PSI-A und PSI-B lokalisiert. 10 weitere Chlorophylle werden von den kleinen Untereinheiten PSI-J, PSI-K, PSI-L, PSI-M und PSI-X gebunden. Ein Chl *a* wird durch ein Phosphatidylglycerolmolekül (PG) koordiniert. Dieses PG ist eines der 4 Lipide, die integrale Bestandteile des PSI-Kernkomplexes sind (FROMME et al. 2001).

### 2.4.2 Organisation des LHCI

Der LHCI des PSI umfaßt die Proteine Lhca1-4, wobei jeweils zwei Monomere eines Typs je PSI-Kern (insgesamt 8 Lhca-Monomere) vorhanden sind (BOEKEMA et al. 2001). Die Expression zweier weiterer Lhca-Proteine (Lhca5 und Lhca6) für die *open-reading-frames* in *Arabidopsis* identifiziert wurden (JANSSON 1999) ist extrem niedrig und die Genprodukte sind in Isolierungen von PSI-Komplexen bisher nicht nachgewiesen worden, so daß diese voraussichtlich nicht zur Antennenausstattung typischer PSI-Komplexe zählen.

Zwei LHCI-Subkomplexe (LHCI-680 sowie LHCI-730) können isoliert und anhand ihrer Fluoreszenzemissionsmaxima nach Anregung bei 77 K differenziert werden (LAM et al. 1984; BASSI & SIMPSON 1987; KNOETZEL et al. 1992; TJUS et al. 1995). Über die immunologische Identifizierung konnten sowohl Lhca3 (LHCI-680A) und Lhca2 (LHCI-680B), als auch Lhca1 und Lhca4 (LHCI-730) einzelnen Subkomplexen eindeutig zugeordnet werden (KNOETZEL et al. 1992). In Rekonstitutionsexperimenten ist die heterodimere Struktur des LHCI-730 bestätigt worden (SCHMID et al. 1997), während für Lhca2 und Lhca3 eine Dimerisierung bisher nicht nachgewiesen wurde. Auf der Basis von elektronenmikroskopischen Aufnahmen und *cross-linking*-Studien läßt sich ein Modell (Abb. 2-13) ableiten, in dem sämtliche Lhca-Proteine asymmetrisch auf einer Seite des Kernkomplexes (orientiert zu PSI-F und -J) lokalisiert sind. Die Lhca-Proteine haben dabei jeweils Kontakt zu benachbarten Lhca-Proteinen, gleichzeitig haben die Lhca2-Proteine engen Kontakt zu PSI-K und die Lhca3-Proteine haben Kontakt zu PSI-G (JANSSON et al. 1996).

**Abb. 2-13** Schematische Ansicht des PSI-Komplexes (von der Stromaseite) auf der Basis von *cross-linking* Experimenten und elektronenmikroskopischen Aufnahmen (aus SCHELLER et al. 2001).



Da bisher keine quantitativen Daten zur Pigmentbindung einzelner Lhca-Proteine vorliegen, kann diese nur anhand eines Vergleiches von PSI-200 Komplexen (mit vollständiger LHCI-Antenne, insgesamt ~200 Chl/P700) mit LHCI-freien PSI-Kernkomplexen sowie Pigmentdaten kompletter LHCI-Antennen abgeschätzt werden (SIEFERMANN-HARMS 1985; DAMM et

al. 1990). Bezogen auf aktuelle Pigmentverhältnisse für den LHCI (CROCE et al. 1998; IHALAINEN et al. 2000) sollte jedes der 8 Lhca-Proteine ca. 10.4 Chl *a*, 2.6 Chl *b*, 1.3 Lutein, 1.3  $\beta$ -Carotin und 0.8 Violaxanthin binden (SCHELLER et al. 2001). Diese Anzahl der gebundenen Chlorophylle wäre damit vergleichbar zu den Daten aus der Kristallstruktur von Lhcb1 aus Erbse, allerdings bindet der LHCII-Monomer erheblich mehr Chl *b* (7 Chl *a* und 5 Chl *b*) sowie zwei Luteine und 1 Neoxanthin (KÜHLBRANDT et al. 1994). Die abgeschätzte Anzahl von drei Carotinoiden/Lhca-Monomer könnte bedeuten, daß in den Lhca-Proteinen im Gegensatz zum LHCII-Monomer (2 Luteine) zwei verschiedene Carotinoide zwischen Helix 1 und 3 (vergl. Abb. 2-5) lokalisiert sind.

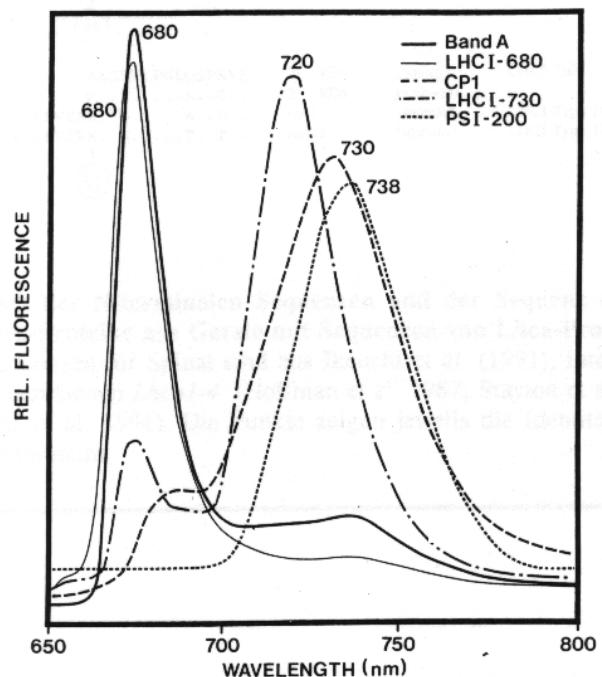
Die so kalkulierten Werte liegen allerdings erheblich über den für *in vitro* rekonstituierte LHCI-730 ermittelten Pigmentdaten (mit 10 Chl *a* und 4 Chl *b* je Heterodimer; SCHMID et al. 1997). Für andere *in vitro* rekonstituierte LHC-Proteine sind ebenfalls deutlich geringere Mengen gebundener Pigmente/Monomer ermittelt worden (z.B. 8 Chlorophylle für Lhcb4/CP29; GIUAFFRA et al. 1997). Gleichzeitig geht ein nicht unerheblicher Anteil der Chlorophylle und Carotinoide bei der Solubilisierung nativer LHCI-Komplexe verloren (DAMM et al. 1990; SCHELLER et al. 2001). Es ist noch ungeklärt, wo diese Pigmente im PSI/LHCI-Holokomplex gebunden werden.

#### 2.4.3 Die langwellige 77 K-Fluoreszenz des PSI

Fraktionierte Pigment/Protein-Komplexe des PSI aus höheren Pflanzen zeigen deutlich unterschiedliche charakteristische 77 K-Fluoreszenzemissionsmaxima (Abb. 2-14). Die LHCI-Subkomplexe fluoreszieren bei 680 nm (LHCI-680) bzw. 730 nm (LHCI-730). Diese Maxima verschieben sich bei Assoziation der Antennen mit dem Reaktionszentrum (PSI-200-Komplexe) in den langwelligen Bereich (bis 738-742 nm), während das Reaktionszentrum ohne Lhca-Proteine (CP1) bei 720 nm fluoresziert (BASSI & SIMPSON 1987; KNOETZEL et al. 1992; TJUS et al. 1995; KNOETZEL 1998). Diese Zuordnung ist durch spektroskopische Untersuchungen an intakten Blättern von *chlorina*- und *viridis*-Mutanten der Gerste bestätigt worden (KNOETZEL et al. 1999), und stimmt auch mit Daten für PSI-Komplexe aus Mais überein (CROCE et al. 1996).

In den PSI-Kernkomplexen sind die LW Chls möglicherweise identisch mit in der Kristallstruktur erkennbaren Chlorophyll-Clustern (1 Trimer und zwei Dimere), die eine auffällige Konfiguration zueinander aufweisen, bei der die Porphyrinringe parallel zueinander orientiert sind (FROMME et al. 2001; MELKOZERNOV et al. 2000a). Die exakte Identifikation und Lokalisation der LW Chls im LHCI ist noch nicht abschließend geklärt. Es ist allerdings gezeigt worden, daß ein Chl *b*- Pool auf Lhca4 die langwellige Emission um 730 nm unterstützt und daß die langwellige Emission durch die Interaktion von Lhca1 und Lhca4 ermöglicht wird (MUKERJI et al. 1993; TJUS et al. 1995). In dem von diesen Proteinen gebildeten Heterodimer LHCI-730 konnten durch spektroskopische Untersuchungen zwei Chlorophylle identifiziert werden, die bei ~711 nm absorbieren und bei ~733 nm emittieren. Gleichzeitig wurden zwei weitere Chlorophylle identifiziert, die bei ~693 nm absorbieren und bei ~702 nm fluoreszieren und möglicherweise auf Homo- bzw. Heterodimeren von Lhca2 bzw. Lhca3 lokalisiert sind (IHALAINEN et al. 2000). Untersuchungen an Lhca2- und Lhca3-*Antisense*mutanten von *Arabidopsis* deuten darüber hinaus auf eine Beteiligung dieser Proteine bei der Entwicklung der langwelligen 730 nm-Fluoreszenz *in vivo* hin (GANETEG et al. 2001).

**Abb. 2-14** 77 K-Fluoreszenzemissionsspektren fraktionierter PSI-Komplexe aus Gerste mit Angabe der Emissionsmaxima. Bande A = LHCI-680A, -B sowie LHCI-730; LHCI-680 = Lhca2 und Lhca3; CP1 = Kernkomplex PSI; LHCI-730 = Heterodimer von Lhca1 und Lhca4; PSI-200 = CP1 mit vollständiger LHCI-Antenne (LHCI-680 und LHCI-730); Abbildung aus KNOETZEL (1998).



Rekonstituierte Lhca1- und Lhca4-Monomere zeigen eine Fluoreszenz von 685-687 nm bzw. 730-732 nm (SCHMID et al. 1997; MELKOZERNOV et al. 2000b). Da die Fluoreszenz des Lhca4-Monomers der Fluoreszenz des LHCI-730 Heterodimers entspricht, sind die langwelligeren Chlorophylle möglicherweise auf Lhca4 lokalisiert. Dies wird durch Befunde unterstützt, nach denen sich die Fluoreszenz rekonstituierter Lhca4-Monomere deutlich in den kürzerwelligen Bereich (685-686 nm) verschiebt, wenn 38 N-terminale AS des Proteins entfernt werden. (RUPPRECHT et al. 2000). Der Lhca4-Monomer kann darüber hinaus stabil ohne Chl *b* rekonstituiert werden. Er zeigt dann aber keine langwellige Fluoreszenz mehr, was auf eine Beteiligung von Chl *b* hinweist (SCHMID et al. 2001).

Die spektroskopischen Untersuchungen von KNOETZEL et al. (1999) weisen darauf hin, daß für die Entwicklung der langwelligsten Fluoreszenz (F742) eine Interaktion von Lhca4 mit Lhca1 sowie mit dem PSI-Kern erforderlich ist. Dies wird durch Ergebnisse unterstützt, nach denen die langwellige Fluoreszenz des PSI in *Arabidopsis*-Mutanten ohne Lhca4 (ZHANG et al. 1997) bzw. ohne die Lhca4-orientierende PSI-Untereinheit PSI-F (HALDRUP et al. 2000) deutlich in den kürzerwelligen Bereich verschoben ist.

Die LW Chls des LHCI leisten ca. 5-7 % der gesamten PSI-Absorption, dominieren aber das Fluoreszenzspektrum bei Raumtemperatur (TURCONI et al. 1994, CROCE et al. 1996). Gleichzeitig sind ihnen 85-90 % der angeregten Chl-Zustände zuzuordnen, was ihre Bedeutung für den Energietransfer zum Reaktionszentrum unterstreicht (CROCE et al. 1996, 1998). Die starke excitonische Kopplung der im LHCI-730 lokalisierten langwelligeren Chlorophylle deutet zudem auf einen möglichen ladungstrennenden Charakter hin, wie er bereits für vergleichsweise schwächer gekoppelte Systeme vermutet worden ist (IHALAINEN et al. 2000).

#### 2.4.4 Interaktion von PSI mit LHCII

In Abhängigkeit von den physiologischen Bedingungen kann der Anteil der mit dem PSII oder PSI assoziierten LHCII-Trimere (Lhcb1/2) verändert und so die jeweilige Antennengröße beider Photosysteme dynamisch angepaßt werden. Die Veränderung der Verteilung der LHCII-Trimere zwischen den Photosystemen wird auch als *state1/state2-transition* bezeichnet und ist mit einer Verringerung der Stapelung der Granathylakoide im *state2* verbunden (ALLEN & NILSSON 1997). Die Regulation erfolgt über den Redox-Zustand des Plastochinon-Pools am Cytochrom *b<sub>6</sub>f*-Komplex. Dieser aktiviert unter Bedingungen, bei denen bevorzugt PSII angeregt wird, eine Kinase, die eine oder mehrere Untereinheiten des LHCII-Trimers N-terminal phosphoryliert.

Es ist noch unklar, ob die beobachtete Konformationsänderung des LHCII durch diese Phosphorylierung induziert wird (NILSSON et al. 1997), oder bereits vor der Phosphorylierung erfolgen muß, um diese zu ermöglichen (RUPPRECHT et al. 2000). Eine Phosphorylierung und Konformationsänderung des LHCII bewirkt eine Dissoziation des Trimers vom PSII und eine Assoziation der Lhcb1- und/oder Lhcb2-Monomere mit PSI. Diese Assoziation wird offensichtlich über die Untereinheit PSI-H vermittelt, da ohne diese Untereinheit weder die Interaktion von LHCII mit PSI noch eine *state-transition* beobachtet werden kann (LUNDE et al. 2000).

## 2.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Auf der Grundlage ihres konservierten Aufbaus sowie der verfügbaren Modelle zur phylogenetischen Entwicklung von Kernkomplexen und Antennensystemen in höheren Pflanzen ist eine konservierte molekulare Interaktion ihrer Untereinheiten zu erwarten. Die Frage nach dem Charakter dieser molekularen Wechselwirkungen läßt sich zwar gegenwärtig nicht umfassend beantworten, offensichtlich sind aber Wechselwirkungen von Proteinen mit anderen Proteinen, mit den gebundenen Pigmenten sowie mit den Lipiden der Membran daran beteiligt. Von besonderem Interesse bei der Betrachtung der Struktur und Funktion der Photosysteme sind die 10 verschiedenen Typen von *cab*-Proteinen, die nach ihrer Entwicklung im Verlauf der Evolution eukaryotischer phototropher Organismen konserviert worden sind. Obwohl diese weitreichende Übereinstimmungen in ihren Gen- und AS-Sequenzen aufweisen, wird sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine spezifische Assemblierung zu bzw. mit dem jeweils „richtigen“ Photosystem (PSI oder PSII) oder LHC-Komplex (LHCI-730 und LHCI) beobachtet. Im LHCI-730 führt diese mit Lhca1 und Lhca4 zu einem Komplex, der *in vivo* und *in vitro* darüber hinaus die charakteristisch langwellig fluoreszierenden Chlorophylle bindet, die für den Energietransfer innerhalb des PSI und seiner Antennen aller Voraussicht nach von zentraler Bedeutung sind.

Mit der *in vitro*-Rekonstitution rekombinanter *cab*-Proteine mit Pigmentextrakten zu funktionellen LHC-Komplexen steht eine Methode zur Verfügung, die bereits für die Untersuchung der Assemblierung von LHC-Komplexen eingesetzt wurde. Aufgrund der erkennbaren Sequenzhomologien von Lhca1 und Lhca4 kann eine „heterologe“ Rekonstitution des LHCI-730 mit Proteinen aus unterschiedlichen Spezies bzw. Gruppen (z.B. Mono- und Dikotyledonen) erwartet werden. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit mit Lhca-Proteinen aus der monokotylen Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und dikotylen Tomate (*Lycopersicon esculentum*) in Zusammenarbeit mit Dr. Volkmar Schmid aus der Arbeitsgruppe von Prof. Harald Paulsen (Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz) durchgeführt.

Aufbauend auf eigene Vorarbeiten (KLIMMEK 1997) sollten hierzu zunächst die kompletten kodierenden Sequenzen für Lhca1 und Lhca4 aus Gerste einschließlich der Transitpeptide isoliert werden. Nach Klonierung der kodierenden Sequenzen für die reifen Proteine und Expression in einem bakteriellen Expressionssystem sollten aufgereinigte rekombinante Proteinfractionen mit Pigmentextrakten aus Gerste und Tomate rekonstituiert werden. Bei einer erfolgreichen Assemblierung von rekombinanten Proteinen aus Gerste mit Proteinen aus Tomate sollten die rekonstituierten, „heterologen“ LHCI-730-Dimere hinsichtlich Bindung und Orientierung der für die Lichtabsorption wichtigsten Pigmente Chl *a* und *b* über die Untersuchung ihrer Fluoreszenzemissionseigenschaften bei 77 K charakterisiert und so auf ihre physiologische Funktionalität überprüft werden.

Parallel sollten die ermittelten Aminosäuresequenzen der Proteine Lhca1 und Lhca4 aus Gerste mit verfügbaren Daten für *cab*-Proteine aus angiospermen Pflanzen in einer vergleichenden Analyse für eine Identifikation möglicher konservierter Interaktionsdomänen zwischen Lhca1 und Lhca4 bei der Assemblierung zum LHCI-730 ausgewertet werden.





## 3 Material und Methoden

Unter Verwendung zell- und molekularbiologischer Techniken (Abschnitt 3.1) wurden die kodierenden Sequenzen für Lhca1 und Lhca4 aus RNA-Extrakten aus Gerste (*H. vulgare*, L.) (Abschnitt 3.2) durch PCR mit sequenzspezifischen N- und C-terminalen Primern isoliert. Für die Aufklärung der Transitpeptidsequenzen von Lhca1 und Lhca4 wurde zusätzlich eine cDNA-Bibliothek (*barley-λgt11*) amplifiziert und anschließend ebenfalls mittels PCR-Screening durchgemustert (Abschnitt 2.3).

Die kodierenden Sequenzen für die reifen Proteine wurden in Expressionsvektoren kloniert (Abschnitt 3.4). Nach Induktion positiver rekombinanter Klone wurden die überexprimierten Proteine als Einschlusskörper isoliert und aufgereinigt (Abschnitt 3.5). Mit gereinigtem Protein und isolierten Pigmentextrakten aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*) bzw. Gerste (Abschnitt 3.6) wurden Pigment-/Proteinkomplexe *in vitro* rekonstituiert und anschließend mittels Fluoreszenzemissionspektroskopie bei 77 K charakterisiert (Abschnitt 3.7).

Die ermittelten Proteinsequenzen für die reifen Proteine sowie deren Transitpeptide wurden mit verfügbaren Sequenzen für Lichtsammelproteine aus angiospermen Pflanzen verglichen (Abschnitt 2.8).

### 3.1 Isolierung der kodierenden Sequenzen für Lhca1 und Lhca4

#### 3.1.1 Primer

Als Primersequenzen wurden komplementäre DNA-Sequenzen der für den C- und N-Terminus kodierenden bekannten Sequenzen für Lhca1 und Lhca4 (KNOETZEL et al. 1992; ANANDAN et al. 1993) ausgewählt und für die Ligation in die Vektoren des verwendeten Expressionssystems (Abschnitt 2.4.1) um die entsprechenden Schnittstellensequenzen am N-Terminus (*Bam*H1 und *Sph*I; Primer: 1- und 4-N-*Bam*I-*Sph*) bzw. C-Terminus (*Hind*III; Primer: 1- und 4-C-*Hind*) ergänzt.

Bedingt durch diese Schnittstellenkomplementierung enthielten die rekombinanten Proteine *rLhca1* und *rLhca4* vor der ersten nativen Aminosäure (AS) eine bzw. drei zusätzliche N-terminale Aminosäuren (für die *Sph*I-Schnittstelle: Prolin; für die *Bam*HI-Schnittstelle: Arginin-Isoleucin-Prolin). Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, daß solche zusätzlichen AS die Expression und Rekonstitution von Proteinen des LHCI-730 höherer Pflanzen (SCHMID et al. 1997) nicht negativ beeinflussen.

Eine zusammenfassende Darstellung aller Primersequenzen und Primereigenschaften findet sich in Anhang A 1.

#### 3.1.2 PCR-Amplifikationen

Für die Amplifikation von DNA/cDNA-Sequenzen wurden (soweit nicht anders beschrieben) *KlenTherm™ Taq*- (GENECRAFT, Münster) sowie *Pwo*-Polymerase (BOEHRINGER, Mannheim) eingesetzt. Die Amplifikationen erfolgten mit einem *PROGENE*- (TECNE, Cambridge, GB) oder *PTC150-16 PCR Mini Cycler* (MJ RESEARCH, Massachusetts, USA) in 0.5 ml *SafeLock* PCR-Gefäßen (EPPENDORF, Hamburg). Die PCR-Ansätze wurden mit Mineralöl

(GENAXIS, Spechbach) überschichtet. Die als äquimolares Mix (je 5 pM bzw. 10 pM dGTP, dATP, dCTP und dTTP) eingesetzten dNTPs (GENAXIS, Spechbach) wurden zusammen mit bidest. H<sub>2</sub>O, DMSO (wenn eingesetzt) sowie dem vom Hersteller gelieferten Polymerase-Puffer als Mastermix gemeinsam für alle Ansätze vorgelegt und anschließend aliquotiert. Primer (Anhang A 1) wurden ebenfalls im Mastermix oder separat zugesetzt. Die Zugabe der Polymerase erfolgte als *hot start* innerhalb des ersten Extensionszyklus bei 72°C.

### 3.1.3 Gelelektrophorese von Plasmiden und DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte (soweit nicht anders beschrieben) unter Zugabe von 1:10 v/v *LoadingDye* (LD; 50 % v/v Glycerin, 75 mM EDTA, 0.2 % w/v Bromphenolblau) in Agarose-Gelen (0.9-2 % w/v) mit einem TBE-Puffer (50 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA pH 8.0) nach SAMBROCK et al. (1989) mit 0.5-1 ng/ml Ethidiumbromid (ETBr) in Gel und Laufpuffer. Als DNA-Nukleotidstandard wurden jeweils 5 µl (entspr. ~720 ng DNA) *SmartLadder* (EUROGENTEC, Seraing, Belgien) eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen 5 min im Wasserbad bei 95°C denaturiert und anschließend 5-10 min auf Eis gelagert.

Die Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese unter UV-Licht (*Transilluminator TI 1*; BIOMETRA, Göttingen) mit einer DS34-Kamera (POLAROID, Offenbach) auf s/w-Film (POLAROID SW667) fotografiert und mit einem Flachbettscanner (*ScanMagic 1200 CU*; MUSTEK, Neuss) unter Verwendung von Software des Herstellers eingescannt.

### 3.1.4 Isolierung und Aufreinigung von Plasmiden und DNA-Fragmenten

Für die Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen wurden das *Plasmix DNA Purification System* (TALENT, Triest, Italien) sowie - insbesondere für die Gewinnung von primärer Vektor- sowie zu sequenzierender DNA - das *Qiagen Plasmid Kit* (QIAGEN, Hilden) verwendet. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Gelen erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden) oder mit dem *Easypure DNA Purification Kit* (BIOZYME, Hess.-Oldendorf). PCR-Ansätze oder Restriktionsansätze wurden mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* bzw. mit dem *QIAquick Nucleotide Removal Kit* (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt. Sämtliche kommerziell erhältlichen Kits wurden nach den Angaben des jeweiligen Herstellers verwendet. Falls erforderlich, wurden DNA-Proben nach SAMBROCK et al. (1989) durch Phenol/Chloroform-Präzipitation aufgereinigt.

### 3.1.5 Bestimmung von RNA- und DNA-Konzentrationen

Die Konzentration von RNA- und DNA-Eluaten wurden entweder aus der photometrisch (SHIMADZU UV-160; SHIMADZU, Kyoto, Japan) bei 260 und 280 nm bestimmten Absorption (als Verdünnung mit bidest. H<sub>2</sub>O in Quarzküvetten gegen bidest. H<sub>2</sub>O) nach SAMBROCK et al. (1989) berechnet (RNA: C [ng/µl] = A<sub>260</sub> x 40 x VF ; DNA: C [ng/µl] = A<sub>260</sub> x 50 x VF) oder nach Auftrennung im Agarose-Gel (Abschnitt 2.1.3) gegen den verwendeten DNA-Nukleotidstandard abgeschätzt. Verunreinigungen von DNA-Isolaten mit Proteinen wurden durch Bestimmung des A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>-Verhältnisses quantifiziert.

## 3.2 RNA-Screening

### 3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gerste

Gerstenpflanzen (*Hordeum vulgare* L., Wildtyp) wurden auf *Vermiculite* (DEUTSCHE VERMICULITE DÄMMSTOFFE, Sprockhövel) für 6-7 Tage im Phytotron bei 70 % rel. Luftfeuchte, 25°C und 70-80  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (MT400DL/BH-Halogenmetalllampen) im periodischen Licht/Dunkelwechsel (16 h /8 h), angezogen.

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden 7-10 cm lange Gerstenblätter mit Beginn der Lichtphase geerntet. Die Extraktion von RNA erfolgte mit dem *RNeasy-Plant-Kit* (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Da die niedermolekularen RNA-Fractionen<sup>21</sup> in dem eingesetzten Hochsalz-Puffer nicht quantitativ an die verwendete Silica-Matrix binden, erfolgt eine bevorzugte Aufreinigung größerer RNA-Moleküle (>200 Nukleotide). Die in DEPC-behandeltem bidest. H<sub>2</sub>O (DEPC-H<sub>2</sub>O) eluierte RNA wurde nach photometrischer Konzentrationsbestimmung (Abschnitt 2.1.5) in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bis zur weiteren Verwendung aliquotiert bei -80°C gelagert.

### 3.2.2 Amplifikation der kodierenden Sequenzen aus RNA

Zur Amplifikation der kodierenden Sequenzen für Lhca1 und Lhca4 mit einer Größe von jeweils ~600 bp wurde der mRNA-Anteil aus isolierter Gersten-RNA mit *M-MLV*-Reverser Transkriptase (PROMEGA, Madison, USA) in cDNA umgeschrieben und anschließend mit *Taq*- und/oder *Pwo*-Polymerase amplifiziert. Die Protokolle für die Zahl und Länge der Amplifikationszyklen sowie für die Annealingtemperaturen wurden im Verlauf der Arbeiten dahingehend modifiziert, daß eine möglichst prominente Amplifikation der ~600bp-Fragmente ohne unerwünschte Nebenprodukte erzielt werden konnte. Hierbei wurden z.T. ~600bp-Fragmente aus Gelen ausgeschnitten und in bidest H<sub>2</sub>O inkubiert. Diese Eluate wurden dann als Template für eine erneute Re-Amplifikation verwendet.

#### 3.2.2.1 Reverse Transkription und PCR-Amplifikation

Aliquots isolierter Gersten-RNA (Abschnitt 2.2.1) wurden auf Eis aufgetaut und als Template für eine reverse Transkription mit *M-MLV*-RT mit Lhca1- und Lhca4-spezifischen Primern eingesetzt (Tabelle 3-1). Aliquots dieser reversen Transkription wurden dann als Template für eine PCR-Amplifikation mit *Taq*- (Tabelle 3-2) oder *Pwo*-Polymerase (Tabelle 3-3) verwendet. Die gewählten PCR-Programme entsprechen den Angaben in KLIMMEK (1997), so daß die dort bereits verwendeten Primer (1-N-*Eco* und 1-C-*Eco* sowie 4-N-*Eco* und 4-C-*Eco*, vergl. Anhang A 1) hier als Kontrollen eingesetzt werden konnten. Aliquots (je 5 bzw. 2  $\mu\text{l}$ ) der Ansätze wurden anschließend im Agarose-Gel aufgetrennt (Abb. 3-1 **A** bzw. Abb. 3-1 **B**).

Nach der Auftrennung der mit *Taq*-Polymerase amplifizierten Fragmente wurden die prominenten ~600bp-Banden aus dem Gel herausgeschnitten und in jeweils 100  $\mu\text{l}$  bidest. H<sub>2</sub>O bei 6°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden diese Eluate als Template für eine Re-Amplifikation mit *Taq*-Polymerase eingesetzt (Amplifikation wie in Tabelle 3-2 mit 5  $\mu\text{l}$

<sup>21</sup> Diese kleineren RNA-Fractionen (5.8S RNA, 5S RNA sowie tRNAs) mit einer Größe von 70-160 Nukleotiden entsprechen einem Anteil von ca. 15-20 % der gesamten RNA.

eluiertes DNA als Template). Nach Aufreinigung der Ansätze (*QIAquick PCR Purification Kit*) wurde die Konzentration der in 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) eluierten DNA-Fragmente im Agarose-Gel (Abb. 3-2 **A**) bestimmt.

Die verbleibenden Volumina der mit *Pwo*-Polymerase amplifizierten Fragmente (Tabelle 3-3) wurden ohne weitere Re-Amplifikation direkt im Agarose-Gel aufgetrennt, die Banden aus dem Gel herausgeschnitten und aufgereinigt (*Easypure DNA Purification Kit*). Die Konzentration der in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) eluierten DNA-Fractionen wurde im Agarose-Gel bestimmt (Abb. 3-2 **B**).

**Tabelle 3-1** Reverse Transkription von Lhca1- und Lhca4-Sequenzen aus RNA (430 ng/μl  $A_{260}/A_{280} = 2.03$ ) mit *M-MLV*-RT; alle Mengenangaben in μl; Inkubation für 1h 45' (15' 40°C, 15' 39°C, 15' 38°C, 1h 37°C).

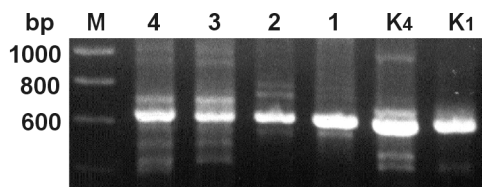
Ansatz	K1	K4	1	4
RNA (430 ng/μl)	10	10	10	10
bidest. H <sub>2</sub> O (DEPC)	22	22	22	22
dNTP-Mix [je 10 mM]	3	3	3	3
5 x <i>MLV</i> -Puffer	10	10	10	10
Rnasin® (40 u/μl)	1	1	1	1
Primer [15 pM]				
1-C- <i>Eco</i>	2	-	-	-
4-C- <i>Eco</i>	-	2	-	-
1-C- <i>Hind</i>	-	-	2	-
4-C- <i>Hind</i>	-	-	-	2
<i>M-MLV</i> [200 u/μl]	1	1	1	1
<b>gesamt</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

**Tabelle 3-2** Amplifikation von Lhca1- und Lhca4-Sequenzen nach reverser Transkription (Tabelle 3-1) mit *Taq*-Polymerase; alle Mengenangaben in μl; 36 Zyklen (Z) touch down-PCR-Programm (1 Z [2' 94°C] 3 Z [45'' 94°C, 45'' 60°C, 1' 72°C] 3 Z [45'' 94°C, 45'' 58°C, 1' 72°C] 3 Z [45'' 94°C, 45'' 56°C, 1' 72°C] 25 Z [45'' 94°C, 45'' 55°C, 1' 72°C] 1 Z [5' 72°C] 4°C hold).

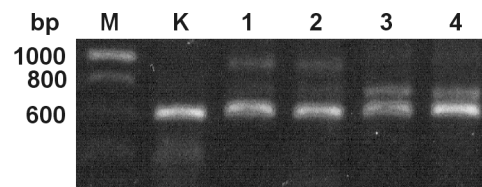
Ansatz	K1	K4	1	2	3	4
Template (Tabelle 3-1)						
K1	10	-	-	-	-	-
K4	-	10	-	-	-	-
1	-	-	10	10	-	-
4	-	-	-	-	10	10
bidest. H <sub>2</sub> O (DEPC)	25	25	25	25	25	25
DMSO [100 % v/v]	5	5	5	5	5	5
dNTP-Mix [je 10 mM]	2	2	2	2	2	2
10 x <i>Taq</i> -Puffer	5	5	5	5	5	5
Primer [15 pM]						
1-N- <i>Eco</i>	1	-	-	-	-	-
1-C- <i>Eco</i>	1	-	-	-	-	-
4-N- <i>Eco</i>	-	1	-	-	-	-
4-C- <i>Eco</i>	-	1	-	-	-	-
1-C- <i>Hind</i>	-	-	1	1	-	-
1-N- <i>Bam</i>	-	-	1	-	-	-
1-N- <i>Sph</i>	-	-	-	1	-	-
4-C- <i>Hind</i>	-	-	-	-	1	1
4-N- <i>Bam</i>	-	-	-	-	1	-
4-N- <i>Sph</i>	-	-	-	-	-	1
<i>Taq</i> [5 u/μl]	1	1	1	1	1	1
<b>gesamt</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

**Tabelle 3-3** Amplifikation von Lhca1- und Lhca4-Sequenzen aus reverser Transkription (Tabelle 3-1) mit *Pwo*-Polymerase; alle Mengenangaben in  $\mu$ l; 46 Zyklen (Z) *touch down*-PCR-Programm (1 Z [2' 94°C] 3 Z [45'' 94°C, 45'' 60°C, 1' 72°C] 3 Z [45'' 94°C, 45'' 58°C, 1' 72°C] 3 Z [45'' 94°C, 45'' 56°C, 1' 72°C] 35 Z [45'' 94°C, 45'' 53°C, 1' 72°C] 1 Z [5' 72°C] 4°C hold).

Ansatz	K4	1	2	3	4
Template (Tabelle 3-1)					
K4	5	-	-	-	-
1	-	5	5	-	-
4	-	-	-	5	5
bidest. H <sub>2</sub> O (DEPC)	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5
DMSO [100 % v/v]	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
dNTP-Mix [je 10 mM]	2	2	2	2	2
MgSO <sub>4</sub> [25 mM]	3	3	3	3	3
10 x <i>Pwo</i> -Puffer	5	5	5	5	5
Primer [15 pM]					
1-C- <i>Hind</i>	-	1	1	-	-
1-N- <i>Bam</i>	-	1	-	-	-
1-N- <i>Sph</i>	-	-	1	-	-
4-C- <i>Hind</i>	-	-	-	1	1
4-N- <i>Bam</i>	-	-	-	1	-
4-N- <i>Sph</i>	-	-	-	-	1
4-C- <i>Eco</i>	1	-	-	-	-
4-N- <i>Eco</i>	1	-	-	-	-
<i>Pwo</i> [5 u/ $\mu$ l]	1	1	1	1	1
<b>gesamt</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

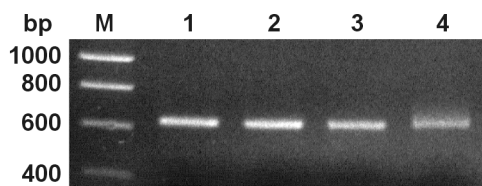


**A** *Taq*-Fragmente

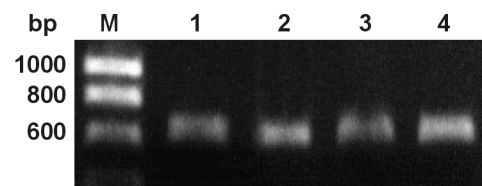


**B** *Pwo*-Fragmente

**Abb. 3-1** Auftrennung von PCR-Fragmenten im Agarose-Gel (**A**) aus der *Taq*-Amplifikation (Tabelle 3-2), jeweils 5  $\mu$ l aus Ansatz K1, K4 sowie 1-4 bzw. (**B**) aus der *Pwo*-Amplifikation (Tabelle 3-3), jeweils 2  $\mu$ l aus Ansatz K4 sowie 1-4; M = Nukleotidstandard.



**A** *Taq*-Fragmente



**B** *Pwo*-Fragmente

**Abb. 3-2** Auftrennung der aufgereinigten (**A**) *Taq*- und (**B**) *Pwo*-amplifizierten Lhca1- und Lhca4-Fragmente mit den Schnittstellen *Bam*/*Hind* (-B/H) bzw. *Sph*/*Hind* (-S/H) im Agarose-Gel (1 = Lhca1-B/H, 2 = Lhca1-S/H, 3 = Lhca4-B/H, 4 = Lhca4-S/H); M = Nukleotidstandard.

### 3.2.2.2 Restriktionsschnitt

Eluierte DNA-Fragmente wurden mit Restriktionsenzymen im Parallelverdau (*Bam*HI und *Hind*III bzw. *Sph*I und *Hind*III) den Angaben des Herstellers (EUROGENTEC, Seraing, Belgien) entsprechend in Volumina von 10-100  $\mu$ l für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze aufgereinigt (*QiaQuick Nucleotide Removal Kit*), um abgetrennte komplementäre Oligonukleotide zu entfernen. Die Konzentration der in 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) eluierten DNA wurde anschließend im Agarose-Gel bestimmt. So gewonnene DNA-Fragmente wurden dann bis zur weiteren Verwendung in der Klonierung (Abschnitt 2.4.3) bei -35°C gelagert.

### 3.3 cDNA-Screening

Für das Screening nach Lhca1- und Lhca4-Sequenzen einschließlich der Sequenzen für das jeweilige Transitpeptid (1-TP bzw. 4-TP) wurde eine aus mRNA-Präparationen ergründender Gerstenblätter (*H. vulgare*, Wildtyp) im Phagen  $\lambda$ gt11 (YOUNG & DAVIS 1983; SAMBROCK et al. 1989) konstruierte cDNA-Bibliothek durchgemustert. Diese cDNA-Bibliothek wurde von Dr. Bernhard Grimm (Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben) zur Verfügung gestellt (ca. 60  $\mu$ l mit  $10^8$  pfu/ml) und vor dem eigentlichen Screening amplifiziert.

#### 3.3.1 Amplifikation der cDNA-Bibliothek (*barley*- $\lambda$ gt11)

Die Amplifikation der cDNA-Bank erfolgte durch Infektion von *E. coli* (Y1090<sup>r</sup>; PROMEGA, Madison, USA) und Ausplattieren in Top-Agar (7 g/l Agar) auf LB-Platten (15 g/l Agar) nach SAMBROCK et al. (1989). LB<sub>AMP</sub>-Medien und -Platten ( $\varnothing$  85 mm, soweit nicht abweichend vermerkt) enthielten 50 mg/ml Ampicillin. Gegossene Platten und Top-Agar wurden bis zur Verwendung bei 6°C gelagert. Unmittelbar vor dem Ausplattieren wurden die Platten 30 min bei 37°C temperiert. Der Top-Agar wurde vor dem Ausplattieren im Wasserbad bei 95°C aufgeschmolzen und anschließend bei 42°C temperiert. Bestimmungen der bakteriellen Konzentrationen erfolgten photometrisch als OD<sub>600</sub> (SHIMADZU UV-160; SHIMADZU, Kyoto, Japan). Die nach Lyse der Zellen freigesetzten Phagen wurden durch Überschichten mit *SM-Medium* (100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 % w/v Gelatine) gewonnen. Für die Zentrifugationen wurden SS34-Rotoren (SORVALL RC5B; DU-PONT INSTRUMENTS, Newtown, USA) verwendet.

##### 3.3.1.1 Vorbereitung

Zellen von *E. coli* (Y1090<sup>r</sup>) wurden aus Stammkulturen (-80°C) auf LB<sub>Amp</sub>-Platten ausgestrichen und 16 h bei 37°C inkubiert. Von diesen Platten wurden einzelne Kolonien in LB<sub>Amp</sub>-Medium (mit 0.2 % w/v Maltose und 10 mM MgSO<sub>4</sub>) überimpft und 4 h bei 37°C unter Schütteln (170-220 rpm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0.6 bis 0.8 inkubiert<sup>22</sup>. Aus dieser Kultur wurden Aliquots mit 15 % v/v (EK) Glycerin in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und als Stammkulturen bei -80°C für weitere Anzuchten gelagert.

Nach Zentrifugation (10 min, 500 x g, SS34-Rotor) wurden pelletierte Zellen mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 1.5-2.0 eingestellt und entweder unmittelbar im Anschluß verwendet oder bis zur Verwendung maximal 5 Tage bei 4°C gelagert<sup>23</sup>.

##### 3.3.1.2 Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten vor der Amplifikation

Vor der Amplifikation wurde eine Abschätzung der Anzahl der koloniebildenden Einheiten (*plaque forming units*, pfu) durchgeführt. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe der Bibliothek in SM-Medium von  $10^5$  bis  $10^2$  pfu/ml erstellt und auf LB<sub>Amp</sub>-Platten ausplattiert.

Nach Abschnitt 2.3.1.1 angezogene *E. coli* (Y1090<sup>r</sup>) wurden mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> auf eine OD<sub>600</sub> von 0.5 eingestellt. Jeweils 400  $\mu$ l dieser Zellen wurden mit 10  $\mu$ l Phagensuspension der Verdünnungsstufen  $10^5$  bis  $10^2$  pfu/ml infiziert und 15 min bei 37°C inkubiert. Für jede

<sup>22</sup> Nach SAMBROCK et al. (1989) soll eine OD<sub>600</sub> von 1.0 nicht überschritten werden.

<sup>23</sup> Nach SAMBROCK et al. (1989) sind diese Zellen bei 4°C bis zu drei Wochen transfektionskompetent.

Verdünnungsstufe wurden 2 Ansätze ausplattiert. Als Kontrollen wurden 400  $\mu\text{l}$  Zellen mit 10  $\mu\text{l}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  (0-Kontrolle) sowie 410  $\mu\text{l}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  (00-Kontrolle) verwendet. Die Ansätze wurden anschließend mit jeweils 3 ml Top-Agar vermischt und ausplattiert. Nach Erstarren des Top-Agars (ca. 5-8 min) wurden die Platten 8 h bei 37°C inkubiert. Aus den beobachteten Plaques/Platte der eingesetzten Verdünnungsstufen

- 1:10<sup>5</sup> vollständige Lyse
- 1:10<sup>4</sup> kaum beobachtbare einzelne Plaques, sonst vollständige Lyse
- 1:10<sup>3</sup> beide Platten ca. 250-400 Plaques
- 1:10<sup>2</sup> 44 und 67 Plaques

wurde die Zahl koloniebildender Einheiten der gestellten Phagensuspension mit  $> 4 \times 10^9$  pfu/ml und damit um den Faktor 40 höher als erwartet (vergl. Abschnitt 3.3) bestimmt. Die 0-Kontrolle war ohne Plaques, die 00-Kontrolle war zellfrei.

### 3.3.1.3 Ausplattieren der Phagenbibliothek

Aus der gestellten Phagenbibliothek ( $> 4 \times 10^9$  pfu/ml) wurden 5 Ansätze mit 900  $\mu\text{l}$  und  $4 \times 10^4$  pfu/ml in SM-Medium hergestellt. Nach Abschnitt 2.3.1.1 angezogene *E. coli* (Y1090<sup>r</sup>) wurden mit 10 mM  $\text{MgSO}_4$  auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0.5 eingestellt. Jeweils 900  $\mu\text{l}$  dieser Zellen wurden mit 900  $\mu\text{l}$  Phagensuspension ( $\sim 36.000$  pfu) 20 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 30 ml Top-Agar gemischt und auf  $\text{LB}_{\text{Amp}}$ -Platten (225 mm x 225 mm x 15 mm; jeweils  $\sim 250$  ml) ausplattiert. Damit wurden je Platte  $\sim 36.000$  pfu ausplattiert, was einer Gesamtmenge von  $\sim 180.000$  pfu entspricht. Nach Erstarren des Top-Agars wurden die Platten bei 37°C inkubiert. Nach 7.5 h waren erste Plaques erkennbar, nach weiteren 4.5 h wurde die Inkubation beendet.

Die Platten wurden bei 4°C mit jeweils 20 ml SM-Medium überschichtet und unter leichtem Schwenken 19 h inkubiert. Nach Abzug der Überstände (insgesamt  $\sim 60$  ml) wurde jede Platte nochmals mit 5 ml SM-Medium überschichtet und nochmals 20 min inkubiert. Die Überstände wurden abgezogen und mit dem ersten Überstand gepoolt (zusammen  $\sim 80$  ml). Nach Zugabe von 4.2 ml 100 % v/v Chloroform (ad 5 % v/v EK) wurde die Phagensuspension 30 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min bei 500 x g (SS34-Rotor) zentrifugiert, um Agar- und Zellreste zu pelletieren. Der Überstand ( $\sim 70$  ml) wurde nochmals mit 210  $\mu\text{l}$  100 % v/v Chloroform (ad 0.3 % v/v EK) versetzt und bis zur folgenden pfu-Bestimmung bei 6°C gelagert.

### 3.3.1.4 Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten nach der Amplifikation

Durch schrittweise Zugabe von SM-Medium wurde eine Verdünnungsreihe der gewonnenen Phagensuspension von 1:10 bis 1:10<sup>9</sup> angelegt. Zellen von *E. coli* (Y1090<sup>r</sup>) wurden mit 10 mM  $\text{MgSO}_4$  auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0.5 eingestellt. Jeweils 400  $\mu\text{l}$  Zellen wurden mit 90  $\mu\text{l}$  Phagensuspension der Verdünnungsstufen 1:10<sup>5</sup> bis 1:10<sup>9</sup> infiziert. Als Kontrollen wurden 400  $\mu\text{l}$  Zellen mit 90  $\mu\text{l}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  (0-Kontrolle) sowie 490  $\mu\text{l}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  (00-Kontrolle) angesetzt. Die Ansätze wurden vor dem Ausplattieren 15 min bei 37°C inkubiert. Aus den Ansätzen wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  in 3 ml Top-Agar auf  $\text{LB}_{\text{Amp}}$ -Platten ausplattiert (vergl. Abschnitt 2.3.1.3) und 23 h bei 37°C inkubiert.

Aus den ausgezählten Kolonien/Platte wurde die durchschnittliche *pfu*-Zahl der gewonnenen Phagensuspension mit  $3.4 \times 10^9$  *pfu/ml* bestimmt. Die 0-Kontrollen zeigten keine Plaques, die 00-Kontrollen waren zellfrei.

Von der gewonnenen Phagensuspension wurden Aliquots ( $3.2 \times 10^9$  *pfu/ml*; 7 % v/v DMSO; 0.3 % v/v Chloroform) in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und als Stammkulturen bei -80°C gelagert. Die verbliebene Menge des gewonnenen Überstandes wurde bis zur Isolierung von λ-DNA (Abschnitt 2.3.2.1) bei 6°C gelagert.

### 3.3.2 Screening der cDNA-Bank

Für das Screening wurde neben den insertspezifischen Primern 1-C-*Hind* und 4-C-*Hind* (Abschnitt 2.1.1) ein vektorspezifischer λgt11-Sequenzierungsprimer eingesetzt. Zusätzlich wurden die insertspezifischen Primer 1-N-*Eco*, 1-C-*Eco*, 4-N-*Eco* und 4-C-*Eco* aus Vorversuchen (KLIMMEK 1997) sowie ein interner Primer innerhalb der Lhca4-Sequenz (4-IN-L) verwendet. Eine zusammenfassende Darstellung aller Primersequenzen und -eigenschaften findet sich in Anhang A 1.

#### 3.3.2.1 Isolierung von λ-DNA

Die Isolierung von λ-DNA aus der amplifizierten Phagenkultur (Abschnitt 2.3.1) erfolgte durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion nach SAMBROCK et al. (1989) ohne bzw. unter Verwendung des *PhaseLock Gel*-Systems (EPPENDORF, Hamburg). Die mit bidest. H<sub>2</sub>O eluiert λ-DNA wurde nach photometrischer Konzentrationsbestimmung (~40-60 ng/μl) aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 3.3.2.2 PCR-Amplifikation von Lhca1

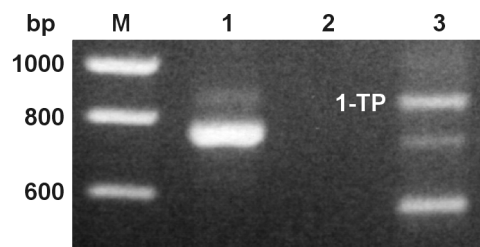
Isolierte λ-DNA (nach SAMBROCK et al. 1989, ohne Verwendung des *PhaseLock Gel*-Systems; vergl. Abschnitt 2.3.2.1) wurde als Template für eine Amplifikation mit *Taq*-Polymerase eingesetzt (Tabelle 3-4). Als Kontrolle wurde rekombinante Vektor-DNA (kodierende Sequenz für Lhca1 der Gerste kloniert in pUC57/T-Vektor; MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot) sowie der vektorspezifische SP6 Promotor-Primer (PROMEGA, Madison, USA) verwendet. Nach Auftrennung der PCR-Fragmente im Agarose-Gel (Abb. 3-3) wurde ein ~800bp-Fragment (1-TP) aus dem Gel herausgeschnitten und in 50 μl bidest. H<sub>2</sub>O 1 h bei RT inkubiert.

**Tabelle 3-4** Amplifikation von DNA-Fragmenten aus λ-DNA mit *Taq*-Polymerase und Lhca1-spezifischem Primer; alle Mengenangaben in μl; Kontrolle: Plasmid-DNA (T-Vektor mit Lhca1-Insert); 37 Zyklen (Z) *touch down*-PCR-Programm (1 Z [2' 94°C] 14 Z [45'' 94°C, 30'' 60°C mit -0,5°C im folgenden Z, 45'' 72°C] 21 Z [45'' 94°C, 30'' 53°C, 45'' 72°C] 1 Z [5' 72°C] 4°C hold).

Ansatz	1	2	3
Template			
Kontrolle	1	-	-
λgt11-DNA [60 ng/μl]	-	-	1
bidest. H <sub>2</sub> O	21	21	21
DMSO [100 % v/v]	1	1	1
dNTP-Mix [je 5 mM]	1	1	1
10 x <i>Taq</i> -Puffer	3	3	3
Primer [5 pM]			
1-C- <i>Hind</i>	1	1	1
SP6	1	1	-
λgt11	-	1	1
<i>Taq</i> [1 u/μl]	1	1	1
<b>gesamt</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>30</b>



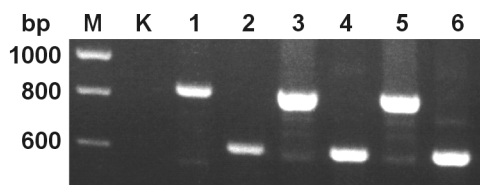
**Abb. 3-3** Auftrennung der PCR-Ansätze (jeweils 5  $\mu$ l + 1  $\mu$ l LD) aus Tabelle 3-4 im 1.5 % w/v Agarose-Gel. Das Fragment 1-TP wurde aus dem Gel herausgeschnitten und in bidest. H<sub>2</sub>O inkubiert; M = Nukleotidstandard.



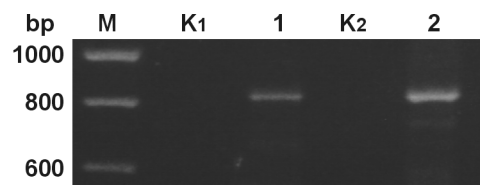
Das Eluat dieses Fragmentes 1-TP (~800bp) wurde anschließend als Template für eine Re-Amplifikation mit *Taq*-Polymerase entsprechend Tabelle 3-5 eingesetzt. Dabei wurde die niedrigste Annealingtemperatur von 53°C auf 56°C erhöht. Die Auftrennung der PCR-Ansätze im Agarose-Gel (Abb. 3-4 **A**) zeigte eine Re-Amplifikation des ~800bp-Fragmentes (1-TP). Über die parallele Amplifikation eines ~600bp-Fragmentes aus dem ~800bp-Fragment konnte gezeigt werden, daß das ~800bp-Fragment für Lhca1-TP kodiert.

**Tabelle 3-5** Re-Amplifikationen aus dem ~800bp-Fragment 1-TP (Eluat) mit *Taq*-Polymerase; alle Mengenangaben in  $\mu$ l; 37 Zyklen (Z) *touch down*-PCR-Programm (1 Z [2' 94°C] 8 Z [45'' 94°C, 30'' 60°C mit -0,5°C im folgenden Z, 45'' 72°C] 27 Z [45'' 94°C, 30'' 56°C, 45'' 72°C] 1 Z [5' 72°C] 4°C hold)

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7
Template							
1-TP (Eluat)	-	1	3	5	1	3	5
bidest. H <sub>2</sub> O	5.5	5	3	1	5	3	1
DMSO [100 % v/v]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
dNTP-Mix [je 5 mM]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
10 x <i>Taq</i> -Puffer	1	1	1	1	1	1	1
Primer [5 pM]							
1-C- <i>Hind</i>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
$\lambda$ gt11	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-	-
1-N- <i>Eco</i>	0.5	-	-	-	0.5	0.5	0.5
<i>Taq</i> [0.5 u/ $\mu$ l]	1	1	1	1	1	1	1
<b>gesamt</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>



**A**

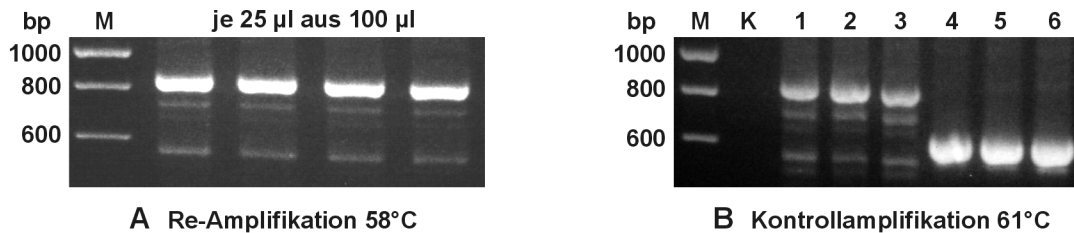


**B**

**Abb. 3-4** Auftrennung der PCR-Ansätze im 1.5 % w/v Agarose-Gel mit jeweils 1  $\mu$ l LD aus **(A)** Tabelle 3-5 sowie **(B)** der re-amplifizierten PCR-Fragmente entsprechend Tabelle 3-5 mit erhöhten Annealingtemperaturen (1 = 58°C, 2 = 57°C); M = Nukleotidstandard, K<sub>1</sub> und K<sub>2</sub> = template-freie Kontrolle.

In zwei weiteren Re-Amplifikationen (Ansätze wie in Tabelle 3-5) mit dem ~800bp-Eluat als Template konnte durch Erhöhung der niedrigsten Annealingtemperatur von 56°C auf 57°C bzw. auf 58°C die Menge und Anzahl der Nebenprodukte deutlich verringert werden (Abb. 3-4 **B**). Die Re-Amplifikation wurde mit der niedrigsten Annealingtemperatur von 58°C in größeren Volumina (Ansatz 1 aus Tabelle 3-5 skaliert auf 100  $\mu$ l) wiederholt. Aus den aufgetrennten Fragmenten wurden die prominenten 800bp-Banden (Abb. 3-5 **A**) herausgeschnitten (1-TP\*), gepoolt und nach Aufreinigung (*QIAquick Gel Extraction Kit*) in 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) eluiert.

Dieses Eluat (1TP\*QQ) wurde vor der Sequenzierung in einer Kontrollamplifikation (Tabelle 3-6) mit *Taq*-Polymerase eingesetzt, bei der die niedrigste Annealingtemperatur noch einmal von 58°C auf 61°C angehoben wurde. Die Auftrennung dieser PCR-Ansätze zeigte eine spezifische Amplifikation sowohl des ~800bp-(Abb. 3-5 **B**, Spur 1-3) als auch des ~600bp-Fragmentes (Abb. 3-5 **B**, Spur 4-6), so daß die QQ-gereinigte DNA (1-TP\*QQ) nach einer Konzentrationsbestimmung im Agarose-Gel mit den Primern  $\lambda$ gt11 (Sequenz: 99061712) und 1-C-*Eco* (Sequenz: 99061712) sequenziert wurde (GAG BIOSCIENCE, Bremen).



**Abb. 3-5** Auftrennung der Ansätze im 1.5 % w/v Agarose-Gel aus **(A)** der Re-Amplifikation (100 µl Ansatz wie Ansatz 1 in Tabelle 3-5) mit maximaler Annealingtemperatur 58°C sowie **(B)** der Kontrollamplifikation (Tabelle 3-6) mit maximaler Annealingtemperatur 61°C; M = Nukleotidstandard.

**Tabelle 2-6** Kontrollamplifikation aus den Eluaten 1-TP und 1-TP\*QQ (1:2 und 1:10 mit bidest. H<sub>2</sub>O) mit *Taq*-Polymerase; alle Mengenangaben in µl; 37 Zyklen (Z) *touch down*-PCR-Programm (1 Z [2' 94°C] 8 Z [45'' 94°C, 30'' 65°C mit -0,5°C im folgenden Z, 45'' 72°C] 27 Z [45'' 94°C, 30'' 61°C, 45'' 72°C] 1 Z [5' 72°C] 4°C hold.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7
Template							
1-TP	-	1	1	-	-	-	-
1-TP*QQ (1:10)	-	-	-	1	1	-	-
1-TP*QQ (1:2)	-	-	-	-	-	1	1
bidest. H <sub>2</sub> O	12	12	12	12	12	12	12
DMSO [100 % v/v]	1	1	1	1	1	1	1
dNTP-Mix [je 5 mM]	1	1	1	1	1	1	1
10 x <i>Taq</i> -Puffer	2	2	2	2	2	2	2
Primer [5 pM]							
1-C- <i>Hind</i>	1	1	1	1	1	1	1
$\lambda$ gt11	1	1	-	1	-	1	-
1-N- <i>Eco</i>	1	-	1	-	1	-	1
<i>Taq</i> [1 u/µl]	1	1	1	1	1	1	1
<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

Gleichzeitig wurde  $\lambda$ -DNA vor einer PCR-Amplifikation in einer vorherigen PCR mit nur einem einzigen sequenzspezifischen Primer entsprechend den Angaben in Tabelle 3-7 eingesetzt. Dabei wird jeweils nur ein DNA-Strang repliziert (*extension*), um die Templatemenge in der nachfolgenden PCR (mit beiden sequenzspezifischen Primern) zu erhöhen. Die hierbei zusätzlich verwendete *Pwo*-Polymerase weist gegenüber der *Taq*-Polymerase eine *proofreading*-Funktion auf, die die Replikationsgenauigkeit erhöht. Nach der PCR wurden die Ansätze aus Tabelle 3-7 als Template für eine PCR mit *Taq*- und *Pwo*-Polymerase verwendet (Tabelle 3-8) Dabei wurden in einzelnen Ansätzen erhöhte Mengen an Primern und dNTPs (→ Ansatz 4 und 5) bzw. an Polymerase eingesetzt (→ Ansatz 9). Nach Auftrennung der Ansätze im Agarose-Gel (Abb. 3-6) zeigte sich, daß mit *Taq*-Polymerase in den Ansätzen 1 bis 5 drei Fragmente (~800bp, ~700bp und ~550bp) amplifiziert werden konnten, während mit *Pwo*-Polymerase in den Ansätzen 6 bis 9 (auch bei erhöhter Menge an Polymerase in Ansatz 9) nur das ~550bp-Fragment amplifiziert wurde.

Außerdem zeigten bis auf den Ansatz 2 alle übrigen mit *Taq*-Polymerase amplifizierten Ansätze eine deutlich verbesserte Ausbeute gegenüber Ansatz 1, in dem  $\lambda$ -DNA direkt (ohne vorherige *extension*) als Template eingesetzt wurde. Auch bei mehrmaliger Wiederholung (entspr. Tabelle 3-8) mit Absenkung der niedrigsten Annealingtemperatur bis auf 45°C konnte mit *Pwo*-Polymerase keine prominente Amplifikation eines Fragmentes > 550bp erreicht werden.

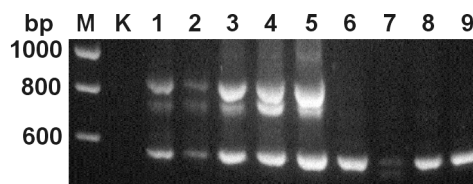
**Tabelle 3-7** *Extension* aus  $\lambda$ gt11-DNA mit *Taq*- (Ansatz 1) und *Pwo*-Polymerase (Ansatz 2); 37 Zyklen (Z) PCR-Programm (1 Z [3' 95°C] 3 Z [45'' 94°C, 30'' 60°C, 45'' 72°C] 32 Z [45'' 94°C, 30'' 55°C, 45'' 72°C] 1 Z [20' 72°C] 4°C hold).

Ansatz	1	2
Template		
$\lambda$ gt11-DNA [60 ng/ $\mu$ l]	3	3
bidest. H <sub>2</sub> O	32	32
DMSO [100 % v/v]	3	3
dNTP-Mix [je 5 mM]	2	2
10 x <i>Taq</i> -Puffer	5	-
10 x <i>Pwo</i> -Puffer	-	5
Primer [5 pM]		
1-C- <i>Hind</i>	3	3
<i>Taq</i> [1 u/ $\mu$ l]	2	-
<i>Pwo</i> [1u/ $\mu$ l]	-	2
<b>gesamt</b>	<b>50</b>	<b>50</b>

**Tabelle 3-8** PCR-Ansätze für Amplifikation von Lhca1-Fragmenten aus den *Extension*-Ansätzen (Tabelle 3-7 mit *Taq*- und *Pwo*-Polymerase; alle Mengenangaben in  $\mu$ l; 37 Zyklen (Z) *touch down*-PCR-Programm (1 Z [2' 94°C] 20 Z [45'' 94°C, 30'' 60°C mit -0,5°C im folgenden Z, 45'' 72°C] 15 Z [45'' 94°C, 30'' 50°C, 45'' 72°C] 1 Z [5' 72°C] 4°C hold)

Ansatz	K	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Template										
$\lambda$ gt11DNA [60 ng/ $\mu$ l]	-	1	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Taq</i> -Extension	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-
<i>Pwo</i> -Extension	-	-	-	1	-	1	-	-	1	-
bidest. H <sub>2</sub> O	6	5	5	5	3.5	3.5	5	5	5	4
DMSO [100 % v/v]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
dNTP-Mix [je 5 mM]	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5
10 x <i>Taq</i> -Puffer	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-
10 x <i>Pwo</i> -Puffer	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
Primer [5 pM]										
1-C- <i>Hind</i>	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5
$\lambda$ gt11	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>Taq</i> [0.5 u/ $\mu$ l]	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-
<i>Pwo</i> [0.5 u/ $\mu$ l]	-	-	-	-	-	-	1	1	1	2
<b>gesamt</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

**Abb. 3-6** Auftrennung der PCR-Ansätze 1 bis 9 aus Tabelle 3-8 im 1.5 % w/v Agarose-Gel; M = Nukleotidstandard.

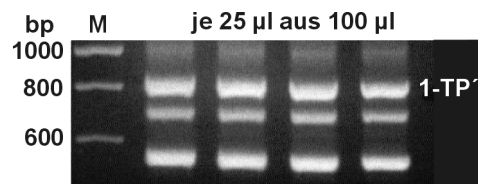


Deshalb wurde anschließend das Template aus der *Pwo*-Extension mit *Taq*-Polymerase amplifiziert (Tabelle 3-9). Nach Auftrennung des kompletten Ansatzes im 2 % (w/v) Agarose-Gel (Abb. 3-7) wurden die mit 1-TP' bezeichneten Banden ausgeschnitten, mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* aufgereinigt und in 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) eluiert. Die DNA-Konzentration des Eluates (1-TP\*\*QQ) wurde im Agarose-Gel mit ca. 20 ng/μl bestimmt. Die Auftrennung der Reaktionsansätze einer Kontrollamplifikation (Tabelle 3-10) mit *Taq*-Polymerase im Agarose-Gel (Abb. 3-8) unter Verwendung der QQ-gereinigten DNA (1-TP\*\*QQ) als Template zeigte die Amplifikation sowohl der ~800bp-Bande als auch des ~600bp-Fragmentes für das reife Protein. Die isolierte DNA wurde anschließend durch die GAG BIOSCIENCE (Bremen) mit dem λgt11-Primer sequenziert (Sequenz 99072121).

**Tabelle 3-9** Amplifikation von Lhca1-spezifischen Fragmenten aus dem *Pwo*-first-strand (Tabelle 3-7) mit *Taq*-Polymerase; alle Mengenangaben in μl; 37 Zyklen (Z) *touch down*-PCR-Programm (1 Z [2' 94°C] 10 Z [45'' 94°C, 30'' 65°C mit -0,5°C im folgenden Z, 45'' 72°C] 25 Z [45'' 94°C, 30'' 60°C, 45'' 72°C] 1 Z [5' 72°C] 4°C hold).

Ansatz	1
Template	
<i>Pwo</i> -Extension	5
bidest. H <sub>2</sub> O	32
DMSO [100 % v/v]	5
dNTP-Mix [je 5 mM]	5
10 x <i>Taq</i> -Puffer	5
Primer [5 pM]	
1-C- <i>Hind</i>	5
λgt11	5
<i>Taq</i> [1 u/μl]	2
<b>gesamt</b>	<b>100</b>

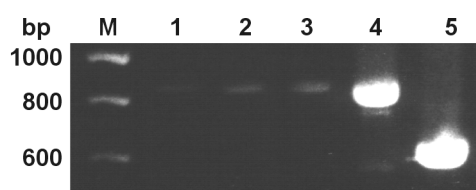
**Abb. 3-7** Auftrennung von Ansatz 1 aus Tabelle 3-9 im 2 % w/v Agarose-Gel. Die mit 1-TP' bezeichneten Fragmente von ~800 bp wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und gepoolt (1-TP\*\*QQ).



**Tabelle 3-10** Kontrollamplifikation von Lhca1-Fragmenten aus 1-TP\*\*QQ (1:10 mit bidest. H<sub>2</sub>O) mit *Taq*-Polymerase; alle Mengenangaben in μl; 37 Zyklen (Z) *touch down*-PCR-Programm (1 Z [2' 94°C] 10 Z [45'' 94°C, 30'' 65°C mit -0,5°C im folgenden Z, 45'' 72°C] 25 Z [45'' 94°C, 30'' 60°C, 45'' 72°C] 1 Z [5' 72°C] 4°C hold).

Ansatz	1	2
Template		
1-TP**QQ (1:10)	1	1
bidest. H <sub>2</sub> O	12	12
DMSO [100 % v/v]	1	1
dNTP-Mix [je 5 mM]	1	1
10 x <i>Taq</i> -Puffer	2	2
Primer [5 pM]		
1-C- <i>Hind</i>	1	1
λgt11	1	-
1-N- <i>Eco</i>	-	1
<i>Taq</i> [1 u/μl]	1	1
<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

**Abb. 3-8** Auftrennung von Ansatz 1 (Spur 4) und 2 (Spur 5) aus Tabelle 3-10 im 1.5 % (w/v) Agarose-Gel; Spur 1-3: 1-TP\*\*QQ-DNA, M = Nukleotidstandard.



### 3.3.2.3 PCR-Amplifikation von *Lhca4*

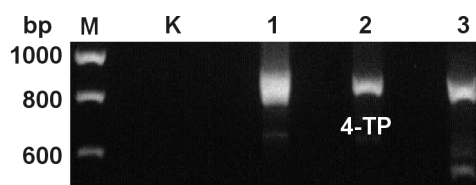
Für die Gewinnung der *Lhca4*-Sequenz wurde isolierte Phagen-DNA (nach SAMBROCK et al. 1989 unter Verwendung des *PhaseLock Gel*-Systems; vergl. Abschnitt 2.3.2.1) als Template für eine PCR mit *Taq*-Polymerase verwendet. Dabei wurde das Verhältnis des Vektorprimers  $\lambda$ gt11 zu den eingesetzten *Lhca4*-spezifischen Primern in den Ansätzen 2 bis 4 variiert (Tabelle 3-11).

**Tabelle 3-11** Amplifikation von DNA-Fragmenten aus  $\lambda$ gt11-DNA mit *Taq*-Polymerase und *Lhca4*-spezifischen Primern; alle Mengenangaben in  $\mu$ l; 42 Zyklen (Z) *touch down*-PCR-Programm (1 Z [2' 94°C] 4 Z [45'' 94°C, 30'' 65°C mit -0,5°C im folgenden Z, 45'' 72°C] 36 Z [45'' 94°C, 30'' 61°C, 45'' 72°C] 1 Z [5' 72°C] 4°C hold).

Ansatz	K	1	2	3
Template				
$\lambda$ gt11-DNA [40 ng/ $\mu$ l]	-	1	1	1
bidest. H <sub>2</sub> O	5.5	5	4.5	4
DMSO [100 % v/v]	0.5	0.5	0.5	0.5
dNTP-Mix [je 5 mM]	0.5	0.5	0.5	0.5
10 x <i>Taq</i> -Puffer	1	1	1	1
Primer [5 pM]				
$\lambda$ gt11	0.5	0.5	0.5	0.5
4-C- <i>Bam</i>	0.5	-	-	-
4-C- <i>Eco</i>	0.5	0.5	1	1.5
<i>Taq</i> [0.5 u/ $\mu$ l]	1	1	1	1
<b>gesamt</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Nach Auftrennung der Ansätze im Agarose-Gel (Abb. 3-9) konnte in den Ansätzen 1 bis 3 ein ~800bp-Fragment identifiziert werden, das in der Auftrennung von Ansatz 2 (Bande 4-TP) aus dem Gel herausgeschnitten und 1 h bei RT in 50  $\mu$ l bidest. H<sub>2</sub>O inkubiert wurde. Dieses Eluat wurde als Template für eine Re-Amplifikation mit *Taq*-Polymerase verwendet (Tabelle 3-12). Hier wurden die niedrigsten Annealingtemperaturen gegenüber der vorherigen Amplifikation (vergl. Tabelle 3-11) von 61°C auf 63°C angehoben, um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen. Die Auftrennung im Agarose-Gel (Abb. 3-10) zeigte eine Re-Amplifikation des ~800bp-Fragmentes im Ansatz 1.

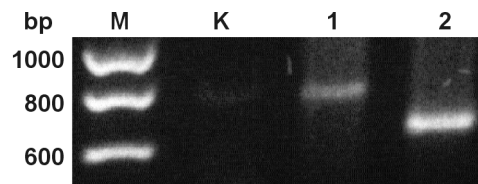
**Abb. 3-9** Auftrennung der Ansätze aus Tabelle 3-11 im 1.5 % w/v Agarose-Gel; das mit 4-TP bezeichnete Fragment wurde aus dem Gel herausgeschnitten und in bidest. H<sub>2</sub>O inkubiert



**Tabelle 3-12** Re-Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Eluat (Bande 4-TP) mit *Taq*-Polymerase und Lhca4-spezifischen Primern; alle Mengenangaben in  $\mu\text{l}$ ; 40 Zyklen (Z) *touch down*-PCR-Programm (1 Z [2' 94°C] 2 Z [45'' 94°C, 30'' 65°C mit -0,5°C im folgenden Z, 45'' 72°C] 36 Z [45'' 94°C, 30'' 63°C, 45'' 72°C] 1 Z [5' 72°C] 4°C hold).

Ansatz	K	1	2
Template			
Eluat (4-TP)	-	1	1
bidest. H <sub>2</sub> O	5	5	5
DMSO [100 % v/v]	0.5	0.5	0.5
dNTP-Mix [je 5 mM]	0.5	0.5	0.5
10 x <i>Taq</i> -Puffer	1	1	1
Primer [5 pM]			
$\lambda\text{gt}11$	0.5	0.5	-
4-N- <i>Bam</i>	0.5	-	-
4-C- <i>Hind</i>	0.5	0.5	0.5
4-C- <i>Eco</i>	0.5	-	0.5
<i>Taq</i> [0.5 u/ $\mu\text{l}$ ]	1	1	1
<b>gesamt</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

**Abb. 3-10** Auftrennung der Ansätze aus Tabelle 3-12 im 1.4 % w/v Agarose-Gel mit Nachweis der Re-Amplifikation des ~800bp-Fragmentes in Ansatz 1; M = Nukleotidstandard.



Das Eluat (4-TP) wurde dann als Template für eine Re-Amplifikation in größerem Volumen (entsprechend Ansatz 1 in Tabelle 3-12 skaliert auf 100  $\mu\text{l}$ ) mit *Taq*-Polymerase eingesetzt. Nach Auftrennung im Agarose-Gel wurden die ~800bp-Fragmente aus dem Gel herausgeschnitten und aufgereinigt (*QIAquick Gel Extraction Kit*). Die Konzentration der in 10 mM Tris-HCl (pH 8.5) eluierten DNA (4-TP\*QQ) wurde im Agarose-Gel mit ~20-25 ng/ $\mu\text{l}$  bestimmt.

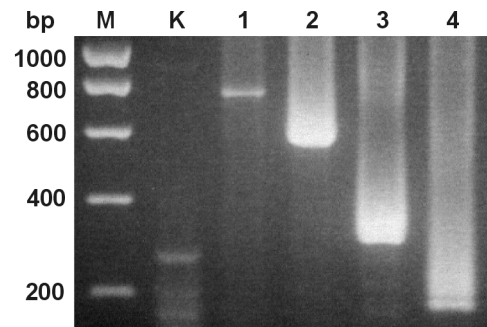
**Tabelle 3-13** Kontrollamplifikation von Lhca4-Fragmenten aus 4-TP\*QQ (20-25 ng/ $\mu\text{l}$ ; 1:10 mit bidest. H<sub>2</sub>O verdünnt) mit *Taq*-Polymerase; alle Primer als 1:1-Mix, jeweils 2.5 pM; alle Mengenangaben in  $\mu\text{l}$ ; 40 Zyklen (Z) *touch down*-PCR-Programm (1 Z [2' 94°C] 2 Z [45'' 94°C, 30'' 65°C mit -1°C im folgenden Z, 45'' 72°C] 36 Z [45'' 94°C, 30'' 63°C, 45'' 72°C] 1 Z [5' 72°C] 4°C hold)

Ansatz	K	1	2	3
Template				
4-TP*QQ (1:10)	-	1	1	1
bidest. H <sub>2</sub> O	5	5	5	5
DMSO [100 % v/v]	0.5	0.5	0.5	0.5
dNTP-Mix [je 5 mM]	0.5	0.5	0.5	0.5
10 x <i>Taq</i> -Puffer	1	1	1	1
Primer [5 pM]				
$\lambda\text{gt}11/4\text{-C-Eco}$	0.5	1	-	-
4-N- <i>Bam</i> /4-C- <i>Hind</i>	0.5	-	1	-
$\lambda\text{gt}11/4\text{-IN-L}$	0.5	-	-	1
<i>Taq</i> [0.5 u/ $\mu\text{l}$ ]	1	1	1	1
<b>gesamt</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

Die gereinigte DNA (4-TP\*QQ) wurde als Template für eine Kontrollamplifikation mit *Taq*-Polymerase eingesetzt (Tabelle 3-13). Dabei wurde zusätzlich ein interner spezifischer Primer (4-IN-L) innerhalb der Lhca4-Sequenz eingesetzt, um das für den N-terminalen Abschnitt des Proteins kodierende Fragment einschließlich der Sequenz für das Transitpeptid mit einer erwarteten Größe von ~320-330 bp zu amplifizieren.

Die Auftrennung im Agarose-Gel (Abb. 3-11) zeigte sowohl die Amplifikation des ~800bp-Fragments in Ansatz 1 als auch der Kontrollfragmente (Ansatz 2 bis 4). Die isolierte DNA wurde daraufhin mit dem  $\lambda$ gt11-Primer (Sequenzen 00020331 und 00031102), 4-C-*Hind* (00020332 und 00031103) sowie 4-IN-L (00032622) durch die GAG BIOSCIENCE (Bremen) sequenziert.

**Abb. 3-11** Auftrennung der PCR-Ansätze aus der Kontrollamplifikation (Tabelle 3-13) im 1.5 % w/v Agarose-Gel mit Nachweis der spezifischen Amplifikation von Lhca4-Fragmenten; M = Nukleotidstandard.



#### 3.3.2.4 Auswertung der DNA-Sequenzen

Ermittelte DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm CLUSTALW nach Algorithmen von THOMPSON et al. (1994) vergleichend orientiert, um kodierende Abschnitte und  $\lambda$ gt11-Vektorsequenzen zu identifizieren. Außerdem wurden diese Sequenzen mit den Daten der sequenzierten Vektoren (Abschnitt 2.4.5) zur Bestimmung der *consensus*-Sequenzen für Lhca1 und Lhc4 verglichen. Die *consensus*-Sequenzen wurden in Aminosäuresequenzen übersetzt.

Identifizierte Transitpeptidsequenzen wurden dann gesondert mit verfügbaren Transitpeptidsequenzen angiospermer Pflanzen für Lichtsammelproteine vom Lhca- (n=26) und Lhcb-Typ (n=116) verglichen. Die Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen innerhalb der verglichenen Transitpeptide und Sequenzen für die reifen Proteine wurden auf der Basis der Algorithmen von THOMPSON et al. (1994) unter Verwendung eines Programmes (TreeView 1.6.6) von SLOWINSKI & PAGE (1999) dargestellt.

## 3.4 Klonierung

### 3.4.1 Expressionssystem

Die isolierten Lhca1- und Lhca4-Fragmente (Abschnitt 2.2.2.2) wurden zur Überexpression in *E. coli* (JM101) in pDS12-Vektoren ligiert. Die beiden verwendeten ~3.5 kb-Vektoren pDS12-II (im folgenden nach den C- bzw. N-terminalen Schnittstellen *Bam*HI und *Hind*III als pDS-B/H bezeichnet) bzw. *Sph*I und *Hind*III (im folgenden als pDS-S/H bezeichnet; DILLY-HARTWIG et al. 1998) basieren auf dem Expressionsplasmid pDS5.

Dieses Plasmid enthält den starken  $P_{N25}$  Promotor aus dem Phagen T5, der mit der *lacZ*-Operatorsequenz aus *E. coli* gekoppelt ist. Nach Zugabe von *Isopropylthiogalactosid* (IPTG) bindet dieses an das *lacI*-Genprodukt und vermindert damit die durch *lacI* vermittelte konstitutive Repression des Operators. Damit wird eine starke Transkription der innerhalb der nachfolgenden Polylinkerregion inserierten DNA-Sequenz induziert (BUJARD et al. 1987).

Der für die Expression verwendete Zellstamm *E. coli* (JM101) weist nach der genetischen Charakterisierung von YANISCH-PERRON et al. (1985) eine Mutation im Prolin-Stoffwechsel auf ( $\Delta$ *lac-pro* AB) sowie ein F'-Episom mit Sequenzen, die für (1) die Komplementierung von  $\beta$ -Galactosidase<sup>24</sup> ( $\Delta$ *lacZ*M15), (2) eine starke Expression des Operator-Suppressors *lacI* (*lacI*<sup>q</sup>) sowie (3) die Unterdrückung eines Transfers des F'-Episoms (*traD*36) kodieren.

Der Zellstamm wächst auch auf Minimalmedien ohne Zusatz von Thiamin (*thi*) und UAG (*amber*)-Mutationen werden unterdrückt (*sup* E). Überexprimiertes rekombinantes Protein reichert sich innerhalb der Zellen in Form von Partikeln, sog. *inclusion bodies* an. Dieses Expressionssystem mit pDS12-Vektoren im *E. coli*-Zellstamm JM101 ist bereits erfolgreich für die Überexpression von rekombinanten Lichtsammelproteinen eingesetzt worden (PAULSEN et al. 1990; PAULSEN & HOBE 1992; PAULSEN & KUTTKAT 1993; SCHMID et al. 1997).

### 3.4.2 Anzucht von *E. coli* (JM101)

Die Anzucht von *E. coli* (JM101) erfolgte in LB-Medium nach SAMBROCK et al. (1989), so nicht anderslautend beschrieben. LB-Platten enthielten 15g/l Agar. Selektive LB<sub>AMP</sub>-Medien und -Platten enthielten 50  $\mu$ g/ml Ampicillin. Die Anzucht von Zellen in Flüssigmedien erfolgte grundsätzlich durch Animpfen einzelner Kolonien von Plattenkulturen. Plattenkulturen wurden jeweils aus Stammkulturen (-80°C) angeimpft und bis zum Auftreten einzelner Kolonien (12-16 h) bei 37°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in der Regel bei 37°C und unter Schütteln (170-220 *rpm*) inkubiert. Stammkulturen (-80°C) wurden jeweils mit 15 % v/v (EK) Glycerin angelegt, aliquotiert (100  $\mu$ l) in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und dann bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Sämtliche Arbeiten mit lebenden Kulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen; das Picken von Kolonien von Platten erfolgte mit Zahnstochern. Zentrifugationen wurden mit SS34-Rotoren (Sorvall RC5B, DU-PONT INSTRUMENTS, Newtown, USA) oder Minifugen (*Biofuge 15* und *Biofuge B*; HAEREUS SEPATECH, Osterode) durchgeführt. Die Auf-

---

<sup>24</sup> Bei Einsatz von Plasmiden mit  $\alpha$ -komplementierenden Sequenzen in einer Blau/Weiss-Selektion mit X-GAL und IPTG.



trennung von Vektoren und DNA-Fragmenten in Agarose-Gelen erfolgte entsprechend Abschnitt 2.1.3. DNA-Konzentrationen wurden photometrisch bei 260 und 280 nm, Zelldichten als OD gegen LB-Medium bestimmt (SHIMADZU UV-160; SHIMADZU, Kyoto, Japan).

Für die Erzeugung transfektionskompetenter Zellen wurden außerdem folgende Medien verwendet:

<i>TYM-Broth</i> -Medium:	2 % w/v Kasein-Hydrolysat (Bacto-Tryptone), 0.5 % w/v Hefe-Extrakt, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; mit 1 M NaOH auf pH 7.5 eingestellt; autoklaviert.
<i>TFB1</i> -Medium:	30 mM K-Acetat, 100 mM KCl, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 15 % v/v Glycerin; mit bidest. H <sub>2</sub> O auf 950 ml aufgefüllt, nach Autoklavieren 50 ml 1 M MnCl <sub>2</sub> (sterilfiltriert) zugegeben.
<i>TFB2</i> -Medium:	10 mM Na-MOPS, 75 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM KCl, 15 % v/v Glycerin; autoklaviert.
<i>SOB</i> -Medium	2 % w/v Kasein-Hydrolysat (Bacto-Trypton), 0.5 % w/v Hefe-Extrakt, 86 mM NaCl, 2.5 mM KCl, mit 5 M NaOH auf pH 7.0 eingestellt; autoklaviert
<i>SOC</i> -Medium	<i>SOB</i> -Medium mit 0.2 M Glukose, frisch angesetzt.

#### 3.4.2.1 Stammkulturen

Untransformierte *E. coli* (JM101) wurden von LB-Platten in LB-Medium (5 ml) überimpft. Nach Inkubation über Nacht (12-16h) wurde aus diesen 1:10<sup>3</sup> v/v in LB-Medium (100 ml) überimpft und nochmals über Nacht (12-16) inkubiert. Die Zellen wurden dann 10 min bei 1000 x g (SS34-Rotor) bei 4°C pelletiert. Nach Resuspendierung in LB-Medium wurden Stammkulturen angelegt.

#### 3.4.2.2 Kompetente Zellen

Untransformierte *E. coli* (JM101) wurden von LB-Platten (mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>) in *TYM-Broth*-Medium (5 ml) überimpft. Nach 2 h wurde der Ansatz in frisches *TYM-Broth*-Medium (100 ml) überführt und weitere 1.5 bis 2 h bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0.8-0.9 wie beschrieben inkubiert. Die Zellen wurden 10 min bei 1000 x g (SS34-Rotor) pelletiert und nach Resuspendierung in *TFB1*-Medium (20 ml) 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die nun kompetenten Zellen 8 min bei 1000 x g (SS34-Rotor) bei 4°C pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in *TFB2*-Medium (4 ml) aufgenommen, aliquotiert (100 µl) und nach Einfrieren in flüssigem N<sub>2</sub> bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Im Verlauf der Arbeiten zeigte sich, daß die relative Transformationseffizienz gegenüber frisch präparierten Zellen nach 1-3 Monaten Lagerung nur noch ca. 10-30 % betrug, weshalb für Transformationen im weiteren Verlauf keine Zellen verwendet wurden, die älter als 6 Wochen waren.

### 3.4.3 Konstruktion der Expressionsvektoren

#### 3.4.3.1 Isolierung von Vektor-DNA

Aliquots (100  $\mu$ l) kompetenter *E. coli* (JM101) (Abschnitt 2.4.2) wurden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von jeweils 1  $\mu$ l Vektor-DNA<sup>25</sup> (pDS12-B/H: ~60 ng/ $\mu$ l; pDS-S/H: ~100 ng/ $\mu$ l) 30 min auf Eis inkubiert. Als Kontrollen wurden kompetente Zellen verwendet, denen 1  $\mu$ l bidest. H<sub>2</sub>O zugesetzt wurde. Die Aufnahme der DNA durch die Zellen wurde durch eine Inkubation für 90 s bei 42°C im Wasserbad induziert. Die Zellen wurden anschließend 1-2 min auf Eis gelagert und dann in SOC-Medium (800  $\mu$ l) aufgenommen. Nach 60 min Inkubation bei 37°C unter leichtem Schwenken wurden die Zellen auf LB<sub>AMP</sub>-Platten aus-gestrichen (jeweils 10-50  $\mu$ l) und über Nacht (12-16 h) weiter bei 37°C inkubiert.

Von den LB<sub>AMP</sub>-Platten wurden einzelne Kolonien in LB<sub>AMP</sub>-Medium (5 ml) überimpft und 16 h bei 37°C inkubiert. Aus diesen Kulturen wurde Plasmid-DNA (Mini-Prep) isoliert (*Plasmix DNA Purification System*) und im Agarose-Gel auf Anwesenheit des Vektors kontrolliert. Aus der Übernachtskultur für die Mini-Preps wurden außerdem Kulturen im Verhältnis 1:10<sup>3</sup> v/v in LB<sub>AMP</sub>-Medium (200 ml) angeimpft und über Nacht (12-16 h) bei 37°C inkubiert. Aus diesen Kulturen wurde Plasmid-DNA (Midi-Prep) (*Qiagen Plasmid Kit*) isoliert und die Konzentration der in bidest. H<sub>2</sub>O aufgenommenen DNA sowohl photometrisch als auch im Agarose-Gel bestimmt. Isolierte Plasmid-DNA (100-500 ng/ $\mu$ l) wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 3.4.3.2 Linearisierung und Aufreinigung

Isolierte Vektor-DNA wurde mit Restriktionsenzymen (1  $\mu$ g Plasmid-DNA) im Parallelverdau (*Bam*H1 und *Hind*III sowie *Sph*1 sowie *Hind*III) nach den Angaben des Herstellers (EUROGENTEC, Seraing, Belgien) in Volumina von 50-100  $\mu$ l für 1 h bei 37°C inkubiert. Die im Doppelverdau geschnittenen Vektoren wurden nach Aufreinigung (*QiaQuick Nucleotide Removal Kit*) im Agarose-Gel zur Bestimmung der Konzentration aufgetrennt. So gewonnene linearisierte Plasmid-DNA (~ 60-150 ng/ $\mu$ l) wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 3.4.3.3 Ligation

Die geschnittenen pDS-Vektoren und die isolierten DNA-Fragmente mit den kodierenden Sequenzen für Lhca1 und Lhca4 (Abschnitt 2.2.2.2) wurden mit *T4 DNA Ligase* (PROMEGA, Madison, USA) nach den Angaben des Herstellers ligiert. Je Ligationsansatz (10-30  $\mu$ l) wurden dabei ca. 100-120 ng Vektor-DNA und 15-25 ng Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:0.7-1.5 (Vektor:Insert) sowie 1-2 U T4-Ligase verwendet. Die Ansätze wurden über Nacht bei 6°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Ligationskontrolle über die Auftrennung von 5-10  $\mu$ l der Ligationsansätze im Vergleich zu linearisierter und zirkulärer Plasmid-DNA im Agarose-Gel. Die verbleibende Hälfte wurde bis zum Ende der Ligationskontrolle bei +6°C gelagert und dann unmittelbar für die Transformation verwendet.

---

<sup>25</sup> Die Vektor-DNA wurde als Plasmid-DNA in bidest. H<sub>2</sub>O von H. Paulsen (Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz) zur Verfügung gestellt.

#### 3.4.3.4 Transformation

Aliquots kompetenter *E. coli* (JM101) (Abschnitt 2.4.2) wurden auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 5-10 µl Ligationsansatz (s.o.) 30 min auf Eis inkubiert. Als Kontrollen wurden jeweils gleiche Volumina an bidest. H<sub>2</sub>O (00-Kontrolle) sowie 50-100 ng (in bidest. H<sub>2</sub>O) zirkuläre Vektor-DNA (0-Kontrolle) verwendet. Nach der Inkubation auf Eis wurden die Ansätze 90 s bei 42°C im Wasserbad inkubiert und anschließend sofort wieder 1-2 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 800µl SOC-Medium wurden die Ansätze 1-2 h bei 37°C unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend 5 min mit 90 x *g* abzentrifugiert. Nach Abziehen von 500 µl Überstand wurde das Pellet im verbleibenden Überstand resuspendiert. Von diesem Überstand wurden verschiedene Mengen (5-100 µl) auf LB<sub>AMP</sub>-Platten ausgestrichen und über Nacht (10-16 h) bei 37°C inkubiert. Die Überstände der 00-Kontrolle wurden auf LB-Platten ausgestrichen. Nach der Inkubation wurden einzelne Kolonien der mit ligierter DNA transformierten Ansätze von den LB<sub>AMP</sub>-Platten gepickt und wie unter 2.4.4 beschrieben auf positive Rekombinante gescreent.

### 3.4.4 Screening auf positive Rekombinante

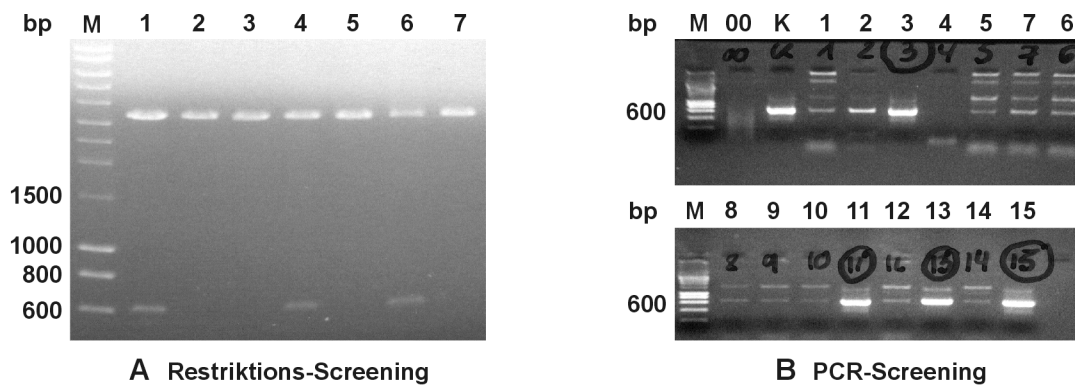
#### 3.4.4.1 Screening durch Restriktionsanalyse

Für die Restriktionsanalyse wurden einzelne Kolonien von LB<sub>AMP</sub>-Platten 10-16 h in LB<sub>AMP</sub>-Medium (5 ml) inkubiert. Mit dem *Plasmix DNA Purification System* wurde Plasmid-DNA (Mini-Prep) aus jeweils ~1.2 ml der Kulturen isoliert, der verbleibende Rest wurde bis zum Abschluß der Restriktionsanalyse bei +6°C gelagert. Von der in bidest. H<sub>2</sub>O eluierten Plasmid-DNA wurden dann ohne vorherige Bestimmung der DNA-Konzentration jeweils 5 µl in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit den entsprechenden Enzymen (mit *Bam*HI und *Hind*III bzw. *Sph*I und *Hind*III; jeweils 0.5-1 u/Ansatz) nach den Angaben des Herstellers (EUROGENTEC, Seraing, Belgien) 1 h bei 37°C geschnitten und diese Restriktionsansätze anschließend im Agarose-Gel aufgetrennt (Abb. 3-12 **A**). Von positiven Rekombinanten wurden Stammkulturen (-80°C) aus den Rückstellproben angelegt.

#### 3.4.4.2 PCR-Screening

Einzelne Kolonien wurden von LB<sub>AMP</sub>-Platten mit sterilen Zahnstochern gepickt und diese vor Überführung in leere Reagenzgläser kurz auf den Boden von PCR-Reaktionsgefäßen getippt. Die Reagenzgläser wurden bis zum Abschluß des PCR-Screenings bei +6°C gelagert. Als Kontrollen wurden bidest. H<sub>2</sub>O (00-Kontrolle), untransformierte *E. coli* (JM101) mit pDS-Vektor (0-Kontrolle) sowie *E. coli* (JM101) mit der jeweils spezifischen Insert-DNA (+Kontrolle) aus Stammkulturen (-80°C) verwendet. Die PCR-Ansätze wurden dann mit im Mastermix vorgelegten übrigen Komponenten (entsprechend Tabelle 3-2) supplementiert und nach einer PCR im Agarose-Gel aufgetrennt (Abb. 3-12 **B**).

Den bei +6°C zurückgestellten Reagenzgläsern der positiv gescreenten Klone wurde dann LB<sub>AMP</sub>-Medium (5 ml) zugesetzt und diese über Nacht (10-16h) inkubiert. Von diesen Kulturen wurden dann Stammkulturen (-80°C) angelegt, die negativ gescreenten Klone wurden verworfen. Dieses Verfahren erwies sich insgesamt als weniger zeitaufwendig und kostengünstiger, so daß es im weiteren Verlauf der Arbeiten bevorzugt für die Identifikation positiver Rekombinanten eingesetzt wurde.



**Abb. 3-12** Auftrennung von (A) geschnittener Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* (JM101) im Agarose-Gel; aufgetragen sind jeweils die gesamten Ansätze (10 µl); positive Rekombinante: 1, 4 und 6; (B) Ansätzen aus einem PCR-Screening (Lhca1- in PDS12-B/H-Vektor); eindeutig positive Rekombinante: 3, 11, 13 und 15; K = isoliertes Lhca1-PCR-Produkt als Template, 00 = Kontrolle ohne Template, M = Nukleotidmarker.

### 3.4.5 Sequenzierung

Identifizierte positive Klone wurden von LB<sub>AMP</sub>-Platten in LB<sub>AMP</sub>-Medium (5 ml) überimpft. Nach einer Inkubationszeit von 10 h bei 37°C wurden diese Kulturen komplett in LB<sub>AMP</sub>-Medium (100 ml) überführt und weitere 12 h bei 37°C inkubiert. Aus dieser Kultur wurde mit dem *Qiagen Plasmid Kit* Plasmid-DNA (Midi-Prep.) isoliert. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung der in bidest. H<sub>2</sub>O eluierten DNA wurde diese bis zur Sequenzierung durch GAG BIOSCIENCE (Bremen) bei -20°C gelagert. Vor einer Sequenzierung wurde jeweils ein Teil mit Restriktionsenzymen geschnitten und/oder als Template für eine Kontroll-PCR mit Vektor- (pDS-*start*) und insertspezifischen Primern eingesetzt.

Die gewonnenen Sequenzen wurden nach Algorithmen von THOMPSON et al. (1994) sowohl untereinander als auch mit den Ergebnissen aus dem Screening der cDNA-Bibliothek (Abschnitt 2.3.2.4) verglichen. Dabei wurde sowohl die korrekte Insertion des Inserts mit Ausbildung des Startcodons (ATG) als auch die korrekte Amplifikation des Inserts in Bezug auf die Basenrichtigkeit gegenüber den abgeleiteten *consensus*-Sequenzen für Lhca1 und Lhca4 überprüft. Bei der Überprüfung der Basenrichtigkeit wurden nicht eindeutige Basenidentifikationen (z.B. **S** für **C** oder **G**) als fehlerhafte Base bewertet, wenn der komplementäre Strang eine abweichende Base aufwies oder keine Sequenz für den komplementären Strang verfügbar war. Für die anschließende Überexpression der rekombinanten Proteine wurden lediglich Klone mit doppelsträngig fehlerfrei sequenzierten Vektoren (vergl. Abschnitt 4.2) verwendet.

## 3.5 Proteinexpression

### 3.5.1 Anzucht und Induktion der Zellen

Bei der Anzucht transformierter *E. coli* (JM101) für die Gewinnung von rekombinantem Protein erfolgten das Anlegen von bzw. das Animpfen aus Stammkulturen, die Kultivierung der Zellen, die Zentrifugationen und Konzentrationsbestimmungen (so nicht abweichend vermerkt) wie im Abschnitt 2.4.2 beschrieben.

#### 3.5.1.1 Vorkultur

Transformierte *E. coli* (JM 101) wurden von LB<sub>AMP</sub>-Platten in LB<sub>AMP</sub>-Medium (5 ml) überimpft und über Nacht (12-16 h) inkubiert. Aus diesen Kulturen wurde dann 1:10<sup>3</sup> v/v in LB<sub>AMP</sub>-Medium (100-500 ml) überimpft und diese Kulturen ca. 2-3 h bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0.4-0.5 inkubiert. LB<sub>AMP</sub>-Medien enthielten 100 µg/ml Ampicillin.

#### 3.5.1.2 Rückstellproben

Vor der Induktion der Proteinexpression wurden Aliquots (1-2 ml) entnommen und 5 min mit  $9.3 \times 10^3 \times g$  pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden in 25-50 µl *Fling-Buffer* (vergl. Abschnitt 2.5.4) resuspendiert und als t<sub>0</sub>-Kontrollen bei -20°C eingefroren.

#### 3.5.1.3 Induktion

Bei einer OD<sub>550</sub> von 0.4-0.65 wurde den Kulturen 1:100 1 M IPTG (in bidest. H<sub>2</sub>O) zugesetzt (1 mM EK). Die Kulturen wurden dann weitere 4-8 h inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0.5 bis 8 h) nach der Induktion wurden Rückstellproben (t<sub>h</sub>) entsprechend Abschnitt 2.5.1.2 gezogen.

### 3.5.2 Isolierung rekombinanter Proteine

Die Isolierung überexprimierter rekombinanter Proteine aus den induzierten Kulturen erfolgte nach PAULSEN et al. (1990). Daneben wurde das *B-PER*<sup>TM</sup>-Isolierungssystem (PIERCE, Rockford, USA) zur Aufreinigung bakterieller Proteine eingesetzt. In beiden Verfahren werden pelletierte Zellen mit Lysozym aufgeschlossen, die überexprimierten Proteine als Einschlusskörper pelletiert und anschließend in mehreren Schritten mit detergenzhaltigen Puffern aufgereinigt.

Die Aufreinigung rekombinanter Proteine erfolgte jeweils aus 500 ml Kultur mit einer OD<sub>550</sub> von 0.45-0.65. Bei kleineren Kulturmengen (bis 100 ml) wurden die für die Aufreinigung angegebenen Volumina entsprechend skaliert. Für die Kontrolle des Aufreinigungsverfahrens durch Auftrennung von Proteinfractionen in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Abschnitt 2.5.4) wurden einzelnen Fraktionen Rückstellproben (⇒ RP) von jeweils 25 - 100 µl entnommen, mit dem gleichen Volumen *Fling-Buffer* (Abschnitt 2.5.4) versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

### 3.5.2.1 Isolierung nach PAULSEN et al. (1990)

#### Stammlösungen

<i>EDTA</i> -Stammlösung	200 mM EDTA pH 7.8 (NaOH) in bidest. H <sub>2</sub> O
<i>Lysozym</i> -Stammlösung	1 % w/v Lysozym (SIGMA-ALDRICH, Seelze) in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 % w/v Saccharose, 1 mM EDTA (aus EDTA-Stammlösung)
<i>MgCl<sub>2</sub></i> -Stammlösung	1 M MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O in bidest. H <sub>2</sub> O
<i>MnCl<sub>2</sub></i> -Stammlösung	0.1 M MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O in bidest. H <sub>2</sub> O
<i>DTT</i> -Stammlösung	1 M Dithiothreitol in 0.01 M Na-Acetat pH 5.2
<i>DNaseI</i>	1 mg/ml DNaseI in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM DTT (aus DTT-Stammlösung), 50% v/v Glycerin
<i>Detergenzlösung A</i>	200 mM NaCl, 1 % w/v Deoxycholsäure (als Natriumsalz; SIGMA-ALDRICH, Seelze), 1 % v/v NONIDET 40 (SIGMA-ALDRICH, Seelze) 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA (aus EDTA-Stammlösung)
<i>Detergenzlösung B</i>	0.5 % w/v Triton-X-100, 1 mM EDTA (aus EDTA-Stammlösung)
<i>Suspensionslösung</i>	50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA (aus EDTA-Stammlösung)

Die Zellen aus 500 ml Kultur (OD<sub>550</sub> 0.45-0.65) wurden 3-5 min bei 5000 x g (SS34- oder GSA-Rotor) pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 1.2 ml *Lysispuffer* resuspendiert und dann mit *Lysispuffer* auf ein Volumen von 4 ml gebracht (⇒ RP). Nach Zugabe von 1 ml *Lysozym-Stammlösung* wurden die Ansätze gut durchmischt und 30 min bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden dabei gelegentlich geschwenkt. Nach Zugabe von *MgCl<sub>2</sub>*-, *MnCl<sub>2</sub>*- sowie *DnaseI*-Stammlösung (jeweils 50 µl) wurde wieder gut durchmischt und nochmals 30 min bei RT inkubiert. Nun wurden 10 ml *Detergenzlösung A* (mit 30 mM EK DTT aus *DTT*-Stammlösung) zugesetzt, gut durchmischt und ca. 2-3 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml *Detergenzlösung B* (mit 20 mM EK DTT aus *DTT*-Stammlösung) wurde gut durchmischt und 10 min bei 10<sup>4</sup> x g (SS34-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen (⇒ RP) und verworfen.

Die pelletierten Einschlusskörper wurden in 4 ml *Detergenzlösung B* (mit 20 mM EK DTT aus *DTT*-Stammlösung) resuspendiert (⇒ RP), 1-2 min bei RT inkubiert und dann erneut 10 min bei 10<sup>4</sup> x g (SS34-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen (⇒ RP) und verworfen. Dieser Schritt wurde 2-4 mal wiederholt, bis das gewonnene Proteinpellet annähernd weiß war und sich gut resuspendieren ließ. Die gewaschenen Einschlusskörper wurden in 500 µl *Suspensionslösung* (mit 20 mM EK DTT aus *DTT*-Stammlösung) resuspendiert (⇒ RP) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Von J. Rupprecht (Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz) wurde rekombinantes *rLhca4* aus Tomate (*L. esculentum*) zur Verfügung gestellt, das in gleicher Weise isoliert und aufgereinigt wurde.

### 3.5.2.2 Isolierung mit B-PER™

Mit dem *B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent* (PIERCE, Rockford, USA) können sowohl lösliche als auch unlösliche bakterielle Proteinfractionen (insbesondere rekombinante Proteine) mit einem milden (nichtionischen) Detergenz in einem Tris-Puffer-System (20 mM Tris-HCl pH 7.5) isoliert und gleichzeitig aufgereinigt werden. Die Isolierung erfolgte aus Kulturvolumina von 1-2 ml (*Miniscale*) bzw. 5-50 ml (*Midiscale*) nach den Angaben des Herstellers. Isolierte Einschlusskörper wurden in *Suspensionspuffer* (Abschnitt 2.5.2.1) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.5.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteingehalte [mg/ml] isolierter Zellextrakte erfolgte photometrisch (SHIMADZU UV-160; SHIMADZU, Kyoto, Japan) nach NEUHOFF (1979) oder BRADFORD (1976) gegen Eichreihen (0, 1, 2, 4, 10 und 20 x 10<sup>-3</sup> mg/ml) mit Verdünnungstufen eines Rinderserumalbumin-Standards (10 mg/ml; ACROS, Geel, Belgien) in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 20 mM DTT. Da beide Assays durch Detergenzien wie Triton-X-100 oder SDS z.T. bereits in niedrigen Konzentrationen beeinflusst werden (BRADFORD 1976; NEUHOFF et al. 1979), entsprach die Detergenz-Konzentration in den für die Eichreihen sowie Blindproben verwendeten Puffern den Konzentrationen in den zu bestimmenden Proteinlösungen. Es wurden Einmalküvetten (*Plastikbrand-Halbmikro* 1.5 ml; BRAND, Wertheim) verwendet. Bei Absorptionen über 1.0 wurden Konzentrationen verdünnter Proteinproben in einer Wiederholung erneut bestimmt. Es wurden jeweils Doppel- oder Dreifachbestimmungen durchgeführt.

#### 3.5.3.1 Neuhoff-Assay

Bei der Proteinbestimmung nach NEUHOFF et al. (1979) wird der bevorzugt an Amino-(Lysin), Guanidino- (Arginin) und Imidazolgruppen (Histidin) basischer Proteine bindende Diazofarbstoff *Amidoschwarz 10 B* eingesetzt. Dieser Protein-Farbkomplex ist 2 h stabil. Angelehnt an NEUHOFF (1981) wurden jeweils 5 µl einer Verdünnungsreihe der zu bestimmenden Proteinprobe auf 1 cm<sup>2</sup> Zelluloseacetatfolie (SARTORIUS, Göttingen) pipettiert. Als Referenz wurden jeweils 5 µl proteinfreier Puffer eingesetzt. Nach Antrocknen der Probe wurde die Zelluloseacetatfolie 5 min in *Färbelösung* (0.5 % w/v *Amidoschwarz 10 B* in 9:1 Methanol:Eisessig) gefärbt und anschließend nach jeweiligem Wechsel der Lösung dreimal für jeweils 5 min in Methanol:Eisessig (9:1) entfärbt. Die Folienstücke wurden in feuchtem Zustand in Eppendorfgefäße (2 ml) gegeben und nach dem Trocknen in je 1 ml DMSO unter gründlichem Schütteln aufgelöst. Aus der gegen die Referenz bestimmten Absorption bei 630 nm wurde die Proteinkonzentration [mg/ml] berechnet. Der lineare Messbereich lag hier zwischen 0.1 und 5 mg/ml.

#### 3.5.3.2 Bradford-Assay

Bei der Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) induziert die Bindung des eingesetzten Farbstoffes *Coomassie Brilliant-Blau* eine Veränderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm („rote Form“) auf die im Assay photometrisch detektierten 595 nm („blaue Form“). Diese Farbreaktion ist innerhalb von 2 min abgeschlossen und ~1 h stabil. Jeweils 500 µl einer Proteinprobe wurden 10 min mit 500 µl *Färbelösung* (0.005 % w/v *Coomassie Brilliant-Blau G/250* in 1% v/v Ethanol, 17.5 % v/v *ortho*-Phosphorsäure)

inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben bei 595 nm gegen den Blindansatz (500 µl Färbelösung + 500 µl des jeweiligen Proteinpuffers) gemessen. Es wurde eine geringfügige Verschiebung der Absorptionsmaxima in den verwendeten Einmalküvetten gegenüber Küvetten aus optischem Glas (von 465 auf 467 nm bzw. von 595 auf 582 nm) beobachtet.

#### 3.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteinextrakte wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach FLING & GREGERSON (1986) und LAEMMLI (1970) mit einem Mini-PROTEAN® II-Gelsystem (BIORAD GmbH, München) in linearen Trenngelen (12 % oder 16 %; 1-2 mm) aufgetrennt.

Trenngele enthielten 0.75 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % w/v SDS und 0.05 % w/v APS. Die Endkonzentration an Acrylamid (12 % oder 16 %) wurde über die jeweils eingesetzte Menge des verwendeten Acrylamid:Bis-Acrylamid(37.5:1)-Monomers (BIORAD GmbH, München) eingestellt. Trenngele wurden bis zum Auspolymerisieren 30-45 min mit bidest H<sub>2</sub>O überschichtet. Anschließend wurden sie mit 5 % w/v Sammelgel (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1 % w/v SDS, 0.1 % w/v APS, 5 % v/v Acrylamid:Bis-Acrylamid 37.5:1) überlagert, wobei je nach Probenvolumen Kämme (1 bzw. 2 mm Stärke) mit 5, 10 oder 15 Taschen eingesetzt wurden. Sämtliche Komponenten für die Gele wurden auf Eis angesetzt, die Polymerisierung wurde dann durch Zugabe von 1:10<sup>3</sup> v/v TEMED gestartet. Fertige Gele wurden für mindestens 12 h (längstens 2 Wochen) bis zur Verwendung bei 6°C gelagert.

Aufzutrennende Proben wurden vor dem Auftragen in *Fling-Buffer* (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 16 % w/v Glycerin, 2.3 % w/v SDS, 5 % v/v β-Mercaptoethanol, 0.02 % w/v Serva Blue G) aufgenommen, 5 min bei 95°C im Wasserbad denaturiert und dann 5-10 min auf Eis gelagert. Von Proben bekannter Proteinkonzentration wurden - soweit möglich - gleiche Mengen an Gesamtprotein aufgetragen. Als Protein-Molekulargewichtsstandard wurden jeweils 2 µl *Rainbow™-Marker* (AMERSHAM LIFE SCIENCE, Buckinghamshire, England) in 8 µl *Fling-Buffer* verwendet.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem Tris/Glycin-Puffer (50 mM Tris, 190 mM Glycin, 0.1 % w/v SDS in bidest. H<sub>2</sub>O; Einstellung des pH-Wertes) bei 150-200 V für 1-2 h. Unmittelbar im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Gele entweder gefärbt (Abschnitt 2.5.5) oder die Proteine für die anschließende Immunodetektion auf Membranen geblottet (Abschnitt 2.5.6).

#### 3.5.5 Färben von Gelen

Aufgetrennte Proteinbanden wurden über eine *Coomassie-* oder *Silberfärbung* angefärbt. Die Färbeschritte erfolgten unter leichtem Schwenken der inkubierten Gele. Gefärbte Gele wurden fotografiert oder direkt mit einer CCD-Kamera (INTAS, Göttingen) unter Verwendung der Software CREAM 4.1 (KEM-EN-TEC A/S, Kopenhagen, Dänemark) eingescannt.

##### 3.5.5.1 Coomassie-Färbung

Die Gele wurden unmittelbar im Anschluß an die Elektrophorese 30-45 min in 7 % v/v Eisessig, 40 % v/v Methanol fixiert, um SDS und Glycin aus dem Gel zu entfernen, und anschließend 3-5 h in 7 % v/v Eisessig (mit 0.025 % w/v Coomassie BrilliantBlau R250) gefärbt.



Dieser Farbstoff bindet bevorzugt an bei saurem pH positiv geladene AS (Glutamin- und Asparaginsäure). Durch Inkubation in 7 % v/v Eisessig wurden die Gele unter mehrmaligem Wechsel der Lösung (Inkubation im ersten Schritt: über Nacht) bis zur optimalen Auflösung der Proteinbanden entfärbt und dann in 20 % v/v Glycerin in bidest. H<sub>2</sub>O (SAMBROCK et al. 1989) gelagert.

### 3.5.5.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1985). Dabei wurden die Gele unmittelbar nach der Elektrophorese in 30 % v/v Ethanol/ 10 % v/v Eisessig über Nacht inkubiert, um Glycin und SDS zu entfernen und gleichzeitig durch eine Entwässerung die Penetration der im *Fixierer* (4.1 % w/v Na-Acetat, 0.2 % w/v Na-Thiosulfat, 30 % v/v Ethanol, 0.5 % v/v Glutaraldehyd) zugegeben reduzierenden Agentien während der anschließenden Inkubation (2-3 h) der Gele zu verbessern. Ein reduzierendes Milieu bewirkt eine Beschleunigung und Intensivierung der späteren Farbentwicklung. Durch wiederholtes Spülen (4 x 20 min) mit bidest. H<sub>2</sub>O wurde anschließend der pH-Wert in den neutralen Bereich angehoben, da die Assoziation von ionischem Silber an die Aminosäuren der Proteine bei niedrigen pH-Werten stark vermindert ist.

Nach Zugabe von *Färbelösung* (0.1 % w/v AgNO<sub>3</sub>, 0,01 % w/v Formaldehyd in bidest. H<sub>2</sub>O) wurden die Gele 1 h im Dunkeln inkubiert. Bei diesem Schritt wird ionisches Ag<sup>+</sup> in der Nähe basischer (Lysin), saurer (Asparagin- und Glutaminsäure) bzw. schwefelhaltiger Aminosäuren (Cystein und Methionin) zu metallischem Silber reduziert und bildet so die sog. „Silberkeime“, an denen in der späteren Entwicklung die weitere Reduktion bevorzugt abläuft. Der Aminosäure Lysin kommt bei dieser Initiation möglicherweise besondere Bedeutung zu, da sie zusätzlich Glutaraldehyd bindet, welches seinerseits wieder bevorzugt mit Silberionen interagieren soll (HEUKESHOVEN & DERNICK 1985).

Nach Waschen der Gele (3 x 1 min in bidest. H<sub>2</sub>O) wurde der pH-Wert durch Zugabe von *Entwicklerlösung* (2.5 % w/v Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.01 % v/v Formaldehyd in bidest. H<sub>2</sub>O) stark erhöht und damit eine Reduktion von Ag<sup>+</sup> zu metallischem Silber (bevorzugt in der Nähe der Silberkeime) gestartet. Die Entwicklung wurde durch Absenkung des pH-Wertes bei Zugabe von 1 % v/v Essigsäure gestoppt, sobald eine optimale Auflösung der Banden erreicht war. Die Gele wurden dann abgedunkelt in 1 % v/v Essigsäure gelagert.

## 3.5.6 Immunodetektion

### 3.5.6.1 Blotting

Für die spezifische Detektion einzelner Proteine wurden die aufgetrennten Proteinbanden im Anschluß an die Elektrophorese (Abschnitt 2.5.4) auf Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membranen (*Immobilon-P*, MILLIPORE, Sydney, Australien) transferiert. Hierzu wurden die Membranen 1 min in 100 % v/v Methanol benetzt und dann zusammen mit den Gelen 5 min in *Transferpuffer* (25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM Glycin) inkubiert. Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte mit einem Mini-TransBlot-System (BIORAD, München) in *Transferpuffer* für 3 h bei 50 V bzw. über Nacht bei 30 V jeweils abgedunkelt auf Eis. Anschließend wurden die Membranen getrocknet und bis zur weiteren Verwendung lichtgeschützt zwischen *Kimwipes* (KIMBERLY-CLARK, Roswell, USA) bei RT gelagert.

### 3.5.6.2 Antikörperdetektion

Zur Detektion der nativen bzw. überexprimierten rekombinanten Proteine wurden spezifische polyklonale Antikörper (AK) gegen Lhca1 (KRÓL et al. 1995) und Lhca4 (SA6291 und SA6292; vergl. Abschnitt 2.5.6.3) aus Gerste verwendet. Das eingesetzte System basiert auf einer sekundären Detektion der primären spezifischen AK mit einem *Alkalische Phosphatase*-konjugierten sekundären Anti-Kaninchen AK (D306; DAKO IMMUNOCHEMICALS, Kopenhagen, Dänemark).

Nach kurzer Inkubation (~1 min) der Membranen in 100 % v/v Methanol wurden diese 1 h in 5 % w/v *Skummet Mælk Powder* (SMP) in PBS-Puffer (*phosphate buffered saline*<sup>26</sup>) bei 37°C abgesättigt, um unspezifische Wechselwirkungen der Transfermembran mit primärem oder sekundärem AK zu unterdrücken. Anschließend wurde 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Nach Inkubation der Membranen für 2 h mit primärem AK (*anti-Lhca1* bzw. *anti-Lhca4*) in 10 ml 5 % w/v SMP in PBS wurden nicht spezifisch gebundener AK durch mehrmaliges (3 x 10 min) Waschen in PBS entfernt. Die Membranen wurden dann 2 h in 5 % w/v SMP in PBS mit 1:10<sup>3</sup> v/v sekundärem AK inkubiert und anschließend 3 x 10 min in PBS gewaschen. Nach Inkubation in phosphatfreiem Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5) wurden die Membranen 5 min in *Phosphatpuffer* (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl) äquilibriert und dann in *Phosphatpuffer* mit 1:150 v/v *NBT*-Stammlösung (0.5 % w/v NBT in 70% v/v DMF) aufgenommen. Durch Zugabe von 1:300 v/v *BCIP*-Stammlösung (0.5 % w/v BCIP in 100 % v/v DMF) wurde die Farbreaktion<sup>27</sup> gestartet und bei ausreichender Bandenintensität (nach ~2-10 min) durch Abgießen der Färbelösung und mehrmaliges Waschen (2 x 20 min) mit bidest. H<sub>2</sub>O beendet. Getrocknete Membranen wurden entweder direkt oder nach dem Fotografieren mit einem *ScanMagic 1200 CU* Flachbettscanner (MUSTEK, Neuss) unter Verwendung von Software des Herstellers eingescannt.

### 3.5.6.3 Antikörper gegen Lhca4

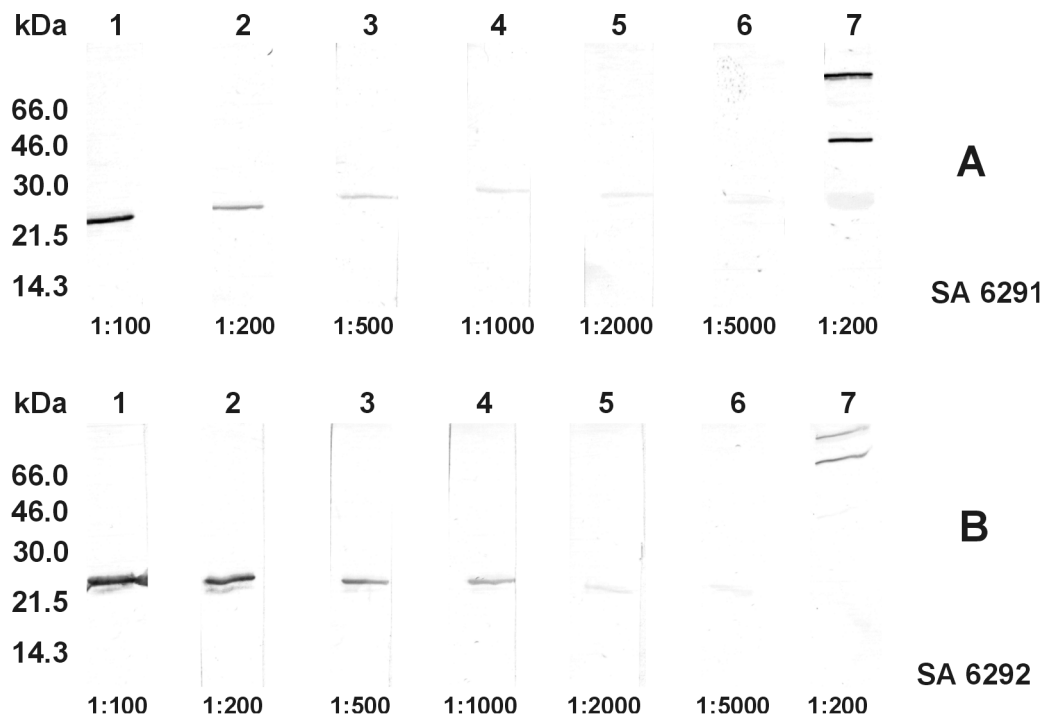
Für die spezifische Detektion von Lhca4 und rLhca4 aus Gerste wurden zwei polyklonale Antikörper (SA6291 und SA6292) bei EUROAGENTEC (Seraing, Belgien) gegen 12 Aminosäuren des N-Terminus (AKGSWLPGLQSP) von Lhca4 hergestellt. Prä-Immunsereen sowie Seren der 1. und 2. Charge wurden auf ihre spezifische Reaktion gegen Thylakoid- bzw. PSI-Präparationen aus Gerste (vergl. Abschnitt 2.6.1) sowie Proteinisolierungen aus transgenen *E. coli* (JM101) mit rLhca4 aus Tomate getestet. Hierzu wurden die Präparationen in einer SDS-PAGE entsprechend Abschnitt 2.5.4 aufgetrennt und nach Abschnitt 2.5.6.1 geblottet. Die Immunodetektion erfolgte nach Abschnitt 2.5.6.2, wobei der primäre AK (SA6291 oder SA6292) in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt wurde.

Mit beiden AK konnte natives Lhca4 in Thylakoid- (Abb. 3-14 Spur 1-3) sowie PSI-Präparationen aus Gerste (Abb. 3-13 **A** und **B**, Spur 1-6 sowie Abb. 3-14, Spur 4-6) spezifisch detektiert werden. Dagegen wurde rLhca4 aus Tomate auch bei Erhöhung der aufgetrennten Proteinmengen entweder nicht (Abb. 3-14 sowie Abb. 3-13 **B**, jeweils Spur 7) oder nur sehr schwach (Abb. 3-13 **A**, Spur 7) detektiert. Dieses läßt vermuten, daß die

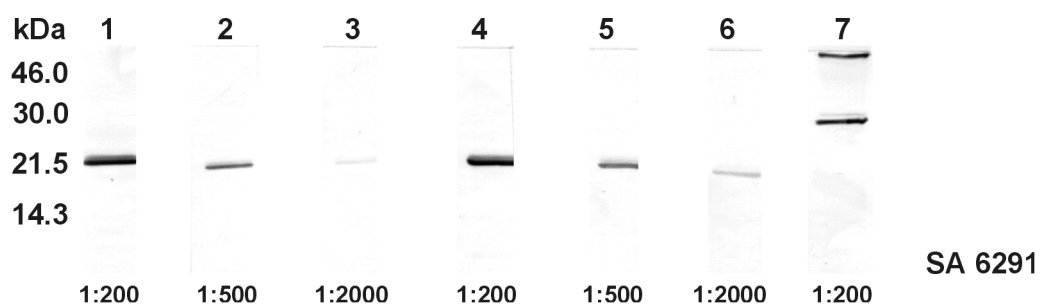
<sup>26</sup> Hierzu werden 700 ml *Stammlösung A* (1.78 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 16.4 g NaCl ad. 2000 ml mit bidest. H<sub>2</sub>O) mit 250 ml *Stammlösung B* (1.56 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 8.2 g NaCl) versetzt, der pH-Wert beträgt dann ~7.2.

<sup>27</sup> Unter Abspaltung eines BCP-Phosphatrestes wird das schwach gelbliche NBT reduktiv zum stark violett/blauen Formazan umgesetzt.

zusätzlichen Aminosäuren am N-terminalen Ende von *rLhca4* die spezifische Erkennung durch den Antikörper möglicherweise behindern. Allerdings liegen die Proteine im eingesetzten Gel/Blotsystem unter den gewählten Bedingungen denaturiert, d.h. aufgefaltet vor, so daß eventuelle Behinderungen durch die Tertiärstruktur nicht auftreten sollten. Darüber hinaus unterscheiden sich die Sequenzen von *Lhca4* aus Gerste und Tomate in 3 der 12 für die Immunisierung verwendeten N-terminalen Aminosäuren. Beide Antikörper wurden für die Immunodetektion von *rLhca4* bzw. *Lhca4* jeweils als 1:200 v/v Verdünnung in 5 % v/v SMP in PBS (s. Abschnitt 2.5.6.2) eingesetzt.



**Abb. 3-13** Detektion von *Lhca4* mit *anti-Lhca4*-AK (**A**: SA6291, **B**: SA6292; Seren der 1. Charge) in PSI-Präparationen aus Gerste (Spur 1-6, je 5 µg Gesamtprotein) sowie *rLhca4* (Spur 7, 2 µg Gesamtprotein) in Extrakten aus transgenen *E. coli* JM101 (mit *rLhca4* aus Tomate) nach Auftrennung in SDS-PAGE (linear, 16 %) und Blot auf *Immobilon P*-Membran; angegeben sind jeweils die eingesetzten Verdünnungen (1:100 bis 1:5000 v/v) des primären AK in 10 ml 5 % v/v SMP in PBS; Färbezeit ca. 12 min (weitere Erläuterungen s. Text).



**Abb. 3-14** Detektion von *Lhca4* mit *anti-Lhca4*-AK (SA6291, Serum der 2. Charge) in Thylakoid- (Spur 1-3, je 4 µg Gesamtprotein) und PSI-200-Präparationen aus Gerste (Spur 4-6, je 8.4 µg Gesamtprotein) sowie *rLhca4* (Spur 7, 5 µg Gesamtprotein) in Extrakten aus transgenen *E. coli* JM101 (mit *rLhca4* aus Tomate) nach Auftrennung in SDS-PAGE (linear, 16 %) und Blot auf *Immobilon P*-Membran; angegeben sind jeweils die eingesetzten Verdünnungen (1:100 bis 1:2000 v/v) des primären AK in 10 ml 5 % v/v SMP in PBS; Färbezeit ca. 4 min (weitere Erläuterungen s. Text).

### 3.6 Präparation von Pigment/Protein-Komplexen und Pigmentextrakten

Für die Präparation von PSI-Komplexen und Pigmentextrakten wurden Gerstenpflanzen (*H. vulgare*, WT) wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben angezogen. Bei der Isolierung von Chloroplasten und Thylakoidmembranen wurden GSA- oder SS34-Rotoren (Sorvall RC5B, DUPONT INSTRUMENTS, Newtown, USA) verwendet. Sämtliche Isolierungsschritte erfolgten abgedunkelt unter Verwendung vorgekühlter Puffer, Gefäße und Rotoren bei 4°C. Die Bestimmung von Chlorophyllkonzentrationen erfolgte nach Abschnitt 2.7.3.1.

Gerstenblätter wurden nach Homogenisierung in 50 mM Tricin-NaOH pH 7.8, 0.4 M Sorbitol durch *Miracloth*-Filtergewebe (CALBIOCHEM, La Jolla, USA) filtriert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 x *g* (GSA-Rotor) wurden Chloroplasten pelletiert und anschließend durch Aufnahme in 5 mM EDTA-NaOH pH 7.8 mit 50 mM Sorbitol aufgebrochen. Die so freigesetzten Thylakoidmembranen wurden 10 min bei 10<sup>4</sup> x *g* (GSA-Rotor) pelletiert, in 100 mM Sorbitol aufgenommen, nochmals 10 min bei 10<sup>4</sup> x *g* (GSA-Rotor) zentrifugiert und nach Bestimmung des Chlorophyllgehaltes mit einem durchschnittlichen Chl *a/b* Verhältnis von 4.07 ± 0.03 (n = 11) entweder sofort für die Solubilisierung von PSI-Komplexen bzw. Isolierung von Pigmentextrakten verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 3.6.1 Isolierung von PSI-Komplexen

Die Isolierung von PSI-Komplexen erfolgte durch Solubilisierung von Thylakoidmembranen mit dem nichtionischen Detergenz Triton-X-100 und anschließende Ultrazentrifugation im Saccharosegradienten nach MULLET et al. (1980). Während der Zentrifugation diffundiert mit den solubilisierten Komplexen assoziiertes Detergenz in den Saccharosegradienten mit geringerer Detergenzkonzentration, dabei bilden die PSI-Komplexe miteinander höhermolekulare Aggregate, die dann pelletiert werden können.

Für die Auftrennung im Saccharosegradienten wurden jeweils 31 ml *Gradientenpuffer* (0.4 M Saccharose, 0.02 % w/v Triton-X-100) in *UltraClear* Zentrifugen-Röhrchen (BECKMAN, INSTRUMENTS LTD, Palo Alto, USA) bei -20°C eingefroren und 5-6 h vor der Verwendung bei +4°C langsam aufgetaut. Aufgetaute Gradienten wurden mit 3 ml 2 M Saccharose (mit 0.02 % w/v Triton-X-100) unterschichtet.

Isolierte Thylakoidmembranen wurden mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 0.8 mg/ml Gesamtchlorophyll eingestellt. Mit 20 % w/v Triton-X-100 wurde dann in verschiedenen Ansätzen eine Detergenz-Endkonzentration von 0.6 %, 0.65 % sowie 0.7 % (jeweils w/v) eingestellt und die Ansätze 30 min abgedunkelt bei RT unter leichtem Rühren inkubiert. Nicht solubilisierbare Membranfragmente wurden 30 min bei RT mit 4.2 x 10<sup>4</sup> x *g* (SS34-Rotor) pelletiert. Aliquots der Überstände (~5-8 ml) wurden dann auf die vorbereiteten Gradienten geschichtet und die Gradienten zusammen mit den auf 4°C vorgekühlten Buckets auf ± 0.1 g austariert. Nach 16 h Zentrifugation bei 10<sup>5</sup> x *g* (SW27- oder SW40-Rotor, L5-65 Ultrazentrifuge; BECKMANN INSTRUMENTS, München) wurden die Gradienten fotografiert und aggregierte PSI-Komplexe mit einer Kanüle abgezogen.

Die abgezogenen Pigment/Protein-Komplexe wurden über Nacht in Dialyse-Schläuchen (BIOMOL, Hamburg; Ausschlußgröße 12-16 kDa bei 25 Å Porengröße) gegen 20 mM Tricin-NaOH pH 7.5 dialysiert und dann durch Zentrifugation bei 5000 x *g* (SS34-Rotor) in

*Centricons* (YM 10, 10 kDa Ausschlußgröße; MILLIPORE, Bedford, USA) aufkonzentriert. So isolierte PSI-Komplexe wurden nach Bestimmung der Chlorophyllkonzentration mit einem durchschnittlichen<sup>28</sup> molaren Chl *a/b* Verhältnis von  $6.93 \pm 0.54$  ( $n = 9$ ) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.6.2 Herstellung von Pigmentextrakten

Frisch isolierte pelletierte Thylakoidmembranen wurden im Verhältnis 1:5 v/v in 20 mM Tricin-NaOH (pH 7.8) aufgenommen und dann im Verhältnis 1:4 v/v mit 100 % v/v Aceton versetzt. Die Ansätze wurden gut durchmischt und 30 min in einem geschlossenen Gefäß bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Dieser Acetonextrakt wurde dann 10 min bei  $10^4 \times g$  (SS34-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen Scheidetrichter überführt, mit dem doppelten Volumen 10 % w/v KCl versetzt und vorsichtig geschwenkt. Durch Zugabe des gleichen Volumens Diethylether wurden die Pigmente in die Etherphase überführt. Dies wurde ggf. durch Zugabe geringer Mengen von kristallinem NaCl unterstützt. Nach Trennung der Wasser/Aceton-Phase von der Etherphase wurde die wässrige Phase abgelassen und die Etherphase mehrmals (2-3 mal) mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  gespült, um Aceton- und KCl-Reste zu entfernen.

Die Etherphase wurde dann mit  $\text{N}_2$  zu ~95 % im Volumen reduziert und nach vollständigem Ablassen der abgesetzten wässrigen Phase in ein konisches Reagenzglas überführt. Hier wurde der Extrakt dann bis zur Trockne mit  $\text{N}_2$  eingedampft und in einem kleinem Volumen (1-2 ml) 100 % v/v Aceton aufgenommen. Nach Bestimmung der Chlorophyllkonzentration wurden die für die Rekonstitutions-Assays benötigten Mengen (30  $\mu\text{g}$  bzw. 200  $\mu\text{g}$  Gesamtchlorophyll entsprechend Abschnitt 2.7.1 bzw. Abschnitt 2.7.2) in Eppendorfgefäße (1.5 ml) aliquotiert, und dort mit  $\text{N}_2$  bis zur Trockne eingedampft. Nach Überschichten mit  $\text{N}_2$  wurden die Pigmentextrakte mit einem durchschnittlichen molaren Chl *a/b*-Verhältnis von  $3.93 \pm 0.15$  ( $n = 7$ ) bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

In gleicher Weise isolierte Gesamtpigmentextrakte (Chl *a/b* =  $3.29 \pm 0.01$ ) aus Blättern von Tomate (*Lycopersicon esculentum*) wurden durch V. Schmid (Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz) zur Verfügung gestellt.

---

<sup>28</sup> Gemittelt über sämtliche Präparationen ohne Berücksichtigung der eingesetzten Triton-X-100 Konzentration. Da je nach Menge des bei der Solubilisierung eingesetzten Detergenz unterschiedliche Anteile assoziierter LHCI-*Antennen* von den PSI-Komplexen abdissoziieren (vergl. Abschnitt 2.4), variieren die Chl *a/b*-Verhältnisse für die jeweils erhaltenen PSI-Komplexe von ~5.5 (bei 0.6 % w/v Triton-X-100), ~6-7 (bei 0.65% w/v Triton) bis zu 8-9 (bei 0.7 % w/v Triton-X-100).

### 3.7 Rekonstitution

Durch eine *in vitro* Assemblierung von zuvor separierten Pigmentextrakten und Lhcb-Proteinen aus Thylakoidmembranen von *Spinacia* konnten PLUMLEY & SCHMID (1987) erstmals LHCI-Komplexe rekonstituieren (vergl. Abschnitt 1.3.4). Mit Lithium-Dodecylsulfat (LiDS) solubilisierete Proteine wurden hierbei in Gegenwart von DTT, Benzamidin (BAM) und  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure ( $\epsilon$ -ACS) durch Erhitzen auf 100°C voll denaturiert und nach Zugabe von in Diethylether/Ethanol gelösten Pigmentextrakten einer Reihe (2-3) alternierender Gefrier/Auftau-Zyklen (6-12 h bei -20°C / 15 min bei +20°C) unterworfen (*freeze-thaw method*). In der Auftrennung der Rekonstitutionsansätze konnten dann in einer LiDS-PAGE stabile LHCI-Komplexe aufgetrennt werden, deren spektroskopische Eigenschaften denen nativer Komplexe entsprachen. Mit dieser Methode konnten sowohl native (CAMMARATA et al. 1992) als auch rekombinante Lichtsammelproteine nach Überexpression in *E. coli* erfolgreich rekonstituiert werden (PAULSEN et al. 1990; CAMMARATA & SCHMIDT 1992).

In einem alternativen Ansatz (PAULSEN et al. 1993; SCHMID et al. 1997) wurde die Reihe alternierender Gefrier/Auftau-Zyklen durch ein Protokoll ersetzt, bei dem das für die Solubilisierung der Proteine verwendete LiDS nach Zugabe der Pigmente sowie eines zweiten Detergenz (Octylglykosid, OG) mit KCl präzipitiert wird. Die Interaktion der Pigmente mit dem Protein wird hier während des Austausches des löslichkeitsvermittelnden LiDS durch OG ermöglicht (*detergent-exchange method*). Dieses Verfahren wurde entsprechend der Beschreibung von SCHMID et al. (1997) auch in dieser Arbeit verwendet.

Rekonstituierte Komplexe wurden anschließend entweder in einer nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (ND-PAGE) oder durch Ultrazentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Sämtliche Arbeiten mit Pigmentextrakten oder rekonstituierten Komplexen erfolgten abgedunkelt. Zentrifugationen wurden mit einem AM100.13-Rotor (JOUAN MR 22i, JOUAN GmbH, Unterhaching, Deutschland) oder mit Minifugen (*Biofuge B*, *Biofuge 15*; HAEREUS SEPATECH, Osterode) durchgeführt.

#### 3.7.1 Rekonstitution und Auftrennung in der ND-PAGE

25  $\mu$ g (für Monomer-Rekonstitution) oder je 12.5  $\mu$ g (für Dimer-Rekonstitution) aufgereinigtes rekombinantes Protein (Abschnitt 2.5.2.1) wurden mit bidest. H<sub>2</sub>O in 16  $\mu$ l Endvolumen aufgenommen. Nach Zugabe des gleichen Volumens *Rekonstitutionspuffer* (200 mM Tris, 4 % w/v LDS, 100 mM DTT, 2 mM BAM, 10 mM  $\epsilon$ -ACS) mit 25 % w/v Saccharose wurden 3.7  $\mu$ l 20 % w/v OG zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde gut durchgemischt. Die so vorbereiteten Proteine wurden dann 1 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert, und nach Zugabe von 1.2  $\mu$ l 1 M DTT bis zu ihrer Zugabe zu den Pigmenten auf Eis gelagert.

Aliquotierte Pigmentextrakte (30  $\mu$ g Gesamtchlorophyll, vergl. Abschnitt 2.6.2) wurden in 1.2  $\mu$ l 100 % v/v Ethanol vollständig aufgelöst, gut durchgemischt und kurz abzentrifugiert (10 s, 2.1 x 10<sup>4</sup> x g). Den so präparierten Pigmenten wurde dann die auf Eis inkubierte Proteinsuspension unter kräftigem Durchmischen zupipettiert. Die Ansätze wurden anschließend 15-20 s kräftig durchgemischt, 1 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert und dann auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 6.8  $\mu$ l 1 M KCl wurden die Ansätze nochmals gut durchgemischt und dann 20 min bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Präzipitiertes Kaliumdodecylsulfat wurde dann durch 5 min Zentrifugation bei 1.58 x 10<sup>4</sup> x g und 4°C pelletiert

(AM100.13-Rotor). Die Überstände (~40 µl) wurden in ein neues Gefäß überpipettiert und bis zur anschließenden Auftrennung in der ND-PAGE auf Eis gelagert.

Zur Auftrennung rekonstituierter Komplexe wurden nicht-denaturierende Polyacrylamidgele nach KNOETZEL & SIMPSON (1991) von 1 mm Stärke vorbereitet (Mini-PROTEAN®II; BIORAD GmbH, München, Deutschland). Hierzu wurden Trenngele mit 12.5 % Acrylamid:Bisacrylamid (37.5:1; BIORAD GmbH, München, Deutschland), 0.42 M Tris-HCl pH 8.8, 0.05 % w/v APS, 13 % v/v Glycerin und 0.06 % v/v TEMED gegossen. Die Gele wurden zum Auspolymerisieren mit bidest. H<sub>2</sub>O überschichtet und so bis zur Verwendung maximal 24 h bei +6°C gelagert. Die Trenngele wurden 3-4 h vor der Verwendung mit 4 % Sammelgelen (4% v/v Acrylamid:Bisacrylamid 37.5:1 in 0.25 M Tris-HCl pH 8.45, 0.08 % w/v APS, 13 % v/v Glycerin und 0.08 % v/v TEMED) überschichtet und bis zum Auftragen der Proben in Laufpuffer (5 mM Tris, 490 mM Glycin, 10 % w/v SDS in bidest. H<sub>2</sub>O) gelagert.

Von den Überständen (~40 µl) aus der Rekonstitution wurden jeweils ~15-25 µl auf das vorbereitete Gel aufgetragen und anschließend ca. 2 -2.5 h bei 4 mA (~50 V) abgedunkelt auf Eis aufgetrennt. Sobald sich die Monomer- bzw. Dimerbanden deutlich von den freien Chlorophyllen abgesetzt hatten, wurde die Elektrophorese beendet und die Gele fotografiert.

### 3.7.2 Rekonstitution und Auftrennung im Saccharose-Dichtegradienten

167 µg (für Monomer-Rekonstitution) oder je 83.5 µg (für Dimer-Rekonstitution) aufgereinigtes rekombinantes Protein (Abschnitt 2.5.2.1) wurden mit bidest. H<sub>2</sub>O in 80 µl Endvolumen aufgenommen. Nach Zugabe des gleichen Volumens *Rekonstitutionspuffer* (s.o.) wurden 18.5 µl 10 % w/v OG hinzugefügt. Nach jeder Zugabe wurde gut durchmischt. Die so vorbereiteten Proteine wurden dann 1 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert, und die Ansätze bis zur Zugabe zu den Pigmenten auf Eis gelagert.

Aliquotierte Pigmentextrakte (200 µg Gesamtchlorophyll, vergl. Abschnitt 2.6.2) wurden in 6 µl 100 % v/v Ethanol vollständig aufgelöst, gut durchmischt und kurz abzentrifugiert (10-20 s, 2.1 x 10<sup>4</sup> x g). Den so präparierten Pigmenten wurde dann die auf Eis inkubierte Proteinsuspension unter kräftigem Durchmischen zupipettiert. Die Ansätze wurden anschließend 15-20 s kräftig durchmischt, 1 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert und auf Eis gelagert. Die Ansätze wurden nach Zugabe von 28.8 µl 1 M KCl gut durchmischt und dann 20 min bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Präzipitiertes Kaliumdodecylsulfat wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 1.58 x 10<sup>4</sup> x g und 4°C pelletiert (AM100.13-Rotor). Die Überstände (~200 µl) wurden in ein neues Gefäß überpipettiert und abgedunkelt auf Eis gelagert.

Für die Auftrennung im Saccharosegradienten wurden jeweils 11 ml Gradientenlösung (0.4 M Saccharose, 5 mM Tricin-NaOH pH 7.8, 0.08 % w/v Dodecylmaltosid) in *UltraClear* Zentrifugen-Röhrchen (BECKMAN INSTRUMENTS LTD, PLO Alt, USA) bei -20°C eingefroren und 5 h vor Gebrauch bei +6°C langsam aufgetaut. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Gradienten im Kühlraum (4°C) auf +/- 0.1 g austariert. Von den ~200 µl Überstand aus der Rekonstitution wurden jeweils ~150 µl auf die vorbereiteten Gradienten geschichtet. Diese wurden nach dem Beladen der vorgekühlten Rotorbuckets zusammen nochmals auf +/-0.1 g austariert. Nach Auftrennung für 16-22 h bei 10<sup>5</sup> x g (SW27-Rotor, L5-65 Ultrazentrifuge; BECKMANN INSTRUMENTS, München) bei 4°C wurden pigmenthaltige Banden fotografiert, abgezogen und bis zur weiteren Verwendung bei 6°C im Dunkeln gelagert.

### 3.7.3 Untersuchung von Pigment/Proteinkomplexen

#### 3.7.3.1 Chlorophyllkonzentrationen

Für die Bestimmung der Chlorophyllkonzentrationen wurden Aliquots (1-10 µl) in 80 % v/v Aceton aufgenommen und 1 min kräftig durchmischt. Ausgefällte Proteine wurden dann 5 min bei  $2.1 \times 10^4 \times g$  pelletiert. Die Absorption der Pigmente im Überstand wurde photometrisch (SHIMADZU UV-160; SHIMADZU, Kyoto, Japan) gegen 80 % v/v Aceton bei 646.6 nm und 663.6 nm bestimmt. Es wurden Doppel- und Dreifachbestimmungen durchgeführt. Aus den Absorptionen wurden die Konzentrationen [µg/ml] an Chl *a* und Chl *b* unter Verwendung der Koeffizienten nach PORRA et al. (1989) wie folgt berechnet:

$$\text{Chlorophyll } a \quad [\mu\text{g/ml}] \quad 12.25 \times E_{663.6} - 2.55 \times E_{646.6}$$

$$\text{Chlorophyll } b \quad [\mu\text{g/ml}] \quad 20.31 \times E_{646.6} - 4.91 \times E_{663.6}$$

$$\text{Gesamtchlorophyll} \quad [\mu\text{g/ml}] \quad 17.76 \times E_{646.6} + 7.34 \times E_{663.6}$$

Für den Vergleich der molaren Chl *a/b*-Verhältnisse wurden die ermittelten Absorptionen unter Verwendung der Koeffizienten nach PORRA et al. (1989) in molare Konzentrationen [nM/ml] wie folgt umgerechnet:

$$\text{Chlorophyll } a \quad [\text{nM/ml}] \quad 13.71 \times E_{663.6} - 2.85 \times E_{646.6}$$

$$\text{Chlorophyll } b \quad [\text{nM/ml}] \quad 22.39 \times E_{646.6} - 5.42 \times E_{663.6}$$

#### 3.7.3.2 Tieftemperatur-Fluoreszenzspektroskopie

Für die Aufnahme von Fluoreszenzspektren bei 77 K wurden isolierte rekonstituierte Komplexe (Abschnitt 2.7.2) mit einem Gesamtchlorophyllgehalt von 1.8 µg in 200 µl *Gradienten-Puffer* (0.4 M Saccharose, 5 mM Tricin-NaOH pH 7.8, 0.08 % w/v Dodecylmaltosid) aufgenommen. Nach Zugabe von 400 µl *Glycerin-Puffer* (75 % v/v Glycerin, 5 mM Tricin-NaOH pH 7.8, 0.025 % w/v Dodecylmaltosid) wurden die so vorbereiteten Proben abgedunkelt auf Eis gelagert und unmittelbar vor der Messung in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren.

Die Aufnahme von Fluoreszenzspektren erfolgte mit einem F-4500 Spektralfluorimeter (HITACHI, Tokio, Japan) nach Anregung bei 440 nm (spezifische Anregung von Chl *a*) sowie 470 nm (spezifische Anregung von Chl *b*). Aus jeweils 10 Messungen der Fluoreszenz-emission (Spaltbreite für Anregung und Emission: 5 nm; Scangeschwindigkeit 30.000 nm/min) zwischen 600-800 nm wurde ein gemitteltes, quantenkorrigiertes Spektrum bestimmt, das unter Verwendung der Gerätesoftware geglättet und im ASCII-Format zur weiteren Bearbeitung in Excel (MICROSOFT Corp.) importiert wurde. Die nach Anregung mit 440 nm erhaltenen Spektren wurden auf eine maximale Fluoreszenz von  $9 \times 10^3$  relativen Einheiten normiert. Die korrespondierenden Spektren (nach Anregung mit 470 nm) wurden anschließend jeweils mit dem gleichen Korrekturfaktor normiert, so daß die relativen Unterschiede zum ermittelten Spektrum nach Anregung bei 440 nm nicht verändert wurden. Auf diese Weise bearbeitete Spektren wurden mit SigmaPlot (SPSS Inc.) grafisch dargestellt.



## 4 Ergebnisse

Aus der Sequenzierung von PCR-Produkten des mRNA- und cDNA-Screenings konnten *consensus*-Sequenzen für die Gerstenproteine Lhca1 und Lhca4 einschließlich ihrer Transitpeptide ermittelt werden, die mit bereits publizierten Sequenzen verglichen wurden (Abschnitt 4.1). Die kodierenden Sequenzen für die reifen Proteine wurden in Expressionsvektoren kloniert (Abschnitt 4.2). Während für Lhca1 eine deutliche Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten Proteins erreicht wurde, konnten die Expression in den Lhca4-Klonen nicht induziert werden (Abschnitt 4.3). Daher stand für die anschließende Rekonstitution (Abschnitt 4.4) lediglich rekombinantes *rLhca1* aus Gerste zur Verfügung, aus dem mit Pigmentextrakten aus Gerste und Tomate stabile Monomere rekonstituiert werden konnten. Darüber hinaus konnten mit rekombinantem *rLhca4* aus Tomate „heterologe“ Dimere des LHCI-730 rekonstituiert werden, die ebenso wie die Monomere durch Bestimmung von Chl *a/b*-Verhältnissen und Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektren charakterisiert wurden.

### 4.1 Isolierung der kodierenden Sequenzen für Lhca1 und Lhca4

#### 4.1.1 Lhca1 mit vollständigem Transitpeptid

Durch PCR-Screening einer cDNA-Bibliothek (*barley-λgt11*) mit Lhca1-spezifischen Primern konnten drei DNA-Fragmente der erwarteten Länge von ~800 bp isoliert und sequenziert werden. Die Sequenzen (99061711, 99061712 und 99072121) wurden sowohl untereinander als auch mit den Daten aus den sequenzierten Expressionsvektoren (Abschnitt 4.2) verglichen. Aus dem Alignment dieser 19 Sequenzen (Anhang A 2) konnte eine kodierende *consensus*-Sequenz von 735 bp ermittelt werden, die als GenBank-Eintrag AF218305 veröffentlicht wurde. Da hierbei keine wiederkehrenden geclusterten Abweichungen beobachtet werden konnten, liegt Lhca1 in Gerste als *single-copy*-Gen vor.

Diese Sequenz kodiert für 201 Aminosäuren des reifen Proteins sowie 44 Aminosäuren des Transitpeptids, das damit erstmals vollständig aufgeklärt werden konnte (Abb. 4-1). Das entspricht den durchschnittlichen Längen für die reifen Proteine ( $199.43 \pm 1.59$  AS) bzw. Transitpeptide ( $44.00 \pm 1.31$  AS) verfügbarer Lhca1-Sequenzen aus angiospermen Pflanzen (vergl. Tabelle 5-2 sowie Anhang A 4).

#### 4.1.2 Lhca4 mit unvollständigem Transitpeptid

Durch PCR-Screening einer cDNA-Bibliothek (*barley-λgt11*) mit Lhca4-spezifischen Primern konnten 4 Sequenzen (00020331, 00031102, 00031103 und 00032622) von isolierten ~800bp-Fragmenten ausgewertet werden. Über ein Alignment (Anhang A 3) mit den aus der Sequenzierung der Expressionsvektoren gewonnenen Sequenzen (Abschnitt 4.2) wurde eine *consensus*-Sequenz von 684 bp ermittelt, die als GenBank-Eintrag AF287276 veröffentlicht wurde. Hierbei konnten ebenfalls keine wiederkehrenden geclusterten Abweichungen beobachtet werden. Daher liegt Lhca4 in Gerste (wie Lhca1) als *single-copy*-Gen vor.

Diese Sequenz (Abb. 4-1) kodiert für 201 AS des reifen Proteins sowie für 27 AS des Transitpeptids, das damit nicht vollständig bestimmt werden konnte. Mit 201 AS ist das reife

Protein etwa so lang wie bekannte Lhca4-Proteine anderer angiospermer Pflanzen (200.29 ± 0.70 AS). Auf der Grundlage der verfügbaren Lhca4-Transitpeptidsequenzen angiospermer Pflanzen (vergl. Tabelle 5-2 sowie Anhang A 4) mit einer durchschnittlichen Länge von 49.60 (± 2.87) AS kann vermutet werden, daß zur vollständigen Sequenz des Transitpeptids noch ca. 69 Nukleotide bzw. 23 AS fehlen. Unter der Annahme, daß die Transitpeptidsequenz für Lhca4 in Gerste in der Länge den möglicherweise etwas kürzeren Sequenzen monokotyledoner Pflanzen (z.B. Reis) entspricht, fehlt lediglich ein Abschnitt von ca. 45 Nukleotiden bzw. 15 AS.

### Lhca1

```

atggcgtcgtcaagcgggctcaggagctgcagcgcctggggcgtgccgagcctgctggcgcttccgtcccggctcc
M A S S S G L R S C S A V G V P S L L A P S S R S TP
ggccgctccggactgccgttctgcgcctacgccaccacctccggccgcgtcaccatgtccgacgagtggttcccc
G R S G L P F C A Y A T T S G R V T M S A E W F P
ggccagccccgccccgccatctggacggctcctgccaggggacttccgggttcgacccccctgggctcgccacc
G Q P R P A H L D G S S P G D F G F D P L G L A T
gtgccggagaacttcgagcgggttcaaggagtccgagatctaccactgccgctgggcatgctctgcgtgccaggg
V P E N F E R F F K E S E I Y H C R W A M L C V P G 1
gtgctggtgccggaggcgtggggctgggcaactgggtgaaggcgcaggagtgggcccgcctccagacgggcag
V L V P E A L G L G N W V K A Q E W A A L P D G Q
gcgacgtacctgggcaaccgggtgccgtggggcaacctgccgaccatcctggcgatcgagttcctggccatcgcc
A T Y L G N P V P W G N L P T I L A I E F L A I A 2
ttcggggagcagcagcgcaccatggagaaggacccggagaagaagaagtacccggcgccgcttcgaccgcctc
F A E Q Q R T M E K D P E K K K Y P G G A F D P L
ggcttctccaaggacccccccaagttcgaggagctcaagctcaaggagatcaagaacgggcccggctggcgatgctg
G F S K D P A K F E E L K L K E I K N G R L A M L 3
gcttctgctggggttctgctgacgcagctcggcgtaccggcaccggcccgcctggagaacctggccacgcctcc
A F V G F C V Q Q S A Y P G T G P L E N L A T H L 4
gcggaaccgctggcacaacaacatcggcgacatcgatcctccagaaatctacggccct
A D P W H N N I G D I V I P R N I Y G P

```

### Lhca4

```

[+45-69 Nukleotide]...tcagcgtcgagccccgggttccgtg
[+14-23 Aminosäuren] . S A S S P R F L TP
ggcgactccggccgcgtcgggctcgccaagtcacccgcgcgcagctcgtccaggccaaggggtccgcctggctc
G D S G R V G L A K S T R R D V A V Q A K G S W L
cccggcctccagtcctcctgctacctcgacggcagctcggcgggtgacaatggttttgaccgctggcgctggcg
P G L Q S P A Y L D G S L A G D N G F D P L A L A
gaggacccggaggacctcgggtgggtcgtgcagggcggagctggtgaacgggcccgggtggcgatgctgggggtggcg
E D P E D L R W F V Q A E L V N G R W A M L G V A 1
gggatgctgatccggaggtgctgacccaagggggctgctgaacgcgcccagtggtacgacgcggcaaggag
G M L I P E V L T K A G L L N A P E W Y D A G K E 2
acctaactcgctcctcctccacgctcttctgctcatcgagttcatcctcctccactacgtcgagatccggcgggtgg
T Y F A S S S T L F V I E F I L F H Y V E I R R W
caggacatcaagaacccgggctccgtcaaccaggaccccatctcaagagctacagcctccgccccacgagtgcc
S Y S L P P H E C Q D I K N P G S V N Q D P I F K
ggctaccccgccagcgtcttcaacccccctcaacttcgccccaccctcgagaacaaggagaaggagctcgccaac
G Y P G S V F N P L N F A P T L E N K E K E L A N 3
gggagactggccatgctggcgctcctggggtcctgggtcgagcacaacgtgaccgggaagggcgcttcgagaac
G R L A M L A F L G F L V Q H N V T G K G P F E N 4
ctgcagcagcacctggccgaccatggcacaacacccatcatccagaccatctccggccaa
L Q Q H L A D P W H N T I I Q T I S G Q

```

**Abb. 4-1** Kodierende DNA- und Aminosäuresequenzen für Lhca1 (AF218305) und Lhca4 (AF287276) aus Gerste mit Angabe der Lage der Transitpeptide (TP, unterstrichen) sowie der drei transmembranen Helices (1 bis 3) und der kürzeren Helix 4 auf der Lumenseite der Thylakoidmembran (Lage der Helices nach RUPPRECHT et al. 2000).

## 4.2 Klonierung in Expressionsvektoren

Nach Ligation der isolierten kodierenden Sequenzen für Lhca1 und Lhca4 (ohne Transitpeptid) in pDS-Vektoren wurden transfizierte *E. coli* (JM101) auf Selektivmedien angezogen (Abschnitt 2.4.4). Hierbei zeigte sich, daß bei der Klonierung der Inserts in pDS-B/H-Vektoren sowohl für das Lhca1- als auch für das Lhca4-Insert jeweils z.T. erheblich höhere Mengen von Klonen erzeugt werden konnten als für den Vektor pDS-S/H (Tabelle 4-1).

Die Klonierungsexperimente wurden jeweils parallel für Lhca1- und Lhca4-Inserts in beiden Vektoren unter Verwendung von T4-Ligase sowie kompetenten Zellen der jeweils gleichen Charge durchgeführt. Die Möglichkeit eines nicht vollständigen Restriktionsschnittes bei den Vektoren wurde in wiederholten Experimenten ausgeschlossen, in denen isolierte Plasmid-DNA nach dem Restriktionsverdau (Abschnitt 2.4.3.2) vor der Aufreinigung im Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend aus dem Gel ausgeschnitten wurde. Obwohl damit ausschließlich vollständig geschnittene, nicht selbstkomplementierungsfähige Vektor-DNA für die Ligation verwendet wurde, zeigten mit pDS-S/H-Vektoren transformierte *E. coli* gegenüber den mit pDS-B/H-Vektoren transfizierten *E. coli* weiterhin eine deutlich verminderte Transformationseffizienz (Tabelle 4-1).

**Tabelle 4-1** Übersicht über Transformationseffizienzen ausgewählter Klonierungsexperimente unter Verwendung von mit dem *Qiagen Plasmid Kit* (Qiagen-DNA) bzw. *Plasmix Kit* (Plasmix-DNA) isolierter Vektor-DNA; angegeben ist jeweils die Anzahl isolierter Klone unter Standardbedingungen (*stand.*) entsprechend Abschnitt 2.4.3, bei Verwendung von aus Agarosegelen aufgereinigter Vektor-DNA (+ *Gel*), bei Erhöhung des molaren Vektor:Insert-Verhältnisses auf 1:3 (+ *Insert*) sowie Erhöhung der Menge eingesetzter T4-Ligase (+ *Ligase*); *n.d.* kein Klonierungsexperiment durchgeführt; \*von diesen Klonen hätten weitere gepickt werden können.

Insert	Vektor	gepickte Klone gesamt	für Klonierung verwendete Vektoren						
			Qiagen-DNA				Plasmix-DNA		
			stand.	stand. + Gel	+ Insert	+ Ligase	+ Insert + Ligase	stand.	+ Insert + Ligase
Lhca1	pDS-B/H	162	42*	10	16	44*	10*	40*	n.d.
	pDS-S/H	73	25*	7	2	5	4	n.d.	30*
Lhca4	pDS-B/H	96	33*	10	24*	12	5	12	n.d.
	pDS-S/H	40	17	6	5	6	3	n.d.	3

Gleichzeitig konnten für die Lhca1-Inserts sowohl im pDS-B/H- als auch im pDS-S/H-Vektor grundsätzlich höhere Mengen an Klonen isoliert werden (insgesamt 235) als bei der Klonierung von Lhca4-Inserts (insgesamt 136). Die ließ sich in wiederholten Experimenten auch durch eine Erhöhung des Insert:Vektor-Verhältnisses (von 1:1.5 entsprechend Abschnitt 2.4.3.3 bis auf 1:3) sowie Erhöhung der Menge an eingesetzter T4-Ligase (von 1-2 U entsprechend Abschnitt 2.4.3.3 auf bis zu 4-5 u) nicht verbessern (Tabelle 4-1). Der Ersatz des für die Gewinnung der Vektor-DNA verwendeten *Plasmid Kits* (QIAGEN) durch Isolierungskits anderer Hersteller (z.B. *Plasmix*, TALENT) führte zu einer leichten Erhöhung der Ausbeute isolierbarer Klone, was allerdings auch auf eine Erhöhung der aus den Transformationsansätzen ausplattierten Menge (Erhöhung der Anzahl der Platten) zurückzuführen ist.

Von Selektivmedien isolierte Klone wurden im Anschluß auf Anwesenheit des jeweiligen Inserts gescreent (Abschnitt 2.4.4). Von den so identifizierten 42 Klonen, für die im Screening ein Insert eindeutig nachgewiesen wurde, konnten über die Sequenzierung isolierter Plasmid-DNA (entsprechend Abschnitt 2.4.5) für 14 Klone verwertbare DNA-Sequenzen gewonnen werden (Tabelle 4-2).

**Tabelle 4-2** Übersicht über das Screening der im pDS-Expressionssystem erzeugten Klone; <sup>a)</sup> Plasmid-Isolierung (Mini/Midi-Prep) und Restriktionsanalyse entsprechend Abschnitt 2.4.4.1; <sup>b)</sup> PCR-Screening entsprechend Abschnitt 2.4.4.2.

Insert	Vektor	gescreente Klone		Klone mit Insert		sequenzierte Klone
		Restriktion <sup>a)</sup>	PCR <sup>b)</sup>	Restriktion	PCR	
Lhca1	pDS-B/H	68	94	6	6	1-1, 1-2, 1-5, 1-7, 1-8, 1-9
	pDS-S/H	43	39	3	1	1-3, 1-4, 1-6
Lhca4	pDS-B/H	42	83	8	3	4-3, 4-5
	pDS-S/H	8	2	9	6	4-1, 4-2, 4-4

Insgesamt wurden für Lhca1 9 Vektoren (davon 7 doppelsträngig) sequenziert. Vier dieser Vektoren (1-1 bis 1-4) enthielten mit *Taq*-Polymerase, die übrigen (1-5 bis 1-8) mit *Pwo*-Polymerase amplifizierte Inserts. Für Lhca4 wurden insgesamt fünf Vektoren (3 davon doppelsträngig) sequenziert. Von diesen enthielten zwei (4-1 und 4-2) mit *Taq*-Polymerase und 3 (4-3 bis 4-5) mit *Pwo*-Polymerase amplifizierte Inserts.

Dabei zeigte sich (Tabelle 4-3), daß einige der Inserts z.T. erhebliche (in doppelsträngig sequenzierten Vektoren z.T. redundante) Basenfehler aufwiesen (Klone 1-1 bis 1-4 sowie 4-1 und 4-2). Abweichungen in der Basensequenz, die lediglich in einem der beiden Stränge beobachtet wurden, sind möglicherweise lediglich auf eine Amplifikations- oder Detektionsungenauigkeit während der Sequenzierung zurückzuführen. Dennoch wurden für die anschließende Expression bevorzugt solche Klone verwendet, für die doppelsträngig fehlerfreie Sequenzen verfügbar waren (Klon 1-7 und 1-9 für Lhca1 sowie 4-5 für Lhca4). Diese drei Klone enthielten pDS-B/H-Vektoren mit Inserts, die mit *Pwo*-Polymerase worden waren.

Darüber hinaus wurde ein weiterer Klon (1-3) mit *Taq*-amplifiziertem Lhca1-Insert im Vektor pDS-S/H verwendet, der in der Sequenzierung lediglich eine Abweichung gegenüber der *consensus*-Sequenz aufwies, die aber im komplementären Strang in der gleichen Sequenzierung nicht bestätigt wurde. Deshalb wurde diese Abweichung als Lesefehler in der Detektion während der Sequenzierung bewertet.

**Tabelle 4-3** Übersicht über die sequenzierten rekombinanten pDS-Expressionsvektoren für Lhca1 und Lhca4 mit Angabe der Anzahl einzelner (s.) und redundanter (r.) Basenfehler; für die Expression verwendete Vektoren sind schattiert; vollständige Sequenzen, Alignments und weitere Angaben zu den Sequenzen in Anhang A 2 (Lhca1) und A 3 (Lhca4).

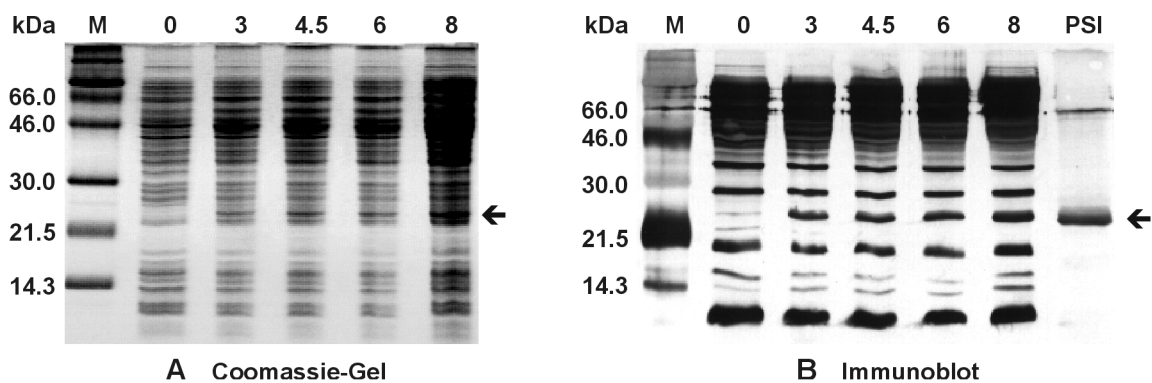
Insert	Klon	Vektor	Insert	Sequenz	Basenfehler	
					s.	r.
<b>Lhca1</b>	1-1	pDS-B/H	<i>Taq</i>	98042712	1	1
				98042713	9	
	1-2	pDS-B/H	<i>Taq</i>	98042714	1	
				98042715		
	1-3	pDS-S/H	<i>Taq</i>	98042716 98042717	1	
	1-4	pDS-S/H	<i>Taq</i>	98042718		3
				98042719	1	
	1-5	pDS-B/H	<i>Pwo</i>	98061109	1	
	1-6	pDS-S/H	<i>Pwo</i>	98061110	7	
1-7	pDS-B/H	<i>Pwo</i>	98080626 90080627			
1-8	pDS/B-H	<i>Pwo</i>	98080628		4	
			98080629			
1-9	pDS-B/H	<i>Pwo</i>	98080630 98060831			
<b>Lhca4</b>	4-1	pDS-S/H	<i>Taq</i>	98042724		2
				98042725		
	4-2	pDS-S/H	<i>Taq</i>	98042726		2
				98042727	1	
	4-3	pDS-B/H	<i>Pwo</i>	98061111	2	
4-4	pDS-S/H	<i>Pwo</i>	98081112	2		
4-5	pDS-B/H	<i>Pwo</i>	98092829 98092830			

## 4.3 Expression

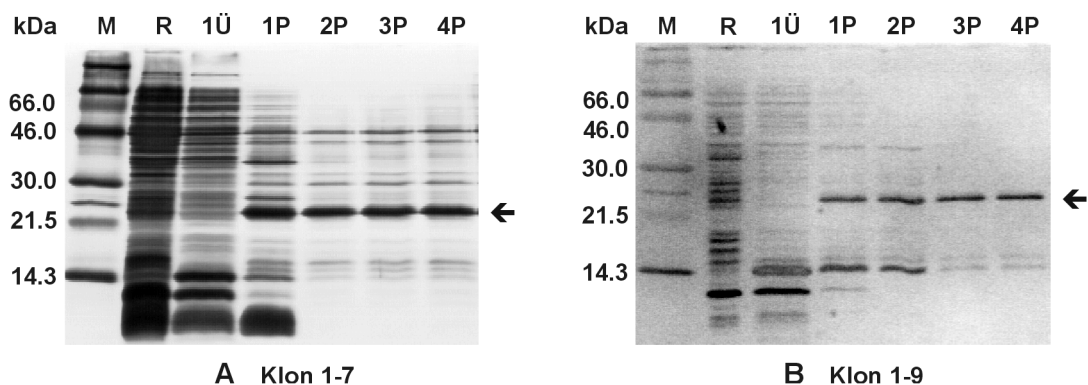
### 4.3.1 Expression von Lhca1

Bereits nach der Auftrennung nicht weiter aufgereinigter Proteinextrakte (Abschnitt 2.5.1.3) aus induzierten *E. coli* (JM101) in einer SDS-PAGE (Abschnitt 2.5.4) konnte für den Klon 1-7 eine deutliche Expression von *rLhca1* im Coomassie-gefärbten Gel (Abschnitt 2.5.5.1; Abb. 4-2 **A**) nachgewiesen werden. Dies konnte über eine Immunodetektion (Abschnitt 2.5.6) mit einem spezifischen *anti-Lhca1*-AK im Vergleich mit *nLhca1* aus einer PSI-Präparation aus Gerste (Abschnitt 2.6.1) bestätigt werden (Abb. 4-2 **B**).

In der Auftrennung aufgereinigter Proteinextrakte (Abschnitt 2.5.2.1) aus induzierten *E. coli* (JM101) im SDS-Polyacrylamidgel konnte für die beiden genetisch identischen Klone 1-7 und 1-9 eine deutliche Reduktion der Verunreinigungen mit bakteriellen Proteinen beobachtet werden (Abb. 4-3 **A** und **B**).



**Abb. 4-2** Nachweis von *rLhca1* und *nLhca1* (→) in der Auftrennung von zum Zeitpunkt  $T_0$  bis  $T_8$  isolierten Proteinrohextrakten (5  $\mu$ g Gesamtprotein) aus IPTG-induzierten *E. coli* (JM101) des Klons 1-7 im SDS-Polyacrylamidgel; (**A**) Coomassie-Färbung, (**B**) Immunoblot mit *anti-Lhca1*-AK; PSI (5  $\mu$ g Gesamtprotein aus PSI-Isolierung entspr. Abschnitt 2.6.1); M = Proteinmarker.



**Abb. 4-3** Auftrennung von Proteinextrakten mit aufgereinigtem *rLhca1* (→) aus (**A**) Klon 1-7 sowie (**B**) Klon 1-9 im SDS-Polyacrylamidgel nach Silberfärbung; aufgetragen sind jeweils 5  $\mu$ g (Gesamtprotein) von (R) Rohextrakt, (1Ü) 1. Überstand, (1P) 1. Pellet sowie (2P, 3P, 4P) 2. bis 4. Pellet entsprechend der in Abschnitt 2.5.2.1 beschriebenen Aufreinigung zu  $T_4$  nach IPTG-Induktion; M = Proteinmarker.

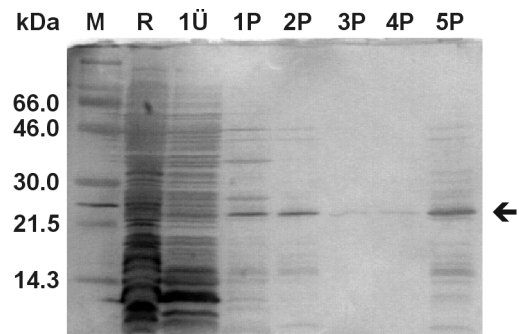
Dagegen konnte eine Überexpression von *rLhca1* im pDS-S/H-Vektor (Klon 1-3) nicht induziert werden. In einem Vergleich der im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten aufgereinigten Proteinextrakte mit dem Klon 1-7 (*Lhca1* im pDS-B/H-Vektor; Abb. 4-4 A) fehlt in den aufgereinigten Proteinextrakten des Klones 1-3 eine deutlich sichtbare *rLhca1*-Bande (Abb. 4-4 B). Auch über eine parallel durchgeführte Immunodetektion (Abb. 4-4 C) konnte kein *rLhca1* in den aufgereinigten Proteinextrakten des Klones 1-3 nachgewiesen werden.

**Abb. 4-4** Auftrennung von aus IPTG-induzierten *E. coli* (JM101) isolierten Proteinextrakten im SDS-Polyacrylamidgel nach Silberfärbung; aufgetragen sind jeweils 5 µg (Gesamtprotein) von (R) Rohextrakt, (1Ü) 1. Überstand, (1P) 1. Pellet sowie (2P, 3P, 4P, 5P) 2. bis 5. Pellet entsprechend der in Abschnitt 2.5.2.1 beschriebenen Aufreinigung zu T<sub>4</sub> nach IPTG-Induktion; M = Proteinmarker.

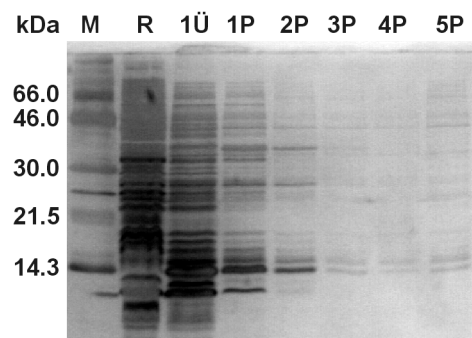
(A) Klon 1-7 (pDS-B/H-Vektor) mit deutlicher Aufreinigung von *rLhca1* (→).

(B) Klon 1-3 (pDS-S/H-Vektor) ohne erkennbare Induktion bzw. Aufreinigung von *rLhca1*.

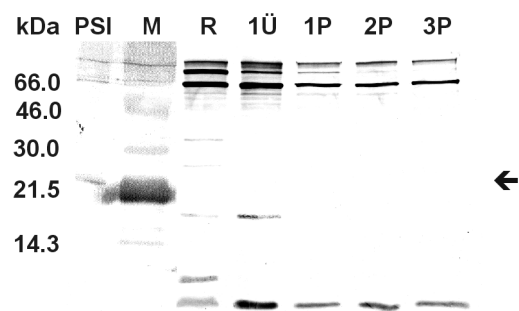
(C) Inkubation aufgetrennter Proteinextrakte aus Klon 1-3 (pDS-S/H-Vektor) mit *anti-Lhca1*-AK ohne Detektion von *rLhca1* (→); PSI (5 µg Gesamtprotein aus PSI-Isolierung entsprechend Abschnitt 2.6.1).



A



B



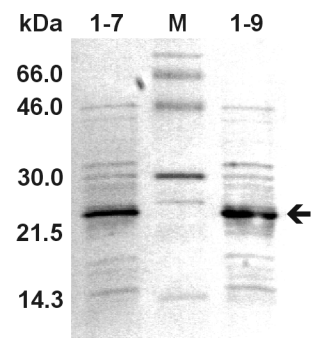
C

Eine Induktion der Expression von *rLhca1* im Klon 1-3 konnte weder durch Variationen der Anzuchtbedingungen hinsichtlich

- (1) der Temperatur (Absenkung der Anzuchttemperatur von 37°C auf 32°C),
- (2) der Zelldichte zum Zeitpunkt der Induktion ( $OD_{550}$  von 0.4, 0.6, 0.8, 1.0),
- (3) der Menge an zugegebenen IPTG (2 und 4 mM anstelle von 1 mM) oder
- (4) des Isolierungsprotokolles (nach PAULSEN et al. entsprechend Abschnitt 2.5.2.1 oder mit *B-PER*<sup>TM</sup> entsprechend Abschnitt 2.5.2.2) erreicht werden.

Für die anschließenden Rekonstitutionsexperimente stand daher nur *rLhca1* aus den Klonen 1-7 und 1-9 zur Verfügung. Für die Isolierung des dort verwendeten *rLhca1* wurden 500 ml-Kulturen von *E. coli* (JM101) der Klone 1-7 und 1-9 4 h nach Induktion mit 1 mM IPTG pelletiert (Abschnitt 2.5.1). Aus den bakteriellen Extrakten wurde *rLhca1* dann entsprechend Abschnitt 2.5.2.1 bis zu einer abgeschätzten Reinheit von ca. 85 % aufgereinigt (Abb. 4-5).

**Abb. 4-5** Auftrennung der entsprechend Abschnitt 2.5.2.1 aufgereinigten Proteinextrakte (Fraktion 4P) mit *rLhca1* (→) aus den Klonen 1-7 und 1-9 im SDS-Polyacrylamidgel nach Silberfärbung; aufgetragen sind jeweils 2 µg (Gesamtprotein), M = Proteinmarker.

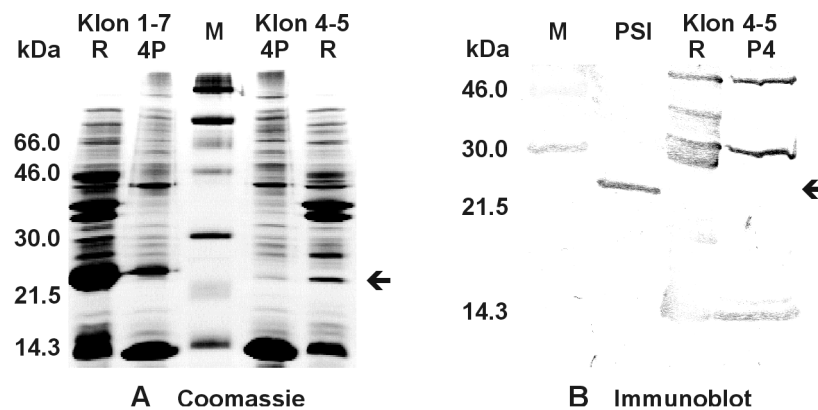


#### 4.3.2 Expression von *Lhca4*

In der Auftrennung von aufgereinigten Proteinextrakten aus IPTG-induzierten *E. coli* (JM101) des Klons 4-5 (mit *Lhca4* im pDS-B/H-Vektor) im SDS-Polyacrylamidgel konnte im Vergleich mit Proteinextrakten aus induzierten *E. coli* (JM101) des Klons 1-7 (*Lhca1* im pDS-B/H-Vektor) keine durch IPTG induzierte Überexpression von *rLhca4* beobachtet werden (Abb. 4-6 **A**). Eine schwach ausgeprägte Proteinbande innerhalb der Proteinextrakte aus Klon 4-5 bei ~22 kDa (Abb. 4-6 **A**) konnte im Immunoblot (Abb. 4-6 **B**) mit einem spezifischen *anti-Lhca4*-AK weder im Rohextrakt (R) noch in der aufgereinigten Proteinfraktion (4P) als *rLhca4* identifiziert werden.

Eine Überexpression von *rLhca4* im Klon 4-5 konnte auch durch eine Variation der Anzuchtbedingungen wie sie für den Klon 1-3 durchgeführt wurde (Abschnitt 3.3.1), nicht erreicht werden. Daher wurden in weiteren Klonierungsexperimenten isolierte Klone, bei denen ein PCR-amplifizierbares *Lhca4*-Inserts nachgewiesen wurde (Screening entsprechend Abschnitt 2.4.4.2), ohne eine vorherige Sequenzierung der Vektor-DNA in einem Antikörper-Screening durchgemustert. Hierzu wurden Rohextrakte aus IPTG-induzierten *E. coli* (JM101) und aufgereinigte Einschlusskörper-Fractionen (aus Aufreinigung mit *B-PER*<sup>TM</sup> entsprechend Abschnitt 2.5.2.2) im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach Transfer auf PVDF-Membranen mit einem spezifischen *anti-Lhca4*-AK inkubiert (Abschnitt 2.5.6).

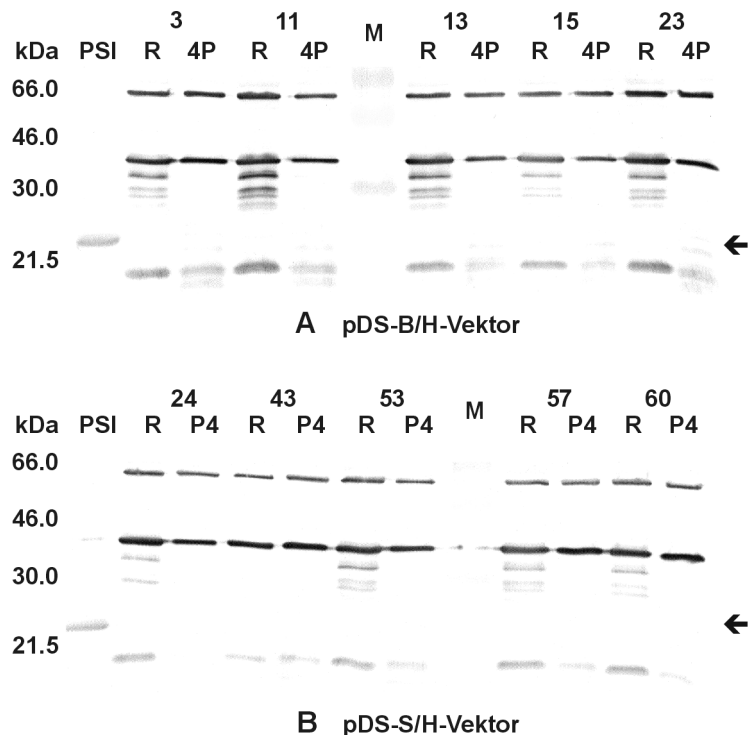


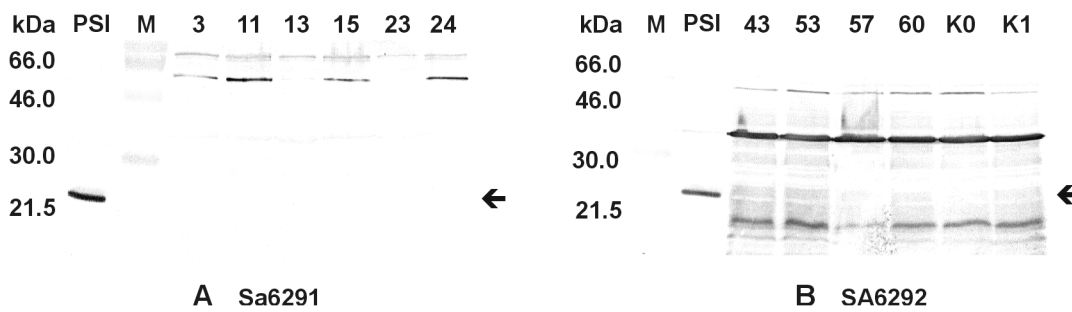


**Abb. 4-6** Auftrennung von Proteinextrakten aus IPTG-induzierten *E. coli* (JM101) **(A)** im SDS-Polyacrylamidgel nach *Coomassie*-Färbung sowie **(B)** nach Inkubation mit *anti-Lhca4* (SA6291); aufgetragen sind jeweils 5 µg (Gesamtprotein) der Fraktionen *Rohextrakt* (R) und *4. Pellet* (4P) der Aufreinigung entsprechend Abschnitt 2.5.2.1; → *rLhca1* (A) bzw. *nLhca4* (B), PSI (5 µg PSI-Präparation entsprechend Abschnitt 2.6.1); M = Proteinmarker.

Während die verwendeten Antikörper bei den Kontrollen (nach Abschnitt 2.6.1 isolierte PSI-Komplexe) eindeutig positive Signale zeigten, konnte für alle durchgemusterten 10 Klone (jeweils 5 im pDS-B/H- bzw. pDS-S/H-Vektor) in den aufgetrennten Proteinextrakten kein Signal beobachtet und somit keine Expression nachgewiesen werden (Abb. 4-7 **A** und **B**). Parallel aufgetrennte aufgereinigte Proteinextrakte (entsprechend Abschnitt 2.5.2.1) zeigten in der immunologischen Detektion ebenfalls kein positives Signal. Dabei war es unerheblich, ob bei der Detektion der *anti-Lhca4*-AK SA6291 (Abb. 4-8 **A**) oder SA6292 (Abb. 4-8 **B**) verwendet wurde.

**Abb. 4-7** Immunodetektion von Lhca4 mit *anti-Lhca4*-AK (SA5291) nach Auftrennung mit *B-PER*<sup>TM</sup> aufgereinigter Proteinextrakte aus IPTG-induzierten *E. coli* (JM101) im SDS-Polyacrylamidgel **(A)** Klone 3, 11, 13, 15 und 23 (im Vektor pDS-B/H), **(B)** Klone 24, 43, 53, 57 und 60 (im Vektor pDS-S/H); *nLhca4* (→), R = Rohextrakte, 4P = viertes Pellet; PSI (5 µg Gesamtprotein aus PSI-Isolierung entspr. Abschnitt 2.6.1), M = Proteinmarker.





**Abb. 4-8** Immunodetektion von Lhca4 (→) in Proteinextrakten aus IPTG-induzierten *E. coli* (JM101) nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel mit **(A)** AK SA6291 für Klone 3, 11, 13, 15, 23 und 24 und **(B)** AK SA6292 für Klone 43, 53, 57 und 60; K0 sowie K1 = Proteinextrakte aus IPTG-induzierten *E. coli* (JM101) mit und ohne Vektor-DNA, PSI (5 µg Gesamtprotein aus PSI-Isolierung entspr. Abschnitt 2.6.1), M = Proteinmarker.

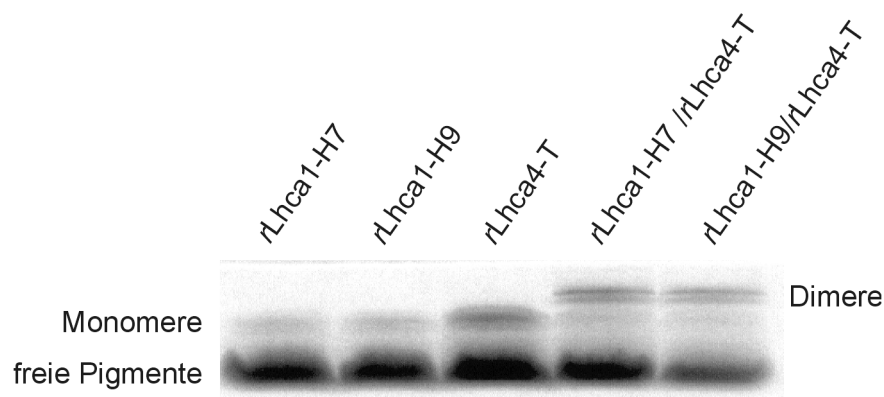
Diese Ergebnisse bestätigen Erfahrungen, daß die Exprimierbarkeit ähnlicher Gensequenzen im gleichen Expressionssystem, insbesondere für Membranproteine, nicht in jedem Fall übertragbar ist (ROGL et al. 1998). So konnte CHARISIUS (1999) bei der Expression von Lhca2 aus Gerste im gleichen Expressionssystem bestenfalls Proteingehalte von ca. 1 % w/w des Gesamtproteingehaltes aufreinigen, was auf eine schlechte Expression schließen ließ. Expressionsexperimente aus der Gruppe von Volkmar Schmid (pers. Mitteilung) führten z.T. ebenfalls zu deutlich heterogenen Expressionsergebnissen für einzelne Lhc-Gene.

#### 4.4 Rekonstitution

Da die Expression von *rLhca4* in beiden verwendeten Vektoren nicht erreicht werden konnte und auch Klone mit *Lhca1* im pDS-S/H-Vektor nicht induziert werden konnten, stand für die Rekonstitutionsexperimente lediglich *rLhca1* aus den genetisch identischen Klonen 1-7 und 1-9 (*Lhca1* im pDS-B/H-Vektor) zur Verfügung (im folgenden als *rLhca1*-H7 und -H9 bezeichnet). Außerdem wurden *rLhca1* (*rLhca1*-T) sowie *rLhca4* (*rLhca4*-T) aus Tomate (Abschnitt 2.5.2.1) verwendet, die von J. Rupprecht (Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz) zur Verfügung gestellt wurden.

Nach Rekonstitution aufgereinigter Proteinextrakte (Abschnitt 3.3.1) von *rLhca1*-H mit Pigmentextrakten (Abschnitt 2.6.2) konnten sowohl stabile Monomere (*rLhca1*-T und -H sowie *rLhca4*-T) als auch stabile homologe (*rLhca1*-T/*rLhca4*-T) bzw. heterologe Heterodimere (*rLhca1*-H/*rLhca4*-T) in einer nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.7.1) aufgetrennt werden.

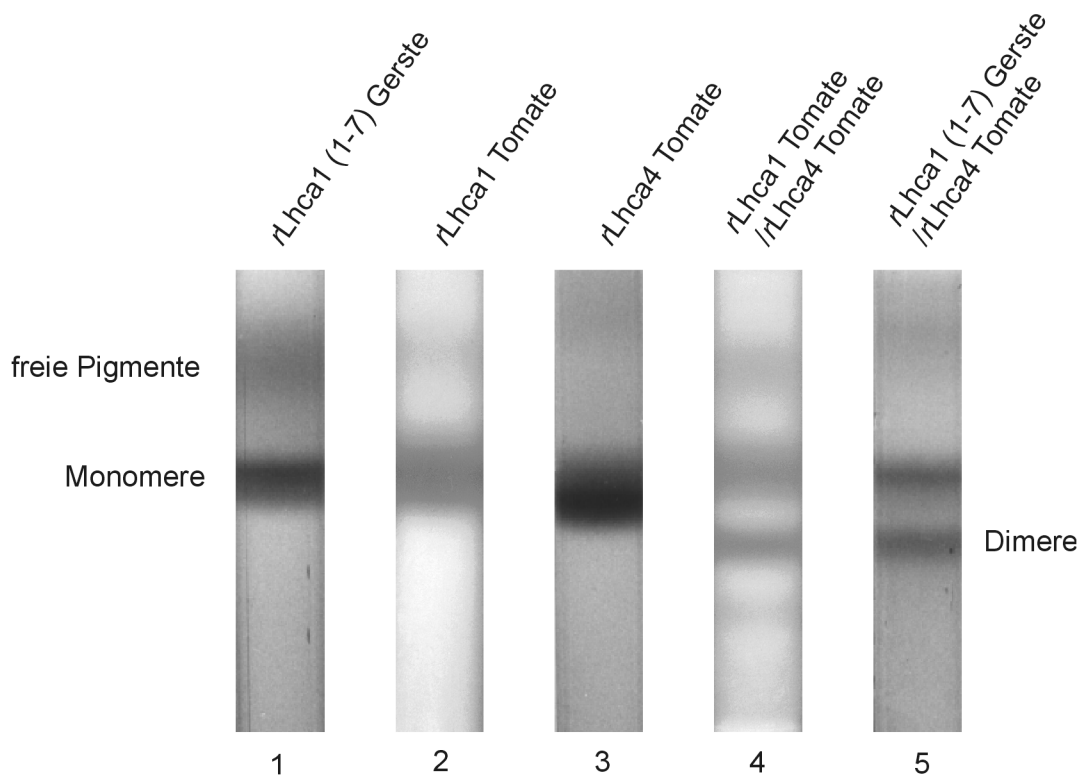
Mit der Rekonstitution von heterologen Dimeren (*rLhca1*-H/*rLhca4*-T) konnte erstmals eine Interaktion von Proteinen des LHCI-730 aus einer mono- und einer dikotylen Spezies gezeigt werden. Da in den Rekonstitutionsansätzen für die heterologen Dimere kaum freie Monomere nachgewiesen werden konnten (Abb. 4-9), ist diese Interaktion offensichtlich sehr spezifisch.



**Abb. 4-9** Auftrennung stabiler Monomere von *rLhca1*-H7, *rLhca1*-H9 (beide aus Gerste) und *rLhca4*-T (aus Tomate) sowie heterologer Dimere (*rLhca1*-H7+9/*rLhca4*-T) in einer ND-PAGE (Abschnitt 2.7.1).

In der Auftrennung von Rekonstitutionsansätzen im Saccharose-Dichtegradienten (Abschnitt 2.7.2) konnten diese Monomere und (heterologen) Dimere ebenfalls stabil isoliert werden (Abb. 4-10). Im Vergleich zur Auftrennung im Gel ist der Anteil nicht spezifisch interagierender Monomere mit ca. 50 % (bezogen auf den Chlorophyllgehalt) in der Gradientenauftrennung allerdings deutlich höher.

Insgesamt wurden in 11 Rekonstitutionsexperimenten mit Pigmentextrakten aus Gerste und Tomate insgesamt 34 rekonstituierte Pigment/Protein-Komplexe isoliert und zunächst hinsichtlich ihrer Chl *a/b*-Verhältnisse (Abschnitt 2.7.3.1) untersucht (Tabelle 4-4).



**Abb. 4-10** Auftrennung stabiler Monomere (1-3) und Dimere (4-5) im Saccharose-Dichtegradienten aus Rekonstitutionsansätzen entsprechend Abschnitt 2.7.2.

**Tabelle 4-4** Übersicht über Chl *a/b*-Verhältnisse aus isolierten rekonstituierten Pigment/Protein-Komplexen mit Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen (MW ± STAB).

Pigment-extrakte	Monomere				Dimere	
	rLhca1-H7	rLhca1-H9	rLhca1-T	rLhca4-T	rLhca1-H7 rLhca4-T	rLhca1-H9 rLhca4-T
<b>Gerste</b>	3.42	3.62	3.29	2.99	2.44	2.00
	4.57	2.73		2.13	2.39	2.24
	4.19	3.78		2.58	2.79	2.93
	2.53	4.16			2.81	
					2.42	
MW ± STAB	3.68 ± 0.78	3.57 ± 0.52	3.29	2.57 ± 0.35	2.62 ± 0.22	2.39 ± 0.39
<b>Tomate</b>	3.44	2.99	-	-	3.02	2.62
	4.20	4.41			2.36	2.50
	3.72	3.80			2.08	2.93
					2.67	
MW ± STAB	3.74 ± 0.31	3.73 ± 0.58	-	-	2.53 ± 0.35	2.68 ± 0.18

Anhand der Chl *a/b*-Verhältnisse sind für die rekonstituierten *rLhca1-H* Monomere keine Unterschiede hinsichtlich des verwendeten rekombinanten Proteins (Klon 1-7 oder Klon 1-9) oder des verwendeten Pigmentextraktes (aus Gerste oder Tomate) zu beobachten (Tabelle 4-5). Die für alle *rLhca1-H7*-Monomere bestimmten Chl *a/b*-Verhältnisse ( $3.73 \pm 0.62$ ) entsprechen unabhängig vom verwendeten Pigmentextrakt den für rekonstituierte *rLhca1-H9*-Monomere bestimmten Werten ( $3.64 \pm 0.56$ ). Gleichzeitig stimmen die für die mit Pigmentextrakten aus Gerste rekonstituierten Komplexe bestimmten Werte ( $3.63 \pm 0.67$ ) mit den Werten für die Monomere überein, die mit Pigmentextrakten aus Tomate rekonstituiert wurden ( $3.76 \pm 0.47$ ). Insgesamt wurde auf der Basis von 14 rekonstituierten *rLhca1*-Monomeren ein mittleres Chl *a/b*-Verhältnis von  $3.68 \pm 0.59$  bestimmt.

Ähnlich verhält es sich für die untersuchten Heterodimere von *rLhca1-H7/9* mit *rLhca4-T* (Tabelle 4-6). Unabhängig vom verwendeten Protein und eingesetzten Pigmentextrakt wurde auf der Basis von 16 untersuchten Heterodimeren ein mittleres Chl *a/b*-Verhältnis von  $2.57 \pm 0.31$  bestimmt. Die Streuung der für die Dimere ermittelten Werte ist etwas geringer als bei den untersuchten Monomeren.

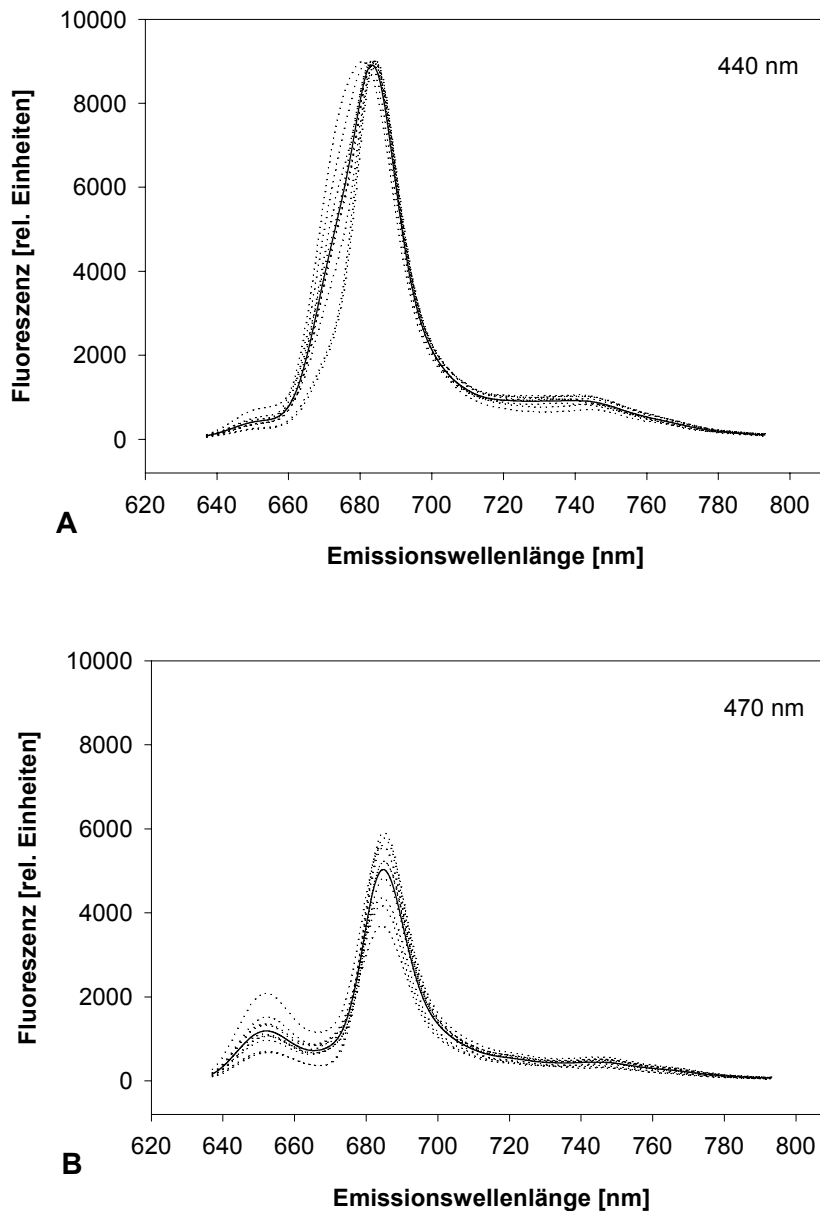
**Tabelle 4-5** Übersicht über Chl *a/b*-Verhältnisse (MW  $\pm$  STAB) für rekonstituierte *rLhca1*-Monomere, gruppiert nach verwendetem *r*Protein (-H7 aus Klon 1-7 oder -H9 aus Klon 1-9) und Pigmentextrakt (aus Gerste oder Tomate) auf der Basis der in Tabelle 4-4 angegebenen Werte.

		Protein		zusammen
		<i>rLhca1-H7</i>	<i>rLhca1-H9</i>	
Pigment Extrakt	Gerste	$3.68 \pm 0.78$	$3.57 \pm 0.52$	<b><math>3.63 \pm 0.67</math></b>
	Tomate	$3.74 \pm 0.31$	$3.73 \pm 0.58$	<b><math>3.76 \pm 0.47</math></b>
zusammen		<b><math>3.73 \pm 0.62</math></b>	<b><math>3.64 \pm 0.56</math></b>	<b><math>3.68 \pm 0.59</math></b>

**Tabelle 4-6** Übersicht über Chl *a/b*-Verhältnisse (MW  $\pm$  STAB) für rekonstituierte Heterodimere, gruppiert nach verwendetem *r*Protein (-H7 aus Klon 1-7 oder -H9 aus Klon 1-9) und Pigmentextrakt (aus Gerste oder Tomate) auf der Basis der in Tabelle 4-4 angegebenen Werte.

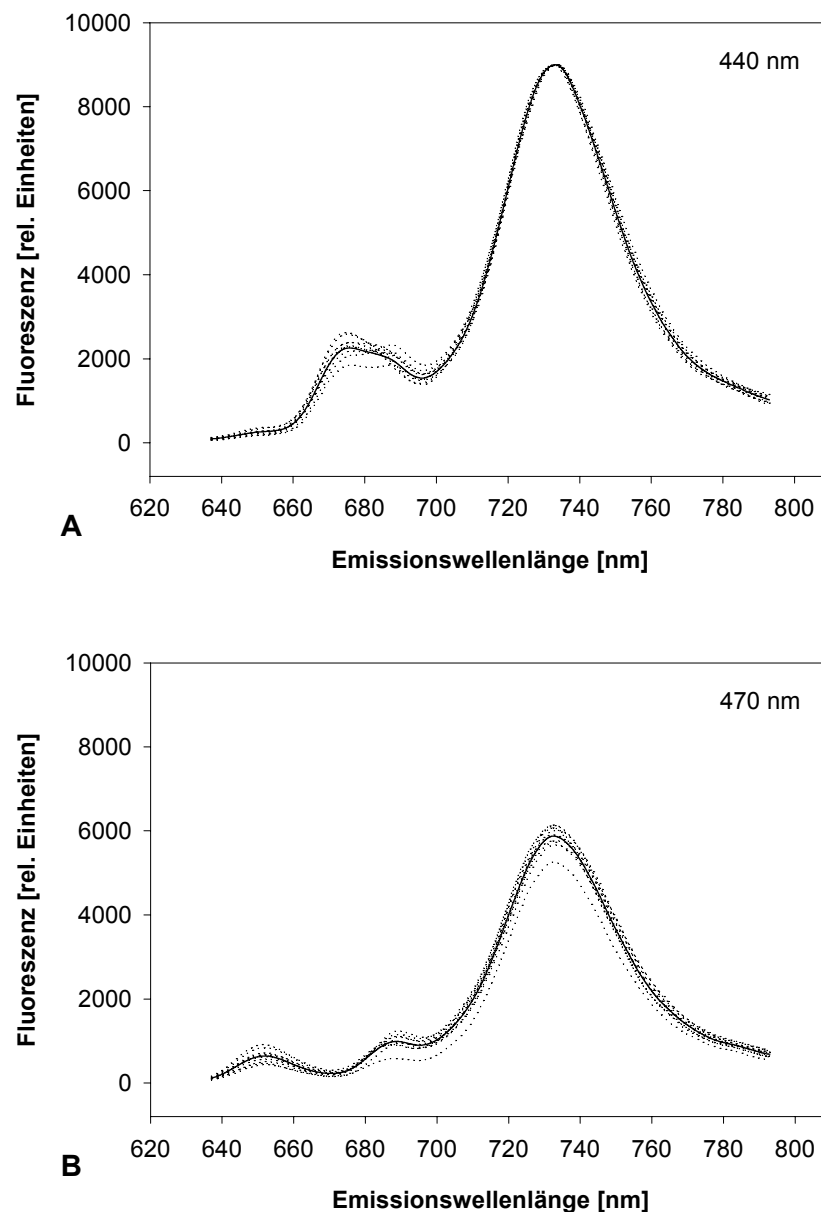
		Protein		zusammen
		<i>rLhca1-H7</i> <i>rLhca4-T</i>	<i>rLhca1-H9</i> <i>rLhca4-T</i>	
Pigment Extrakt	Gerste	$2.62 \pm 0.22$	$2.39 \pm 0.39$	<b><math>2.55 \pm 0.31</math></b>
	Tomate	$2.53 \pm 0.35$	$2.68 \pm 0.18$	<b><math>2.60 \pm 0.30</math></b>
zusammen		<b><math>2.59 \pm 0.29</math></b>	<b><math>2.54 \pm 0.34</math></b>	<b><math>2.57 \pm 0.31</math></b>

Von jeweils 10 der 14 isolierten Monomere bzw. der 16 isolierten Heterodimere wurden Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektren bei 77 K nach Anregung von Chl *a* (bei 440 nm) und Chl *b* (bei 470 nm) aufgenommen (Abschnitt 2.7.3.2). Aus den jeweils erhaltenen 10 Einzelspektren wurden die gemittelten Emissionsspektren für den rekonstituierten Monomer (Abb. 4-11 **A** und **B**) bzw. Heterodimer (Abb. 4-12 **A** und **B**) abgeleitet.



**Abb. 4-11** Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektren rekonstituierter *rLhca1*-Monomere nach Anregung bei **(A)** 440 nm und **(B)** 470 nm. Dargestellt sind jeweils  $n = 10$  Einzelspektren (.....) sowie das daraus gemittelte Spektrum (—).

Das Emissionsmaximum für die rekonstituierten rLhca1-Monomere nach Anregung bei 440 nm (Abb. 4-11 **A**) entspricht mit  $683.10 \pm 1.04$  nm dem mit  $684.60 \pm 0.49$  nm bestimmten Emissionsmaximum nach Anregung bei 470 nm (Abb. 4-11 **B**). Für die rekonstituierten Heterodimere liegen die bestimmten Emissionsmaxima mit  $733.20 \pm 0.40$  (bei 440 nm) bzw.  $732.50 \pm 0.67$  (bei 470 nm) ähnlich dicht beieinander (Abb. 4-12 **A** bzw. **B**).



**Abb. 4-12** Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektren rekonstituierter rLhca1-H/rLhca4-T-Heterodimere nach Anregung bei **(A)** 440 nm und **(B)** 470 nm. Dargestellt sind jeweils  $n = 10$  Einzelspektren (.....) sowie das daraus gemittelte Spektrum (—).

Die im Vergleich der gemittelten Emissionsspektren nach Anregung bei 440 und 470 nm sichtbare gute energetische Kopplung von Chl *b* mit Chl *a* (Abb. 4-13 **A** und **C**) entspricht dem Grad der Kopplung innerhalb rekonstituierter vergleichbarer Komplexe mit Proteinen aus Tomate (Abb. 4-13 **B** und **D**). Die zwischen 640 und 660 nm zu beobachtende höhere Fluoreszenz von Chl *b* nach Anregung bei 470 nm (Abb. 4-13 **A** und **C**) ist möglicherweise auf einen etwas höheren Anteil schlecht mit Chl *a* gekoppelter Chl *b*-Moleküle zurückzuführen, deren Fluoreszenz nach Anregung dann nicht von Chl *a* gequenchet (gelöscht) werden kann.

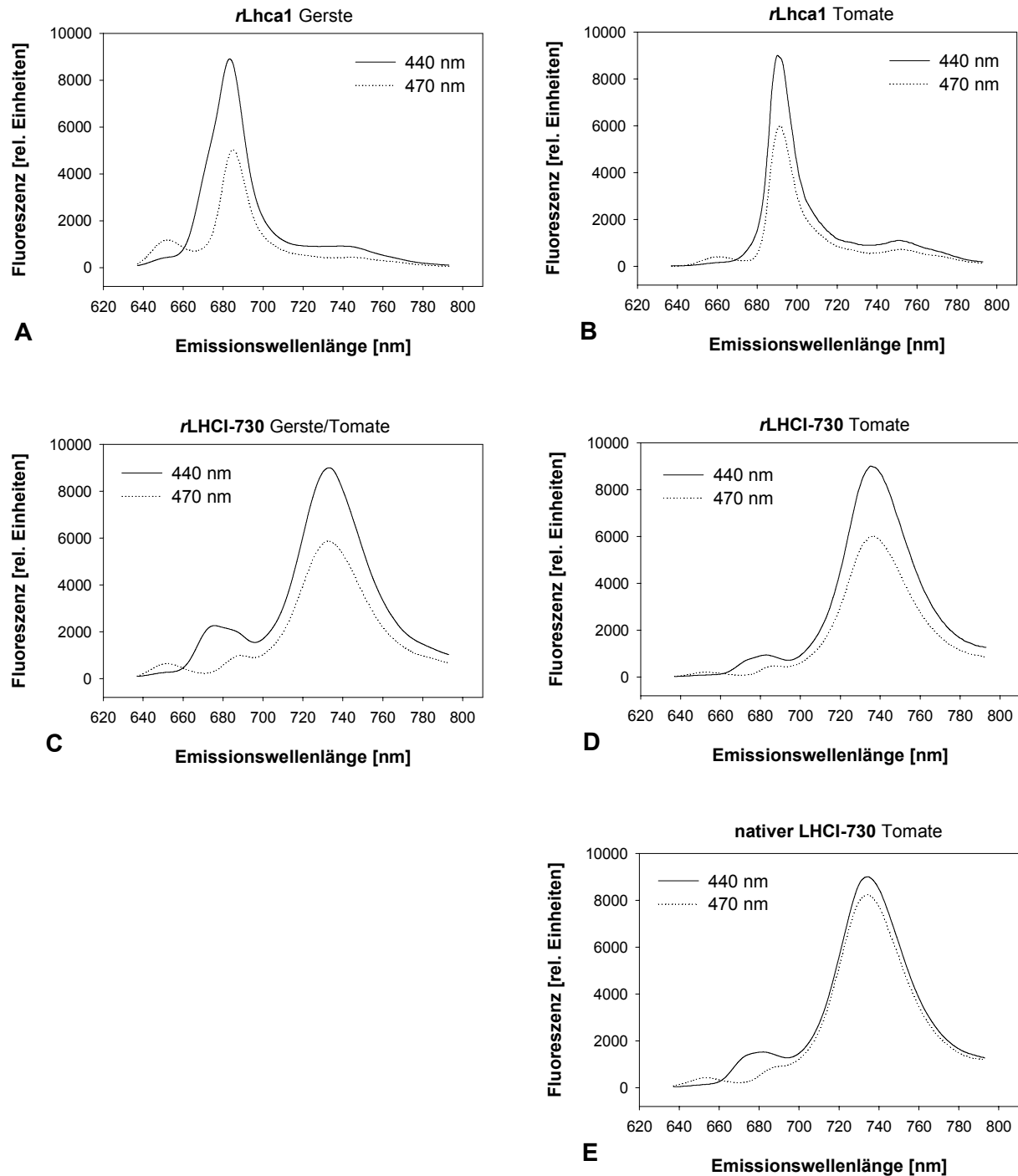
Im Vergleich der gemittelten Emissionsspektren weisen die rekonstituierten heterologen Dimere (Abb. 4-13 **C**) eine größere Ähnlichkeit mit nativen LHCI-730-Komplexen aus Tomate (Abb. 4-13 **E**) auf, als die mit Proteinen aus Tomate rekonstituierten LHCI-730 (Abb. 4-13 **D**). Allerdings ist der Grad der energetischen Kopplung zwischen Chl *a* und Chl *b* innerhalb der nativen LHCI-730-Komplexe deutlich größer als innerhalb der rekonstituierten Komplexe.

Die ermittelten Emissionsmaxima für die rekonstituierten *r*Lhca1-Monomere aus Gerste nach Anregung bei 440 nm liegen leicht unter den für rekonstituierte *r*Lhca1 aus Tomate bestimmten Werten, während die Emissionsmaxima für die heterologen Dimere (Gerste/Tomate) exakt denen für native sowie rekonstituierte LHCI-730 aus Tomate entsprechen (Tabelle 4-7).

**Tabelle 4-7** Übersicht über Emissionsmaxima von rekonstituierten (*r*) und nativen (*n*) Pigment/Protein-Komplexen aus Gerste und Tomate nach Anregung bei 77 K; <sup>1</sup> nach SCHMID et al. (1997), <sup>2</sup> nach J. Rupprecht sowie <sup>3</sup> V. Schmid (Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz; pers. Mitteilung).

Pigment/Protein-Komplex	Emissionsmaximum [nm] bei 77 K nach Anregung bei	
	440 nm	470 nm
<i>r</i> Lhca1 Gerste	683.10 ± 1.04	684.60 ± 0.49
<i>r</i> Lhca1 Tomate	<sup>1</sup> 685-687 / <sup>2</sup> 683	<sup>2</sup> 684
<i>r</i> LHCI-730 Gerste / Tomate	733.20 ± 0.40	732.50 ± 0.67
<i>r</i> LHCI-730 Tomate	<sup>1</sup> 732-734 / <sup>2</sup> 735	<sup>2</sup> 735
nativer LHCI-730 Tomate	<sup>1</sup> 732-734 / <sup>3</sup> 734	<sup>3</sup> 734





**Abb. 4-13** Aus jeweils 10 Einzelspektren gemittelte Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionspektren nach Anregung bei 440 nm und 470 nm für die rekonstituierten Monomere (A) *rLhca1* (Gerste) und (B) *rLhca1* (Tomate), die rekonstituierten Heterodimere (C) *rLHCI-730* (Gerste/Tomate) und (D) *rLHCI-730* (Tomate) sowie (E) von nativen LHCI-730 Komplexen aus Tomate. Daten für (B), (C) und (D) mit freundlicher Genehmigung von V. Schmid und J. Rupprecht (Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz).



## 5 Diskussion

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sollen vor dem Hintergrund der phylogenetisch bedingten Homologien der *cab*-Proteine diskutiert werden. Hierzu werden zunächst die für Lhca1 und Lhca4 der Gerste ermittelten Aminosäuresequenzen mit bereits publizierten Sequenzen (Abschnitt 4.1.1) sowie verfügbaren Sequenzen für Lhc1- bzw. Lhca4-Proteine angiospermer Pflanzenspezies verglichen. Da hierbei eine auffällig hohe Übereinstimmung der Lhca1-Transitpeptidsequenzen von Gerste und Reis festgestellt werden kann (Abschnitt 4.1.4), werden in einem umfassenden Vergleich von 142 Aminosäuresequenzen die spezifischen Merkmale von Transitpeptiden und reifen LHC-Proteinen zwischen mono- und dikotylen Spezies dargestellt (Abschnitt 4.1.2). Grundsätzlich sind die reifen Proteine stärker konserviert als ihre Transitpeptide (Abschnitt 4.1.3). Neben Lhca1 aus Gerste und Reis können weitere Paare von Lhcb-Proteinen aus unterschiedlichen Spezies identifiziert werden, deren Transitpeptide ebenfalls auffällig hohe Übereinstimmungen zeigen, die z.T. sogar höher als die Übereinstimmungen innerhalb der jeweiligen reifen Proteine sind (Abschnitt 4.1.5). Aus dem Vergleich der Transitpeptidsequenzen kann ein konserviertes Motiv innerhalb der Transitpeptide von LHC-Proteinen angiospermer Pflanzen abgeleitet werden (Abschnitt 4.1.6).

Mit rekombinanten Proteinen und Pigmentextrakten aus Gerste bzw. Tomate können Lhca1-Monomere und heterologe LHCI-730-Dimere (Gerste/Tomate) *in vitro* rekonstituiert werden (Abschnitt 4.2), deren Eigenschaften denen nativer Komplexe oder rekonstituierter Dimere (Tomate/Tomate) z.T. sehr ähnlich sind (Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2). Dies weist auf Wechselwirkungen zwischen Lhca1 und Lhca4 hin, die in Mono- und Dikotyledonen konserviert sind. Die Dimerisierung zum LHCI-730 ist aber - anders als beim LHCII - wahrscheinlich nicht durch N- bzw. C-terminale Proteinabschnitte determiniert (Abschnitt 4.2.4.2), sondern wird möglicherweise durch elektrostatische Wechselwirkungen der stromalen Loops von Lhca1 und Lhca4 unterstützt. Deren AS-Sequenzen weisen gegenüber Lhca2- und Lhca3-Proteinen in diesen Bereichen eine auffällig hohe Zahl konservierter geladener Aminosäuren auf (Abschnitt 4.2.4.3).

### 5.1 Analyse der Proteinsequenzen von Lichtsammelproteinen angiospermer Pflanzen

In der Sequenzdatenbank des EMBL<sup>29</sup> wurden für angiosperme Pflanzenspezies insgesamt jeweils 142 AS-Sequenzen für Transitpeptide (aus 35 Spezies) und reife LHC-Proteine (aus 34 Spezies) identifiziert (Tabelle 5-1; vollständige Übersicht in Anhang A 4) und hinsichtlich ihrer Übereinstimmung miteinander verglichen (vollständige Übersicht in Anhang A 5). Bei über 50 % dieser Sequenzen handelt es sich um Lhcb1-Sequenzen. Insgesamt machen alle Lhcb-Sequenzen über 80 % der verglichenen Sequenzen aus. Gleichzeitig entfallen beinahe

---

<sup>29</sup> *European Molecular Biology Laboratory* (Heidelberg) unter <http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html> (Stand 10/2001). Die Sequenzen sind durchgängig mit ihrer Accession-Nummer (Acc.-Nr.) und der wissenschaftlichen Bezeichnung der Spezies gekennzeichnet (z.B. „b1.2\_L.esculentum\_M20241“ für das zweite Protein vom Lhcb1-Typ aus *Lycopersicon esculentum* mit der Acc.-Nr. M20241), und können damit insbesondere in den vergleichenden Darstellungen in Abschnitt 5.1.3 unter Verwendung von Anhang A 4 eindeutig zugeordnet werden.

80 % auf dikotyle Pflanzen, während die monokotylen Spezies lediglich ~20 % der Sequenzen stellen. Dadurch ist für einzelne LHC-Typen im Einzelfall keine bzw. keine ausreichende Vergleichsmöglichkeit innerhalb der jeweiligen Bezugsgruppe gegeben, während andere Gruppen eine erheblich breitere Basis für einen Vergleich bieten<sup>30</sup>.

**Tabelle 5-1** Übersicht über die für den Vergleich verwendeten Sequenzen von Transitpeptiden und reifen LHC-Proteinen aus angiospermen mono-(m-kotyl) und dikotylen (d-kotyl) Pflanzenspezies (vergl. Anhang A 4).

Gruppe	Transitpeptide			reife Proteine		
	[n Sequenzen/aus n Spezies]			[n Sequenzen/aus n Spezies]		
	m-kotyl	d-kotyl	gesamt	m-kotyl	d-kotyl	gesamt
Lhca1	2/2	5/3	<b>7/5</b>	2/2	5/3	<b>7/5</b>
Lhca2	3/3	7/4	<b>10/7</b>	3/3	7/4	<b>10/7</b>
Lhca3	-/-	4/3	<b>4/3</b>	-/-	4/3	<b>4/4</b>
Lhca4	1/1	4/3	<b>5/6</b>	2/2	5/4	<b>7/6</b>
<b>alle Lhca</b>	<b>6/3</b>	<b>20/5</b>	<b>26/8</b>	<b>7/3</b>	<b>21/5</b>	<b>28/8</b>
Lhcb1	13/5	59/23	<b>72/28</b>	13/5	59/23	<b>72/28</b>
Lhcb2	3/1	13/10	<b>16/11</b>	4/2	13/10	<b>17/12</b>
Lhcb3	1/1	7/6	<b>8/7</b>	1/1	5/5	<b>6/6</b>
Lhcb4	2/2	6/2	<b>8/4</b>	2/2	5/2	<b>7/4</b>
Lhcb5	3/2	3/3	<b>6/5</b>	3/2	3/3	<b>6/5</b>
Lhcb6	1/1	5/4	<b>6/5</b>	1/1	5/4	<b>6/5</b>
<b>alle Lhcb</b>	<b>23/5</b>	<b>93/29</b>	<b>116/34</b>	<b>24/5</b>	<b>90/28</b>	<b>114/33</b>
<b>alle Lhc</b>	<b>29/6</b>	<b>113/29</b>	<b>142/35</b>	<b>31/6</b>	<b>111/28</b>	<b>142/34</b>

### 5.1.1 Die ermittelten Sequenzen für Lhca1 und Lhca4 der Gerste unterscheiden sich von bereits veröffentlichten Sequenzen

Die bereits in einer früheren Arbeit (KLIMMEK 1997) festgestellten Unterschiede zu den von Anandan et al. (1993) veröffentlichten unvollständigen Sequenzen für Lhca1 (7 Abweichungen) und Lhca4 (39 Abweichungen) aus Gerste konnten mit den in dieser Arbeit isolierten Sequenzen bestätigt werden (Abb. 5-1 **A** und **B**). Neben vereinzelten Basenlesefehlern führen vor allem Leserasterverschiebungen zu Abweichungen, von denen 6 (von 7 für Lhca1) bzw. 20 (von 39 für Lhca4) im Vergleich mit den verfügbaren AS-Sequenzen von Lhca1- bzw. Lhca4-Proteinen angiospermer Pflanzen (vergl. Anhang A 4) als offensichtliche Abweichungen in dort vollständig konservierten Positionen identifiziert werden konnten (in Abb. 5-1 **A** und **B** jeweils mit \* markiert).

<sup>30</sup> So liegen für „Transitpeptide von Lhca4 aus Monokotyledonen“ lediglich eine vollständige Sequenz aus Reis und für „Transitpeptide von Lhca1 aus Monokotyledonen“ lediglich zwei vollständige Sequenzen aus Gerste und Reis vor, während für „Transitpeptide bzw. reife Proteine für Lhcb1 aus Dikotyledonen“ jeweils 59 Sequenzen aus 23 Spezies verfügbar sind.

<b>A</b>		<b>Lhca1</b>
	▽	
AF218305	MASSSGLRSCSAVGVPSLLAPSSRSGRSGLPFCAYATTSGRVTMSAEWFPQPRPAHLDG	60
S68728	-----PGRSGLPFCAYATTSGRVTMSAEWFPQPRPAHLAG	36
AF218305	SSPGDFGFDPLGLATVPENFERFKSEIYHCRWAMLCVPGVLVPEALGLGNWVKAQEWAA	120
S68728	SSPRGLRVRPLGLATVPENFERFKSEIYHCRWAMLCVPGVLVPEALGLGNWVKAQEWAA *****	96
AF218305	LPDGQATYLGPNPVPWGNLPTILAIIEFLAIAFAEQQRTMEKDPEKKKYPGGAFDPLGFSKD	180
S68728	LPDGQATYLGPNPVPWGNLPTILAIIEFLAIAFAEQQRTMEKDPEKKKYPGGAFDPLGFSKD	156
AF218305	PAKFEELKLKEIKNGRLAMLAFVGFVQQSAYPGTGPLENLATHLADPWHNNIGDIVIPR	240
S68728	PAKFEELKLKEIKNGRLAMLAFVGFVQQSAYPGTGPLENLATHLADPWHNNIGDIVIPR	216
AF218305	NIYGP	245
S68728	NIYGP	221
<b>B</b>		<b>Lhca4</b>
	▽	
AF287276	-----SASSPRFLG----DSGRVGLAKSTRRDVAVQAKGSWLPGLQSPAYLDGSLAGD	49
S68729	-----RIQAYRFRTRVPPSPAASGSPRSTRRDVAVQAKGSWLPGLQSPAYLDGSL*EGD	53
AF287276	NGFDPLALAEDPEDLRWFVQAEVNGRWAMLGAVGMLIPEVLTKAGLLNAPEWYDA-GKE	108
S68729	NGFDPLALAEDPEDLRWFVQADVNGRWAMLGAVGMLIPEVLTKAGLMNAPEWLRLEPGKE ** * * * *	113
AF287276	TYFASSTLFVIEFILFHYVEIRRWQDIKNPGSVNQDPIFKSYSLPPHECGYPGSVFNPL	168
S68729	TYFASSTALRVHMSS-TYVEIRRWQDIKNPGSVNQDPIFKSYSLPPHECGYPGRVFNPL * * * * * *	171
AF287276	NFAPTLNKEKELANGLAMLAFVGFVQHNVTGKGPFFENLQQHLADPWHNTIIQTISGQ	228
S68729	NFAPLENKEKELANGLAMLAFVGFVQHNVTGKGPFFENLQQHLADPWHNTIIQTISGQ * * * * *	231

**Abb. 5-1** Abweichungen (invers markiert) der für Lhca1 (A) und Lhca4 (B) ermittelten AS-Sequenzen (Acc.-Nr. AF218305 bzw. AF287276) zu den von ANANDAN et al. (1993) publizierten unvollständigen Teilsequenzen (Acc.-Nr. S68728 bzw. S68729); ▽ Schnittstelle für Transitpeptid; \*Abweichungen von konservierten AS (im Vergleich von Sequenzen angiospermer Pflanzen identifiziert, s. Text).

### 5.1.2 Die Längen der Transitpeptide und der reifen Proteine angiospermer Pflanzen vom Lhca- und Lhcb-Typ sind deutlich unterschiedlich

Die verglichenen AS-Sequenzen der reifen Lichtsammelproteine angiospermer Pflanzen weisen eine durchschnittliche Länge von ~228 AS (zwischen 197-262 AS) auf, ihre Transitpeptide sind durchschnittlich 37 AS (zwischen 28-58 AS) lang (Tabelle 5-2). Im Vergleich mit der durchschnittlichen Länge von Transitpeptiden chloroplasten-translozierter Proteine von 30 bis >100 AS (KEEGSTRA & CLINE 1999) bzw. 20 bis 120 AS (SOLL & TIEN 1998) zählen sie damit zu den kurzen Transitpeptiden .

Die reifen Lhca-Proteine sind durchschnittlich etwa 23 AS kürzer (~209 AS) als die reifen Lhcb-Proteine (~232 AS), dafür sind ihre Transitpeptide (~47 AS) im Vergleich zu denen der Lhcb-Proteine (~35 AS) etwa 12 AS länger. Die längsten Transitpeptide besitzen die Lhca4- (~50 AS) und Lhca2-Proteine (~49 AS), während die Lhcb4 Proteine mit ~31 AS die kürzesten Transitpeptide aufweisen. Die längsten reifen Proteinen gehören zur Gruppe der Lhcb4- (~259 AS) bzw. Lhcb5-Proteine (~246 AS) während die Lhca1- (~199 AS) und Lhca4-Proteine (~200 AS) zu den kürzesten Lichtsammelproteinen aus angiospermen Pflanzen zählen. Die Lhcb4-Proteine weisen am N-terminalen Ende vor dem Beginn der ersten transmembranen Helix eine Insertion von ~40 AS auf, die bei keinem anderen Typ von LHC-Proteinen aus angiospermen Pflanzen vorhanden ist (JANSSON 1994).

Die LHC-Proteine von Mono- und Dikotyledonen unterscheiden sich in der Länge ihrer Transitpeptidsequenzen. Mit Ausnahme der Gruppe der Lhcb3-Proteine sind die Transitpeptide von LHC-Proteinen der Monokotyledonen jeweils immer etwas bzw. deutlich kürzer als die der Dikotyledonen (vergl. Anhang A 5). Durchschnittlich beträgt ihre Länge ~36 AS (28-52 AS) gegenüber ~38 AS (29-58 AS) bei den dikotylen Spezies. Das kürzeste Transitpeptid (28 AS) findet sich ebenfalls bei einer monokotylen Spezies (b1.2\_O.sativa\_X13908), während das längste (58 AS) in einer dikotylen (a2\_L.esculentum\_M20241) zu beobachten ist.

**Tabelle 5-2** Durchschnittliche (MW ± STABW) Länge (Anzahl AS) von Transitpeptiden und reifen Proteinen innerhalb der einzelnen Gruppen von Lichtsammelproteinen aus angiospermen Pflanzen mit Angabe der jeweils verwendeten Grundgrößen (*n* Sequenzen/ aus *n* Spezies)

Gruppe		Transitpeptide	[n/n]	reife Proteine	[n/n]
<b>Lhca</b>	<b>Lhca1</b>	44.00 ± 1.31	7/5	199.43 ± 1.59	7/5
	<b>Lhca2</b>	49.30 ± 5.42	10/7	214.20 ± 3.31	10/7
	<b>Lhca3</b>	40.25 ± 0.43	4/3	233.25 ± 0.43	4/3
	<b>Lhca4</b>	49.60 ± 2.87	5/4	200.29 ± 0.70	7/6
	<b>gesamt</b>	46.54 ± 5.09	26/8	209.43 ± 11.63	28/8
	monokotyl	44.67 ± 3.90	6/3	205.14 ± 5.38	7/3
	dikotyl	47.10 ± 5.27	20/5	211.29 ± 12.93	21/5
	<b>Lhcb</b>	<b>Lhcb1</b>	33.50 ± 2.54	72/28	232.75 ± 1.98
<b>Lhcb2</b>		35.53 ± 0.85	16/11	229.00 ± 0.00	17/12
<b>Lhcb3</b>		42.75 ± 1.64	8/7	223.33 ± 0.75	6/6
<b>Lhcb4</b>		30.63 ± 1.32	8/4	258.86 ± 1.88	7/4
<b>Lhcb5</b>		37.33 ± 1.60	6/5	246.17 ± 2.27	6/5
<b>Lhcb6</b>		45.50 ± 4.50	6/5	210.50 ± 0.76	6/5
<b>gesamt</b>		35.12 ± 4.11	117/32	232.50 ± 9.31	115/32
monokotyl		33.09 ± 3.55	23/5	235.79 ± 10.90	24/5
dikotyl	35.52 ± 4.04	93/29	229.66 ± 20.93	90/28	
<b>alle Lhc</b>	<b>gesamt</b>	37.26 ± 6.20	142/35	227.99 ± 13.42	142/34
	monokotyl	35.48 ± 5.93	29/6	228.87 ± 16.21	31/6
	dikotyl	37.57 ± 6.16	113/29	227.78 ± 12.56	111/28

Bei einer Betrachtung der Übereinstimmungen bezogen auf die Anteile identischer AS innerhalb der einzelnen Typen von LHC-Proteinen (Tabelle 5-3) wird deutlich, daß die reifen Proteine grundsätzlich stärker (~42 % bis ~88 % identische AS) konserviert sind, als die Transitpeptide (~2 % bis 28 % identische AS). Gleichzeitig scheinen die Sequenzen der LHC-Proteine aus Monokotyledonen sowohl im Transitpeptid als auch im reifen Protein stärker konserviert zu sein als die AS-Sequenzen der Dikotyledonen. Bei gleichzeitiger Berücksichtigung der jeweils verwendeten Anzahl von Sequenzen bzw. Spezies trifft dies jedoch nicht zu. So ist der geringe Anteil identischer AS innerhalb der reifen Lhca2-Proteine aus Dikotyledonen (6.87 % identische AS in 10 Sequenzen aus 7 Spezies) gegenüber den

Monokotyledonen (39.63 % identische AS in 3 Sequenzen aus 3 Spezies) auf die erheblich höhere Anzahl der verglichenen Sequenzen bzw. Spezies zurückzuführen. Bei Betrachtung von Gruppen, bei denen jeweils die gleiche Anzahl Sequenzen aus der gleichen Anzahl Spezies verglichen wurde, zeigt sich kein Unterschied hinsichtlich des Anteils identischer AS (z.B. reife Lhca2-Proteine aus Monokotyledonen: 84.43 % mit n= 3/3 sowie reife Lhcb5-Proteine aus Dikotyledonen: 84.55 % mit n = 3/3). Deutlich ist allerdings die jeweils höhere Übereinstimmung innerhalb der Sequenzen aus Mono- bzw. Dikotyledonen für die einzelnen Typen von LHC-Proteinen im Vergleich zur Gesamtheit aller verfügbaren Sequenzen für die betreffende Gruppe.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß

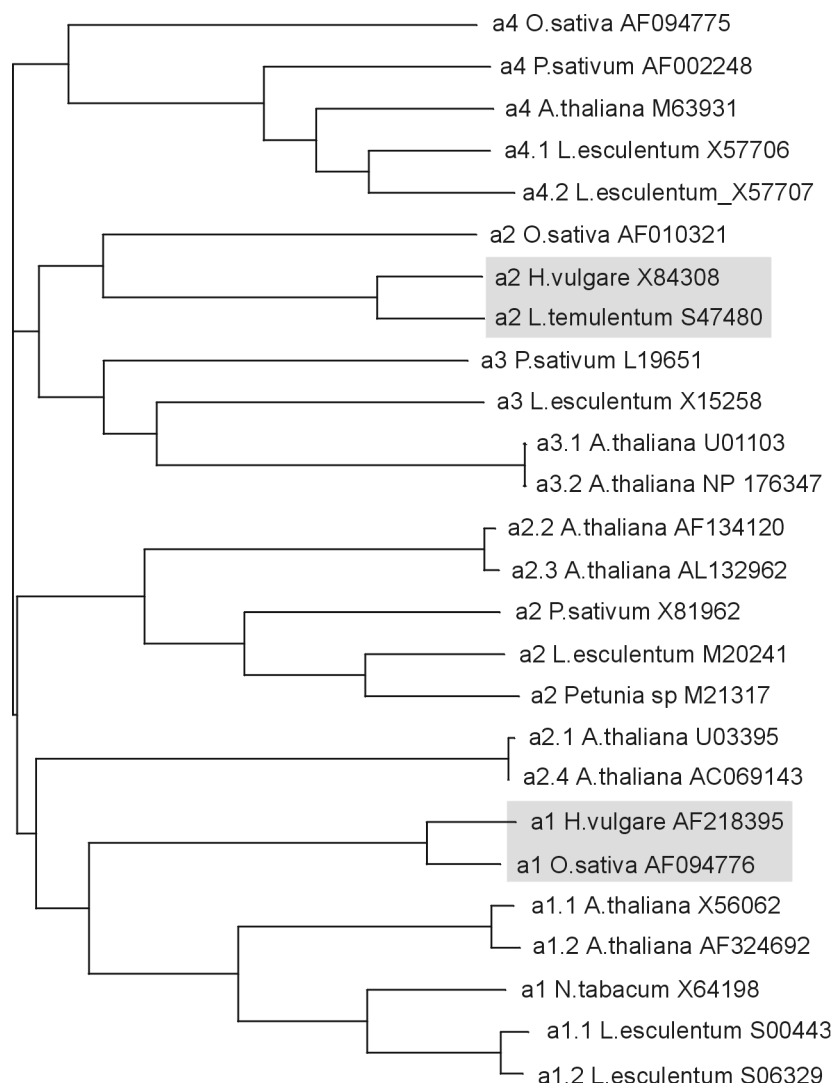
- die reifen Lhca-Proteine sowohl in Mono- als auch in Dikotyledonen durchschnittlich ~23 AS kürzer sind als die reifen Lhcb-Proteine,
- die Transitpeptide der Lhca-Proteine sowohl in Mono- als auch in Dikotyledonen durchschnittlich ~12 AS länger sind,
- der Anteil identischer AS sowohl im Transitpeptid als auch bei den reifen LHC-Proteinen mit steigender Anzahl der verglichenen Sequenzen bzw. Spezies abnimmt (bis auf ca. 42 % bei den reifen Lhcb1-Proteinen mit n = 72 Sequenzen / aus 28 Spezies),
- dabei aber keine Unterschiede hinsichtlich der Höhe der Konservierung zwischen Mono- und Dikotyledonen sowohl in den Transitpeptiden als auch in den reifen LHC-Proteinen festzustellen sind,
- die Sequenzen der reifen Proteine grundsätzlich stärker konserviert sind als die ihrer Transitpeptide (s. folgenden Abschnitt) und
- daß die Konservierung der Sequenzen innerhalb einer Gruppe bei getrennter Betrachtung von Mono- und Dikotyledonen jeweils höher ist, als bei Betrachtung der gesamten Gruppe.

**Tabelle 5-3** Vergleich der Anzahl identischer AS [%] in Transitpeptiden und reifen LHC-Proteinen monokotyler (m-kotyl) und dikotyler (d-kotyl) angiospermer Pflanzen (hinsichtlich der Anzahl der verwendeten Sequenzen und der Anzahl der Spezies vergl. Tabelle 4-1 sowie Anhang A 5).

Gruppe	Transitpeptide			reife Proteine		
	m-kotyl	d-kotyl	gesamt	m-kotyl	d-kotyl	gesamt
Lhca1	84.09	51.11	<b>24.44</b>	91.04	88.06	<b>75.12</b>
Lhca2	39.63	6.87	<b>1.72</b>	84.43	53.21	<b>47.71</b>
Lhca3	-	26.83	<b>26.83</b>	-	87.61	<b>87.61</b>
Lhca4	-	53.85	<b>21.15</b>	86.57	81.59	<b>74.13</b>
Lhcb1	16.67	4.54	<b>2.27</b>	63.90	55.56	<b>42.32</b>
Lhcb2	91.18	18.92	<b>10.81</b>	88.21	82.10	<b>74.67</b>
Lhcb3	-	36.96	<b>28.26</b>	-	81.78	<b>79.56</b>
Lhcb4	96.55	25.00	<b>25.00</b>	90.08	82.63	<b>77.10</b>
Lhcb5	88.89	57.50	<b>22.50</b>	86.00	84.55	<b>74.00</b>
Lhcb6	-	20.00	<b>10.00</b>	-	80.09	<b>72.04</b>

### 5.1.3 Die Sequenzen reifer LHC-Proteine aus angiospermen Pflanzen sind grundsätzlich stärker konserviert als die ihrer Transitpeptide

Im Vergleich der grafischen Darstellungen der berechneten Ähnlichkeiten für Transitpeptide und reife Proteine vom Lhca- sowie Lhcb-Typ wird deutlich, daß die Übereinstimmungen<sup>31</sup> innerhalb der reifen Proteine eines LHC-Typs (Abb. 5-3 und Abb. 5-5) grundsätzlich höher sind als innerhalb der Transitpeptide (Abb. 5-2 und Abb. 5-4). Dabei zeigen die verschiedenen Sequenzen für Proteine des gleichen Typs aus einer Spezies (z.B. Lhca2.2 und Lhca2.3 aus *Arabidopsis*) sowohl im Transitpeptid als auch im reifen Protein erwartungsgemäß hohe Übereinstimmungen. Während die reifen Lhca- und Lhcb-Proteine entsprechend ihrer Übereinstimmungen deutlich voneinander differenzierbare Gruppen mit geringen Distanzen innerhalb der einzelnen Gruppen bilden, zeigen die Transitpeptide generell eine größere Variabilität.



**Abb. 5-2** Vergleichende Darstellung der relativen Übereinstimmungen von 26 Transitpeptiden von Lhca-Proteinen aus 8 angiospermen Pflanzenspezies. Hervorgehoben sind Sequenzen mit einem Anteil identischer AS von >75 % (vergl. Tabelle 5-5 und Anhang A 5).

<sup>31</sup> dargestellt als horizontale Entfernungen zwischen einzelnen Spezies bzw. Gruppen



Diese ist überwiegend auf eine Variabilität innerhalb der jeweiligen Gruppen beschränkt, allerdings sind für zwei Transitpeptide unerwartete Übereinstimmungen mit Sequenzen aus anderen Gruppen zu beobachten: die Transitpeptide von Lhcb1 aus *Pyrus pyrifolia* (D00571) und Lhcb6 aus *Zea mays* (U23190) ähneln stärker den Lhcb4- bzw. Lhcb3-Transitpeptiden als denen ihrer eigenen Gruppe (Abb. 5-4). Gleichzeitig zeigen einzelne Paare von Transitpeptidsequenzen für LHC-Typen aus unterschiedlichen Spezies ungewöhnlich hohe Übereinstimmungen von >75 bis >90 % (in den Abb. 5-2 bis 5-5 hervorgehoben). Diese werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

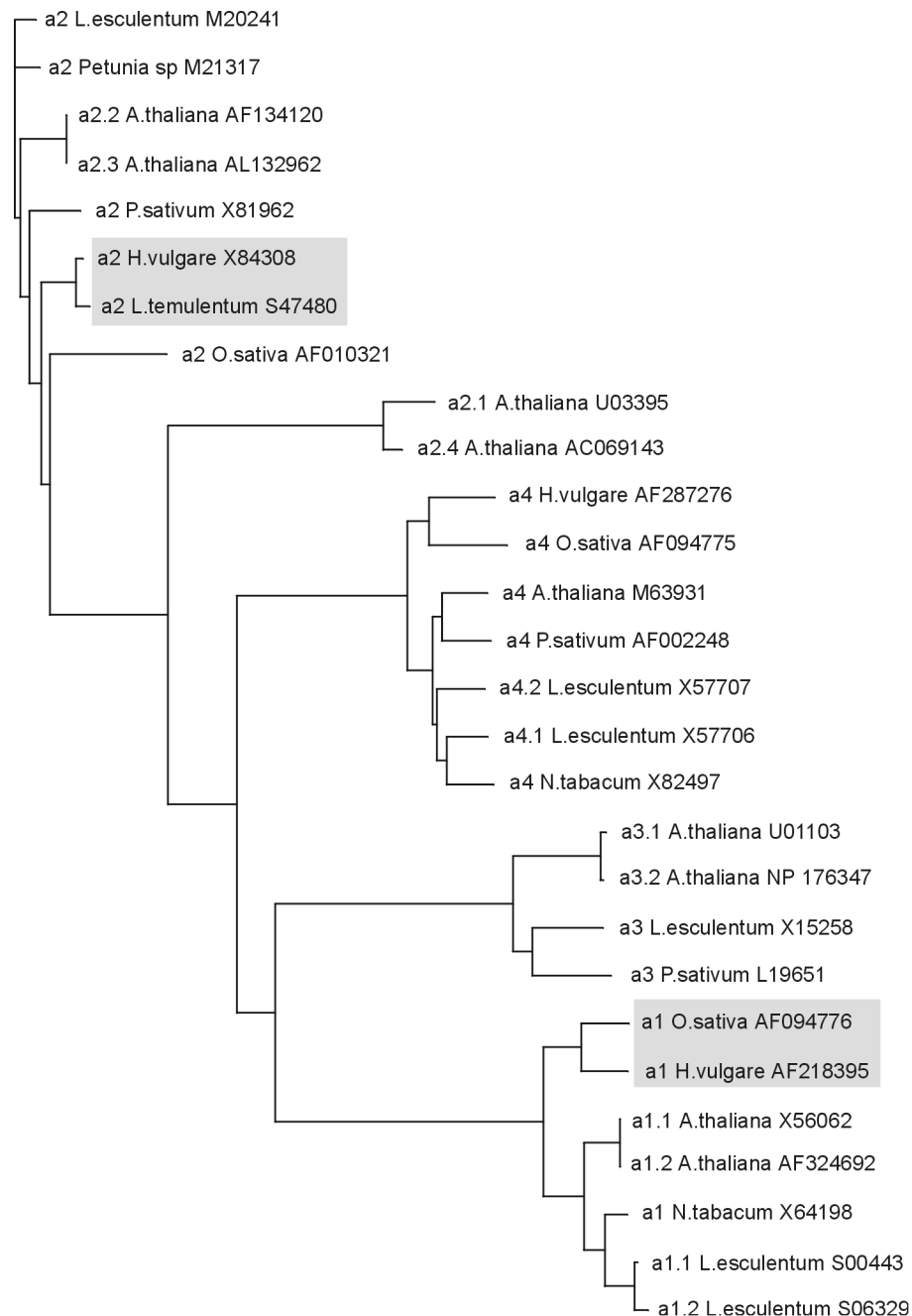
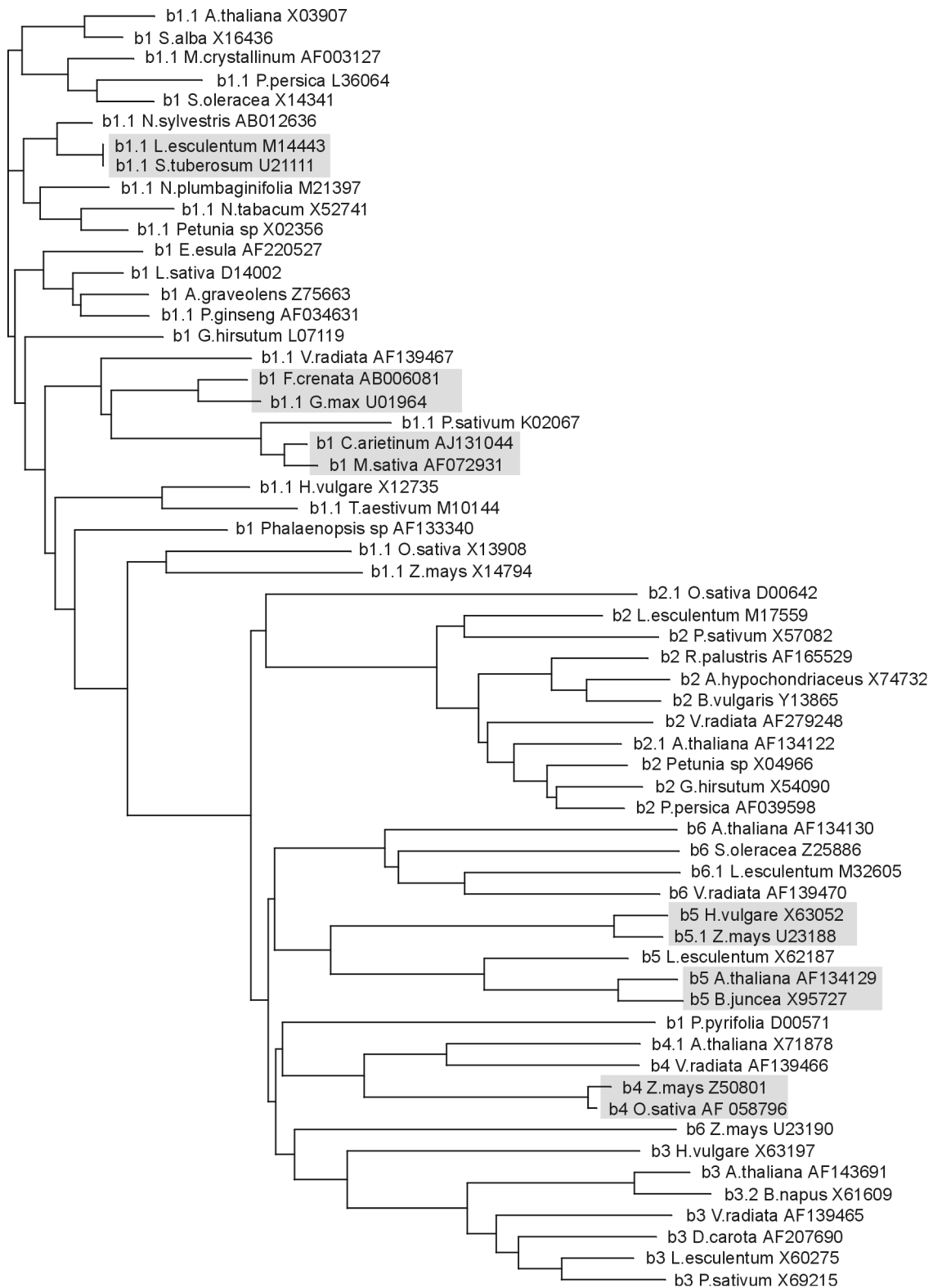
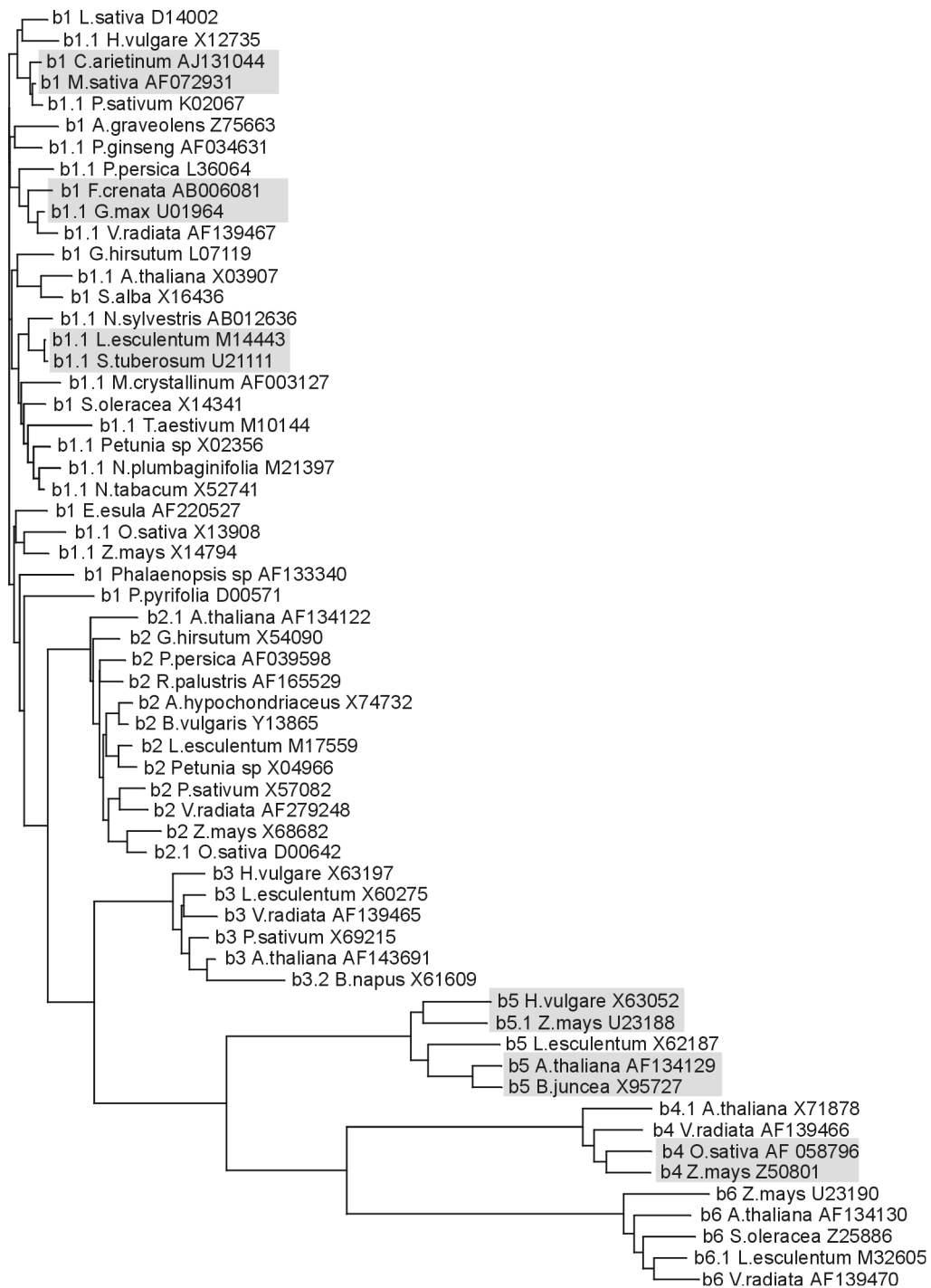


Abb. 5-3 Vergleichende Darstellung der relativen Übereinstimmungen von 28 reifen Lhca-Sequenzen von Lhca-Proteinen aus 8 angiospermen Pflanzenspezies. Hervorgehoben sind Sequenzen, deren Transitpeptide (vergl. Abb. 4-2) einen Anteil identischer AS von >75 % aufweisen (vergl. Tabelle 5-5 sowie Anhang A 5)



**Abb. 5-4** Vergleichende Darstellung der relativen Übereinstimmung von 60 Lhcb-Transitpeptidsequenzen aus 34 angiospermen Pflanzenspezies. Hervorgehoben sind Sequenzen mit einem Anteil identischer AS von >75 % (vergl. Tabelle 5-5 sowie Anhang A 5).



**Abb. 5-5** Vergleichende Darstellung der relativen Übereinstimmung von 60 reifen Lhcb-Proteinen aus 33 angiospermen Pflanzenspezies. Hervorgehoben sind Sequenzen, deren Transitpeptide (vergl. Abb. 4-4) einen Anteil identischer AS von >75 % aufweisen (vergl. Tabelle 5-5 sowie Anhang A 5).

### 5.1.4 Die Transitpeptide von Lhca1 aus Gerste und Reis sind auffallend ähnlich

Die vollständig ermittelte Transitpeptidsequenz für Lhca1 aus Gerste zeigt eine auffällige Ähnlichkeit mit dem Transitpeptid von Lhca1 aus Reis. Diese liegt mit einem Anteil identischer AS von 84.09 % (Abb. 5-6 **B**) deutlich über der Übereinstimmung sowohl aller Transitpeptide sämtlicher verglichener Lhca1-Sequenzen (24.44 % identische AS; Abb. 5-6 **A**) als auch über dem Anteil identischer AS in Lhca1-Transitpeptiden vergleichbar nahe verwandter Spezies wie z.B. Tomate und Tabak (73.33 % identische AS; Abb. 5-6 **C**). Diese Ähnlichkeit korreliert nicht mit den Übereinstimmungen innerhalb der jeweiligen reifen Proteine (Tabelle 5-4). Der Anteil identischer AS der reifen Lhca1-Proteine von Gerste und Reis ist mit 91.04 % etwas geringer als bei vergleichbar verwandten Spezies wie Tabak und Tomate (93.03 % identische AS). Gleichzeitig ist der Anteil identischer AS im Transitpeptid mit 84.09 % erheblich höher als bei Tabak und Tomate (73.33 % identische AS) und liegt damit etwa 15 % höher als es die Übereinstimmung im reifen Protein im Vergleich zu Tabak und Tomate erwarten ließe (71.76 %).

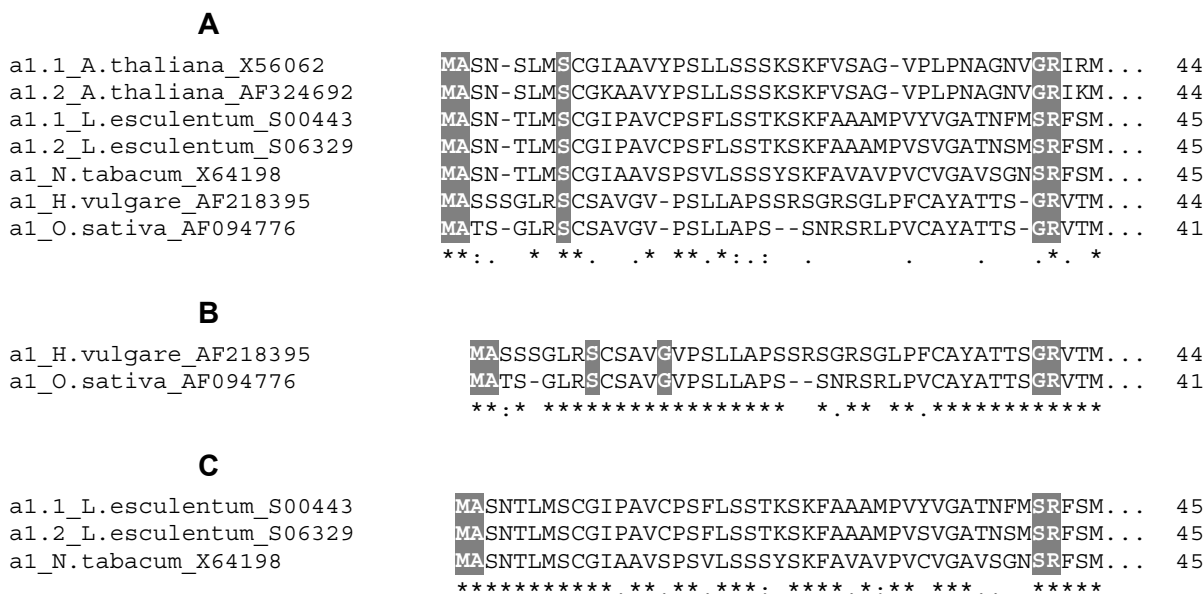
**Tabelle 5-4** Identische AS in den verglichenen Lhca1- und Lhca4-Proteinsequenzen angiospermer Pflanzen (Anhang A 5). Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl identischer AS sowie der prozentuale Anteil bezogen auf die jeweils längste Sequenz im Vergleich.

verglichene Sequenzen		Transitpeptid		reifes Protein	
		AS	%	AS	%
<b>Lhca1</b>	sämtliche Lhca1	11/45	24.44	151/201	75.12
	<i>H. vulgare</i> / <i>O. sativa</i>	39/44	84.09	183/201	91.04
	<i>L. esculentum</i> / <i>N. tabacum</i>	33/45	73.33	189/201	93.03
<b>Lhca4</b>	sämtliche Lhca4	11/52	21.15	149/201	74.13
	<i>H. vulgare</i> / <i>O. sativa</i>	12/44	27.27	175/201	87.06
	<i>P. sativum</i> / <i>A. thaliana</i>	33/52	63.46	181/201	90.05
	<i>L. esculentum</i> / <i>N. tabacum</i>	n.v.	-	173/202	86.14

Für die Lhca4-Proteine konnte in einem Vergleich von 5 Transitpeptidsequenzen aus 4 Spezies eine derartig auffällige Ähnlichkeit nicht beobachtet werden. Mit einem Anteil identischer AS innerhalb der Transitpeptide von 21.15 % (Abb. 5-7 **A**) ist ihre Ähnlichkeit insgesamt generell etwas niedriger als die der untersuchten Lhca1-Transitpeptide (24.44 % identische AS) was mit der ebenfalls leicht niedrigeren Übereinstimmung der reifen Lhca4-Proteine untereinander von 74.13 % (gegenüber 75.12 % für die Lhca1-Proteine; vergl. Tabelle 5-4) korreliert. Die Transitpeptidsequenz für Lhca4 aus Gerste konnte zwar nicht vollständig aufgeklärt werden, ein Vergleich der aufgeklärten Teilsequenz (27 AS) mit dem Transitpeptid von Lhca4 aus Reis läßt allerdings keine ungewöhnliche Übereinstimmung erwarten. Voraussichtlich liegt diese noch unterhalb der Übereinstimmung (63.46 % identische AS) von Erbse (*P. sativum*) und *Arabidopsis* (Abb. 5-7 **C**).

Außer den Lhca1-Transitpeptiden aus Gerste und Reis zeigt nur ein weiteres Paar von Lhca-Proteinen des gleichen Typs aus unterschiedlichen Spezies (Lhca2 aus Gerste und Taumellolch, *Lolium temulentum*) eine Übereinstimmung von >75 % (in Abb. 4-2 hervor-

gehoben). Diese Ähnlichkeit korreliert aber nicht mit der Übereinstimmung für die reifen Proteine (vergl. Abb. 4-3). Die beinahe identische AS-Sequenz der reifen Lhca2-Proteine der beiden Poaceen Gerste und *L. temulentum* (98.58 % Übereinstimmung) ließe eigentlich eine entsprechend hohe Ähnlichkeit für die Transitpeptide erwarten. Deren Ähnlichkeit ist mit einer Übereinstimmung von 81.82 % zwar hoch, liegt aber immer noch unterhalb der Übereinstimmung der Lhca1-Transitpeptide von Gerste und Reis von 84.09 %, die damit innerhalb aller verglichenen Lhca-Transitpeptide die höchste Übereinstimmung aufweisen.



**Abb. 5-6** Identische (\*), konservierte (:) und semikonservierte (.) AS innerhalb der Transitpeptide (Anhang A 4) für (A) sämtliche verglichene Lhca1-Proteine, (B) von Gerste (*H. vulgare*) und Reis (*O. sativa*) (C) sowie von Tomate (*L. esculentum*) und Tabak (*N. tabacum*); konserviertes Motiv (vergl. Abschnitt 4.1.6) markiert.



**Abb. 5-7** Identische (\*), konservierte (:) und semikonservierte (.) AS innerhalb der Transitpeptide (s. Anhang A 4) für (A) sämtliche verglichene Lhca4-Proteine, (B) der Sequenzen aus Gerste (*H. vulgare*) und Reis (*O. sativa*) sowie (C) Erbse (*P. sativum*) und *Arabidopsis* (*A. thaliana*); konserviertes Motiv (vergl. Abschnitt 4.1.6) markiert.

### 5.1.5 Die Transitpeptide einiger Typen von Lhcb-Proteinen sind in Monokotyledonen stärker konserviert als die Sequenzen ihrer reifen Proteine

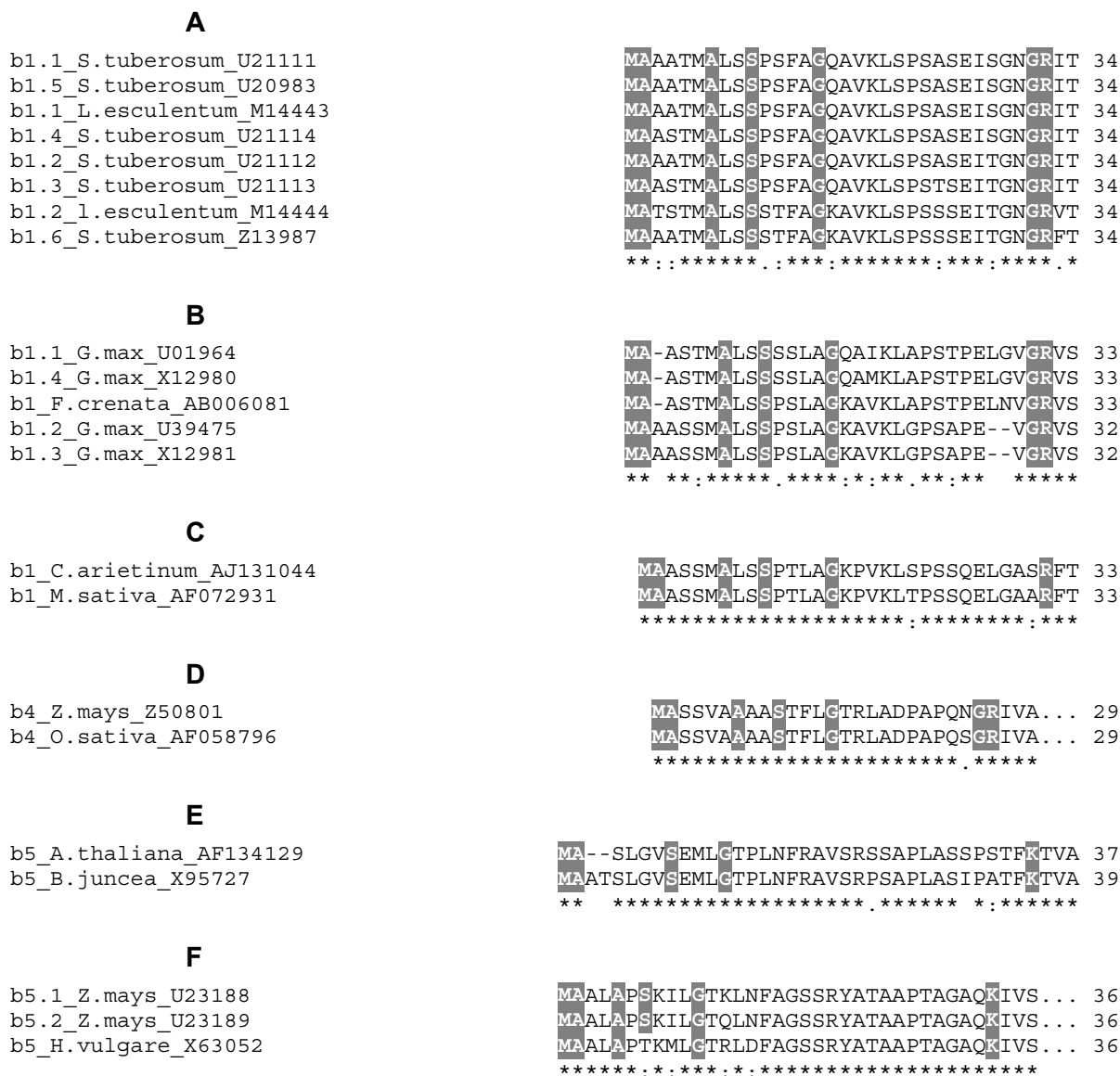
Die für die Lhca-Proteine gezeigte grundsätzlich stärkere Konservierung der reifen Proteine gegenüber den Transitpeptiden ist auch in einem Vergleich der verfügbaren Sequenzen für Lhcb-Proteine angiospermer Pflanzen festzustellen. Davon abweichend wurden allerdings sechs weitere Paare von Transitpeptiden des gleichen Lhcb-Typs in unterschiedlichen Spezies identifiziert, deren Übereinstimmung größer als 75 % ist (Tabelle 5-5).

**Tabelle 5-5** Paare von Lhcb-Proteinen mit ungewöhnlich hoher Übereinstimmung in der AS-Sequenz im Transitpeptid. Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl identischer AS sowie der prozentuale Anteil bezogen auf die jeweils längste Sequenz im Vergleich.

verglichene Sequenzen		Transitpeptid		reifes Protein	
		AS	%	AS	%
<b>Lhcb1</b>	sämtliche Lhcb1	1/44	2.27	102/241	42.32
	<i>L. esculentum</i> / <i>S. tuberosum</i>	26/34	76.47	210/233	90.13
	<i>F. crenata</i> / <i>G. max</i>	25/33	75.76	202/231	87.45
	<i>C. arietinum</i> / <i>M. sativa</i>	31/33	93.94	231/233	99.14
<b>Lhcb4</b>	sämtliche Lhcb4	8/32	25.00	202/262	77.10
	<i>Z. mays</i> / <i>O. sativa</i>	28/29	96.55	236/262	90.08
<b>Lhcb5</b>	sämtliche Lhcb5	9/40	22.50	185/250	74.00
	<i>H. vulgare</i> / <i>Z. mays</i>	32/36	88.89	215/250	86.00
	<i>A. thaliana</i> / <i>B. juncea</i>	34/39	87.18	229/245	93.47

Für die Transitpeptide von Lhcb1 aus *L. esculentum* / *S. tuberosum* (Abb. 5-8 **A**), *F. crenata* / *G. max* (Abb. 5-8 **B**) und *C. arietinum* / *M. sativa* (Abb. 5-8 **C**) sowie Lhcb5 aus *A. thaliana* / *B. juncea* (Abb. 5-8 **D**) korreliert diese hohe Übereinstimmung mit der Übereinstimmung der reifen Proteine. Für Lhcb5 aus *Z. mays* und *H. vulgare* (Abb. 5-8 **E**) sowie Lhcb4 aus *Z. mays* und *O. sativa* (Abb. 5-8 **F**) trifft dies allerdings nicht zu. Die Übereinstimmungen der entsprechenden reifen Proteine liegen jeweils unterhalb der Übereinstimmungen der korrespondierenden Transitpeptide (Tabelle 5-5). Damit sind diese Transitpeptide offensichtlich stärker konserviert als ihre jeweiligen reifen Proteine. Bei beiden identifizierten Paaren mit überdurchschnittlichen Übereinstimmungen innerhalb der Transitpeptide von LHC-Proteinen des gleichen Typs in unterschiedlichen Spezies handelt es sich um LHC-Proteine aus Monokotyledonen.

Die Übereinstimmungen zwischen den beiden inneren PSII-Antennen Lhcb4 (CP29) und Lhcb6 (CP24) mit den Lhca-Proteinen deuten auf eine frühe Entwicklung der inneren LHCII-Antennen aus LHCI-Proteinen hin (DURNFORD et al. 1999). Dies könnte eine mögliche Erklärung für Gemeinsamkeiten mit den übereinstimmenden Lhca1-Transitpeptiden aus Gerste und Reis sein. Allerdings ist eine hohe Übereinstimmung der Transitpeptide kein gemeinsames Merkmal aller Lhca-Proteine (vergl. Tabelle 5-3). Die Frage, warum die Transitpeptide dieser Proteine im Verlauf der phylogenetischen Entwicklung kaum verändert worden sind, während sich die reifen Proteine in den einzelnen Spezies deutlich differenziert haben, kann damit nicht abschließend beantwortet werden.

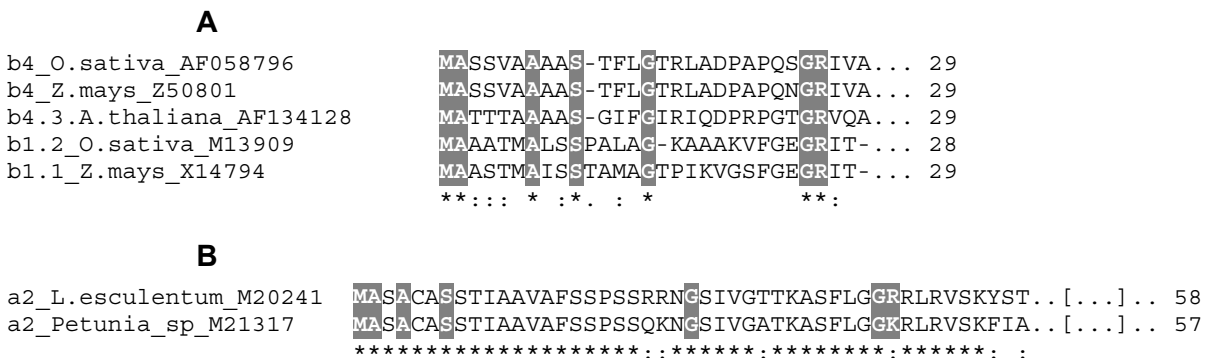


**Abb. 5-8** Identische (\*), konservierte (:) und semikonservierte (.) AS innerhalb der Transitpeptide von Lhcb1-Sequenzen aus (A) Tomate (*L. esculentum*) und Kartoffel (*S. tuberosum*), (B) jap. Rotbuche (*F. crenata*) und Sojabohne (*G. max*) sowie (C) Kichererbse (*C. arietinum*) und Alfalfa (*M. sativa*), (D) Lhcb4-Sequenzen aus Reis (*O. sativa*) und Mais (*Z. mays*), Lhcb5-Sequenzen aus (E) *Arabidopsis* (*A. thaliana*) und Sareptasenf (*B. juncea*) sowie (F) aus Gerste (*H. vulgare*) und Mais (*Z. mays*); konserviertes Motiv (vergl. Abschnitt 4.1.6) markiert.

### 5.1.6 In einem Vergleich der kürzesten LHC-Transitpeptide läßt sich ein konserviertes Motiv identifizieren, das auch in den übrigen LHC-Transitpeptiden vollständig oder teilweise konserviert ist

Die 5 kürzesten Transitpeptide der verglichenen Sequenzen aus 4 mono- und 1 dikotylen Spezies weisen eine Länge von 28-29 AS auf. Eine minimale Länge von 28 AS ist offensichtlich für die Vermittlung des Transfers beim Import über die Chloroplastenhüllmembran ausreichend. Im Vergleich der kürzesten Transitpeptide untereinander (Abb. 5-9 **A**) lassen sich 7 konservierte AS identifizieren. Dieser Anteil konservierter AS ist mit ~24 % nicht sehr hoch und läßt vermuten, daß die Reduktion auf ein minimal funktionelles Transitpeptid in einzelnen Spezies bzw. für einzelne Typen von LHC-Proteinen unabhängig erfolgt ist.

Die ersten beiden der 7 konservierten AS (MA) sind nach BRUCE (2000) in allen cp-Transitpeptiden konserviert. Abweichend hiervon weisen von den in dieser Arbeit untersuchten 142 LHC-Transitpeptiden allerdings fünf Sequenzen (1) ein Threonin (T; b1.8\_N.sylvestris\_AB012640, b1.5\_N.tabacum\_X58229 und b6.2\_L.esculentum\_M32606), (2) ein Glycin (G; b2.1\_A.thaliana\_AF134122) oder (3) ein Lysin (L; a2\_O.sativa\_AF010321) in der 2. Position auf. Damit ist diese Position offensichtlich nicht in allen cp-Transitpeptiden konserviert.



**Abb. 5-9** Konservierte AS innerhalb (**A**) der 5 kürzesten Transitpeptide und (**B**) der beiden längsten Transitpeptide aus angiospermen Pflanzen (vergl. Anhang A 4); Schnittstelle für das Transitpeptid innerhalb der Lhcb4-Sequenzen nach BERGANTINO et al. (1998).

Das konservierte Motiv läßt sich auch in einem Vergleich der beiden längsten Transitpeptide (Abb. 5-9 **B**) identifizieren. Innerhalb der Sequenz von a2\_Petunia\_sp\_M21317 ist Arginin (R) allerdings in einer konservativen Substitution gegen Lysin (K) ausgetauscht (s.u.). Das Motiv ist weiterhin in 64 (8 mono-/56 dikotylen) der untersuchten 142 (29 mono-/113 dikotylen) Transitpeptidsequenzen vollständig und in weiteren 31 (4 mono-/27 dikotylen) mit jeweils einer konservativen Substitution vorhanden.

In allen übrigen Sequenzen sind jeweils mindestens 4 der 7 AS dieses Motivs konserviert. Die Konservierung ist in den Lhcb-Sequenzen deutlicher (60/116 vollständig konservierte, 27/116 mit einer konservativen Substitution) als in den Lhca-Sequenzen (4/26 vollständig konservierte, 4/26 mit einer konservativen Substitution).

Bei einem Vergleich aller Transitpeptide hinsichtlich der Verteilung geladener und ungeladener AS läßt sich unmittelbar vor der Schnittstelle zum reifen Protein gelegenen Abschnitt des Transitpeptids (1-5 AS) eine positiv geladene AS (Arginin bzw. Lysin) innerhalb des

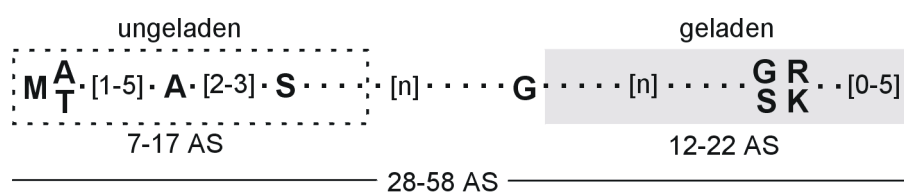


beschriebenen Motivs identifizieren, die in allen 142 untersuchten Transitpeptidsequenzen angiospermer Pflanzen vollständig konserviert ist.

Während das N-terminale Drittel aller Sequenzen keine oder nur vereinzelt<sup>32</sup> geladene AS enthält, finden sich im C-terminalen Drittel 2 bis 3 weitere positiv geladene AS (Lysin und Arginin) sowie 1 bis 2 (vereinzelt bis 3) negativ geladene (Glutamin- und Asparaginsäure), die allerdings nicht nach einem erkennbaren Motiv angeordnet sind. Innerhalb von Transitpeptiden eines einzelnen LHC-Typs ist ihre Lage jedoch jeweils sehr stark konserviert. Zwischen Transitpeptiden aus Mono- und Dikotyledonen sind hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens negativ geladener AS keine Unterschiede festzustellen.

Das von WAEGEMANN & SOLL (1996) identifizierte Phosphorylierungsmotiv (vergl. Abschnitt 1.4.2) lässt sich nicht in allen untersuchten LHC-Sequenzen eindeutig identifizieren. Aufgrund des variablen Abstands der 4 AS-Domänen des Motivs (vergl. Abb. 1-15) und des generell hohen Anteils an Serin und Threonin im Transitpeptid ist die exakte Identifikation der Position der einzelnen AS darüber hinaus nicht immer möglich.

Das Modell, nach dem Transitpeptide generell drei konservierte Domänen (*homology blocks*) enthalten (KARLIN-NEUMANN & TOBIN 1986), beschreibt die heute bekannten Transitpeptide nicht mehr hinreichend (BRUCE 2000). Homologe Regionen und funktionale Übereinstimmungen werden lediglich für Teilgruppen erwartet. Möglicherweise bilden die LHC-Transitpeptide eine der von BRUCE (2000) postulierten „Subgruppen“ von cp-Transitpeptiden. Auf der Basis der hier ausgewerteten Sequenzen lässt sich der Aufbau der Transitpeptide für LHC-Proteine angiospermer Pflanzen nach folgendem Modell beschreiben (Abb. 5-10). Dieses weist eine Reihe von Übereinstimmungen mit den bisherigen Modellen auf: einem ungeladenen N-terminalen Abschnitt folgt eine mittlere Region mit zahlreichen Serinen und Threoninen. Der C-Terminus enthält mehrere geladene AS, von denen eine unmittelbar vor der Schnittstelle konserviert ist (Arginin oder Lysin).



**Abb. 5-10** Modell für LHC-Transitpeptide angiospermer Pflanzen auf der Basis von 142 ausgewerteten Sequenzen (Anhang A 4).

<sup>32</sup> bei den Lhca3-Transitpeptiden aus Tomate sowie bei den Lhcb5-Transitpeptiden der Dikotylen

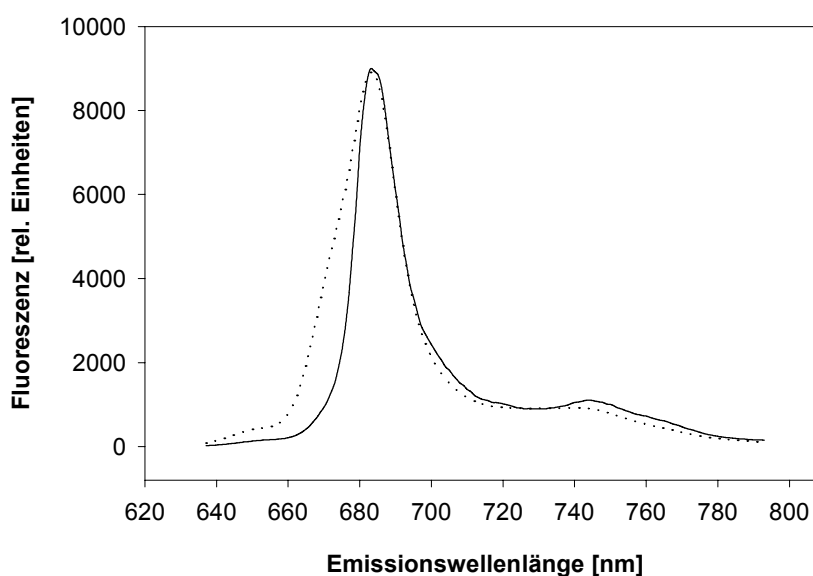
## 5.2 Rekonstitution von LHC-Komplexen

In der vorliegenden Arbeit konnte das Lhca1-Protein der Gerste in *E. coli* (JM101) über-exprimiert und mit Pigmentextrakten aus Gerste und Tomate *in vitro* rekonstituiert werden. Dieser Lhca1-Monomer zeigt hinsichtlich seiner spektroskopischen Eigenschaften hohe Übereinstimmungen zum rekonstituierten Lhca1-Monomer aus Tomate.

Durch die *in vitro* Rekonstitution eines LHCl-730-Komplexes mit Proteinen aus Gerste (monokotyl) und Tomate (dikotyl) konnte die funktionelle Interaktion von Lhca1- und Lhca4-Proteinen aus unterschiedlichen Spezies erstmals experimentell gezeigt werden. Diese rekonstituierten Komplexe sind ausreichend stabil, so daß sie durch nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese bzw. Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden können, was auf die spezifische und stabile Interaktion der beiden Proteine hinweist.

### 5.2.1 Die rekonstituierten Lhca1-Monomere aus Gerste und Tomate weisen leichte Unterschiede auf

Ein Vergleich des gemittelten Fluoreszenzspektrums für 10 rekonstituierte *rLhca1*-Monomere aus Gerste mit dem Spektrum rekonstituierter *rLhca1* aus Tomate (Abb. 5-11) zeigt nur geringe Unterschiede. Im Vergleich zu den besser übereinstimmenden Spektren für die Dimere (Abb. 5-12) ist das Spektrum für *rLhca1* aus Gerste zwischen 660 und 680 nm gegenüber dem *rLhca1*-Spektrum aus Tomate deutlich verbreitert. Dies könnte auf eine abweichende Orientierung der gebundenen Chl *a*-Moleküle im Gersten- und Tomaten-Monomer zurückzuführen sein. Das Maximum für beide Komplexe ist nahezu identisch (*rLhca1* Gerste: 684 nm, *rLhca1* Tomate: 683 nm). Im weiteren Verlauf stimmen die Spektren sehr gut überein und belegen damit eine weitreichende strukturelle Übereinstimmung der beiden Komplexe.

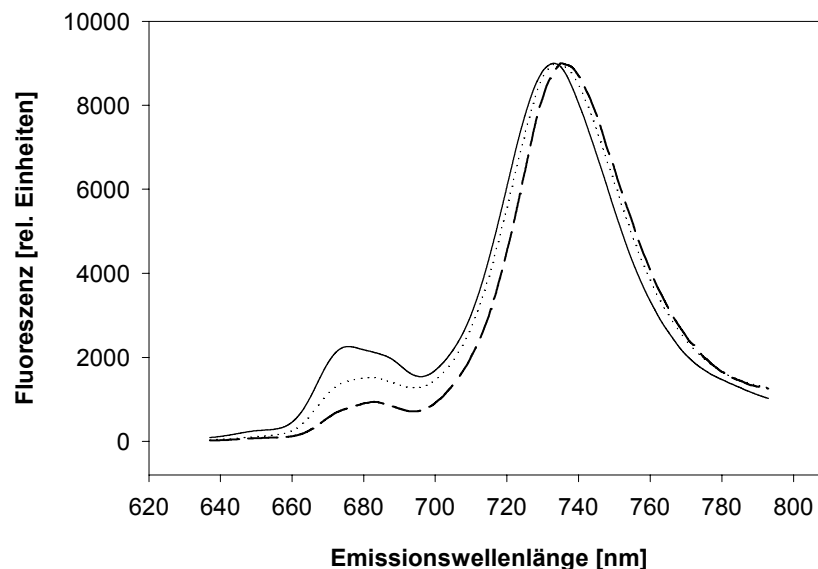


**Abb. 5-11** Vergleich der Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektren rekonstituierter Lhca1-Monomere aus Tomate (—) und Gerste (-----) nach Anregung bei 440 nm.

### 5.2.2 Die rekonstituierten heterologen Dimere (Gerste/Tomate) sind vergleichbar mit nativen oder rekonstituierten LHCI-730-Komplexen aus Tomate

Die Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektren der Heterodimere aus *rLhca1* (Gerste) und *rLhca4* (Tomate) nach Anregung bei 440 nm entsprechen den Fluoreszenzemissionsspektren nativer sowie rekonstituierter LHCI-730 aus Tomate (Abb. 5-12). Dies gilt sowohl für den Kurvenverlauf von 700-790 nm, als auch insbesondere für die Lage der Emissionsmaxima, die ein Indiz für die funktionelle Bindung und Orientierung der langwellig fluoreszierenden Chlorophylle im Dimer darstellen. Die ermittelten Emissionsmaxima mit 733 nm für den nativen LHCI-730 aus Tomate und den rekonstituierten Heterodimer bzw. 734 nm für den rekonstituierten Tomaten-LHCI-730 liegen dicht beieinander. Die energetische Kopplung von Chl *a* und Chl *b*<sup>33</sup> ist anhand der höheren Fluoreszenz im Bereich von 660-700 nm zwar als etwas schlechter zu bewerten als im nativen LHCI-730 aus Tomate, insgesamt jedoch läßt sich aus den ermittelten Fluoreszenzemissionsspektren eine mit nativen und homolog rekonstituierten Komplexen vergleichbare molekulare Interaktion von Lhca1 und Lhca4 im Heterodimer ableiten.

Gleichzeitig entsprechen die bestimmten Chl *a/b*-Verhältnisse für den Heterodimer mit  $2.57 \pm 0.31$  sowohl denen nativer ( $2.57 \pm 0.06$ ) als auch rekonstituierter ( $2.48 \pm 0.07$ ) LHCI-730 aus Tomate. Damit entspricht der rekonstituierte Heterodimer mit Proteinen aus Gerste und Tomate annähernd dem nativen bzw. rekonstituierten LHCI-730 aus Tomate. Es ist daher zu vermuten, daß die für die Dimerbildung zugrundeliegenden molekularen Interaktionen in den verglichenen Komplexen sehr ähnlich und daher im Verlauf der phylogenetischen Entwicklung sowohl bei Mono- als auch bei Dikotyledonen konserviert worden sind.



**Abb. 5-12** Vergleich der Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektren nativer (.....) und rekonstituierter (- -) LHCI-730 aus Tomate sowie der Heterodimere (—) aus *rLhca1* (Gerste) und *rLhca4* (Tomate) nach Anregung bei 440 nm.

<sup>33</sup> gemessen als Chl *a*-Fluoreszenz nach Anregung von Chl *b* bei 470 nm (vergl. Abb. 4-13)

### 5.2.3 Rekonstituierte Monomere und Heterodimere des LHCI binden im Vergleich zu nativen PSI-200-Komplexen weniger Pigmente als erwartet

Die ermittelten Chl *a/b*-Verhältnisse für die Monomere (*rLhca1* aus Gerste) und Heterodimere (*rLhca1* aus Gerste/*rLhca4* aus Tomate) stimmen unter Berücksichtigung der Standardabweichungen mit den für rekonstituierte *Lhca1*-Monomere und LHCI-730-Komplexe von Tomate bestimmten Werten überein (SCHMID et al. 1997; vergl. Abschnitt 4.4). Unter der Annahme, daß die für rekonstituierte LHCI-730 bzw. *Lhca1*- und *Lhca4*-Monomere aus Tomate bestimmten Chlorophyll/Protein-Verhältnisse (Tabelle 5-6) damit ebenfalls vergleichbar sind, bindet ein rekonstituierter *Lhca*-Monomer 5-6 Chlorophylle und ein rekonstituierter LHCI-730-Dimer entsprechend 12-14 Chlorophylle. Dies könnte unter der Voraussetzung, daß ein einzelnes Protein jeweils ganzzahlige Mengen von Pigmenten bindet, bei den gegebenen Chl *a/b*-Verhältnissen auf eine heterogene Population von rekonstituierten *Lhca1*-Monomeren von ca. 70 % (Monomere mit 4 Chl *a* : 2 Chl *b*) zu 30 % (Monomere mit 3 Chl *a* : 2 Chl *b*) hinweisen.

**Tabelle 5-6** Übersicht über Chl *a/b*- bzw. Chl/Protein-Verhältnisse rekonstituierter (r) und nativer (n) LHC-Proteine bzw. -Komplexe nach <sup>1</sup> SCHMID et al. 1997, <sup>2</sup> RUPPRECHT et al. 2000, <sup>3</sup> SCHMID et al. 2001; \* bezogen auf einen Protein-Monomer, n.d. = nicht bestimmt.

rekonstituierte(s) Protein(e)	Protein(e) aus	Chl <i>a/b</i> [mol/mol]	Chl/Protein* [mol/mol]	Referenz
<i>n</i> LHCI-730	Tomate	2.57 ± 0.06	7.17 ± 0.13	1
<i>r</i> LHCI-730	Tomate	2.48 ± 0.07	6.90 ± 0.24	1
<i>r</i> LHCI-730	Gerste/Tomate	2.57 ± 0.31	n.d.	diese Arbeit
<i>rLhca1</i>	Tomate	3.29 ± 0.06	5.24 ± 0.11	1
<i>rLhca1</i>	Tomate	3.29 ± 0.09	n.d.	2
<i>rLhca1</i>	Gerste	3.68 ± 0.59	n.d.	diese Arbeit
<i>rLhca4</i>	Tomate	2.52 ± 0.11	5.27 ± 0.34	1
<i>rLhca4</i>	Tomate	2.60 ± 0.06	n.d.	2
<i>rLhca4</i>	Tomate	2.41 ± 0.34	6.17 ± 0.48	3

Isolierte native PSI-200-Komplexe weisen regelmäßig ~200 Chl *a* + *b* je P700 auf. Von diesen können in der Kristallstruktur des cyanobakteriellen PSI 96 (Chl *a*) im Kernkomplex lokalisiert werden (FROMME et al. 2001). Diese Zahl wird ebenfalls in spektroskopischen Untersuchungen ermittelt (FLEMMING 1996). Damit sollte der gesamte LHCI ca. 100 Chlorophylle (*a* + *b*) binden. Der LHCI von PSI-200-Komplexen besteht aus 8 Proteinuntereinheiten (BOEKEMA et al. 2001). Auf der Basis der für isolierte native LHCI-730 bzw. rekonstituierte Monomere und Dimere ermittelten Chl/Protein-Verhältnisse (Tabelle 5-6) binden diese 8 Proteine jedoch lediglich ~50 Chlorophylle. Damit werden ca. 25 % aller von PSI-200 gebundenen Chlorophylle bei der Präparation von Kernkomplexen und Antennen selektiv verloren, was durch quantitative Pigmentanalysen bestätigt wird (DAMM et al. 1990). Diese Chlorophylle können auch in Rekonstitutionen von LHCI-Proteinen nicht dem *in vivo*-Zustand des LHCI (d.h. im Kontakt mit dem PSI-Kern) entsprechend gebunden werden.

Die weitreichenden Übereinstimmungen isolierter und rekonstituierter LHC-Komplexe hinsichtlich Chl *a/b*-Verhältnissen, Pigmentmustern und Pigment/Protein-Verhältnissen müßten

daher möglicherweise dahingehend interpretiert werden, daß die von diesen Proteinen gebundenen Pigmente lediglich mit Bindestellen assoziiert sind, die ihre Kompetenz zur Pigmentbindung während der Separierung von LHCI und PSI-Kern nicht verlieren und auch in rekonstituierten Proteinen unabhängig von der Interaktion des LHCI mit dem PSI-Kern ausbilden können. Die bei der Fraktionierung von PSI-200-Komplexen verlorenen Pigmente wären dann von Bindestellen koordiniert, die erst in der Interaktion der LHCI-Proteinen sowohl (a) untereinander als auch (b) mit dem Kernkomplex ihre Kompetenz zur Pigmentbindung ausbilden. Dies könnte beispielsweise durch eine Konformationsveränderung der LHCI-Proteine bei Kontakt mit dem PSI-Kern vermittelt werden.

Für die minoren *cab*-Proteine Lhcb4-6 ist ein molekularer Mechanismus beschrieben worden, bei dem über eine Protonierung eine Konformationsänderung des Proteins induziert wird, die eine Veränderung einer Chlorophyll-Bindung bewirkt (CROFTS & YERKES 1994). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch bei der Interaktion der LHCI-Proteine mit dem PSI-Kern den Zugang zu Chlorophyll-Bindestellen bewirken, die in den isolierten Komplexen keine Bindungskompetenz besitzen. Durch ähnliche Effekte wird möglicherweise die bei der Dimerisierung der Proteine Lhca1 und Lhca4 zum LHCI-730 beschriebene zusätzliche Bindung von Chl *b* vermittelt (SCHMID et al. 1997).

Durch Untersuchungen an Lhca2- und Lhca3-*Antisense*mutanten von *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, daß mit der selektiven Deletion von Lhca2- bzw. Lhca3-Proteinen (bei gleichbleibenden Gehalten an Lhca1 und Lhca4) eine deutliche Verminderung der 730 nm-Fluoreszenz beobachtet wird (GANETEG et al. 2001). Dies unterstützt Vermutungen, nach denen die für die Charakterisierung isolierter Lhca2/Lhca3-Proteine verwendete Fluoreszenz bei 680 nm bereits auf eine Abweichung vom *in vivo*-Zustand zurückzuführen ist (GANETEG et al. 2001; IHALAINEN et al. 2000). Während für Lhca4 gezeigt werden konnte, daß dieses Protein Chlorophyll(e) bindet, die bereits im Monomer deutlich langwellig fluoreszieren (SCHMID et al. 1997), ist dies für Lhca2- und Lhca3-Monomere bzw. -Dimere bisher nicht beobachtet worden - obwohl kürzlich im isolierten LHCI-680 ein Chlorophyll-Dimer mit einer langwelligen Fluoreszenz bei 702 nm identifiziert worden ist (IHALAINEN et al. 2000). Bisher liegen auch keine spektroskopischen Daten für rekonstituierte Lhca2- und Lhca3- Proteine vor. Es ist allerdings zu vermuten, daß solche rekonstituierten Monomere oder Dimere von Lhca2 und Lhca3 (ähnlich wie isolierte LHCI-680-Komplexe) die Bindungskompetenz für langwellig fluoreszierende Chlorophylle nicht besitzen oder in einer Konformation vorliegen, in der diese Chlorophylle keine langwellige Fluoreszenzemission zeigen.

Zusammenfassend muß daher angenommen werden, daß ein wesentlicher Teil der *in vivo* von PSI-200 gebundenen Pigmente in isolierten bzw. *in vitro* rekonstituierten PSI-Kern- und LHC-Komplexen nicht (mehr) vorhanden ist und daß diese Pigmenten möglicherweise *in vivo* von Bedeutung für die energetische Verbindung der LHCI-Antenne mit dem PSI-Kern sind, da sie voraussichtlich an den Kontaktflächen der LHCI-Proteine mit dem PSI-Kern lokalisiert sein müssen. Einen experimentellen Zugang könnten hier vergleichende Untersuchungen von Lhca-defizienten Mangelmutanten der Gerste (BOSSMANN et al. 1997) darstellen, in denen isolierte PSI-Komplexe (mit Antenne) vor und nach Rekonstitution mit den jeweils fehlenden rekombinanten Lhca-Protein(en) hinsichtlich Pigmentbindung und spektroskopischen Eigenschaften charakterisiert werden.

## 5.2.4 Durch welche Faktoren wird die molekulare Interaktion von Lhca1 und Lhca4 vermittelt ?

Als ein wesentlicher Faktor bei der Interaktion von Membranproteinen werden Helix/Helix-Wechselwirkungen innerhalb der Membran beschrieben (VON HEIJNE & GAVEL 1988; REES et al. 1989; BORMANN & ENGELMANN 1992). Diese Wechselwirkungen spielen bei LHC-Proteinen vor allem bei der Assemblierung des Monomers eine Rolle. Neben der Ausbildung ionischer Wechselwirkungen zwischen geladenen AS von Helix A und B (BASSI et al. 1999) wird diese durch die koordinierte Bindung der Pigmente unterstützt.

Die Faltung der *cab*-Proteine erfolgt nicht ohne eine Beteiligung von Chlorophyllen (PAULSEN et al. 1993). Zusätzlich sind 2-3 fest gebundene Xanthophyllmoleküle für eine korrekte Konformation und Stabilisierung der *cab*-Monomere notwendig (PLUMLEY & SCHMIDT 1987; PAULSEN et al. 1990; vergl. Abb. 2-5). Dabei ist die Anzahl der gebundenen Chlorophylle pro Monomer ungeachtet der hohen strukturellen Übereinstimmungen zwischen einzelnen *cab*-Proteinen variabel. Während für den LHCII je Monomer 7 Chl *a* und 5 Chl *b* gebunden werden (DAINESE & BASSI 1991; KÜHLBRANDT et al. 1994) sind es für Lhcb4 (CP29) 4 Chl *a* und 4 Chl *b*. Für einen rekonstituierten LHCI-730 Dimer werden auf der Basis der kalkulierten molaren Massen für Proteine und Chlorophylle und experimentell ermittelten Chl *a/b*-Verhältnisse 10 Chl *a* und 4 Chl *b* kalkuliert (SCHMID et al. 1997). Damit variiert die Zahl der gebundenen Chlorophylle pro Monomer zwischen 7 und 12. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß die Bindestellen von *cab*-Proteinen z.T. sowohl Chl *a* als auch Chl *b* binden können, wobei die Chl *a/b*-Verhältnisse in Abhängigkeit von den bei der Rekonstitution verwendeten Pigmentverhältnissen stark variiert werden können. So konnten GIUAFFRA et al. (1997) Lhcb4-Monomere mit 2 bis 6 Chl *b* (von maximal 8 gebundenen Chlorophyllen) rekonstituieren, die hinsichtlich ihrer spektroskopischen Eigenschaften keine erkennbaren Unterschiede untereinander sowie zum nativen LHC-Protein aufwiesen. Während bisher angenommen wurde, daß die Verfügbarkeit von Chl *a* ebenfalls essentiell für eine stabile Monomerkonformation ist, konnten SCHMID et al. (2001) Lhcb1-Monomere rekonstituieren, die ausschließlich Chl *b* enthalten.

Gleichzeitig ist eine Rekonstitution sowohl von LHCII-Trimeren (HOBE et al. 1994) als auch von LHCI-730-Komplexen (SCHMID et al. 1998) ohne das Lipid Phosphatidylglycerol (PG) nicht möglich. Dieses Lipid ist essentiell für die LHCII-Trimerisierung (SIMIDJIEV et al. 1998), eine Behandlung mit *PhospholipaseA2* führt zur Auflösung der Trimere (NUSSBERGER et al. 1993). Die exakte Funktion von PG bei der Unterstützung der Trimerisierung ist allerdings noch unklar. Schließlich ist gezeigt worden, daß eine Assemblierung von Membranprotein(komplex)en über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen AS vermittelt wird (SZCZEPANIAK et al. 1991).

### 5.2.4.1 Der LHCII wird ebenfalls durch molekulare Interaktion von Lhcb-Proteinen konstituiert

Der wichtigste Lichtsammelkomplex in Thylakoidmembranen höherer Pflanzen (LHCII) wird ebenfalls durch die molekulare Interaktion von LHC-Proteinen (Lhcb1/LHCP, Lhcb2 und Lhcb3) konstituiert. Bei dieser Interaktion spielt neben dem Lipid Phosphatidylglycerol (PG) der N-Terminus der LHC-Proteine eine zentrale Rolle. In Rekonstitutionsexperimenten mit C- und N-terminal deletiertem *r*LHCP aus Tomate konnte gezeigt werden, daß eine stabile

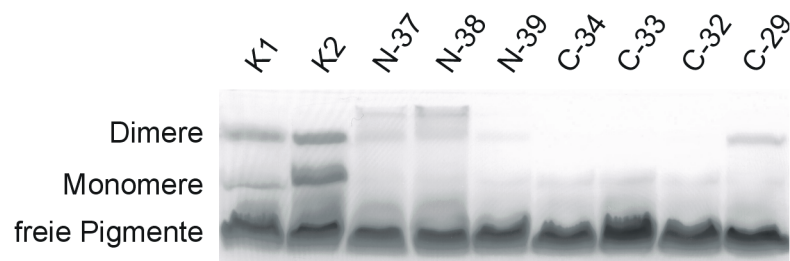
Monomer-Rekonstitution ab einer C-terminalen Deletion >10 AS nicht mehr möglich ist (PAULSEN & KUTTKAT 1993). Als essentiell für die Trimerisierung wurde als 11. AS des C-Terminus ein Tryptophan (W222) identifiziert (KUTTKAT et al. 1996). Dagegen beeinträchtigt eine N-terminale Deletion von 61 AS weder die Monomer-Rekonstitution noch die Bindung der Pigmente (HOBE et al. 1995). Allerdings können ohne den N-terminalen Bereich von 16-61 AS keine stabilen Trimere isoliert werden. Das Motiv WYGPDR (AS 17-22 des N-Terminus) wird als essentiell für die Trimerbildung betrachtet und spielt möglicherweise auch bei der Interaktion von LHCII mit den minoren *cab*-Proteinen eine Rolle.

Für rekonstituierte LHCII-Komplexe konnten außerdem innerhalb des Stroma-Loops zwischen der 2. und 3. Helix 4 von 25 AS identifiziert werden, deren Mutation eine *in vitro* Rekonstitution des Monomers verhindert (HEINEMANN & PAULSEN 1999). Dieses Ergebnis widerspricht möglicherweise Befunden, nach denen z.B. Opsinfragmente ohne kovalente Verbindung der einzelnen Helices nach Bindung des Retinals zu stabilem Bakteriorhodopsin rekonstituiert werden können (MARTI 1998). Es belegt aber gleichzeitig die Bedeutung der stromalen Loop-Region für die korrekte Faltung der LHCII-Monomere.

#### 5.2.4.2 Die N-terminalen Bereiche von Lhca1 und Lhca4 sind für die Rekonstitution stabiler Monomere und Dimere entbehrlich

In Experimenten zur Rekonstitution N- bzw. C-terminal deletierter *rLhca1* und *rLhca4* aus Tomate konnte gezeigt werden, daß durch diese Deletionen die Ausbildung stabiler Monomere von Lhca1 bzw. Lhca4 nicht beeinträchtigt wird. Für Lhca1 konnten stabile Monomere mit Proteinen rekonstituiert werden, denen 36 AS des N- oder 20 AS des C-terminalen Endes fehlen. Bei Lhca4 sind 38 AS des N- und 12 AS des C-terminalen Endes für eine stabile Rekonstitution des Monomers entbehrlich (RUPPRECHT et al. 2000).

Für den Fall, daß die N- bzw. C-terminalen Abschnitte an der molekularen Interaktion der beiden Proteine - ähnlich der N-terminalen Abschnitte der Proteine des LHCII - beteiligt sind, sollten sich mit C- bzw. N-terminal deletierten Proteinen keine stabilen Dimere rekonstituieren lassen. Hierzu wurden in gemeinsamen Versuchen mit Jens Rupprecht (Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz) N- bzw. C-terminal deletionsmutierte *rLhca4*-Proteine aus Tomate mit *rLhca1* aus Gerste nach den Angaben in Abschnitt 2.7.1 mit Pigmenten aus Tomate rekonstituiert.



**Abb. 5-13** Auftrennung von *in vitro* rekonstituierten LHCI-730 Dimeren in der ND-PAGE. Verwendet wurden jeweils *rLhca1* und *rLhca4* aus Tomate (K1), *rLhca1* aus Gerste und *rLhca4* aus Tomate (K2), sowie *rLhca1* aus Gerste und N- (N-37 bis N-39) bzw. C-terminal (C-29 bis C-34) deletierte *rLhca4* aus Tomate.

In der Auftrennung der Rekonstitutionsansätze im ND-PAGE ließen sich mit rLhca4-Mutanten bis N-38 bzw. bis C-29 stabile Dimere isolieren (Abb. 5-13). Offensichtlich spielen die N-terminalen (bis 38 AS) und C-terminalen Bereiche (bis 29 AS) von Lhca4 daher keine Rolle bei der Dimer-Formation. Dies entspricht für die N-terminalen Deletionen den Ergebnissen von RUPPRECHT et al. (2000), nach denen stabile Monomere von Lhca4 bis N-38 rekonstituiert werden können.

Bemerkenswert ist allerdings der Befund, daß sich mit Lhca4-Proteinen, die aufgrund der Länge ihrer C-terminalen Deletion als Monomer nicht stabil rekonstituiert werden können (>C-12; RUPPRECHT et al. 2000), noch stabile Heterodimere isolieren lassen (Abb. 5-13, C-29). Dies unterstützt möglicherweise das Modell einer Stabilisierung durch oder bei der Veränderung der Konformation im Kontakt mit anderen Proteinen (hier mit Lhca1), wie es im Abschnitt 4.2.3 für eine konformationsverändernde Interaktion zwischen LHCI und PSI-Kern vorgeschlagen worden ist. Die Interaktion von Lhca1 und Lhca4 wird daher möglicherweise durch andere Faktoren vermittelt als bei der Assemblierung des LHCII (s.o.).

#### 5.2.4.3 Möglicherweise sind geladene Aminosäuren der Stroma-Loops von Lhca1 und Lhca4 an der molekularen Interaktion beteiligt

Für die Bewertung einer möglichen Beteiligung der Loop-Regionen zwischen der 1. und 2. Helix (im Lumen) bzw. der 2. und 3. Helix (im Stroma) bei der Dimerisierung von Lhca1 und Lhca4 wurden AS-Sequenzen dieser Bereiche von allen Lhca-Proteine auf konservierte Übereinstimmungen untersucht (Tabelle 5-7).

**Tabelle 5-7** Vergleich der AS-Sequenzen zwischen der 1. und 2. Helix (1. Loop) sowie der 2. und 3. Helix (2. Loop) bei Lhca-Proteinen angiospermer Pflanzen (Anhang A 4); <sup>1</sup> innerhalb der konservierten AS, <sup>2</sup> bezogen auf die Anzahl konservierter AS; <sup>3</sup> bezogen auf eine durchschnittliche Länge von 45 AS.

	1. Loop					2. Loop				
	Länge [AS]	konservierte AS [AS]	davon geladen <sup>1</sup> [%]	davon geladen <sup>1</sup> [AS]	davon geladen <sup>1</sup> [%] <sup>2</sup>	Länge [AS]	konservierte AS [AS]	davon geladen <sup>1</sup> [%]	davon geladen <sup>1</sup> [AS]	davon geladen <sup>1</sup> [%] <sup>2</sup>
<b>Lhca1</b>	19	16	84.21	1	6.25	25	22	88.00	10	45.45
<b>Lhca2</b>	10	5	50.00	0	-	44-46	17	37.78 <sup>3</sup>	2	11.76
<b>Lhca3</b>	19	17	89.47	1	6.25	44-45	38	84.44 <sup>3</sup>	7	18.42
<b>Lhca4</b>	10	5	50.00	0	-	40	29	72.50	5	17.24

Für den 1. Loop (Abb. 5-14) besteht eine deutliche Ähnlichkeit zwischen den Lhca4- und Lhca2-Proteinen. Sowohl in Mono- als auch in Dikotyledonen sind hier 5 von 10 AS konserviert, davon jeweils drei AS sowohl in den Lhca2- als auch in den Lhca4-Proteinen. Der 1. Loop der Lhca1- und Lhca3-Proteine ist mit jeweils 19 AS ungefähr doppelt so lang und erheblich stärker konserviert als der 1. Loop der Lhca2- bzw. Lhca4-Proteine. Bei den Lhca1-Proteinen sind 16 AS und bei den Lhca3-Proteinen 17 AS konserviert, jeweils 2 AS sind in beiden Lhca-Typen gemeinsam konserviert.

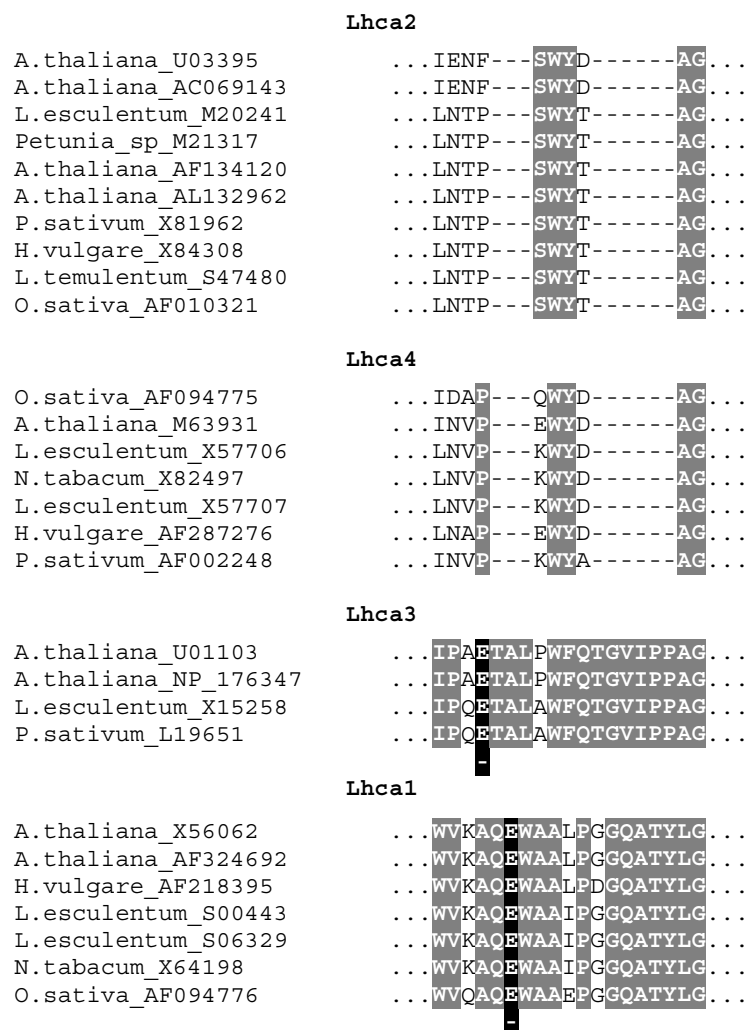
Während die Lhca2- und Lhca4-Proteine überhaupt keine geladenen konservierten AS aufweisen, ist es bei den Lhca1- und Lhca3-Proteinen jeweils eine AS. Damit ist eine Beteiligung der lumenalen Loop-Region an einer molekularen Interaktion zwischen Lhca1 und Lhca4 unwahrscheinlich. Der geringe Anteil geladener AS im lumenalen Loop entspricht



den Angaben von COHEN et al. (1995), nach denen Proteinbereiche, die die Thylakoidmembran zum Lumen hin durchqueren müssen, generell kaum geladene AS aufweisen.

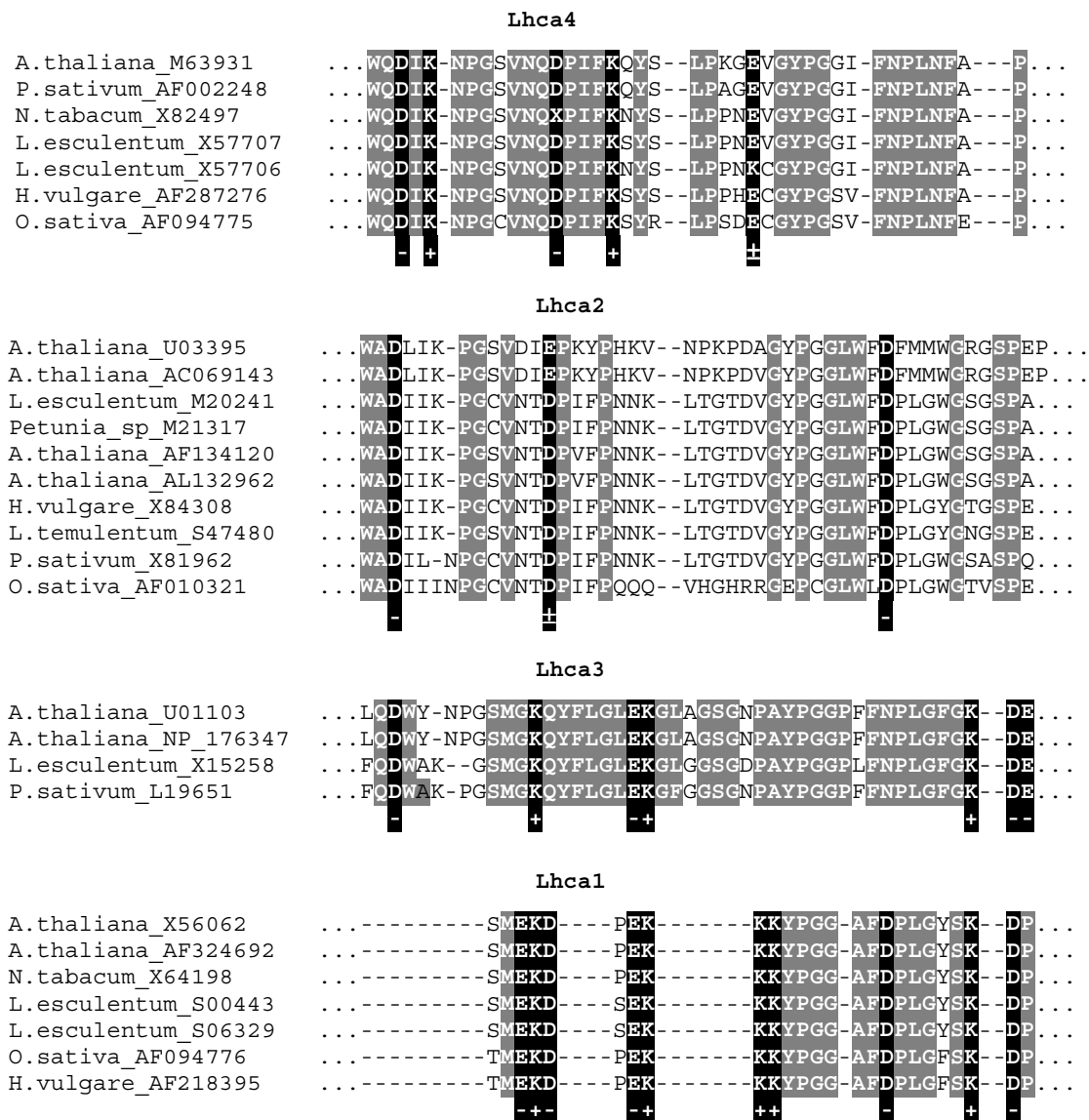
Der 2. Loop ist bei den Lhca1-Proteinen mit 25 AS nur geringfügig, bei allen übrigen Lhca-Proteinen mit 40-47 AS deutlich länger als der 1. Loop (Abb. 5-15). Allerdings bestehen auch beim 2. Loop (ebenso wie beim 1. Loop) wieder deutliche Übereinstimmungen in der AS-Sequenz zwischen Lhca2- und Lhca4- sowie zwischen Lhca1- und Lhca3-Proteinen. Bei den Lhca2-Proteinen ist der 2. Loop mit ~36 % noch schwächer, bei den Lhca4-Proteinen mit ~72 % deutlich stärker konserviert als der 1. Loop (jeweils 50 %). Jeweils 9 AS sind in beiden Gruppen gemeinsam konserviert.

Die Lhca1- bzw. Lhca3-Proteine weisen im 2. Loop mit 88 % bzw. ~84 % eine im Vergleich zum 1. Loop ähnlich hohe Konservierung auf. Jeweils 14 AS sind in beiden Gruppen gemeinsam konserviert. Bei den Lhca1-Proteinen ist der Anteil konservierter AS in der 2. Loop-Region sogar höher als die durchschnittliche Übereinstimmung der Gesamtproteine (~75 %; vergl. Anhang A 5). Dies könnte auf eine möglicherweise konservierte Funktion dieser Region bei den Lhca1-Proteinen hindeuten.



**Abb. 5-14** Identifikation konservierter (grau) und geladener (schwarz) AS im lumenalen Loop zwischen 1. und 2. Helix von Lhca-Proteinen angiospermer Pflanzen (Anhang A 4).

Bis auf die Lhca2-Proteine weisen alle anderen Lhca-Proteine zwischen der 2. und 3. Helix erheblich mehr konservierte geladene AS auf als im 1. Loop. Deren Anteil ist mit über 45 % (bezogen auf die Anzahl der konservierten Aminosäuren) bei den Lhca1-Sequenzen sogar überdurchschnittlich hoch. Mit ~18 % weisen die Lhca3-Sequenzen den nächsthöheren Anteil auf. Möglicherweise ist dieser hohe Anteil aber auch darauf zurückzuführen, daß lediglich 4 Sequenzen aus ausschließlich dikotylen Spezies verfügbar waren. Der Anteil konservierter geladener AS der Lhca4-Sequenzen ist mit ~17 % deutlich höher als bei den Lhca2-Proteinen (~12 %). Neben den konservierten geladenen AS enthalten einige der Lhca-Proteine vereinzelt maximal 2 weitere geladene AS in der 1. und 2. Loop-Region.



**Abb. 5-15** Identifikation konservierter (grau) und geladener (schwarz) konservierter AS im stromalen Loop zwischen 2. und 3. Helix von Lhca-Proteinen angiospermer Pflanzen (Anhang A 4).

Insgesamt ist der Anteil konservierter geladener AS in den stromalen Loop-Regionen von Lhca1 und Lhca4 im Vergleich zu den Lhca2- und Lhca3-Sequenzen (unter Berücksichtigung der geringen Anzahl ausgewerteter Lhca3-Sequenzen) erhöht. Diese AS könnten daher über eine elektrostatische Wechselwirkung der Loop-Regionen eine molekulare Interaktion bei der Dimerisierung unterstützen.



## 6 Zusammenfassung

Der Lichtsammelkomplex LHCI-730 des PSI höherer Pflanzen wird *in vivo* durch die beiden Chlorophyll *a/b*-bindenden (LHC-) Proteine Lhca1 und Lhca4 gebildet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zur funktionellen Assemblierung dieser Proteine durch die *in vitro* Rekonstitution von rekombinanten Proteinen der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Tomate (*Lycopersicon esculentum*) mit Pigmentextrakten durchgeführt worden.

Hierzu wurden die kodierenden Nukleotidsequenzen für die Proteine der Gerste einschließlich ihrer Transitpeptide für Lhca1 vollständig und für Lhca4 zu ~91 % durch PCR aus einer cDNA-Bibliothek sowie isolierter RNA amplifiziert und unter AF218305 (*Lhca1*) bzw. AF287276 (*Lhca4*) in GenBank veröffentlicht. Auf der Basis der ermittelten Sequenzen konnten bereits früher festgestellte Abweichungen zu publizierten Teilsequenzen bestätigt sowie eine ungewöhnliche Übereinstimmung der Lhca1-Transitpeptide aus Gerste und Reis (*Oryza sativa*) festgestellt werden. Durch eine vergleichende Analyse von 142 verfügbaren Aminosäuresequenzen für LHC-Proteine angiospermer Pflanzen konnten weitere Protein-Paare mit ungewöhnlicher Übereinstimmung der Transitpeptide identifiziert sowie ein konserviertes Motiv für die LHC-Transitpeptide angiospermer Pflanzen abgeleitet werden.

Die kodierenden Sequenzen für Lhca1 und Lhca4 wurden in bakterielle Expressionsvektoren (pDS12-RBSII) ligiert und in *E. coli* (JM101) kloniert. Durch Expression und Aufreinigung bakterieller Proteinextrakte wurde rekombinantes rLhca1 gewonnen. Nach Rekonstitution des aufgereinigten rLhca1-Proteins mit Pigmentextrakten aus Gerste und Tomate konnten stabile rLhca1-Monomere in der ND-Page sowie im Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt werden. Die (Über-)Expression von rLhca4 konnte im eingesetzten Expressionssystem weder durch eine Variation der Anzuchtbedingungen und Induktionszeiten noch durch eine Modifikation der verwendeten Aufreinigungsprotokolle - auch unter Verwendung zweier eigens hergestellter polyklonaler Antiseren gegen Lhca4 aus Gerste - nachgewiesen werden.

Mit der Isolierung stabiler LHCI-730-Dimere in der ND-Page sowie im Saccharose-Dichte-gradienten konnte<sup>34</sup> erstmals eine „heterologe“ Rekonstitution eines LHCI-730 mit rekombinanten Proteinen aus einer mono- (rLhca1 aus Gerste) und einer dikotylen Spezies (rLhca4 aus Tomate) experimentell gezeigt werden. Die spektroskopischen Eigenschaften dieser heterologen Komplexe hinsichtlich ihrer Fluoreszenzmissionsspektren bei 77 K weisen auf eine funktionelle energetische Kopplung der orientierten Chlorophylle hin, wie sie sowohl für (a) mit Tomatenproteinen rekonstituierte als auch (b) native LHCI-730-Komplexe aus Tomate beobachtet wird. Dies weist auf Wechselwirkungen von Lhca1 und Lhca4 hin, die in Mono- und Dikotyledonen konserviert sind.

Diese Wechselwirkungen werden - anders als beim LHCII - voraussichtlich nicht durch die Interaktion der N- bzw. C-terminalen Proteinbereiche sondern möglicherweise durch zahlreiche konservierte (geladene) Aminosäuren im stromalen Loop zwischen der 2. und 3. Helix von Lhca1 und Lhca4 vermittelt bzw. unterstützt.

---

<sup>34</sup> in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Volkmar Schmid und Harald Paulsen (Institut für Allgemeine Botanik, Universität Mainz)



## 7 Literatur

- ADAMSKA I (1997) ELIPs - light-induced stress proteins. *Physiologia Plantarum* 100: 974-805
- ALLEN JF, NILSSON A (1997) Redox signalling and the structural basis of regulation of photosynthesis by protein phosphorylation. *Physiologia Plantarum* 100: 863-868
- ALTMANN RB, RENGE I, KADOR L, HAARER D (1992) Dipole moment differences of nonpolar dyes in polymeric matrices: stark effect and photochemical hole burning. *Journal of Chemical Physics* 94: 5316-5322
- ANANDAN S, MORISHIGE DT, THORNER JP (1993) Light-induced biogenesis of light harvesting complex I (LHCI) during chloroplast development in barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiology* 101: 227-236
- ANDERSON SM, KRINSKY NI (1973) Protective action of carotenoid pigments against photo-dynamic damage to liposomes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 18: 403-408
- BARTLEY GE, SCOLNIK PA (1995) Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* 7: 1027-1038
- BASSI R, CROCE R, CUGINI D, SANDONÁ D (1999) Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides identification of chromophores bound to multiple sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 10056-10061
- BASSI R, SIMPSON DJ (1987) Chlorophyll-protein complexes of barley. *European Journal of Biochemistry* 163: 221-230
- BASSI R, SOEN SY, FRANK G, ZUBER H, ROCHAIX JD (1992) Characterization of chlorophyll *a/b* proteins of photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry* 267: 25714-25721
- BAYMANN F, BRUGNA M, MÜHLENHOFF U, NITSCHKE W (2001) Daddy, where did (PS)I come from? *Biochimica et Biophysica Acta* 1507: 291-310
- BERGANTINO E, SANDONÁ D, CUGINI D, BASSI R (1998) The photosystem II subunit CP29 can be phosphorylated in both C3 and C4 plants as suggested by sequence analysis. *Plant Molecular Biology* 36: 11-22
- BLANKENSHIP RE (1992) Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynthesis Research* 33: 91-111
- BOEKEMA EJ, BOONSTRA AF, DEKKER JP, RÖGNER M (1994) Electron microscopic structural analysis of photosystem I, photosystem II and the cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex from green plants and cyanobacteria. *Journal of Bioenergetic and Biomembranes* 26: 17-29
- BOEKEMA EJ, JENSEN PE, SCHLODDER E, VAN BREEMEN JFL, VAN ROON H, SCHELLER HV, DEKKER JP (2001) Green plant photosystem I binds light-harvesting complex I on one side of the complex. *Biochemistry* 40: 1029-1036
- BOEKEMA EJ, WYNN RM, MALKIN R (1990) The structure of spinach photosystem I studied by electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1017: 49-56
- BOICHENKO V (1998) Action spectra and functional antenna sizes of photosystem I and II in relation to the thylakoid membrane organization and pigment composition. *Photosynthesis Research* 58: 163-174
- BORMANN BJ, ENGELMANN DM (1992) Intramembrane helix-helix association in oligomerization and transmembrane signalling. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 21: 223-242

- BOSSMANN B (1998) Die Chlorophyll *a/b*-bindenden Proteine des Photosystems I und des Photosystems II in *Chlorina*- und *Viridis*-Mutanten der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) – Immunologische und spektroskopische Untersuchungen. Dissertation, Universität Bremen
- BOSSMANN B, GRIMME LH, KNOETZEL J (1999) Protease-stable integration of Lhcb1 into thylakoid membranes is dependent on chlorophyll *b* in allelic *chlorina-f2* mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 207: 551-558
- BOSSMANN B, KNOETZEL J, JANSSON S (1997) Screening of *chlorina* mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.) with antibodies against light-harvesting proteins of PSI and PSII: absence of specific antenna proteins. *Photosynthesis Research* 52: 127-136
- BOUDREAU E, TAKAHASHI Y, LEMIEUX C, TURMEL M, ROCHAIX JD (1997) The chloroplast *ycf3* and *ycf4* open reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of photosystem I complex. *EMBO Journal* 16: 6095-6104
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive Method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 113-127
- BRUCE BD (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends in Cell Biology* 10: 440-447
- BRUNNER H, RÜDIGER W (1995) The greening process in cress seedlings IV. Light regulated expression of single Lhc genes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 27: 257-263
- BUJARD H, GENTZ R, LANZER M, STUEBER D, MUELLER M, IBRAHIMI I, HAUPTLE MT, DOBBERSTEIN B (1987) A T5 promotor-based transcription-translation system for the analysis of proteins *in vitro* and *in vivo*. 416-433
- BUTLER WL, TREDWELL CJ, MALKIN R, BARBER J (1979) The relationship between the lifetime and yield of the 735 nm fluorescence of chloroplasts at low temperatures. *Biochimica et Biophysica Acta* 545: 309-315
- CAMMARATA KV, PLUMLEY FG, SCHMIDT GW (1992) Pigment and protein composition of reconstituted light-harvesting complexes and effects of some protein modifications. *Photosynthesis Research* 33: 235-250
- CAMMARATA KV, SCHMIDT GW (1992) *In vitro* reconstitution of a light harvesting gene product: deletion mutagenesis and analysis of pigment binding. *Biochemistry* 31: 2779-2789
- CHARISIUS H (1999) Überexpression und *in vitro* Rekonstitution des Lichtsammelproteins Lhca2 aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Diplomarbeit, Universität Bremen
- CHORY J (1993) Out of darkness: Mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants. *Trends in Genetics* 9: 167-172
- CLINE K, HENRY R (1996) Import and routing of nucleus-encoded chloroplast proteins. *Annual Reviews in Cell and Developmental Biology* 12:1-26
- COHEN Y, YALOWSKY S, NECHUSTAI R (1995) Integration and assembly of photosynthetic protein complexes in chloroplast thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1241: 1-30
- CROCE R, ZUCHELLI G, GARLASCHI FM, JENNINGS RC (1998) A thermal broadening study of the antenna chlorophylls in PSI-200, LHCI, and PSI core. *Biochemistry* 37: 17355-17360
- CROCE R, ZUCHELLI G, GARLASCHI F, BASSI R, JENNINGS RC (1996) Excited state equilibration in the photosystem I light-harvesting complex. P700 is almost isoenergetic with its antenna. *Biochemistry* 35: 8572-8579
- CROFTS AR, YERKES CT (1994) A molecular mechanism for qE-quenching. *FEBS Letters* 352: 265-270



- DABNEY-SMITH C, VAN DEN WIJNGAAR PWJ, TREECE Y, VREDENBERG WJ, BRUCE DB (1999) The C terminus of a chloroplast precursor modulates its interaction with the translocation apparatus and PIRAC. *Journal of Biological Chemistry* 274: 32351-32359
- DAINESE P, BASSI R (1991) Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem II antenna system and aggregation state of the component chlorophyll *a/b* binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* 266: 8136-8142
- DAMM I, STEINMETZ D, GRIMME LH (1990) Multiple functions of  $\beta$ -carotene in photosystem I. in: BALTSCHIEFFSKY M (ed.), Current Research in Photosynthesis, Vol II: 607-610. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- DEMMING-ADAMS B, GILMORE AM, Adams III WW (1996) *In vivo* functions of carotenoids of higher plants. *FASEB Journal* 10: 403-412
- DILLY-HARTWIG H, ALLEN JF, PAULSEN H, RACE HL (1998) Truncated recombinant light harvesting complex II proteins are substrates for a protein kinase associated with photosystem II core complexes. *FEBS Letters* 435: 101-104
- DOLGANOV NA, BHAYA D, GROSSMAN AR (1995) Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll *a/b* binding protein of higher plants: evolution and regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 636-640
- DREYFUSS BW, THORNBER JP (1994a) Assembly of the light-harvesting complexes (LHCs) of photosystem II: monomeric LHC IIb complexes are intermediates in the formation of oligomeric LHC IIb complexes. *Plant Physiology* 106: 829-839
- DREYFUSS BW, THORNBER JP (1994b) Organization of the light-harvesting complex of photosystem I and its assembly during plastid development. *Plant Physiology* 106: 841-848
- DURNFORD DG, DEANE JA, TAN S, MCFADDEN GI, GANTT E, GREEN BR (1999) A phylogenetic assessment of the eukaryotic light-harvesting antenna proteins, with implications for plastid evolution. *Journal of Molecular Evolution* 48: 59-68
- ECCLES J, HONIG B (1983) Charged amino acids as spectroscopic determinants for chlorophyll *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 80: 4959-4962
- EDGE R, MCGARVEY, TRUSCOTT TG (1997) The carotenoids as anti-oxidants – a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 41: 189-200
- EICHACKER L, PAULSEN H, RÜDIGER W (1992) Synthesis of chlorophyll *a* regulates translation of chlorophyll *a* apoproteins P700, CP47, CP43 and D2 in barley etioplasts. *European journal of Biochemistry* 205: 17-24
- FLEMMING C (1996) Charakterisierung des Antennensystems von monomeren und trimeren Photosystem I-Komplexen. Dissertation, Technische Universität Berlin
- FLING SP, GREGERSON DS (1985) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris buffer system without urea. *Analytical Biochemistry* 155: 83-88
- FRANK H, COGDELL RJ (1996) Carotenoids in photosynthesis. *Photochemistry and Photobiology* 63: 257-264
- FRANK HA, DAS SK, BAUTISTA JA, BRUCE D, VASILIEV S, CRIMI M, CROCE R, BASSI R (2001) Photochemical behavior of xanthophylls in the recombinant photosystem II antenna complex, CP26. *Biochemistry* 40: 1120-1225
- FROMME P, JORDAN P, KRAUB N (2001) Structure of photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta* 1507: 5-31
- FUNK C, SCHRÖDER WP, NAPIWOTZKI A, TJUS SE, RENGER G, ANDERSSON B (1995) The PSII-S protein of higher plants: a new type of pigment-binding protein. *Biochemistry* 34: 11133-11141

- FUNK C, VERMAAS W (1999) A cyanobacterial gene family coding for single-helix proteins resembling part of the light-harvesting proteins from higher plants. *Biochemistry* **38**: 9397-9404
- GANETEG U, STRAND Å, GUSTAFSSON P, JANSSON S (2001) The properties of the chlorophyll *a/b*-binding proteins Lhca2 and Lhca3 studied *in vivo* using antisense inhibition. *Plant Physiology* **127**: 150-158
- GILL EM, WITTMERSHAUS BP (1999) Spectral resolution of low-energy chlorophylls in photosystem I of *Synechocystis* sp. PCC 6803 through direct excitation. *Photosynthesis Research* **61**: 53-64
- GIUAFFRA E, CUGINI D, PAGANO A, CROCE R, SANDONÁ D, BASSI R (1995) *In vitro* reconstitution and pigment binding properties of recombinant CP29 and CP24. in: MATHIS P (ed.), *Photosynthesis: from light to biosphere*, Vol I: 271-274. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- GIUAFFRA E, ZUCHELLI G, SANDONÁ B, CROCE R, CUGINI D, GARLASCHI FM, BASSI R, JENNINGS RC (1997) Analysis of some optical properties of a native and reconstituted photosystem II antenna complex, CP29: pigment binding sites can be occupied by chlorophyll *a* or chlorophyll *b* and determine spectral forms. *Biochemistry* **36**: 12984-12993
- GOBETS B, VAN AMERONGEN H, MONSHOUWER R, KRUIP J, RÖGNER M, VAN GRONDELLE R, DEKKER JP (1994) Polarized site-selected fluorescence spectroscopy of isolated photosystem I particles. *Biochimica et Biophysica Acta* **1188**: 75-85
- GOBETS B, VAN GRONDELLE R (2001) Energy transfer and trapping in photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta* **1507**: 80-99
- GOBETS D, DECKER JP, VAN GRONDELLE R (1998) Transfer-to-the-trap-limited model of energy transfer in photosystem I. in: GARAB G (ed.), *Photosynthesis: mechanisms and effects*, Vol I: 503-508. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- GOEDHEER JHC (1981) Comparison of the long-wave chlorophyll fluorescence in various green and blue-green algae and diatoms. *Photosynthesis Research* **2**: 49-60
- GRAY JC (1996) Regulation of expression of nuclear genes encoding polypeptides required for the light reactions of photosynthesis. in: ORT DR, YOCUM CF (eds), *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*: 621-641. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- GREEN BR, KÜHLBRANDT W (1995) Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional structure of LHCII. *Photosynthesis Research* **44**: 139-148
- GREEN BR, PICHESKY 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. *Photosynthesis Research* **39**: 149-162
- GREEN, BR PICHESKY E, KLOPPSTECH K (1991) Chlorophyll *a/b*-binding proteins: an extended family. *Trends in Biochemical Sciences* **16**: 181-186
- GREEN, BR, DURNFORD DG (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 685-714
- GRIMM B, KRUSE E, KLOPPSTECH K (1989) Transiently expressed early light-inducible thylakoid proteins share transmembrane domains with light-harvesting chlorophyll binding proteins. *Plant Molecular Biology* **13**: 583-593
- GUDOWSKA-NOWAK E, NEWTON MD, FAJER J (1990) Conformational and environmental effects on bacteriochlorophyll optical spectra: correlations of calculated spectra with structural results. *Journal of Physical Chemistry* **94**: 5795-5801
- HALDRUP A, SIMPSON DJ, SCHELLER HV (2000) Down-regulation of the PSI-F subunit of photosystem I (PSI) in *Arabidopsis thaliana*. The PSI-F subunit is essential for photo-

- autotrophic growth and contributes to antenna function. *Journal of Biological Chemistry* 275: 31211-31218
- HEINEMANN B, PAULSEN H (1999) Random mutations directed to transmembrane and loop domains of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein: impact on pigment binding. *Biochemistry* 38: 14088-14093
- HEUKESHOVEN J, DERNICK R (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6: 103-112
- 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, PRYTULLA S, KÜHLBRANDT W, PAULSEN H (1994) Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *EMBO Journal* 13 (15): 3423-3429
- HOLT AS, CLAYTON RK (1965) Light-induced absorbancy changes in *Einhjellens' Rhodospseudomonas*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 4: 829-831
- HOLZWARTH AR (1999) Die primären Prozesse der Photosynthese. in: HÄDER D-P (Hrsg.) Photosynthese. Thieme Verlag, Stuttgart: 1-20
- HWANG S, HERRIN DL (1993) Characterization of a cDNA encoding the 20-kDa photosystem I light-harvesting polypeptide of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics* 23: 512-517
- IHALAINEN JA, GOBETS B, SZNEE K, BRAZZOLI M, CROCE R, BASSI R, VAN GRONDELLE R, KORPPI-TOMMOLA JEI, DEKKER JP (2000) Evidence for two spectroscopically different dimers of light-harvesting complex I from green plants. *Biochemistry* 39: 8625-8631
- JANSSON S (1994) The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1184: 1-19
- JANSSON S (1999) A guide to the *Lhc* genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 4: 236-240
- JANSSON S ANDERSEN B, SCHELLER HV (1996) Nearest-neighbor analysis of higher-plant photosystem I holocomplex. *Plant Physiology* 112: 409-420
- JANSSON S, GUSTAFSSON P (1991) Evolutionary conservation of the chlorophyll *a/b*-binding proteins: cDNAs encoding type I, II and III LHC I polypeptides from the gymnosperm Scots pine. *Molecular and General Genetics* 229: 67-76
- JANSSON S, PICHESKY E, BASSI R, GREEN BR, IKEUCHI M, MELIS A, SIMPSON DJ, SPANGFORT M STAEHELIN LA, THORNER JP (1992) A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll *a/b*-binding proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 10(3): 242-253
- JANSSON S, STEFÁNSSON HREINN, NYSTRÖM U, GUSTAFSSON P, ALBERTSSON P-Å (1997) Antenna protein composition of PSI and PSII in thylakoid sub-domains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1320: 297-309
- JENNINGS RC, CROCE R, DORRA D, GARLASCHI FM, HOLZWARTH AR, RIVADOSSI A, ZUCHELLI G (1998) Photosystem I red spectral forms: diffusion limited energy transfer, optical reorganisation energy and absorption cross section. in: GARAB G (ed.), Photosynthesis: mechanisms and effects, Vol I: 271-276. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- JENNINGS RC, GARLASCHI FM, FINZI L, ZUCHELLI G (1996) Slow exciton trapping in photosystem II - a possible physiological role. *Photosynthesis Research* 47: 167-173
- JENNINGS RC, ZUCHELLI G, CROCE R, VALKUNAS L, FINZI L, GARLASCHI FM (1994) Model studies on the excited state equilibrium perturbation due to reaction centre trapping in photosystem I. *Photosynthesis Research* 52: 245-253

- JORDAN P, FROMME P, KLUKAS O, WITT HT, SAENGER W, KRAUß N (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411: 909-917
- JOYARD J, TEYSSIER E, MIÉGE C, BERNY-SEIGNEURIN D, MARÉCHAL E, BLOCK MA, DORNE A-J, ROLLAND N, AJLANI G, DOUCE R (1998) The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiology* 118: 715-723
- KARAPETYAN NV, DORRA D, SCHWEITZER G, BEZSMERTNAYA IN, HOLZWARH AR (1997) Fluorescence spectroscopy of the longwave chlorophylls in trimeric and monomeric photosystem I core complexes from the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biochemistry* 36: 13830-13837
- KARLIN-NEUMANN GA, TOBIN EM (1986) Transit peptides of nuclear-encoded chloroplast proteins share a common amino acid framework. *EMBO Journal* 5: 9-13
- KEEGSTRA K, CLINE K (1999) Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell* 11: 557-570
- KELLMANN J-W, MERFORTH N, WIESE M, PICHESKY E, PIECHULLA B (1993) Concerted circadian oscillations in transcript levels of nineteen *Lhca/b* (*cab*) genes in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Molecular and General Genetics* 237: 439-448
- KITMITTO A, HOLZENBURG A, FORD RC (1997) Two-dimensional crystals of photosystem I in higher plant grana margins. *Journal of Biological Chemistry* 272: 19497-19501
- KITMITTO A, MUSTAFA AO, HOLZENBURG A, FORD RC (1998) Three-dimensional structure of higher plant photosystem I determined by electron crystallography. *Journal of Biological Chemistry* 273: 29592-29599
- KLEIMA FJ, HOBE S, CALKOEN F, URBANUS ML, PETERMAN E JG, VAN GRONDELLE R, PAULSEN H, VAN AMERONGEN H (1999) Decreasing the chlorophyll *a/b* ratio in reconstituted LHCII: structural and functional consequences. *Biochemistry* 38: 6587-6596
- KLIMMEK F (1997) Die Lichtsammelproteine des LHCI-730 des Photosystems I der Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Diplomarbeit, Universität Bremen
- KNOETZEL J (1998) Lichtsammelproteine und Proteinuntereinheiten des Photosystems I der Gerste (*Hordeum vulgare* L.): Identifizierung, Genklonierung und *in vitro* Import der Proteine in Chloroplasten und Thylakoide. Habilitationsschrift, Universität Bremen
- KNOETZEL J, BOSSMANN B, GRIMME LH (1998) *Chlorina* and *viridis* mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.) allow assignment of long-wavelength chlorophyll forms to individual Lhca proteins of photosystem I *in vivo*. *FEBS Letters* 436: 339-342
- KNOETZEL J, MANT A, HALDRUP A, JENSEN PE, SCHELLER HV (2001): PSI-O, a new 10-kDa subunit of eukaryotic photosystem I. *FEBS Letters* (im Druck)
- KNOETZEL J, SIMPSON D (1991) Expression and organisation of antenna proteins in the light- and temperature-sensitive barley mutant *chlorina*<sup>-104</sup>. *Planta* 185: 111-123
- KNOETZEL J, SVENDSEN I, SIMPSON DJ (1992) Identification of the photosystem I antenna polypeptides in barley. *European Journal of Biochemistry* 206: 209-215
- KOCHUBEY SM, SAMOKHVAL EG (2000) Long-wavelength chlorophyll forms from photosystem I from pea thylakoids. *Photosynthesis Research* 63: 281-290
- KOEHNE B, ELLI G, JENNINGS RC, WILHELM C, TRISSL H-W (1999) Spectroscopic and molecular characterization of a long wavelength absorbing antenna of *Ostreobium* sp.. *Biochimica et Biophysica Acta* 1412: 94-107
- KRÓL M, SPANGFORT M, HUNER NPA, ÖQUIST G, GUSTAFSSON P, JANSSON S (1995) Chlorophyll *a/b*-binding proteins, pigment conversions and early light-induced proteins in a chlorophyll *b*-less barley mutant. *Plant Physiology* 107: 873-883

- KRUIP J, BALD D, BOEKEMA E, RÖGNER M (1994) Evidence for the existence of trimeric and monomeric Photosystem I complexes in thylakoid membranes from cyanobacteria. *Photosynthesis Research* 40: 279-286
- KRUIP J, CHITNIS PR, LAGOUTTE B, RÖGNER M, BOEKEMA EJ (1997) Structural Organization of the major subunits in cyanobacterial photosystem I. *Journal of Biological Chemistry* 272: 17061-17069
- KRUIP J, KARAPETYAN NV, TEREKHOVA IV, RÖGNER M (1999) *In vitro* oligomerization of a membrane protein vcomplex. *Journal of Biological Chemistry* 274: 18181-18188
- KÜHLBRANDT W, WANG DN, YOSHINORI F (1994) Atomic model of plant light harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367: 614-621
- 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 Physiology* 109: 1267-1276
- 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. *European Journal of Biochemistry* 242: 288-292
- LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- LAM E, ORTIZ W, MALKIN R (1984) Chlorophyll *a/b* proteins of photosystem I. *FEBS Letters* 168: 10-14
- LJUNGBERG U, ÅKERLUND H-E, LARSSON C, ANDERSSON B (1984) Identification of polypeptides associated with the 23 and 22 kDa proteins of photosynthetic oxygen evolution. *Biochimica et Biophysica Acta* 767: 145-152
- LONG SP, HUMPHRIES S, FALKOWSKI PG (1994) Photoinhibition and photosynthesis in nature. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 633-662
- LUNDE C, JENSEN PE, HALDRUP A, KNOETZEL J, SCHELLER HV (2000) The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature* 408: 613-615
- MAEDA H, WANTANBE T, KOBAYASHI M, IKEGAMI I (1992) Presence of two chlorophyll *a'* in the core of photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta* 1099: 74-80
- MANGELS D (2001) Charakterisierung von Photosystem I aus *Gloeobacter violaceus* - Hinweis auf membranintrinsische Lichtsammelkomplexe? Dissertation. Universität Bremen
- MAROC J, TREMOLIERES A (1990) Chlorophyll *a'* and pheophytin *a*, as determined by HPLC, in photosynthetic mutants and double mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1018: 67-71
- MARQUARDT UND RHIEL (1997) The membrane-intrinsic light-harvesting complex of the red alga *Galdieria sulphuraria* (formerly *Cyanidium caldarium*): biochemical and immunological characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1320: 153-164
- MARTI T (1998) Refolding of bacteriorhodopsin from overexpressed polypeptide fragments. *Journal of Biological Chemistry* 273: 9312-9322
- MELKOZERNOV AN, LIN S, BLANKENSHIP RE (2000a) Femtosecond transient spectroscopy and excitonic interactions in photosystem I. *Journal of Physical Chemistry B* 104: 1651-1656
- MELKOZERNOV AN, LIN S, SCHMID VHR, PAULSEN H, SCHMIDT GW, BLANKENSHIP RE (2000b) Ultrafast excitation dynamics of low energy pigments in reconstituted peripheral light-harvesting complexes of photosystem I. *FEBS Letters* 471: 89-92
- MEYER G, KLOPPSTECH K (1984) A rapidly high-induced chloroplast protein with a high turnover coded for by pea nuclear DNA. *European Journal of Biochemistry* 138: 201-207

- MONTANÉ M-H, DREYER S, TRIANTAPHYLIDES C, KLOPPSTECH K (1997) Early light-inducible proteins during long-term acclimation of barley to photooxidative stress caused by light and cold: high level of accumulation by postranscriptional regulation. *Planta* 202: 293-302
- MONTANÉ M-H, KLOPPSTECH K (2000) The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): was the harvesting of light their primary function? *Gene* 258: 1-8
- MORISHIGE DT, PREISS S (1995) Light-induced biogenesis of the light-harvesting complexes of photosystems I and II. *Photosynthesis Research* 44: 183-190
- MÜHLENHOFF U, KRUIP J, BRYANT DA, RÖGNER M, SÉTIF P, BOEKEMA E (1996) Characterization of a redox-active cross-linked complex between cyanobacterial photosystem I and its physiological acceptor flavodoxin. *EMBO Journal* 15: 488-497
- MUKERJI I SAUER K (1993) Energy transfer dynamics of an isolated light harvesting complex of photosystem I from spinach: time-resolved fluorescence measurements at 295 K and 77 K. *Biochimica et Biophysica Acta* 1142: 311-320
- MULKIDJANIAN AY, JUNGE W (1997) On the origin of photosynthesis as inferred from sequence analysis. *Photosynthesis Research* 51: 27-42
- MULLETT JE, BURKE JJ ARNTZEN CJ (1980) Chlorophyll proteins of photosystem I. *Plant Physiology* 65: 814-822
- NEUHOFF V (1981) Die Tüpfelprobe als einfaches Verfahren zur Proteinbestimmung. *Biologie in unserer Zeit* 11: 121-125
- NEUHOFF V, PHILLIPP K, ZIMMER H-G, MESECKE S (1979) A simple, versatile, sensitive and volumen-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* 360: 1657-1670
- NIELSEN VS, SCHELLER HV, MØLLER BL (1996) The photosystem I mutant *viridis-zb*<sup>63</sup> of barley (*Hordeum vulgare*) contains low amounts of active but unstable photosystem I. *Physiologia Plantarum* 98: 637-644
- NIELSSON A, STYS D, DRAKENBERG T, SPANGFORT MD, FORSEN S, ALLEN JF (1997) Phosphorylation controls the three-dimensional structure of plant light-harvesting complex II. *Journal of Biological Chemistry* 272: 18350-18357
- NUSSBERGER S, DÖRR K, WANG DN, KÜHLBRANDT W (1993) Lipid-Protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *Journal of Molecular Biology* 234: 347-356
- PACKER L (1993) Antioxidant action of carotenoids: *in vitro* and *in vivo* protection against oxidation of human low-density lipoproteins. *Annual Reviews of the New York Academy of Sciences* 691: 48-60
- PASCAL A, GASTALDELLI M, CEOLDO S, BASSI R, ROBERT B (2001) Pigment conformation and pigment-protein interactions in the reconstituted Lhcb4 antenna protein. *FEBS Letters* 492: 54-57
- PAULSEN H, BOROGRAD L (1988) Diurnal and circadian rhythms in the accumulation and synthesis of mRNA for the light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding-protein in tobacco. *Plant Physiology* 88: 1104-1109
- PAULSEN H, FINKENZELLER B, KÜHLEIN N (1993) Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *European Journal of Biochemistry* 215: 809-816
- PAULSEN H, HOBE S (1992) Pigment-binding properties of mutant light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein. *European Journal of Biochemistry* 205: 71-76
- PAULSEN H, 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. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 57: 139-142

- PAULSEN H, RÜMLER U, RÜDIGER W (1990) Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* 181: 204-211
- PETERMAN, EJG, HOBE S, CALKOEN F, VAN GRONDELLE R, PAULSEN H, VAN AMERONGEN H (1996) Low-temperature spectroscopy of monomeric and trimeric forms of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 1273: 171-174
- PIERSON BK, OLSON JM (1987) Evolution of photosynthesis in anoxygenic photosynthetic procaryots. in: COHEN Y, ROSENBERG E (eds.), Microbial Mats: 402-427. *American Society of Microbiologists*, Washington DC
- PLUMLEY FG, SCHMIDT GW (1987) Reconstitution of chlorophyll *a/b* light harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 84: 146-150
- PLUMLEY FG, SCHMIDT GW (1995) Light-harvesting chlorophyll *a/b* complexes: interdependent pigment synthesis and protein assembly. *The Plant Cell* 7: 689-704
- PORRA RJ, THOMPSON WA, KRIEDEMANN WE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975: 383-394
- REES DC, DEANTONIO L, EISENBERG D (1989) Hydrophobic organization of membrane proteins. *Science* 245: 510-513
- REMELLI R, VAROTTO C, SANDONÁ D, CROCE R, BASSI R (1999) Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex. *Journal of Biological Chemistry* 274: 33510-33521
- RHEE K-H, MORRIS EP, BARBER J, KÜHLBRANDT W (1998) Tree-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature* 396: 283-286
- RIVADOSSI A, ZUCHELLI G, GARLASCHI FM, JENNINGS RC (1999) The importance of PSI chlorophyll red forms in light-harvesting by leaves. *Photosynthesis Research* 60: 209-215
- ROGL H, KOSEMUND K, KÜHLBRANDT W, COLLINSON I (1998) Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Letters* 432: 21-26
- ROGL H, KÜHLBRANDT W (1999) Mutant trimers of light-harvesting complex II exhibit altered pigment content and spectroscopic features. *Biochemistry* 38: 16214-16222
- ROS F, BASSI R, PAULSEN H (1998) Pigment-binding properties of the recombinant photosystem II subunit CP26 reconstituted *in vitro*. *European Journal of Biochemistry* 253: 653-658
- RUBAN AV, YOUNG AJ, HORTON P (1996) Dynamic properties of the minor chlorophyll *a/b* binding proteins of photosystem II, an *in vitro* model for photoprotective energy dissipation in the photosynthetic membrane of green plants. *Biochemistry* 35: 674-678
- RUF S, KOSSEL H, BOCK R (1997) Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene. *Journal of Cell Biology* 139: 95-102
- RUPPRECHT J, PAULSEN H, SCHMID VHR (2000) Protein domains required for formation of stable monomeric Lhca1- and Lhca4-complexes. *Photosynthesis Research* 63: 217-224
- SAMBROCK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) Molecular cloning (2. ed) Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- SCHAEFER H (1999) Pigmente und Antennenkomplexe. in: HÄDER D-P (Hrsg.) Photosynthese. Thieme Verlag, Stuttgart: 65-114
- SCHELLER HV, JENSEN PE, HALDRUP A, LUNDE C, KNOETZEL J (2001) Role of subunits in eukaryotic photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta* 1507: 41-60

- SCHLEIFF E, SOLL J (2000) Travelling of proteins through membranes: translocation into chloroplasts. *Planta* 211: 449-456
- SCHMID V, BEUTELMANN P, SCHMIDT GW, PAULSEN H (1998) Ligand requirement for LHCl reconstitution. in: GARAB G (ed.), *Photosynthesis: mechanisms and Effects*, Vol I: 425-428. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- SCHMID VHR, CAMMARATA KV, BRUNS BU, SCHMIDT GW (1997) *In vitro* reconstitution of the photosystem I light-harvesting complex LHCl-730: heterodimerization is required for antenna pigment organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 7667-7672
- SCHMID VHR, THOMÉ P, RÜHLE W, PAULSEN H, KÜHLBRANDT W, ROGL H (2001) Chlorophyll *b* is involved in long-wavelength spectral properties of light-harvesting complexes LHC I and LHC II. *FEBS Letters* 499: 27-31
- SCHUBERT W-D, KLUKAS O, KRAUß N, SAENGER W, FROMME P, WITT HT (1997) Photosystem I of *Synechococcus elongatus* at 4 Å resolution: comprehensive structure analysis. *Journal of Molecular Biology* 272: 741-769
- SCHUBERT W-D, KLUKAS O, SAENGER W, WITT HT, FROMME P, KRAUß N (1998) A common ancestor for Oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems: a comparison based on the structural model of photosystem I. *Journal of Molecular Biology* 280: 297-314
- SCHWARTZ E, SHEN D, AEBERSHOLD R, MCGRATH JM, PICERSKY E, GREEN BR (1991) Nucleotide sequence and chromosomal location of Cab11 and Cab12, the genes for the fourth polypeptide of photosystem I light-harvesting antenna (LHCl). *FEBS Letters* 280: 229-234
- SHUBIN VV, BEZSMERTNAYA IN, KARAPETYAN NV (1992) Isolation from *Spirulina* membranes of two photosystem I-type complexes, one of which contains chlorophyll responsible for the 77 K fluorescence band at 760 nm. *FEBS Letters* 309: 340-342
- SIEFERMANN-HARMS D (1985) Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochimica et Biophysica Acta* 811: 325-355
- SILVERTHORNE J, TOBIN EM (1984) Demonstration of transcriptional regulation of specific genes by phytochrome action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 81: 1112-1116
- SIMIDJIEV I, BARZDA V, MUSTÁRDY L, GARAB G (1998) Role of thylakoid lipids in the structural flexibility of lamellar aggregates of the isolated light-harvesting chlorophyll *a/b* complex of photosystem II. *Biochemistry* 37: 4169-4173
- SIMONETTO R, CRIMI M, SANDONÁ D, CROCE R, CINQUE G, BRETON J, BASSI R (1999) Orientation of chlorophyll transition moments in the higher-plant light-harvesting complex CP29. *Biochemistry* 38: 12974-12983
- SLOWINSKI JB, PAGE RDM (1999) How should species phylogenies be inferred from sequence data? *Systematic Biology* 48 (4): 814-825
- SOLL J, TIEN R (1998) Protein translocation into and across the chloroplastic envelope membranes. *Plant Molecular Biology* 38: 191-207
- SONOIKE K (1996) Degradation of PsaB gene product, the reaction center subunit of photosystem I, is caused during photoinhibition of photosystem I: possible involvement of active oxygen species. *Plant Science* 115: 157-164
- SONOIKE K (1998) Various aspects of inhibition of photosynthesis under light/chilling stress. „Photoinhibition at chilling temperatures“ versus „chilling damage in the light“. *Journal of Plant Research*: 121-129



- STAHL U, TUSOV VB, PASCHENKO VZ, VOIGT J (1989) Spectroscopic investigations of fluorescence behavior, role and function of the long-wavelength pigments of photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta* 973: 198-204
- SUNDSTRÖM V, VAN GRONDELLE R (1995) in: BLANKENSHIP RE, MADIGAN MT, BAUER CE (eds.), Anoxygenic photosynthetic bacteria, Vol I: 349-372. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam
- SZCZEPANIAK A, HUANG D, KEERAN TW, CRAMER WA (1991) Electrostatic destabilization of the cytochrome  $b_6/f$  complex in the thylakoid membrane. *EMBO Journal* 10: 2757-2764
- TEICHER HB, MØLLER BL, SCHELLER HV (2000) Photoinhibition of photosystem I in field grown barley (*Hordeum vulgare* L.): Induction, recovery and acclimation. *Photosynthesis Research* 64: 53-61
- TERASHIMA I, NOGUCHI K, ITOH-NEMOTO T, PARK Y-M, KUBO A, TANAKA K (1998) The cause of PSI photoinhibition at low temperatures in leaves of *Cucumis sativus*, a chilling-sensitive plant. *Physiologia Plantarum* 103: 295-303
- THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680
- THORNER JP (1975) Chlorophyll-proteins: light-harvesting and reaction center components of plants. *Annual Reviews in Plant Physiology* 26: 127-158
- TJUS SE, MØLLER BL, SCHELLER HV (1998) Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures. *Plant Physiology* 116: 755-764
- TJUS SE, MØLLER BL, SCHELLER HV (1999) Photoinhibition of photosystem I damages both reaction center proteins PSI-A and PSI-B and acceptor-side located small photosystem I polypeptides. *Photosynthesis Research* 60: 75-86
- TJUS SE, ROOBOL-BÓZA M, PÁLSSON LO, ANDERSSON B (1995) Rapid isolation of photosystem I chlorophyll-binding proteins by anion exchange perfusion chromatography. *Photosynthesis Research* 45: 41-49
- TRISSEL H-W (1993) Long-wavelength absorbing antenna pigments and heterogeneous absorption bands concentrate excitons and increase absorption cross section. *Photosynthesis Research* 35: 247-263
- TURCONI S, WEBER N, SCHWEITZER G, STROTMANN H, HOLZWARTH AR (1994) Energy transfer and charge separation kinetics in photosystem I. 2. Picosecond fluorescence study of various PSI particles and light-harvesting complex isolated from higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1187: 324-334
- VAN DER VERE PS, BENETT TM, OBLONG JE, LAMPPA GK (1995) A chloroplast processing enzyme involved in precursor maturation shares a zinc-binding motif with a recently recognised family of metalloendopeptidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 7177-7181
- VAN GRONDELLE R, DEKKER JP, GILLBRO T, SUNDSTRÖM V (1994) Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1187: 1-65
- VON HEIJNE G, GAVEL Y (1988) Topogenic signals in integral membrane proteins. *European Journal of Biochemistry* 174: 671-674
- WAEGEMANN K, SOLL J (1996) Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *Journal of Molecular Chemistry* 271: 6545-6554
- WANTANBE T, KOBAYASHI M, HONGU A, NAKAZOTO M, HIYAMA T, MURATA M (1985) Evidence that a chlorophyll  $a'$  dimer constitutes the photochemical reaction centre I (P700) in photosynthetic apparatus. *FEBS Letters* 235: 252-256

- WHITE MJ, FRISTENSKY BW, FALCONET D, CHILDS LC, WATSON JC, ALEXANDER L, ROE BA, THOMPSON WF (1992) Expression of the chlorophyll-*a/b*-protein multigene family in pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 188: 190-198
- WITTMERSHAUS BP, WOOLF VM, VERMAAS WJM (1992) Temperature dependence and polarization of fluorescence from photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynthesis Research* 31: 75-87
- YANISCH-PERRON C, VIERA J, MESSING J (1985) Improved m13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 Vectors. *Gene* 33: 103-119
- YOUNG AJ (1993) Occurrence and distribution of carotenoids in photosynthetic systems. in: YOUNG A, BRITTON G (eds.), Carotenoids in photosynthesis: 61-71. Chapman and Hall, London
- YOUNG RA, DAVIS RW (1983) Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 80: 1194-1198
- ZHANG H, GOODMAN HM, JANSSON S (1997) Antisense inhibition of the photosystem I antenna protein Lhca4 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 115: 1525-1531

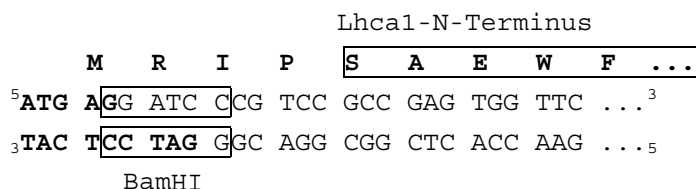
## **8 Anhang**

<b>A 1</b>	Verwendete Nukleotidprimer	123-126
<b>A 2</b>	Ermittelte DNA-Sequenzen für Lhca1	127-132
<b>A 3</b>	Ermittelte DNA-Sequenzen für Lhca4	133-136
<b>A 4</b>	Verwendete LHC-Sequenzen angiospermer Pflanzen	137-140
<b>A 5</b>	Vergleich der verwendeten LHC-Sequenzen angiospermer Pflanzen	141-142
<b>A 6</b>	Publikationen und Tagungsbeiträge	143
<b>Danksagung</b>		145



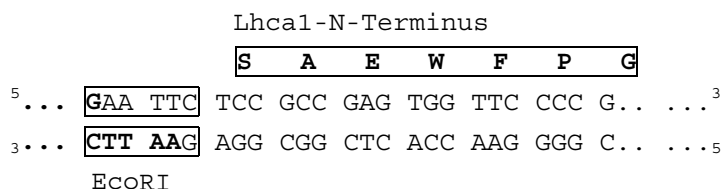
**Übersicht über verwendete Nukleotidprimer:** *TM* = Schmelztemperatur bei 50 mM Na (<sup>a)</sup> nach Angaben des Herstellers, <sup>b)</sup> nach eigenen Berechnungen); % GC = Anteil G und C an der Primersequenz; *ggact* = klein gesetzte Nukleotide wurden für *TM*-Abgleich ergänzt.

**1-N-Bam** 5'ATGAGGATCCCGTCCGCCGAGTGGTTC<sup>3</sup>



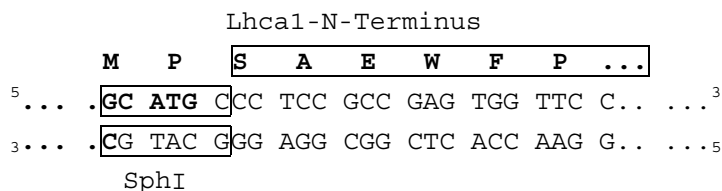
**Länge** 27 Nukleotide  
**Hersteller** GIBCO BRL  
**TM** <sup>a)</sup> 61°C / <sup>b)</sup> 66°C  
**% GC** 62

**1-N-Eco** 5'GAATTCTCCGCCGAGTGGTTCCCCG<sup>3</sup>



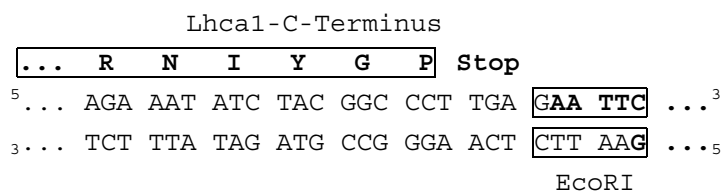
**Länge** 25 Nukleotide  
**Hersteller** GIBCO BRL  
**TM** <sup>a)</sup> 59°C / <sup>b)</sup> 64°C  
**% GC** 64

**1-N-Sph** 5'aatcGCATGCCCTCCGCCGAGTGGTTCC<sup>3</sup>



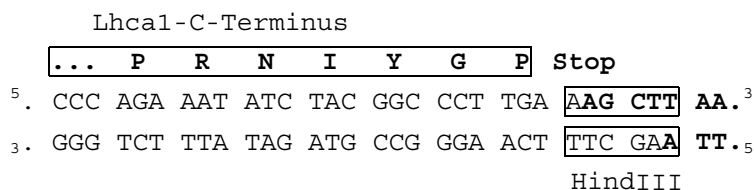
**Länge** 28 Nukleotide  
**Hersteller** GIBCO BRL  
**TM** <sup>a)</sup> 62°C / <sup>b)</sup> 67°C  
**% GC** 64

**1-C-Eco** 5'GAATTCTCAAGGGCCGTAGATATTGCT<sup>3</sup>



**Länge** 27 Nukleotide  
**Hersteller** GIBCO BRL  
**TM** <sup>a)</sup> 53°C / <sup>b)</sup> 58°C  
**% GC** 44

**1-C-Hind** 5'gTTAAGCTTTCAAGGGCCGTAGATATTTCTGGG<sup>3</sup>



**Länge** 33 Nukleotide  
**Hersteller** GIBCO BRL  
**TM** <sup>a)</sup> 58°C / <sup>b)</sup> 63°C  
**% GC** 45

**4-N-Bam** 5'ATGAGGATCCGGGCCAAGGGGTCTGG<sup>3</sup>

Lhca4-N-Terminus

M	R	I	P	A	K	G	S	W	...
---	---	---	---	---	---	---	---	---	-----

5'ATG AGG ATC CCG GCC AAG GGG TCC TGG ...<sup>3</sup>  
<sup>3</sup>TAC TCC TAG GGC CGG TTC CCC AGG ACC ...<sup>5</sup>

BamHI

**Länge** 27 Nukleotide  
**Hersteller** GIBCO BRL  
**TM** <sup>a)</sup> 62°C / <sup>b)</sup> 67°C  
**% GC** 66

**4-N-Eco** 5'GAATTCGCCAAGGGGTCTGGCTC<sup>3</sup>

Lhca4-N-Terminus

A	K	G	S	W	L	...
---	---	---	---	---	---	-----

5... GAA TTC GCC AAG GGG TCC TGG CTC ...<sup>3</sup>  
<sup>3</sup>... CTT AAG CGG TTC CCC AGG ACC GAG ...<sup>5</sup>

EcoRI

**Länge** 24 Nukleotide  
**Hersteller** GIBCO BRL  
**TM** <sup>a)</sup> 57°C / <sup>b)</sup> 63°C  
**% GC** 62

**4-N-Sph** 5'attcGCATGCCGGCCAAGGGGTCTGGCT<sup>3</sup>

Lhca4-N-Terminus

M	P	A	K	G	S	W	L	...
---	---	---	---	---	---	---	---	-----

5... GC ATG CCG GCC AAG GGG TCC TGG CT...<sup>3</sup>  
<sup>3</sup>... CG TAC GGC CGG TTC CCC AGG ACC GA...<sup>5</sup>

SphI

**Länge** 29 Nukleotide  
**Hersteller** GIBCO BRL  
**TM** <sup>a)</sup> 63°C / <sup>b)</sup> 69°C  
**% GC** 65

**4-C-Hind** 5'gggTAAGCTTCATTGGCCGGAGATGGTCTG<sup>3</sup>

Lhca4-N-Terminus

...	Q	T	I	S	G	Q	Stop
-----	---	---	---	---	---	---	------

5... CAG ACC ATC TCC GGC CAA TGA A AGC TTA ...<sup>3</sup>  
<sup>3</sup>... GTC TGG TAG AGG CCG GTT ACT T TCG AAT ...<sup>5</sup>

HindIII

**Länge** 30 Nukleotide  
**Hersteller** GIBCO BRL  
**TM** <sup>a)</sup> 63°C / <sup>b)</sup> 69°C  
**% GC** 56

**4-C-Eco** 5'GAATTCTTATTGGCCGGTGATGGTCTGGAT<sup>3</sup>

Lhca4-C-Terminus

..	I	Q	T	I	S	G	Q	Stop
----	---	---	---	---	---	---	---	------

5.. ATC CAG ACC ATC TCC GGC CAA TAA GAA TTC ..<sup>3</sup>  
<sup>3</sup>.. TAG GTC TGG TAG TGG CCG GTT ATT CTT AAG ..<sup>5</sup>

EcoRI

**Länge** 30 Nukleotide  
**Hersteller** GIBCO BRL  
**TM** <sup>a)</sup> 53°C / <sup>b)</sup> 62°C  
**% GC** 46

**4-IN-L** 5'GCCTTGGTCAGCACCTCCGGGATCAG<sup>3</sup>

...	L	I	P	E	V	L	T	K	A	...
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-----

5... CTG ATC CCG GAG GTG CTG ACC AAG GC. ...<sup>3</sup>  
 3... GAC TAG GGC CTC CAC GAC TGG TTC CG. ...<sup>5</sup>

**Länge** 26 Nukleotide  
**Hersteller** MWG-BIOTECH  
**TM** a) 70°C / b) 74°C  
**% GC** 65

**λgt11** 5'GGTGGCGACGACTCCTGGAGCC<sup>3</sup>

**Länge** 22 Nukleotide  
**Hersteller** GIBCO BRL  
**TM** a) 59°C / b) 64°C  
**% GC** 72

**pDS-start** 5'CAGAATTCATTAAGAGG<sup>3</sup>

**Länge** 18 Nukleotide  
**Hersteller** GIBCO BRL  
**TM** a) 36°C / b) 47°C  
**% GC** 33

**pDS-stop** 5'ACCGAGCGTTCTGAA<sup>3</sup>

**Länge** 15 Nukleotide  
**Hersteller** GIBCO BRL  
**TM** a) 37°C / b) 46°C  
**% GC** 53





Übersicht über die für die Bestimmung der *consensus*-Sequenz von Lhca1-TP verwendeten Nukleotidsequenzen mit Angaben zur internen Sequenznummer, Anzahl der bestimmten Basen sowie Sequenz- und Templategenerierung; <sup>1</sup> Sequenz als reverse Konvertierung ausgewertet.

Sequenz	Sequenzierung			Amplifikation und Klonierung	
	Basen	Primer	Template	Vektor	Basis
98042712	538	pDS-start	rPlasmid	pDS-B/H	mRNA
98042713 <sup>1</sup>	520	pDS-stop	rPlasmid	pDS-B/H	mRNA
98042714	700	pDS-start	rPlasmid	pDS-B/H	mRNA
98042715 <sup>1</sup>	700	pDS-stop	rPlasmid	pDS-B/H	mRNA
98042716	479	pDS-start	rPlasmid	pDS-S/H	mRNA
98042717	730	pDS-stop	rPlasmid	pDS-S/H	mRNA
98042718	750	pDS-start	rPlasmid	pDS-S/H	mRNA
98042719	750	pDS-stop	rPlasmid	pDS-S/H	mRNA
98061109	598	pDS-stop	rPlasmid	pDS-B/H	mRNA
98061110 <sup>1</sup>	500	pDS-stop	rPlasmid	pDS-S//H	mRNA
98080626	849	pDS-start	rPlasmid	pDS-B/H	mRNA
98080627 <sup>1</sup>	160	pDS-stop	rPlasmid	pDS-B/H	mRNA
98080628	619	pDS-start	rPlasmid	pDS-B/H	mRNA
98080629 <sup>1</sup>	700	pDS-stop	rPlasmid	pDS-B/H	mRNA
98080630	731	pDS-start	rPlasmid	pDS-B/H	mRNA
98080631 <sup>1</sup>	700	pDS-stop	rPlasmid	pDS-B/H	mRNA
99061711	785	λgt11	PCR-Produkt	barley-λgt11	cDNA
99061712 <sup>1</sup>	782	1-C-Eco	PCR-Produkt	barley-λgt11	cDNA
99072121	500	λgt11	PCR-Produkt	barley-λgt11	cDNA

Alignment aller ausgewerteten Lhca1-Sequenzen mit abgeleiteter Consensus-Sequenz für Lhca1-TP; Primersequenzen, Vektorbereiche sowie abweichende Basen<sup>A</sup> gekennzeichnet.

98042712	-----	
98042713	-----	
98042714	-----	
98042715	-----	
98042716	-----	
98042717	-----	
98042718	-----	
98042719	-----GTGAGCGGATACCAaTT	17
98061109	-----	
98061110	-----	
98080626	-----	
98080627	-----	
98080630	-----	
98080631	-----	
99061711	GCAGCAATGGCTATGGCGTCGTCAAGCGGGCTCAGGAGCTGCAGCGCCGTGGGCGTGCCGAGCCTG	118
99061712	GCAGCAATGGCTATGGCGTCGTCAAGCGGGCTCAGGAGCTGCAGCGCCGTGGGCGTGCCGAGCCTG	122
99072121	GCAGCAATGGCTATGGCGTCGTCAAGCGGGCTCAGGAGCTGCAGCGCCGTGGGCGTGCCGAGCCTG	118
<b>Lhca1-TP</b>	<b>.....ATGGCGTCGTCAAGCGGGCTCAGGAGCTGCAGCGCCGTGGGCGTGCCGAGCCTG</b>	<b>54</b>

<sup>A</sup> verwendete Symbole (IUPAC-Code): **A** (Adenin), **C** (Cytosin), **G** (Guanin), **T** (Thymin), **N** (A oder C oder G oder T), **M** (A oder C), **R** (A oder G), **W** (A oder T), **S** (C oder G), **Y** (C oder T), **K** (G oder T), **V** (A oder C oder G; nicht T), **H** (A oder C oder T; nicht G), **D** (A oder G oder T; nicht C), **B** (C oder G oder T; nicht A)

98042712 -----  
 98042713 -----  
 98042714 -----  
 98042715 -----ATTTACACAGAATTCATTAAAGAGgAGAAATTAkCT 37  
 98042716 -----  
 98042717 --TAATAGATTCAATTGTGAGCGGATA-CAATTTACACAGAATTCATTAAAGAGgAGAAATTA --- 61  
 98042718 -----  
 98042719 ATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATAkCAATTTACACAGAATTCAtTAAAGAGgAGAAATTA --- 80  
 98061109 -----  
 98061110 -----  
 98080626 -----  
 98080627 -----  
 98080628 -----  
 98080629 -----ATTTACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAkCT 37  
 98080630 -----  
 98080631 -----ATTTACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAct 37  
 99061711 CTGGCGCCTTCGTCCCGGTCCGGCCGCTCCGGACTGCCGTTCTGCGCCTACGCCACCACCTCCGGC 184  
 99061712 CTGGCGCCTTCGTCCCGGTCCGGCCGCTCCGGACTGCCGTTCTGCGCCTACGCCACCACCTCCGGC 188  
 99072121 CTGGCGCCTTCGTCCCGGTCCGGCCGCTCCGGACTGCCGTTCTGCGCCTACGCCACCACCTCCGGC 184  
**Lhca1-TP CTGGCGCCTTCGTCCCGGTCCGGCCGCTCCGGACTGCCGTTCTGCGCCTACGCCACCACCTCCGGC 120**

98042712 -----CGAGTGGTTCCCCGgCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 48  
 98042713 -----  
 98042714 -----GTCCGCCGAGTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 54  
 98042715 ATGAGGATCCCGTCCGCCGAGTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 102  
 98042716 -----GTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 46  
 98042717 ---AGCATGCCCTCCGCCGAGTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 124  
 98042718 ---ATGCCCTCCGCCGAGTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 60  
 98042719 ---AGCATGCCCTCCGCCGAGTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 143  
 98061109 -----G 1  
 98061110 -----  
 98080626 ATGAGGATCCCGTCCGCCGAGTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 66  
 98080627 -----  
 98080628 ATGAGGATCCCGTCCGCCGAGTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 66  
 98080629 ATGAGGATCCCGTCCGCCGAGTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGATCCGCCATCTGGACGGTTCTCTCG 103  
 98080630 -----TCCGCCGAGTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 54  
 98080631 ATGAGGATCCCGTCCGCCGAGTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 103  
 99061711 CGCGTACCATGTCCGCCGAGTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 250  
 99061712 CGCGTACCATGTCCGCCGAGTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 254  
 99072121 CGCGTACCATGTCCGCCGAGTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 250  
**Lhca1-TP CGCGTACCATGTCCGCCGAGTGGTTCCCCGGCCAGCCCCGCCCCGCCATCTGGACGGCTCCTCG 186**

98042712 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 114  
 98042713 -----  
 98042714 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 122  
 98042715 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 168  
 98042716 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 112  
 98042717 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 190  
 98042718 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 126  
 98042719 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 209  
 98061109 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 67  
 98061110 -----  
 98080626 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 132  
 98080627 -----  
 98080628 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 132  
 98080629 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 169  
 98080630 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 120  
 98080631 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 169  
 99061711 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 316  
 99061712 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 320  
 99072121 CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 316  
**Lhca1-TP CCAGGGGACTTCGGGTTGACCCCCCTGGGCCTCGCCACCGTGCCGAGAACTTCGAGCGGTTCAAG 252**

98042712 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 179  
 98042713 -----CTACCACTGCCGCTGGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 55  
 98042714 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 185  
 98042715 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 233  
 98042716 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 177  
 98042717 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 255  
 98042718 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 191  
 98042719 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 274  
 98061109 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 132  
 98061110 -----ATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 35  
 98080626 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 197  
 98080627 -----  
 98080628 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 197  
 98080629 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 234  
 98080630 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 185  
 98080631 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 234  
 99061711 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 381  
 99061712 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 385  
 99072121 GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 381

**Lhca1 - TP GAGTCCGAGATCTACCACTGCCGCT - GGGCCATGCTCTGCGTGCCAGGGGTGCTGGTGCCGGAGGC 317**

98042712 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 245  
 98042713 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 121  
 98042714 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 251  
 98042715 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 299  
 98042716 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 243  
 98042717 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 321  
 98042718 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 257  
 98042719 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 339  
 98061109 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 198  
 98061110 GCTGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 100  
 98080626 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 263  
 98080627 -----  
 98080628 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 263  
 98080629 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 299  
 98080630 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 251  
 98080631 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 300  
 99061711 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 447  
 99061712 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 451  
 99072121 GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 447

**Lhca1 - TP GCTGGGGCTGGGCAACTGGGTGAAGGCGCAGAGTGGGCGGCGCTCCCAGACGGGCAGGCACGTA 383**

98042712 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTCCCTGGCCATCGC 310  
 98042713 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTCCCTGGCCATCGC 186  
 98042714 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 316  
 98042715 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 364  
 98042716 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 308  
 98042717 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 386  
 98042718 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 322  
 98042719 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 404  
 98061109 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 263  
 98061110 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 166  
 98080626 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 328  
 98080627 -----  
 98080628 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 328  
 98080629 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 355  
 98080630 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 316  
 98080631 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 365  
 99061711 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 512  
 99061712 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 516  
 99072121 CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGT----- 500

**Lhca1 - TP CCTGGGCAACCCGGTGCCGTGGGGCAACCTGCGACCATCCTGGCGATCGAGTTCCTGGCCATCGC 548**

98042712 CTTCG - CGGAGCAGCAKCC - CACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 375  
 98042713 CTTCG - CGGAGCAGCAGC - CACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 251  
 98042714 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 382  
 98042715 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 430  
 98042716 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 374  
 98042717 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 452  
 98042718 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 388  
 98042719 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 470  
 98061109 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 329  
 98061110 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 232  
 98080626 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 394  
 98080627 -----  
 98080628 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 394  
 98080629 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 431  
 98080630 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 382  
 98080631 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 431  
 99061711 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 578  
 99061712 CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 582  
 99072121 -----

**Lhca1-TP CTTCG - CGGAGCAGCAGCGCACCATGGAGAAGGACCCGGAGAAGAAGAAGTACCCCGGCGGCCT 514**

98042712 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 441  
 98042713 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 317  
 98042714 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 448  
 98042715 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 496  
 98042716 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 440  
 98042717 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 518  
 98042718 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 454  
 98042719 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 536  
 98061109 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 395  
 98061110 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 298  
 98080626 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 460  
 98080627 -----  
 98080628 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 460  
 98080629 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 497  
 98080630 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 449  
 98080631 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 497  
 99061711 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 644  
 99061712 TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 648  
 99072121 -----

**Lhca1-TP TCGACCCGCTCGGCTTCTCCAAGGACCCCGCCAAGTTCGAGGAGCTCAAGCTCAAGGAGATCAAGA 580**

98042712 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 507  
 98042713 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 383  
 98042714 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 514  
 98042715 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 562  
 98042716 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGGC----- 479  
 98042717 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 584  
 98042718 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 520  
 98042719 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 602  
 98061109 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 461  
 98061110 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 364  
 98080626 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 526  
 98080627 -----CAGTGGCGTACCCCGGCACCG 22  
 98080628 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 526  
 98080629 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 563  
 98080630 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 514  
 98080631 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 563  
 99061711 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 710  
 99061712 ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 714  
 99072121 -----

**Lhca1-TP ACGGGCGGCTGGCGATGCTGGCGTTCTGGGGTTCTGCGTGCAGCAGTGGCGTACCCCGGCACCG 646**

98042712	GCCCGCTGGAGAACCTGGCA <sup>V</sup> GCACCTCGC-----	538
98042713	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGTCA	449
98042714	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACACCGTCA	580
98042715	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACACCGTCA	628
98042716	-----	
98042717	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGTCA	650
98042718	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGCCA	586
98042719	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGCCA	668
98061109	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGTCA	527
98061110	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGTCA	429
98080626	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGTCA	592
98080627	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGTCA	88
98080628	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGTCA	592
98080629	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGTCA	629
98080630	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGTCA	581
98080631	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGTCA	629
99061711	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGTCA	776
99061712	GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGTCA	780
99072121	-----	
<b>Lhca1-TP</b>	<b>GCCCGCTGGAGAACCTGGCCACGCACCTCGCGACCCGTGGCACAACAACATCGGCGACATCGTCA</b>	<b>712</b>
98042712	-----	
98042713	TC <u>CCCAGAAATATCTACGGCCCTTGAAAGCTTAA</u> TTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC	515
98042714	TC <u>CCCAGAAATATCTACGGCCCTTGAAAGCTTAA</u> TTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC	646
98042715	TC <u>CCCAGAAATATCTACGGCCCTTGAAAGCTTAA</u> TTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC	694
98042716	-----	
98042717	TC <u>CCCAGAAATATCTACGGCCCTTGAAAGCTTAA</u> TTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC	716
98042718	TC <u>CCCAGAAATATCTACGGCACTTGAAAGCTTAA</u> TTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC	652
98042719	TC <u>CCCAGAAATATCTACGGCACTTGAAAGCTTAA</u> TTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC	734
98061109	TC <u>CCCAGAAATATCTACGGCCCTTGAAAGCTTAA</u> TTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC	593
98061110	TC <u>CCCAGAAATATCTACGGCCCTTGAAAGCTTAA</u> TTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC	495
98080626	TC <u>CCCAGAAATATCTACGGCCCTTGAAAGCTTAA</u> TTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC	658
98080627	TC <u>CCCAGAAATATCTACGGCCCTTGAAAGCTTAA</u> TTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC	154
98080628	TC <u>CCCAGAAATATCTACGGCCCTTGA</u> -----	619
98080629	TC <u>CCCAGAAATATCTACGGCCCTTGAAAGCTTAA</u> TTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC	696
98080630	TC <u>CCCAGAAATATCTACGGCCCTTGAAAGCTTAA</u> TTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC	646
98080631	TC <u>CCCAGAAATATCTACGGCCCTTGAAAGCTTAA</u> TTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC	695
99061711	TCCCCAGCA-----	785
99061712	TC-----	782
99072121	-----	
<b>Lhca1-TP</b>	<b>TCCCCAGAAATATCTACGGCCCT.....</b>	<b>735</b>



Übersicht über die für die Bestimmung der *consensus*-Sequenz von Lhca4-TP verwendeten Nukleotidsequenzen mit Angaben zur internen Sequenznummer, Anzahl der bestimmten Basen sowie Sequenz- und Templategenerierung; <sup>1</sup> Sequenz als reverse Konvertierung ausgewertet.

Sequenz	Sequenzierung			Amplifikation und Klonierung	
	Basen	Primer	Template	Vektor	Basis
98042724	710	pDS-start	rPlasmid	pDS-S/H	mRNA
98042725 <sup>1</sup>	730	pDS-stop	rPlasmid	pDS-S/H	mRNA
98042726	710	pDS-start	rPlasmid	pDS-S/H	mRNA
98042727 <sup>1</sup>	700	pDS-stop	rPlasmid	pDS-S/H	mRNA
98061111	510	pDS-stop	rPlasmid	pDS-B/H	mRNA
98061112	675	pDS-stop	rPlasmid	pDS-S/H	mRNA
98092829 <sup>1</sup>	620	pDs-start	rPlasmid	pDS-B/H	mRNA
98092830 <sup>1</sup>	641	pDS-stop	rPlasmid	pDS-B/H	mRNA
00020331	693	λgt11	PCR-Produkt	barley-λgt11	cDNA
00031102	713	λgt11	PCR-Produkt	barley-λgt11	cDNA
00031103 <sup>1</sup>	482	4-C-Hind	PCR-Produkt	barley-λgt11	cDNA
00032622 <sup>1</sup>	314	4-IN-L	PCR-Produkt	barley-λgt11	cDNA

Alignment aller ausgewerteten Lhca4-Sequenzen mit abgeleiteter Consensus-Sequenz für Lhca4-TP; Primersequenzen, Vektorbereiche sowie abweichende Basen<sup>A</sup> gekennzeichnet.

98042724	-----	
98042725	-----	
98042726	-----	
98042727	-----	
98061111	-----	
98061112	-----	
98092829	-----	
98092830	-----	
00020331	-----CGGAAGGA-GTCA	11
00031102	-----CGTCAGTATCGGCGGAATTCCGGCGG-CGTCA	31
00031103	-----ATTCGGCGGC-CGTCA	16
00032622	-----TGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCCGGCGG-CGTCA	54
<b>Lhca4 - TP</b>	.....TCA	<b>3</b>

<sup>A</sup> verwendete Symbole (IUPAC-Code): **A** (Adenin), **C** (Cytosin), **G** (Guanin), **T** (Thymin), **N** (A oder C oder G oder T), **M** (A oder C), **R** (A oder G), **W** (A oder T), **S** (C oder G), **Y** (C oder T), **K** (G oder T), **V** (A oder C oder G; nicht T), **H** (A oder C oder T; nicht G), **D** (A oder G oder T; nicht C), **B** (C oder G oder T; nicht A).

98042724	-----		
98042725	-----ATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATAKCAATTTACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAA	60	
98042726	-----		
98042727	-----TCACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAA	28	
98061111	-----		
98061112	-----		
98092829	-----CT	2	
98092830	-----		
00020331	G <sup>S</sup> GTCGAGCCCCGGTTCCTGGGGGACTCCGGCCGCGTCGGGCTCGCCAAGTCCACCCGCCGCGAC	87	
00031102	GCGTCGAGCCCCGGTTCCTGGGGGACTCCGGCCGCGTCGGGCTCGCCAAGTCCACCCGCCGCGAC	97	
00031103	GCGTCGAGCCCCGGTTCCTGGGGGACTCCGGCCGCGTCGGGCTCGCCAAGTCCACCCGCCGCGAC	81	
00032622	GCGTCGAGCCCCGGTTCCTGGGGGACTCCGGCCGCGTCGGGCTCGCCAAGTCCACCCGCCGCGAC	120	
<b>Lhca4 - TP</b>	<b>GCGTCGAGCCCCGGTTCCTGGGGGACTCCGGCCGCGTCGGGCTCGCCAAGTCCACCCGCCGCGAC</b>	<b>69</b>	
98042724	-----TGCCGGCCAAGGGTCTGGCT		58
98042725	TTAAGCATGCCGGCCAAGGGTCTGGCT	125	
98042726	-----TGCCGGCCAAGGGTCTGGCT		58
98042727	TTAAGCATGCCGGCCAAGGGTCTGGCT	93	
98061111	-----		
98061112	-----AAAGGGGTCTGGCT		52
98092829	ATGAGGATCCCGCCAAGGGTCTGGCT	67	
98092830	-----		
00020331	GTCGCCGTCCAGGCCAAGGGTCTGGCTCCCGGCCTCCAGTCCCCTGCCTACCTCGACGG-CAG	142	
00031102	GTCGCCGTCCAGGCCAAGGGTCTGGCTCCCGGCCTCCAGTCCCCTGCCTACCTCGACGG-CAG	162	
00031103	GTCGCCGTCCAGGCCAAGGGTCTGGCTCCCGGCCTCCAGTCCCCTGCCTACCTCGACGG-CAG	148	
00032622	GTCGCCGTCCAGGCCAAGGGTCTGGCTCCCGGCCTCCAGTCCCCTGCCTACCTCGACGG-CAG	185	
<b>Lhca4 - TP</b>	<b>GTCGCCGTCCAGGCCAAGGGTCTGGCTCCCGGCCTCCAGTCCCCTGCCTACCTCGACGG-CAG</b>	<b>134</b>	
98042724	TCTGGCGGGTGACAATGGTTTTGACCCGCTGGCGCTGGCGGAGGACCCGGAGGACCT-GCGGTGGT	123	
98042725	TCTGGCGGGTGACAATGGTTTTGACCCGCTGGCGCTGGCGGAGGACCCGGAGGACCT-GCGGTGGT	190	
98042726	TCTGGCGGGTGACAATGGTTTTGACCCGCTGGCGCTGGCGGAGGACCCGGAGGACCT-GCGGTGGT	123	
98042727	TCTGGCGGGTGACAATGGTTTTGACCCGCTGGCGCTGGCGGAGGACCCGGAGGACCT-GCGGTGGT	158	
98061111	-----		
98061112	TCTGGCGGGTGACAATGGTTTTGACCCGCTGGCGCTGGCGGAGGACCCGGAGGACCT-GCGGTGGT	118	
98092829	TCTGGCGGGTGACAATGGTTTTGACCCGCTGGCGCTGGCGGAGGACCCGGAGGACCT-GCGGTGGT	132	
98092830	-----AATGGTTTTGACCCGCTGGCGCTGGCGGAGGACCCGGAGGACCT-GCGGTGGT	52	
00020331	TCTGGCGGGTGACAATGGTTTTGACCCGCTGGCGCTGGCGGAGGACCCGGAGGACCT-GCGGTGGT	207	
00031102	TCTGGCGGGTGACAATGGTTTTGACCCGCTGGCGCTGGCGGAGGACCCGGAGGACCT-GCGGTGGT	227	
00031103	TCTGGCGGGTGACAATGGTTTTGACCCGCTGGCGCTGGCGGAGGACCCGGAGGACCT-GCGGTGGT	213	
00032622	TCTGGCGGGTGACAATGGTTTTGACCCGCTGGCGCTGGCGGAGGACCCGGAGGACCT-GCGGTGGT	250	
<b>Lhca4 - TP</b>	<b>TCTGGCGGGTGACAATGGTTTTGACCCGCTGGCGCTGGCGGAGGACCCGGAGGACCT-GCGGTGGT</b>	<b>199</b>	
98042724	TCGTGCAGGCGGAGCTGGTGAACGGGCGGTGGGCGATGCTGGGGGTGGCGGGG-ATGCTGATCCCG	188	
98042725	TCGTGCAGGCGGAGCTGGTGAACGGGCGGTGGGCGATGCTGGGGGTGGCGGGG-ATGCTGATCCCG	255	
98042726	TCGTGCAGGCGGAGCTGGTGAACGGGCGGTGGGCGATGCTGGGGGTGGCGGGG-ATGCTGATCCCG	188	
98042727	TCGTGCAGGCGGAGCTGGTGAACGGGCGGTGGGCGATGCTGGGGGTGGCGGGG-ATGCTGATCCCG	222	
98061111	-----GGGCGGTGG <sup>S</sup> CGATGCTGGGGGTG <sup>S</sup> CGGGG <sup>S</sup> ATGCTGATCCCG	43	
98061112	TCGTGCAGGCGGAGCTGGTGAACGGGCGGTGGGCGATGCTGGGGGTGGCGGGG-ATGCTGATCCCG	183	
98092829	TCGTGCAGGCGGAGCTGGTGAACGGGCGGTGGGCGATGCTGGGGGTGGCGGGG-ATGCTGATCCCG	197	
98092830	TCGTGCAGGCGGAGCTGGTGAACGGGCGGTGGGCGATGCTGGGGGTGGCGGGG-ATGCTGATCCCG	117	
00020331	TCGTGCAGGCGGAGCTGGTGAACGGGCGGTGGGCGATGCTGGGGGTGGCGGGG-ATGCTGATCCCG	272	
00031102	TCGTGCAGGCGGAGCTGGTGAACGGGCGGTGGGCGATGCTGGGGGTGGCGGGG-ATGCTGATCCCG	292	
00031103	TCGTGCAGGCGGAGCTGGTGAACGGGCGGTGGGCGATGCTGGGGGTGGCGGGG <sup>S</sup> ATGCTGATCCCG	279	
00032622	TCGTGCAGGCGGAGCTGGTGAACGGGCGGTGGGCGATGCTGGGGG <sup>S</sup> GGCGGGG <sup>S</sup> -----CTGATCCCG	311	
<b>Lhca4 - TP</b>	<b>TCGTGCAGGCGGAGCTGGTGAACGGGCGGTGGGCGATGCTGGGGGTGGCGGGG-ATGCTGATCCCG</b>	<b>264</b>	



98042724 GAGGTGCTGACCAAGGCGGGGCTGCTGAACGCGCCCCGAGTGGTACGACGCCGCAAGGAGACCTAC 254  
 98042725 GAGGTGCTGACCAAGGCGGGGCTGCTGAACGCGCCCCGAGTGGTACGACGCCGCAAGGAGACCTAC 321  
 98042726 GAGGTGCTGACCAAGGCGGGGCTGCTGAACGCGCCCCGAGTGGTACGACGCCGCAAGGAGACCTAC 254  
 98042727 GAGGTGCTGACCAAGGCGGGGCTGCTGAACGCGCCCCGAGTGGTACGACGCCGCAAGGAGACCTAC 288  
 98061111 GAGGTGCTGACCAAGGCGGGGCTGCTGAACGCGCCCCGAGTGGTACGACGCCGCAAGGAGACCTAC 109  
 98061112 GAGGTGCTGACCAAGGCGGGGCTGCTGAACGCGCCCCGAGTGGTACGACGCCGCAAGGAGACCTAC 249  
 98092829 GAGGTGCTGACCAAGGCGGGGCTGCTGAACGCGCCCCGAGTGGTACGACGCCGCAAGGAGACCTAC 263  
 98092830 GAGGTGCTGACCAAGGCGGGGCTGCTGAACGCGCCCCGAGTGGTACGACGCCGCAAGGAGACCTAC 183  
 00020331 GAGGTGCTGACCAAGGCGGGGCTGCTGAACGCGCCCCGAGTGGTACGACGCCGCAAGGAGACCTAC 338  
 00031102 GAGGTGCTGACCAAGGCGGGGCTGCTGAACGCGCCCCGAGTGGTACGACGCCGCAAGGAGACCTAC 358  
 00031103 GAGGTGCTGACCAAGGCGGGGCTGCTGAACGCGCCCCGAGTGGTACGACGCCGCAAGGAGACCTAC 345  
 00032622 GAGGTGCTGACCAAGGC-----

**Lhca4 - TP GAGGTGCTGACCAAGGCGGGGCTGCTGAACGCGCCCCGAGTGGTACGACGCCGCAAGGAGACCTAC 330**

98042724 TTCGCCTCCTCCTCCACGCTCTTCGTCATCGAGCTCATCCTCTTCCACTTCGTCGAGATCCGGCGG 320  
 98042725 TTCGCCTCCTCCTCCACGCTCTTCGTCATCGAGCTCATCCTCTTCCACTTCGTCGAGATCCGGCGG 387  
 98042726 TTCGCCTCCTCCTCCACGCTCTTCGTCATCGAGCTCATCCTCTTCCACTTCGTCGAGATCCGGCGG 320  
 98042727 TTCGCCTCCTCCTCCACGCTCTTCGTCATCGAGCTCATCCTCTTCCACTTCGTCGAGATCCGGCGG 354  
 98061111 TTCGCCTCCTCCTCCACGCTCTTCGTCATCGAGTTCATCCTCTTCCACTACGTCGAGATCCGGCGG 175  
 98061112 TTCGCCTCCTCCTCCACGCTCTTCGTCATCGAGTTCATCCTCTTCCACTACGTCGAGATCCGGCGG 315  
 98092829 TTCGCCTCCTCCTCCACGCTCTTCGTCATCGAGTTCATCCTCTTCCACTACGTCGAGATCCGGCGG 329  
 98092830 TTCGCCTCCTCCTCCACGCTCTTCGTCATCGAGTTCATCCTCTTCCACTACGTCGAGATCCGGCGG 249  
 00020331 TTCGCCTCCTCCTCCACGCTCTTCGTCATCGAGTTCATCCTCTTCCACTACGTCGAGATCCGGCGG 403  
 00031102 TTCGCCTCCTCCTCCACGCTCTTCGTCATCGAGTTCATCCTCTTCCACTACGTCGAGATCCGGCGG 423  
 00031103 TTCGCCTCCTCCTCCACGCTCTTSGTTCATCGAGTTCATCCTCTTCCACTACGTCGAGATCCGGCGG 410

**Lhca4 - TP TTCGCCTCCTCCTCCACGCTCTTCGTCATCGAGTTCATCCTCTTCCACTACGTCGAGATCCGGCGG 396**

98042724 TGGCAGGACATCAAGAACCCGGGCTCCGTCAACCAGGACCCCATCTTCAAGAGCTACAGCCTCCCG 386  
 98042725 TGGCAGGACATCAAGAACCCGGGCTCCGTCAACCAGGACCCCATCTTCAAGAGCTACAGCCTCCCG 453  
 98042726 TGGCAGGACATCAAGAACCCGGGCTCCGTCAACCAGGACCCCATCTTCAAGAGCTACAGCCTCCCG 386  
 98042727 TGGCAGGACATCAAGAACCCGGGCTCCGTCAACCAGGACCCCATCTTCAAGAGCTACAGCCTCCCG 420  
 98061111 TGGCAGGACATCAAGAACCCGGGCTCCGTCAACCAGGACCCCATCTTCAAGAGCTACAGCCTCCCG 241  
 98061112 TGGCAGGACATCAAGAACCCGGGCTCCGTCAACCAGGACCCCATCTTCAAGAGCTACAGCCTCCCG 381  
 98092829 TGGCAGGACATCAAGAACCCGGGCTCCGTCAACCAGGACCCCATCTTCAAGAGCTACAGCCTCCCG 395  
 98092830 TGGCAGGACATCAAGAACCCGGGCTCCGTCAACCAGGACCCCATCTTCAAGAGCTACAGCCTCCCG 315  
 00020331 TGGCAGGACATCAAGAACCCGGGCTCCGTCAACCAGGACCCCATCTTCAAGAGCTACAGCCTCCCG 469  
 00031102 TGGCAGGACATCAAGAACCCGGGCTCCGTCAACCAGGACCCCATCTTCAAGAGCTACAGCCTCCCG 489  
 00031103 TGGCAGGACATCAAGAACCCGGGCTCCGTCAACCAGGACCCCATCTTCAAGAGCTACAGCCTCCCG 476  
 00032622 -----

**Lhca4 - TP TGGCAGGACATCAAGAACCCGGGCTCCGTCAACCAGGACCCCATCTTCAAGAGCTACAGCCTCCCG 462**

98042724 CCCACGAGTGCGGCTACCCCGGAGCGTCTTCAACCCCTCAACTTCGCCCCACCCCTCGAGAAC 452  
 98042725 CCCACGAGTGCGGCTACCCCGGAGCGTCTTCAACCCCTCAACTTCGCCCCACCCCTCGAGAAC 519  
 98042726 CCCACGAGTGCGGCTACCCCGGAGCGTCTTCAACCCCTCAACTTCGCCCCACCCCTCGAGAAC 452  
 98042727 CCCACGAGTGCGGCTACCCCGGAGCGTCTTCAACCCCTCAACTTCGCCCCACCCCTCGAGAAC 486  
 98061111 CCCACGAGTGCGGCTACCCCGGAGCGTCTTCAACCCCTCAACTTCGCCCCACCCCTCGAGAAC 307  
 98061112 CCCACGAGTGCGGCTACCCCGGAGCGTCTTCAACCCCTCAACTTCGCCCCACCCCTCGAGAAC 447  
 98092829 CCCACGAGTGCGGCTACCCCGGAGCGTCTTCAACCCCTCAACTTCGCCCCACCCCTCGAGAAC 461  
 98092830 CCCACGAGTGCGGCTACCCCGGAGCGTCTTCAACCCCTCAACTTCGCCCCACCCCTCGAGAAC 381  
 00020331 CCCACGAGTGCGGCTACCCCGGAGCGTCTTCAACCCCTCAACTTCGCCCCACCCCTCGAGAAC 535  
 00031102 CCCACGAGTGCGGCTACCCCGGAGCGTCTTCAACCCCTCAACTTCGCCCCACCCCTCGAGAAC 555  
 00031103 CCCACGAGTGCGGCTACCCCGGAGCGTCTTCAACCCCTCAACTTCGCCCCACCCCTCGAGAAC 541  
 00032622 -----

**Lhca4 - TP CCCACGAGTGCGGCTACCCCGGAGCGTCTTCAACCCCTCAACTTCGCCCCACCCCTCGAGAAC 528**

98042724 AAGGAGAAGGAGCTCGCCAACGGGAGACTGGCCATGCTGGCGTTCCTGGGGTTCCTGGTGCAGCAC 518  
 98042725 AAGGAGAAGGAGCTCGCCAACGGGAGACTGGCCATGCTGGCGTTCCTGGGGTTCCTGGTGCAGCAC 585  
 98042726 AAGGAGAAGGAGCTCGCCAACGGGAGACTGGCCATGCTGGCGTTCCTGGGGTTCCTGGTGCAGCAC 518  
 98042727 AAGGAGAAGGAGCTCGCCAACGGGAGACTGGCCATGCTGGCGTTCCTGGGGTTCCTGGTGCAGCAC 552  
 98061111 AAGGAGAAGGAGCTCGCCAACGGGAGACTGGCCATGCTGGCGTTCCTGGGGTTCCTGGTGCAGCAC 373  
 98061112 AAGGAGAAGGAGCTCGCCAACGGGAGACTGGCCATGCTGGCGTTCCTGGGGTTCCTGGTGCAGCAC 513  
 98092829 AAGGAGAAGGAGCTCGCCAACGGGAGACTGGCCATGCTGGCGTTCCTGGGGTTCCTGGTGCAGCAC 527  
 98092830 AAGGAGAAGGAGCTCGCCAACGGGAGACTGGCCATGCTGGCGTTCCTGGGGTTCCTGGTGCAGCAC 447  
 00020331 AAGGAGAAGGAGCTCGCCAACGGGAGACTGGCCATGCTGGCGTTCCTGGGGTTCCTGGTGCAGCAC 601  
 00031102 AAGGAGAAGGAGCTCGCCAACGGGAGACTGGCCATGCTGGCGTTCCTGGGGTTCCTGGTGCAGCAC 621  
 00031103 AAGGAGAAGGAGCTCGCCAACGGGAGACTGGCCATGCTGGCGTTCCTGGGGTTCCTGGTGCAGCAC 608  
 00032622 -----

**Lhca4 - TP AAGGAGAAGGAGCTCGCCAACGGGAGACTGGCCATGCTGGCGTTCCTGGGGTTCCTGGTGCAGCAC 594**

98042724 AACGTGACCGGAAGGGGCCGTTTCGAGAACCTGCAGCAGCACCTGGCCGACCCATGGCACAACACC 584  
 98042725 AACGTGACCGGAAGGGGCCGTTTCGAGAACCTGCAGCAGCACCTGGCCGACCCATGGCACAACACC 651  
 98042726 AACGTGACCGGAAGGGGCCGTTTCGAGAACCTGCAGCAGCACCTGGCCGACCCATGGCACAACACC 584  
 98042727 AACGTGACCGGAAGGGGCCGTTTCGAGAACCTGCAGCAGCACCTGGCCGACCCATGGCACAACACC 618  
 98061111 AACGTGACCGGAAGGGGCCGTTTCGAGAACCTGCAGCAGCACCTGGCCGACCCATGGCACAACACC 439  
 98061112 AACGTGACCGGAAGGGGCCGTTTCGAGAACCTGCAGCAGCACCTGGCCGACCCATGGCACAACACC 579  
 98092829 AACGTGACCGGAAGGGGCCGTTTCGAGAACCTGCAGCAGCACCTGGCCGACCCATGGCACAACACC 593  
 98092830 AACGTGACCGGAAGGGGCCGTTTCGAGAACCTGCAGCAGCACCTGGCCGACCCATGGCACAACACC 513  
 00020331 AACGTGACCGGAAGGGGCCGTTTCGAGAACCTGCAGCAGCACCTGGCCGACCCATGGCACAACACC 667  
 00031102 AACGTGACCGGAAGGGGCCGTTTCGAGAACCTGCAGCAGCACCTGGCCGACCCATGGCACAACACC 687  
 00031103 AACGTGACCGGAAGGGGCCGTTTCGAGAACCTGCAGCAGCACCTGGCCGACCCATGGCACAACACC 674  
 00032622 -----

**Lhca4 - TP AACGTGACCGGAAGGGGCCGTTTCGAGAACCTGCAGCAGCACCTGGCCGACCCATGGCACAACACC 660**

98042724 ATCATC CAGACCATCTCCGGCCAATGAAGCTTAAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC 650  
 98042725 ATCATC CAGACCATCTCCGGCCAATGAAGCTTAAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC 717  
 98042726 ATCATC CAGACCATCTCCGGCCAATGAAGCTTAAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC 650  
 98042727 ATCATC CAGACCATCTCCGGCCAATGAAGCTTAAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC 684  
 98061111 ATCATC CAGACCATCTCCGGCCAATGAAGCTTAAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC 505  
 98061112 ATCATC CAGACCATCTCCGGCCAATGAAGCTTAAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC 645  
 98092829 ATCATC CAGACCATCTCCGGCCAATGAAGCT----- 624  
 98092830 ATCATC CAGACCATCTCCGGCCAATGAAGCTTAAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC 641  
 00020331 ATCATC CAGACCATCTCCGGCCAATG----- 693  
 00031102 ATCATC CAGACCATCTCCGGCCAATG----- 713  
 00031103 -----  
 00032622 -----

**Lhca4 - TP ATCATCCAGACCATCTCCGGCCAA..... 684**

Übersicht über die verwendeten Sequenzen von LHCI-Proteinen angiospermer Pflanzen mit Angabe der Spezies, GenBank-Accession-Nummer sowie der Länge von Transitpeptid (TP) und reifem Protein (MP). Die Länge der reifen Proteine bzw. der Transitpeptide wurde anhand der Angaben der Autoren bestimmt. Wo diese fehlten, wurde die Schnittstelle anhand eines Vergleiches mit Sequenzen des gleichen LHC-Typs ermittelt; n.v. = keine Sequenzinformation verfügbar.

Typ	Spezies	Label_GenBank Acc.-Nummer	Länge [AS]	
			TP	MP
Lhca1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	a1.1_A.thaliana_X56062	44	197
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	a1.2_A.thaliana_AF324692	44	197
	<i>Hordeum vulgare</i>	a1_H.vulgare_AF218305	44	201
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	a1.1_L.esculentum_S00443	45	201
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	a1.2_L.esculentum_S06329	45	200
	<i>Nicotiana tabacum</i>	a1_N.tabacum_X64198	45	200
	<i>Oryza sativa</i>	a1_O.sativa_AF094776	41	200
	Lhca2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	a2.1_A.thaliana_U03395	50
<i>Arabidopsis thaliana</i>		a2.2_A.thaliana_AF134120	44	213
<i>Arabidopsis thaliana</i>		a2.3_A.thaliana_AL132962	44	213
<i>Arabidopsis thaliana</i>		a2.4_A.thaliana_AC069143	49	218
<i>Hordeum vulgare</i>		a2_H.vulgare_X84308	44	211
<i>Lolium temulentum</i>		a2_L.temulentum_S47480	42	211
<i>Lycopersicon esculentum</i>		a2_L.esculentum_M20241	58	212
<i>Oryza sativa</i>		a2_O.sativa_AF010321	53	212
<i>Petunia x hybrida</i>		a2_Petunia_sp_M21317	57	213
<i>Pisum sativum</i>		a2_P.sativum_X81962	51	218
Lhca3		<i>Arabidopsis thaliana</i>	a3.1_A.thaliana_U01103	40
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	a3.2_A.thaliana_NP_176347	40	233
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	a3_L.esculentum_X15258	40	233
	<i>Pisum sativum</i>	a3_P.sativum_L19651	41	234
Lhca4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	a4_A.thaliana_M63932	52	199
	<i>Hordeum vulgare</i>	a4_H.vulgare_AF287276	>27	201
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	a4.1_L.esculentum_X57706	51	201
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	a4.2_L.esculentum_X57707	50	200
	<i>Nicotiana tabacum</i>	a4_N.tabacum_X82497	n.v	200
	<i>Oryza sativa</i>	a4_P.sativa_AF094775	44	200
	<i>Pisum sativum</i>	a4_P.sativum_AF002248	51	201
Lhca5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	a5_A.thaliana_AF134121	45	211

Typ	Species	Label _GenBank Acc.-Nummer	Länge [AS]	
			TP	MP
Lhcb1	<i>Apium graveolens</i>	b1.A.graveolens_Z75663	34	230
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	b1.1_A.thaliana_X03907	34	233
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	b1.2_A.thaliana_X03909	34	233
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	b1.3_A.thaliana_X64459	32	232
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	b1.4_A.thaliana_X64460	34	233
	<i>Cicer arietinum</i>	b1_C.arietinum_AJ13104	33	233
	<i>Euphorbia esula</i>	b1_E.esula_AF220527	36	232
	<i>Fagus crenata</i>	b1_F.crenata_AB006081	33	231
	<i>Glycine max</i>	b1.1_G.max_U01964	33	231
	<i>Glycine max</i>	b1.2_G.max_U39475	32	231
	<i>Glycine max</i>	b1.3_G.max_X12981	32	231
	<i>Glycine max</i>	b1.4_G.max_X12980	33	223
	<i>Gossypium hirsutum</i>	b1_G.hirsutum_L07119	34	230
	<i>Hordeum vulgare</i>	b1.1_H.vulgare_X12735	34	230
	<i>Hordeum vulgare</i>	b1.2_H.vulgare_X89023	33	233
	<i>Lactuca sativa</i>	b1_L.sativa_D14002	33	233
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	b1.1_L.esculentum_M14443	34	231
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	b1.2_L.esculentum_M14444	34	233
	<i>Medicago sativa</i>	b1_M.sativa_AF072931	33	233
	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	b1.1_M.crystallinum_AF003127	34	233
	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	b1.2_M.crystallinum_AF003128	34	233
	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	b1.3_M.crystallinum_AF003129	34	233
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.1_N.plumbaginifolia_M21397	34	233
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.2_N.plumbaginifolia_M21398	33	233
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.1_N.sylvestris_AB012636	34	231
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.2_N.sylvestris_AB012637	34	231
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.3_N.sylvestris_AB012637	34	231
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.4_N.sylvestris_AB012637	34	231
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.5_N.sylvestris_AB012638	34	233
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.6_N.sylvestris_AB012638	33	233
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.7_N.sylvestris_AB012639	34	233
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.8_N.sylvestris_AB012640	34	233
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.9_N.sylvestris_AB012641	34	233
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.1_N.tabacum_X52741	33	233
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.2_N.tabacum_X52742	34	233
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.3_N.tabacum_X51743	34	231
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.4_N.tabacum_X51744	34	233
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.5_N.tabacum_X58229	34	233
	<i>Nicotiana glauca</i>	b1.6_N.tabacum_X58230	36	229
	<i>Oryza sativa</i>	b1.1_O.sativa_M13909	31	235
	<i>Oryza sativa</i>	b1.2_O.sativa_X13908	28	235
	<i>Oryza sativa</i>	b1.3_O.sativa_D00641	31	234
<i>Oryza sativa</i>	b1.4_O.sativa_U74295	31	234	

Typ	Species	Label_GenBank Acc.-Nummer	Länge [AS]		
			TP	MP	
Lhcb1 (Forts.)	<i>Panax ginseng</i>	b1_P.ginseng_AF034632	34	232	
	<i>Petunia x hybrida</i>	b1.1_Petunia_sp_X02356	34	233	
	<i>Petunia x hybrida</i>	b1.2_Petunia_sp_X02357	33	233	
	<i>Petunia x hybrida</i>	b1.3_Petunia_sp_X02358	33	233	
	<i>Petunia x hybrida</i>	b1.4_Petunia_sp_X02359	34	233	
	<i>Petunia x hybrida</i>	b1.5_Petunia_sp_X02360	34	233	
	<i>Phalaenopsis sp.</i>	b1_Phalaenopsis_sp_AF133340	36	241	
	<i>Pisum sativum</i>	b1.1_P.sativum_X56538	36	233	
	<i>Pisum sativum</i>	b1.2_P.sativum_K02067	35	233	
	<i>Prunus persica</i>	b1.P.persica_L36064	34	233	
	<i>Pyrus pyrifolia</i>	b1_P.pyrifolia_D00571	44	234	
	<i>Sinapis alba</i>	b1_S.alba_X16436	34	232	
	<i>Solanum tuberosum</i>	b1.1_S.tuberosum_U21111	34	231	
	<i>Solanum tuberosum</i>	b1.2_S.tuberosum_U20983	34	231	
	<i>Solanum tuberosum</i>	b1.3_S.tuberosum_U21112	34	231	
	<i>Solanum tuberosum</i>	b1.4_S.tuberosum_U21113	34	231	
	<i>Solanum tuberosum</i>	b1.5_S.tuberosum_U21114	34	231	
	<i>Solanum tuberosum</i>	b1.6_S.tuberosum_Z19387	34	233	
	<i>Solanum tuberosum</i>	b1.7_S.tuberosum_Z235160	36	229	
	<i>Spinacia oleracea</i>	b1_S.oleracea_X14341	34	233	
	<i>Triticum aestivum</i>	b1.1_T.aestivum_M10144	33	233	
	<i>Triticum aestivum</i>	b1.2_T.aestivum_U73218	33	233	
	<i>Vigna radiata</i>	b1.1_V.radiata_AF139467	32	231	
	<i>Vigna radiata</i>	b1.2_V.radiata_AF279249	33	231	
	<i>Vigna radiata</i>	b1.3_V.radiata_AF279250	33	231	
	<i>Zea mays</i>	b1.1_Z.mays_X14794	29	233	
	<i>Zea mays</i>	b1.2_Z.mays_X53398	31	234	
	<i>Zea mays</i>	b1.3_Z.mays_Z55892	31	234	
	<i>Zea mays</i>	b1.4_Z.mays_X63205	31	233	
	Lhcb2	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	b2_A.hypochondriacus_X74732	35	229
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	b2.1_A.thaliana_AF134122	36	229
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	b2.2_A.thaliana_AF134123	36	229
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	b2.3_A.thaliana_AF134124	36	229
<i>Arabidopsis thaliana</i>		b2.4_A.thaliana_AF134125	37	229	
<i>Beta vulgaris</i>		b2_B.vulgaris_Y13865	35	229	
<i>Lycopersicon esculentum</i>		b2_L.esculentum_M17559	36	229	
<i>Gossypium hirsutum</i>		b2_G.hirsutum_X54090	36	229	
<i>Oryza sativa</i>		b2.1_O.sativa_D00642	34	229	
<i>Oryza sativa</i>		b2.2_O.sativa_AF022739	34	229	
<i>Oryza sativa</i>		b2.3_O.sativa_AF061577	34	229	
<i>Petunia x hybrida</i>		b2_Petunia_sp_X004966	36	229	

Typ	Species	Label _GenBank Acc.-Nummer	Länge [AS]	
			TP	MP
<b>Lhcb2</b> (Forts.)	<i>Prunus persica</i>	b2_P.persica_AF039598	36	229
	<i>Rumex palustris</i>	b2_R.palustris_AF165529	35	229
	<i>Vigna radiata</i>	b2_V.radiata_AF279248	36	229
	<i>Zea mays</i>	b2_Z.mays_X6868	n.v	229
<b>Lhcb3</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	b3_A.thaliana_AF143691	42	223
	<i>Brassica napus</i>	b3.1_B.napus_X61608	42	>160
	<i>Brassica napus</i>	b3.2_B.napus_X61609	42	225
	<i>Brassica napus</i>	b3.3_B.napus_X61610	n.v.	>221
	<i>Daucus carota</i>	b3_D.carota_AF207690	41	>147
	<i>Hordeum vulgare</i>	b3_H.vulgare_X63197	45	223
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	b3_L.esculentum_X60275	42	223
	<i>Pisum sativum</i>	b3_P.sativum_X69215	42	223
	<i>Vigna radiata</i>	b3_V.radiata_AF139465	46	223
<b>Lhcb4</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	>b4.1_A.thaliana_X71878	32	258
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	>b4.2_A.thaliana_AF134127	31	256
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	>b4.3.A.thaliana_AF134128	29	>247
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	>b4.4_A.thaliana_AF370474	32	258
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	>b4.5_A.thaliana_AY048262	32	258
	<i>Oryza sativa</i>	>b4_O.sativa_AF058796	29	261
	<i>Vigna radiata</i>	>b4_V.radiata_AF139466	31	259
	<i>Zea mays</i>	>b4_Z.mays_Z50801	29	262
<b>Lhcb5</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lhcb5_A.thaliana	37	243
	<i>Brassica juncea</i>	Lhcb5_B.juncea	39	244
	<i>Hordeum vulgare</i>	Lhcb5_H.vulgare	36	250
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Lhcb5_L.esculentum	40	246
	<i>Zea mays</i>	Lhcb5.1_Z.mays	36	247
	<i>Zea mays</i>	Lhcb5.2_Z.mays	36	247
	<b>Lhcb6</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lhcb6_A.thaliana	47
<i>Lycopersicon esculentum</i>		Lhcb6.1_L.esculentum	47	209
<i>Lycopersicon esculentum</i>		Lhcb6.2_L.esculentum	45	211
<i>Spinacia oleracea</i>		Lhcb6_S.oleracea	50	211
<i>Vigna radiata</i>		Lhcb6_V.radiata	48	210
<i>Zea mays</i>		Lhcb6_Z.mays	36	211

**Vergleich der verwendeten LHC-Sequenzen** (Anhang A 4) hinsichtlich Länge der Transitpeptide bzw. reifen Proteine (MW  $\pm$  STAB) sowie der Anzahl und prozentualen Anteile identischer AS und konservierter Substitutionen bezogen auf die jeweils längste Sequenz im Vergleich (n). Die Auswertung wurde getrennt für mono-(m-kotyl) und dikotyle Spezies (d-kotyl) unter Angabe der Zahl der verwendeten Sequenzen n / aus n Spezies vorgenommen.

	Transitpeptide					reife Proteine				
	Länge	identische		kon. Subs.		Länge	identische		ähnliche	
	AS (P/S)	AS	%	AS	%	AS (P/S)	AS	%	AS	%
<b>Lhca1</b>										
<i>gesamt</i>	44.00 $\pm$ 1.31 (n=7/5)	11 45	24.44	<u>3</u> 45	6.67	199.43 $\pm$ 1.59 (n=7/5)	<u>151</u> 201	75.12	<u>22</u> 201	10.95
<i>m-kotyl</i>	42.50 $\pm$ 1.50 (n=2/2)	<u>37</u> 44	84.09	<u>1</u> 44	2.27	200.50 $\pm$ 0.50 (n=2/2)	<u>183</u> 201	91.04	<u>9</u> 201	4.48
<i>d-kotyl</i>	44.60 $\pm$ 0.49 (n=5/3)	<u>23</u> 45	51.11	<u>3</u> 45	6.67	199.00 $\pm$ 1.67 (n=5/3)	<u>177</u> 201	88.06	<u>10</u> 201	4.98
<b>Lhca2</b>										
<i>gesamt</i>	49.30 $\pm$ 5.42 (n=10/7)	<u>1</u> 58	1.72	<u>3</u> 58	5.17	214.20 $\pm$ 3.31 (n=10/7)	<u>104</u> 218	47.71	<u>42</u> 218	19.27
<i>m-kotyl</i>	46.33 $\pm$ 4.78 (n=3/3)	<u>21</u> 53	39.63	<u>9</u> 53	16.98	211.33 $\pm$ 0.47 (n=3/3)	<u>179</u> 212	84.43	<u>20</u> 212	9.43
<i>d-kotyl</i>	50.34 $\pm$ 5.15 (n=7/4)	<u>4</u> 58	6.87	<u>10</u> 58	17.24	212.43 $\pm$ 3.25 (n=7/4)	<u>116</u> 218	53.21	<u>34</u> 218	15.60
<b>Lhca3</b>										
<i>gesamt</i>	40.25 $\pm$ 0.43 (n=4/3)	<u>11</u> 41	26.83	<u>13</u> 41	31.70	233.25 $\pm$ 0.43 (n=4/3)	<u>205</u> 234	87.61	<u>13</u> 234	5.56
<i>d-kotyl</i>										
<b>Lhca4</b>										
<i>gesamt</i>	49.60 $\pm$ 2.87 (n=5/4)	<u>11</u> 52	21.15	<u>11</u> 52	21.15	200.29 $\pm$ 0.70 (n=7/6)	<u>149</u> 201	74.13	<u>19</u> 201	9.45
<i>m-kotyl</i>	44 (n=1/1)	<u>n.v</u> n.v	n.v	<u>n.v</u> n.v	n.v	200.50 $\pm$ 0.50 (n=2/2)	<u>147</u> 201	86.57	<u>10</u> 201	4.98
<i>d-kotyl</i>	51.00 $\pm$ 0.71 (n=4/3)	<u>28</u> 52	53.85	<u>7</u> 52	13.46	200.20 $\pm$ 0.75 (n=5/4)	<u>164</u> 201	81.59	<u>14</u> 201	6.97
<b>Lhcb1</b>										
<i>gesamt</i>	33.50 $\pm$ 2.54 (n=72/28)	<u>1</u> 44	2.27	<u>6</u> 44	13.64	232.75 $\pm$ 1.98 (n=72/28)	<u>102</u> 241	42.32	<u>48</u> 241	19.92
<i>m-kotyl</i>	31.69 $\pm$ 2.01 (n=13/5)	6 36	16.67	7 36	19.44	234.00 $\pm$ 2.35 (n=13/5)	<u>154</u> 241	63.90	<u>34</u> 241	14.11
<i>d-kotyl</i>	33.97 $\pm$ 1.57 (n=59/23)	2 44	4.54	6 44	13.64	231.93 $\pm$ 1.65 (n=59/23)	<u>130</u> 234	55.56	<u>38</u> 234	16.24

	Transitpeptide					reife Proteine				
	Länge	identische		kon. Subs.		Länge	identische		ähnliche	
	AS (P/S)	AS	%	AS	%	AS (P/S)	AS	%	AS	%
<b>Lhcb2</b>										
<i>gesamt</i>	35.53 ± 0.85 (n=16/11)	<u>4</u> 37	10.81	<u>11</u> 37	29.73	229.00 ± 0.00 (n=17/12)	<u>171</u> 229	74.67	<u>33</u> 229	14.41
<i>m-kotyl</i>	34.00 ± 0.00 (n=3/1)	<u>31</u> 34	91.18	<u>3</u> 34	8.82	229.00 ± 0.00 (n=4/2)	<u>202</u> 229	88.21	<u>17</u> 229	7.42
<i>d-kotyl</i>	35.85 ± 0.53 (n=13/10)	<u>7</u> 37	18.92	<u>10</u> 37	27.03	229.00 ± 0.00 (n=13/10)	<u>188</u> 229	82.10	<u>23</u> 229	10.04
<b>Lhcb3</b>										
<i>gesamt</i>	42.75 ± 1.64 (n=8/7)	<u>13</u> 46	28.26	<u>5</u> 46	10.87	223.33 ± 0.75 (n=6/6)	<u>179</u> 225	79.56	<u>20</u> 225	8.89
<i>m-kotyl</i>	45 (n=1/1)	n.v n.v	n.v	n.v n.v	n.v	223 (n=1/1)	n.v n.v	n.v	n.v n.v	n.v
<i>d-kotyl</i>	42.43 ± 1.50 (n=7/6)	<u>17</u> 46	36.96	<u>6</u> 46	13.04	223.40 ± 0.80 (n=5/5)	184 225	81.78	<u>16</u> 225	7.11
<b>Lhcb4</b>										
<i>gesamt</i>	30.63 ± 1.32 (n=8/4)	<u>8</u> 32	25.00	<u>8</u> 32	25.00	258.86 ± 1.88 (n=7/4)	<u>202</u> 262	77.10	<u>20</u> 262	7.63
<i>m-kotyl</i>	29.00 ± 0.00 (n=2/2)	<u>28</u> 29	96.55	<u>0</u> 29	n.v	261.50 ± 0.50 (n=2/2)	<u>236</u> 262	90.08	<u>9</u> 262	3.55
<i>d-kotyl</i>	31.17 ± 1.07 (5/2)	<u>8</u> 32	25.00	<u>10</u> 32	31.25	257.80 ± 0.98 (n=5/2)	<u>214</u> 259	82.63	<u>16</u> 259	6.18
<b>Lhcb5</b>										
<i>gesamt</i>	37.33 ± 1.60 (n=6/5)	<u>9</u> 40	22.50	<u>11</u> 40	27.5	246.17 ± 2.27 (n=6/5)	<u>185</u> 250	74.00	<u>25</u> 250	10.00
<i>m-kotyl</i>	36.00 ± 0.00 (n=3/2)	<u>32</u> 36	88.89	<u>4</u> 36	11.11	248.00 ± 1.41 (n=3/2)	<u>215</u> 250	86.00	<u>15</u> 250	6.00
<i>d-kotyl</i>	38.67 ± 1.25 (n=3/3)	<u>23</u> 40	57.50	<u>6</u> 40	15.00	244.33 ± 1.25 (n=3/3)	<u>208</u> 246	84.55	<u>20</u> 246	8.13
<b>Lhcb6</b>										
<i>gesamt</i>	45.50 ± 4.50 (n=6/5)	<u>5</u> 50	10.00	<u>7</u> 50	14.00	210.50 ± 0.76 (n=6/5)	<u>152</u> 211	72.04	<u>30</u> 211	14.22
<i>m-kotyl</i>	36 (n=1/1)	n.v n.v	n.v	n.v n.v	n.v	211 (n=1/1)	n.v n.v	n.v	n.v n.v	n.v
<i>d-kotyl</i>	47.40 ± 1.62 (n=5/4)	<u>10</u> 50	20.00	<u>11</u> 50	22.00	210.40 ± 0.80 (n=5/4)	<u>169</u> 211	80.09	<u>23</u> 211	10.90



**Tagungspublikationen & Posterbeiträge**

- KLIMMEK F, GRIMME L.H., KNOETZEL J (1998) *In vitro* reconstitution of barley Lhca1 and Lhca4, the proteins of photosystem I antenna subcomplex LHCI-730. in: GARAB G (ed.), Photosynthesis: mechanisms and effects, Vol I: 413-416. *Proceedings of the Xth International Congress on Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- KLIMMEK F, RUPPRECHT J, SCHMID VHR, PAULSEN H, KNOETZEL J, GRIMME LH (2000) Reconstitution of a heterologous (barley/tomato) LHCI-730. *5<sup>th</sup> Nordic Conference on Photosynthesis*. October 28-30<sup>th</sup> Elsinore, Dänemark.

**Datenbankeinträge (GenBank)**

- AF 218305 KLIMMEK F, KNOETZEL J, GRIMME LH (1999) *Hordeum vulgare* chlorophyll *a/b*-binding protein precursor (Lhca1) mRNA, complete cds; nuclear gene for chloroplast product.
- AF 287276 KLIMMEK F, KNOETZEL J, GRIMME LH (2000) *Hordeum vulgare* chlorophyll *a/b*-binding protein precursor (Lhca4) mRNA, partial cds; nuclear gene for chloroplast product.



## Danksagung

Bei den in den vergangenen vier Jahren durchgeführten Arbeiten bin ich durch viele Menschen in einem Umfeld unterstützt worden, das mir während dieser Zeit nicht nur Arbeits- sondern auch Lebensraum gewährt hat. Dafür bin ich den folgenden Personen überwiegend zu mehr als nur zu Dank verpflichtet:

An allererster Stelle muß ich hier den „nicht-fachlichen“ Beistand von *Silke Rogosik*, *Lotta Murrel Rogosik* sowie den meiner Eltern *Inge* und *Bernd Klimmek* nennen, denn ohne diese wäre vieles schwieriger und manches vielleicht gar nicht zu bewerkstelligen gewesen.

Von den Menschen, mit denen ich innerhalb der Arbeitsgruppe zusammengearbeitet habe gebührt vor allem *Erika Lorenz* mehr als nur ein warmer Händedruck für die gemeinsam in den Laboren verbrachte Zeit.

*Jürgen Knoetzel* verdanke ich über die Eröffnung des Themas „Photosynthese“ hinaus eine streckenweise herausfordernde, insgesamt vor allem aber menschliche Betreuung. Die Abenteuerfahrten ins Ausland (z.B. nach Villars/Schweiz oder „remember“ Budapest) werden sicherlich auch ihm noch lange im Gedächtnis bleiben. Dies gilt ebenso für die gemeinsamen Labortage - auch und gerade zusammen mit *Björn Boßmann* (dem Herrn der Immunoblots und *Skummet-Mælk-Powder-Gele*) sowie *Hanno Charisius* (*tight-fitter-of-glass-plates*).

Herrn *L. H. Grimme* verdanke ich einen außergewöhnlichen Freiraum für die Durchführung der Arbeit und die kritische Begutachtung derselben sowie den einen oder anderen Blick über den unmittelbaren Teller-/Benchrand hinaus.

Meinen übrigen unmittelbaren Arbeitskolleginnen innerhalb der Arbeitsgruppe *Kerstin Froehner*, *Wiebke Meyer* und *Veronica Hamer* danke ich herzlich für die gemeinsamen guten Tage; gleiches gilt auch für die konstruktive Zusammenarbeit mit der übrigen „Biotest-Crew“ mit *Thomas Backhaus*, *Michael Faust*, *Martin Scholze*, *Marion Junghans* und *Maria Vassilakaki*.

Ohne die Kooperation mit *Volkmar Schmid* und *Harald Paulsen* von der Universität Mainz wäre die vorliegende Arbeit in dieser Form nicht darstellbar gewesen, dafür auch an dieser Stelle nochmals herzlichen Dank. Besonders bedanken möchte ich mich hierbei bei *Jens Rupprecht* für die Betreuung während meiner Tage im Mainzer Labor.

Die Arbeitsgruppe von *Friederike Koenig* (deren Spektrofluorimeter ich unter der Verwendung der von *Hans Lorenz* angefertigten Glaskapillaren benutzen durfte) mit *Annette Hintelmann*, *Petra Joestingmeyer* (die dankenswerterweise eine gründliche Durchsicht des Manuskriptes vornahm), *Dorothea Mangels*, *Ina Groke* und *Guido Lutzenkirchen* vervollständigte schließlich meine „zweite Heimat“ im NWII, dafür Euch allen nochmals herzlichen Dank.

Ich bedanke mich außerdem bei der *FNK der Universität Bremen* für die finanzielle Unterstützung meiner Teilnahmen an Kongressen und Fortbildungen sowie für die Gewährung eines Abschlußstipendiums.

Bremen, im Dezember 2001