

Untersuchung der Violaxanthin De-epoxidation an Antennenkomplexen höherer Pflanzen

Inaugural–Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Antje Wehner

aus Weener

Wuppertal

2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. P. Jahns

Koreferent: Prof. Dr. A.R. Holzwarth

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Dezember 2005

1	Einleitung	6
1.1	Aufbau pflanzlicher Photosysteme	7
1.1.1	Photosystem II	7
1.1.2	Photosystem I	9
1.2	Light-harvesting Komplexe	11
1.2.1	Die Struktur der Lichtsammelkomplexe	12
1.3	Funktionen der Carotinoide in der Photosynthese	15
1.4	Der Xanthophyllzyklus	17
1.5	De-epoxidationsversuche an rekonstituierten Lhcb1-Komplexen	19
1.6	Zielsetzung der Arbeit	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Präparation rekombinanter Antennenproteine	22
2.1.1	Minore Antennenproteine	22
2.1.1.1	Klonierung des Überexpressionsvektors	22
2.1.1.1.1	Bakterienstämme und Plasmide	22
2.1.1.1.2	Herstellung chemischkompetenter Zellen	23
2.1.1.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
2.1.1.1.4	Aufreinigung der DNA	25
2.1.1.1.5	Restriktion von DNA	25
2.1.1.1.6	Alkalische Phosphatase Behandlung	26
2.1.1.1.7	Ligation	26
2.1.1.1.8	Hitze-Schock Transformation	26
2.1.1.1.9	Isolierung von Plasmid DNA	27
2.1.1.1.10	Quantifizierung der DNA	27
2.1.1.2	Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten Proteins	27
2.1.1.2.1	Überexpression	27
2.1.1.2.2	Aufreinigung	28
2.1.1.2.3	Quantifizierung der Proteinmenge	28
2.1.1.2.4	Detektion über SDS-Page und Western-Blot.....	29
2.1.2	Antennenproteine des PSI	29
2.2	Präparation nativer Antennenproteine	30
2.2.1	Minore Antennenproteine des PSII	30
2.2.1.1	Thylakoidisolierung aus <i>Nicotiana tabacum</i>	30
2.2.1.2	BBY-Präparation	30
2.2.1.3	BBY Wasch- und Solubilisierungsschritt	31
2.2.1.4	Dichtegradientenzentrifugation	31
2.2.1.5	PD10 Waschgang	31

2.2.1.6	Isoelektrische Fokussierung	32
2.2.1.7	Detektion über SDS-PAGE und Western-Blot	33
2.2.2	Antennenproteine des PSI	33
2.2.2.1	Thylakoidisolierung aus <i>Lycopersicon esculentum</i>	33
2.3	Präparation der Violaxanthin-De-epoxidase (VDE)	34
2.3.1	Thylakoidisolierung aus <i>Spinacia oleracea</i>	34
2.3.2	VDE-Isolierung	34
2.3.3	Aktivitätsbestimmung	36
2.4	Isolierung von Pigmenten aus <i>Pisum sativum</i>	37
2.4.1	Totalextrakt	37
2.4.2	Dioxanfällung	37
2.4.3	Verseifung	37
2.4.4	Präparative Trennung der Xanthophylle auf der RP-Säule	38
2.4.5	Präparative Trennung der Chlorophylle auf der RP-Säule	38
2.5	Rekonstitution rekombinanter Antennenproteine	39
2.5.1	Minore Antennenproteine	39
2.5.1.1	Rekonstitution über die Detergenzwechsellmethode	39
2.5.1.2	Aufreinigung über Metallchelatchromatographie	40
2.5.2	Antennenproteine des PSI	40
2.6	Extraktion und Quantifizierung von Pigmenten	41
2.6.1	Extraktion	41
2.6.1.1	Aceton-Extraktion	41
2.6.1.2	Butanol Extraktion	41
2.6.2	Quantifizierung	41
2.6.2.1	Chlorophyllbestimmung	41
2.6.2.2	Xanthophyllbestimmung	41
2.6.2.3	HPLC- (High Pressure Liquid Chromatography) Analyse	42
2.7	Elektrophorese	44
2.7.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.7.2	Native Gelelektrophorese	45
2.7.3	Coomassie Färbung von Proteingelen	45
2.8	Western Blot Analyse	46
2.9	Spektroskopie	47
2.10	Deepoxidation	48
2.10.1	In vivo De-epoxidation	48
2.10.2	In vitro De-epoxidation an LHCs	48

3 Ergebnisse und Diskussion	49
3.1 Minore Antennenproteine des PSII	49
3.1.1 Überexpression und Rekonstitution	49
3.1.2 Charakterisierung und De-epoxidation der rekonstituierten minoren Antennenproteine des PSII	52
3.1.2.1 Charakterisierung der rekonstituierten CP24-Komplexe	52
3.1.2.2 Belegung der Carotinoidbindestellen in den rekonstituierten CP24-Komplexen	55
3.1.2.3 <i>In vitro</i> De-epoxidation an rekonstituierten CP24-Komplexen	56
3.1.2.4 Charakterisierung der rekonstituierten CP26-Komplexe	60
3.1.2.5 Belegung der Carotinoidbindestellen in den rekonstituierten CP26-Komplexen	64
3.1.2.6 <i>In vitro</i> De-epoxidation an rekonstituierten CP26-Komplexen	66
3.1.2.7 Charakterisierung der rekonstituierten CP29-Komplexe	70
3.1.2.8 Belegung der Carotinoidbindestellen in den rekonstituierten CP29-Komplexen	74
3.1.2.9 <i>In vitro</i> De-epoxidation an rekonstituierten CP29-Komplexen	76
3.1.3 Isolierung und Charakterisierung nativer PSII-Antennenproteine	82
3.1.4 Vergleich der <i>in vitro</i> De-epoxidation an rekonstituierten minoren Antennenproteine von <i>Nicotiana tabacum</i> mit der <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> erzielten De-epoxidation an Antennenproteinen anderer Spezies	85
3.2 Antennenproteine des PSI	87
3.2.1 Charakterisierung rekonstituierter Lhca-Proteine	87
3.2.2 Belegung der Carotinoidbindestellen in den rekonstituierten Lhca-Komplexen ...	90
3.2.3 De-epoxidation rekonstituierter Lhca-Proteine	92
3.2.4 Charakterisierung nativer LHCI-Komplexe	97
3.2.5 De-epoxidation von LHCI-Proteinen	99
3.3 Welchen Einfluss haben die Carotinoidbindestellen auf das Ausmaß der De-epoxidation?	103
3.4 Welche Bedeutung besitzen die verschiedenen Antennenproteine für die De-epoxidation?	105
3.5 Physiologische Bedeutung der De-epoxidation	106
3.6 Bedeutung einzelner Antennenproteine für den Schutz des Photosyntheseapparates ..	109
3.7 Zusammenfassung	110
4 Literatur	111
5 Anhang	122

1 Einleitung

In der Photosynthese wird die Energie des Sonnenlichtes zum Aufbau organischer Substanzen aus anorganischen Ausgangsstoffen genutzt. Bei der oxygenen Photosynthese von Cyanobakterien, Algen und Pflanzen wird die Energie der Photonen zur Oxidation von Wasser verwendet. Der dabei freigesetzte Sauerstoff ist die Grundlage des aeroben Lebens.

Die pflanzliche Photosynthese findet in speziellen Organellen, den Chloroplasten, statt. Die Chloroplasten sind vom Cytosol der Zellen durch eine doppelte Hüllmembran getrennt. Der Innenraum der Chloroplasten, das Stroma, wird von einem weiteren Membransystem, der Thylakoidmembran, durchzogen. Die Thylakoidmembran liegt in Form von gestapelten Grana- bzw. ungestapelten Stromathylakoiden vor und grenzt einen abgeschlossenen Innenraum, das Lumen, vom Stroma der Chloroplasten ab.

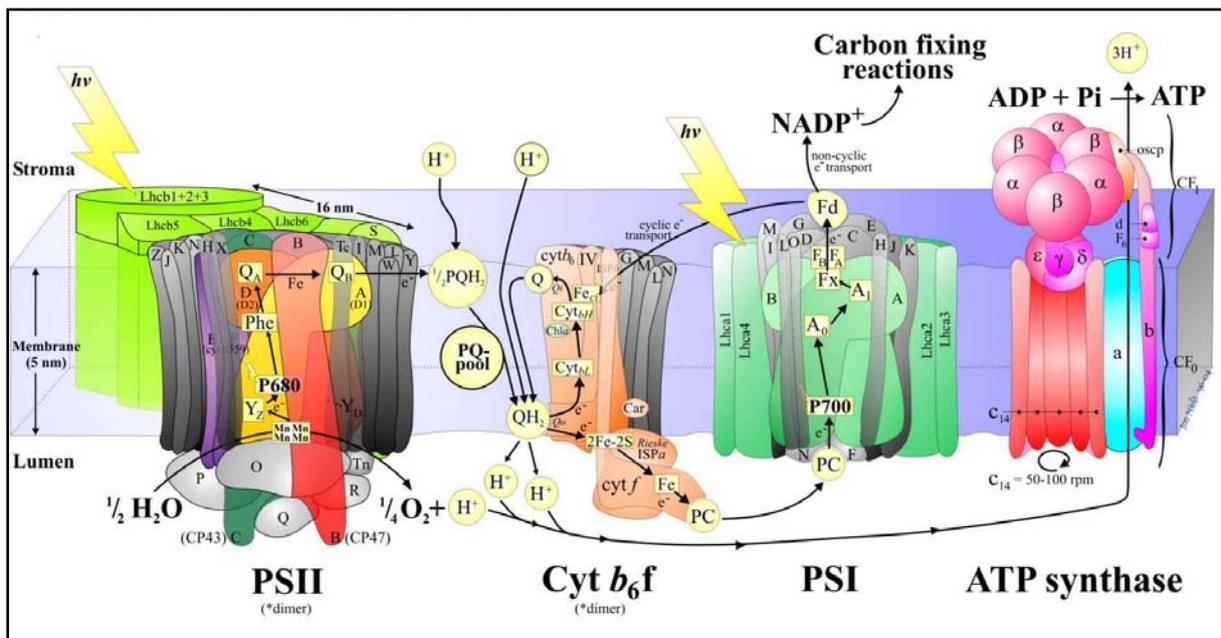


Abbildung 1: Modell des pflanzlichen Photosyntheseapparates (nach Jon Nield, 2004). In schematischer Weise sind die beiden Photosysteme, der Cytochrom *b₆f*-Komplex und die ATP-Synthase, eingebettet in die Thylakoidmembran, dargestellt. Im Text werden die für das Verständnis der Arbeit wichtigen Abkürzungen näher erläutert.

Die Photosynthese lässt sich in Licht- und Dunkelreaktionen unterteilen. Die Lichtreaktionen dienen der Synthese von Energie- und Reduktionsäquivalenten (ATP und NADPH). Über eine lichtgetriebene Elektronentransportkette werden die aus der photolytischen Spaltung des Wassers stammenden Elektronen auf NADP⁺ übertragen. Gleichzeitig entsteht ein Protonengradient über die Thylakoidmembran, der von der ATP-Synthase zur Synthese von ATP genutzt wird. Die Elektronentransportkette im pflanzlichen Photosyntheseapparat besteht aus zwei Photosystemen (PSII und PSI), dem Cytochrom *b₆f*-Komplex sowie den Elektronenüberträgern Plastochinon (PQ) und Plastocyanin (PC). Die endgültige Reduktion

des NADP^+ katalysiert die Ferredoxin-NADP-Reduktase an der stromalen Seite der Membran. Die Protein-Komplexe der Elektronentransportkette befinden sich in der Thylakoidmembran, oder sind mit dieser assoziiert (s. Abb. 1). In den lichtunabhängigen Dunkelreaktionen (Calvin-Zyklus) werden die zuvor gebildeten Energie- und Reduktionsäquivalente zur Fixierung des CO_2 in Form von Kohlenhydraten genutzt. Die Enzyme des Calvin-Zyklus sind im Chloroplastenstroma lokalisiert.

1.1 Aufbau pflanzlicher Photosysteme

Die beiden Photosysteme sind heterogen in der Thylakoidmembran verteilt. Der PSII-Komplex befindet sich vorwiegend in den Granabereichen, wohingegen der PSI-Komplex überwiegend in den Stromathylakoiden vorkommt (Danielsson et al. 2004).

Beide Photosysteme bestehen aus einem Kernkomplex und einer Lichtsammelantenne (LHC = light-harvesting complex). Der Kernkomplex beinhaltet das Reaktionszentrum (RZ) mit einem speziellen Chlorophyll a (Chl a)-Dimer (P680 im PSII und P700 im PSI). Der LHC besteht aus pigmentbindenden Proteinen, deren Pigmente das eingestrahlte Sonnenlicht absorbieren. Die angeregten Chromophore können die absorbierte Energie über excitonische Kopplung an die speziellen Chl a-Dimere der RZ weiterleiten. Durch Anregung des Chl a-Dimers wird die Ladungstrennung induziert und ein Elektron auf die sekundären Elektronenakzeptoren (Pheophytin (Phe) im PSII und Chl a (A_0) im PSI, s. Abb. 1) transferiert. Das am P680 entstandene Elektronendefizit wird durch Elektronen aus der photo-lytischen Wasseroxidation auf der lumenalen Seite des PSII wieder aufgefüllt. Das P700⁺ wird seinerseits durch Transfer eines Elektrons aus dem linearen oder cyclischen Elektronentransport über PC reduziert.

1.1.1 Photosystem II

Der Kernkomplex des pflanzlichen PSII besteht aus mehr als 20 Untereinheiten (Hankamer et al. 2001). Die Proteine des RZ, D1 und D2, binden alle Cofaktoren, die für den Elektronentransfer von Wasser auf Plastochinon (PQ) notwendig sind. In engem Kontakt zum D1- und D2-Protein stehen die Chl a- und Carotinoid-bindenden inneren Antennenproteine, CP43 und CP47, sowie die extrinsischen Proteine des wasserspaltenden Komplexes. Darüber hinaus bindet der pflanzliche PSII Kernkomplex eine große Anzahl niedermolekularer Proteine (vgl. Abb.1).

Die äußere Antenne des PSII besteht aus sechs verschiedenen, kerncodierten Proteinen (Lhcb1-6), die sich durch hohe Sequenzhomologie auszeichnen (Jansson 1994). Im Gegensatz zu den inneren Antennenproteinen binden die Proteine der äußeren Antenne neben

Carotinoiden und Chl a auch Chl b Moleküle, weshalb sie auch als CAB-Proteine (Chl a/b-bindende Proteine) bezeichnet werden. Die Proteine der äußeren Antenne werden darüber hinaus in die häufig vorkommenden majoren (Lhcb1-3) und die weniger stark exprimierten minoren Antennenproteine (Lhcb4-6) unterteilt. Die majoren Antennenproteine bilden *in vivo* Heterotrimere, in denen die Proteine Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 in variablen Stöchiometrien vertreten sind und zumeist im Verhältnis 8:3:1 exprimiert werden (Jansson 1994). Die minoren Antennenproteine werden in Bezug auf ihr Molekulargewicht auch als CP29 (Lhcb4), CP26 (Lhcb5) und CP24 (Lhcb6) bezeichnet. Sie liegen im nativen PSII als monomere Komplexe vor.

Innerhalb der Granathylakoide konnte für das PSII die Struktur eines sog. PSII-LHCII-Superkomplexes abgeleitet werden (Boekema et al. 1995). Im Zentrum des Superkomplexes liegt ein Kernkomplex-Dimer, der von der peripheren Antenne umgeben wird. Die minoren Antennenproteine befinden sich zwischen den außen liegenden LHC-Trimeren und den Kernkomplexen im Inneren des Superkomplexes (s. Abb. 2).

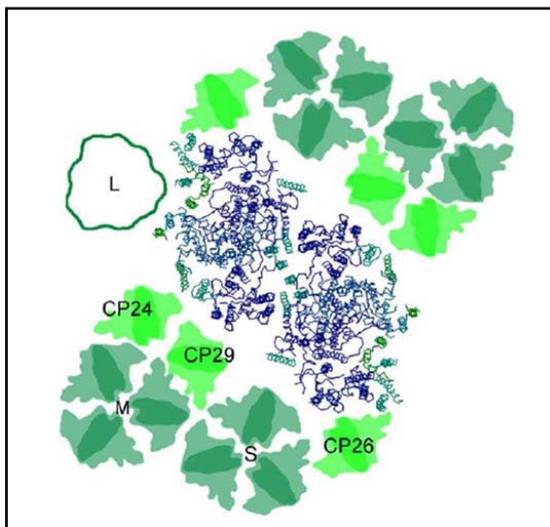


Abbildung 2: PSII-LHCII-Superkomplex (nach Dekker und Boekema 2005). S, M und L bezeichnet die LHCII-Trimeren in starker, mittlerer oder lockerer Assoziation zu den Kernkomplexen. Von diesen sind die membran-integralen Proteine in blau dargestellt. Die minoren Antennenproteine sind in hellgrün wiedergegeben.

Je nach Isolationsbedingungen werden eine unterschiedliche Anzahl von Trimeren und minoren Antennenproteinen im Superkomplex gefunden. Abhängig von ihrer Bindungsstärke werden die LHC-Trimeren in drei Klassen eingeteilt S, M und L (für strong, moderate und loose, vgl. Abb. 2). In S-Trimeren kommen hauptsächlich Lhcb1- und Lhcb2-Proteine vor (Hankamer et al. 1997). M-Trimeren bestehen dagegen aus Lhcb1- und Lhcb3-Proteinen (Boekema et al. 1999). Superkomplexe mit der geringsten LHC-Ausstattung werden als C_2S_2 -Komplexe bezeichnet und setzen sich aus dem Kernkomplex-Dimer, zwei S-Trimeren und je zwei CP29- und CP26-Komplexen zusammen. Cross-linking Studien und elektronenmikroskopische Analysen von PSII-Komplexen aus *lhcb5*- und *lhcb4*-antisense (*aslhcb5*, *aslhcb4*) Pflanzen haben gezeigt, dass CP26 in der Nähe von CP43 und CP29 in der Nähe von CP47 lokalisiert ist (Harrer et al. 1998, Hankamer et al. 1997, Yakushevskaya et al. 2003).

CP24 konnte nur in den größeren sog. $C_2S_2M_2$ -Komplexen nachgewiesen werden (Bassi und Dainese 1992, Harrer et al. 1998, Boekema et al. 1999). Es wird vermutet, dass CP24 im Superkomplex in direkter Nachbarschaft zu den M-Trimeren und CP29 vorliegt. Eine enge Verbindung der beiden minoren Antennenproteine wurde auch durch den gleichzeitigen Verlust von CP24 und CP29 in *aslhcb4* Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* gezeigt (Andersson et al. 2001).

Die Bedeutung der einzelnen LHC-Proteine für die Zusammensetzung der Superkomplexe wurde anhand verschiedener Antisense-Pflanzen verdeutlicht. Fehlten in Folge von *aslhcb2*-Konstrukten die Lhcb1- und Lhcb2-Proteine, entstanden Superkomplexe mit S- und M-Trimeren aus CP26 und Lhcb3 (Ruban et al. 2003). Die Superkomplexe der *aslhcb5* Pflanzen zeigten dagegen nur eine unbesetzte CP26-Position ohne weitere Auswirkung auf den Gesamtkomplex (Yakushevskaya et al. 2003). Die Deletion des CP29-Proteins führte zur Destabilisierung, so dass keine PSII-LHCII-Superkomplexe detektiert werden konnten (Yakushevskaya et al. 2003).

Eine bisher ungeklärte Position im PSII nimmt das PsbS-Protein ein. Aufgrund seiner Sequenz wird es zur Superfamilie der CAB-Proteine gerechnet (vgl. Kapitel 1.2). Das Vorkommen des PsbS-Proteins im PSII-LHCII-Superkomplex wird kontrovers diskutiert (Nield et al. 2000, Thidholm et al. 2002). Neuere Studien wiesen daraufhin, dass eventuell ein Dimer des PsbS mit dem Kernkomplex und das Protein in seiner monomeren Form mit den Lhc-Proteinen assoziiert ist (Bergantino et al. 2003). Die Konversion vom Dimer zum Monomer lässt sich durch ein Senken des pH-Wertes induzieren, wie es bei der Induktion von qE im Thylakoidlumen zu beobachten ist (Bergantino et al. 2003). Physiologisch besitzt das PsbS-Protein eine wichtige Funktion für den pH-abhängigen qE-Mechanismus der nicht-photochemischen Energielöschung (Nicht-Photochemisches-Quenchen = NPQ), vgl. Kapitel 1.3.

1.1.2 Photosystem I

Der pflanzliche PSI-LHCI-HoloKomplex ist ein monomerer Multiproteinkomplex, der aus mindestens 18 Untereinheiten zusammengesetzt ist (Jensen et al. 2003). Das kürzlich publizierte Strukturmodell des PSI von *Pisum sativum* zeigt eine asymmetrische Verteilung der Proteine. Dabei wird der PSI-Kernkomplex einseitig von einem sichelförmigen Gürtel aus LHCI-Proteinen umgeben (vgl. Abb.3, Ben-Shem et al. 2003).

Der Kernkomplex des PSI besteht aus ca. 14 Untereinheiten. Im Zentrum des Kernkomplexes befindet sich ein Heterodimer aus PSI-A und PSI-B. Dieses bindet zusammen mit dem PSI-C alle Cofaktoren, die für den Energietransfer vom Plastocyanin (PC) an der lumenalen Seite auf Ferredoxin (Fd) an der stromalen Seite der Thylakoidmembran notwendig sind. Zusätzlich zu den Cofaktoren der Elektronentransportkette binden PSI-A und PSI-B insgesamt

93 Chl a Moleküle (Ben-Shem et al. 2003) und 22 Carotinoide (Scheller et al. 2001), die zusätzlich zur Absorption der Lichtenergie beitragen. Die kleineren Untereinheiten des Kernkomplexes gruppieren sich um das RZ (s. Abb. 1) und werden anhand ihrer Funktionen (Bindung des PC, Fd, LHCI oder LHCII) in verschiedene Gruppen eingeteilt (Jensen et al. 2003).

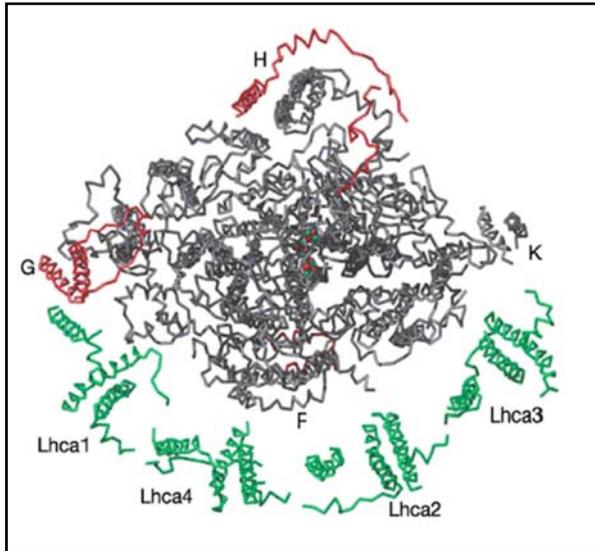


Abbildung 3: Strukturmodell des PSI-LHCI-Holo-komplexes höherer Pflanzen bei einer Auflösung von 4.4 Å (Ben-Shem et al., 2003). Dargestellt ist die Ansicht von der stromalen Seite der Thylakoidmembran. Die Untereinheiten des PSI, die sowohl in Cyanobakterien als auch in höheren Pflanzen vorkommen sind grau gekennzeichnet. Die im PSI von Cyanobakterien nicht vorkommenden Untereinheiten (PSI-H und PSI-G) sind rot hervorgehoben. In grün sind die Lichtsammelproteine (Lhca1 bis Lhca4) abgebildet. Die drei Eisen-Schwefel-Cluster sind als rote (Fe) und grüne (S) Kugeln dargestellt.

Der äußere Antennenkomplex des PSI setzt sich aus vier verschiedenen Proteinen zusammen. Sie werden nach den für sie codierenden Genen als Lhca1, Lhca2, Lhca3 und Lhca4 bezeichnet. Im Wildtyp werden Lhca1-4 in nahezu äquimolaren Mengen exprimiert (Haworth et al. 1983, Ballottari et al. 2004). Unter veränderten Wachstumsbedingungen kann jedoch das stöchiometrische Verhältnis variieren (Bailey et al. 2001). Aus solubilisierten Thylakoidmembranen konnten mittels Dichtegradienten-Zentrifugation zwei LHCI-Subkomplexe isoliert werden (Lam et al. 1984). Die beiden Fraktionen unterscheiden sich in ihren Fluoreszenzeigenschaften und werden entsprechend ihrer Emissionsmaxima als LHCI-730 und LHCI-680 bezeichnet (Bassi et al. 1985). Der LHCI-730 setzt sich aus Lhca1 und Lhca4 zusammen (Ikeuchi et al. 1991), die ein Heterodimer ausbilden (Knoetzel et al. 1992, Tjus et al. 1995, Jansson et al. 1996, Schmid et al. 1997). In der Fraktion des LHCI-680 werden dagegen monomere Lhca2- und Lhca3-Proteine detektiert (Ikeuchi et al. 1991). Spektroskopische Untersuchungen wiesen jedoch daraufhin, dass *in vivo* alle Lhca-Proteine als Dimere vorliegen (Ihalainen et al. 2000, Croce et al. 2002b). Im Fall der LHCI-680 Fraktion ist die Bildung von Homo-, bzw. Heterodimeren der Lhca2- und/oder Lhca3-Proteine noch nicht eindeutig geklärt. Zum einen weisen Crosslinking-Studien auf die Bildung von Homodimeren hin (Jansson et al. 1996), zum anderen lassen Analysen der *lhca2*- und *lhca3*-antisense-Pflanzen die Bildung von Heterodimeren vermuten (Ganeteg et al. 2001).

In neueren Studien wurde ein fünftes Lhca-Protein nachgewiesen (Storf et al. 2004, Ganeteg et al. 2004), dessen Lokalisation kontrovers diskutiert wird. Studien an antisense-Pflanzen

zeigen eine enge Verknüpfung der Expression des Lhca2-Proteins mit Lhca5 (Klimmek et al. 2005). Dagegen wurde in massenspektroskopische Analysen Lhca5 in der LHCI-730 Fraktion nachgewiesen (Storf et al. 2004). Ebenfalls für die Zugehörigkeit des Lhca5 in die LHCI-730 Fraktion sprechen die hohe Sequenzidentität zwischen Lhca4 und Lhca5 sowie *in vitro* Rekonstitutionen in denen die Dimerisierung von rLhca5 mit rLhca1 gezeigt wurde (Storf et al. 2005).

Unabhängig von der ungeklärten Position des Lhca5 innerhalb des PSI-LHCI-Holokomplexes, wird der Kernkomplex zusammen mit je einer Kopie der Lhca1-4 Proteine, wie in der Kristallstruktur gezeigt (Ben-Shem et al. 2003), als die stabilste, bzw. am häufigsten vertretene Form des Holokomplexes angesehen (Klimmek et al. 2005). Zusätzlich wird es *in vivo* Variationen des Holokomplexes geben, die die Assoziation von Lhca5 an den Komplex beinhalten (Klimmek et al. 2005).

1.2 Lichtsammelkomplexe

Die Apoproteine der Lichtsammelkomplexe (LHC) beider Photosysteme gehören zur Superfamilie der CAB-Proteine (Green et al. 1991). Alle LHCs sind kerncodiert und werden im Cytosol synthetisiert. Sie besitzen eine N-terminale Transitsequenz, die bei der posttranslationalen Insertion des Proteins in die Thylakoidmembran abgespalten wird. Die reifen LHC-Proteine sind zwischen 20 und 30 kDa groß und zeigen eine Sequenzidentität von mehr als 35% (Jansson 1994, Pichersky und Jansson 1996). Alle LHC-Proteine besitzen ein gemeinsames LHC-Motif, eine sehr hydrophobe Sequenz aus 22 Aminosäuren (Jansson 1999).

Aufgrund der großen Sequenzhomologien werden neben den LHC-Proteinen noch weitere Membranproteine zur Familie der CAB-Proteine gezählt. Hierbei handelt es sich um stressinduzierte Proteine, sog. ELIPS (= early light induced proteins), HLIPS (= highlight induced proteins) und SEPS (= stress enhanced proteins) (Adamska et al. 2001). Ebenfalls zu den CAB-Proteinen rechnet man das PsbS-Protein, ein 22 kDa großes, intrinsisches Membranprotein.

Alle CAB-Proteine besitzen 1–4 transmembrane Helices und verfügen über die Fähigkeit Chlorophylle und Carotinoide zu binden, allerdings in unterschiedlichen Stöchiometrien. Eine Ausnahme stellt das PsbS-Protein dar. Für dieses Protein ist noch nicht eindeutig geklärt, ob es *in vivo* Chlorophylle bindet (Funk et al. 1995, Dominici et al. 2002).

1.2.1 Die Struktur der Lichtsammelkomplexe

Die majore Untereinheit der PSII-Antenne, der LHCII, ist das häufigste Protein der Thylakoidmembran und bindet 50% der an der Photosynthese beteiligten Chlorophylle (Peter und Thornber 1991). In zwei neueren Studien konnte die Struktur des LHCII bei einer Auflösung von 2.72 Å, bzw. 2.5 Å, bestimmt werden. Die Erkenntnisse aus der zuerst publizierten Struktur des LHCII aus *Spinacia oleracea* (Liu et al. 2004) stimmen mit den Daten aus der Analyse des etwas höher aufgelösten Komplexes aus *Pisum sativum* (Standfuss et al. 2005) überein und werden im Folgenden als Beispiel für die Struktur der LHC-Proteine näher erläutert.

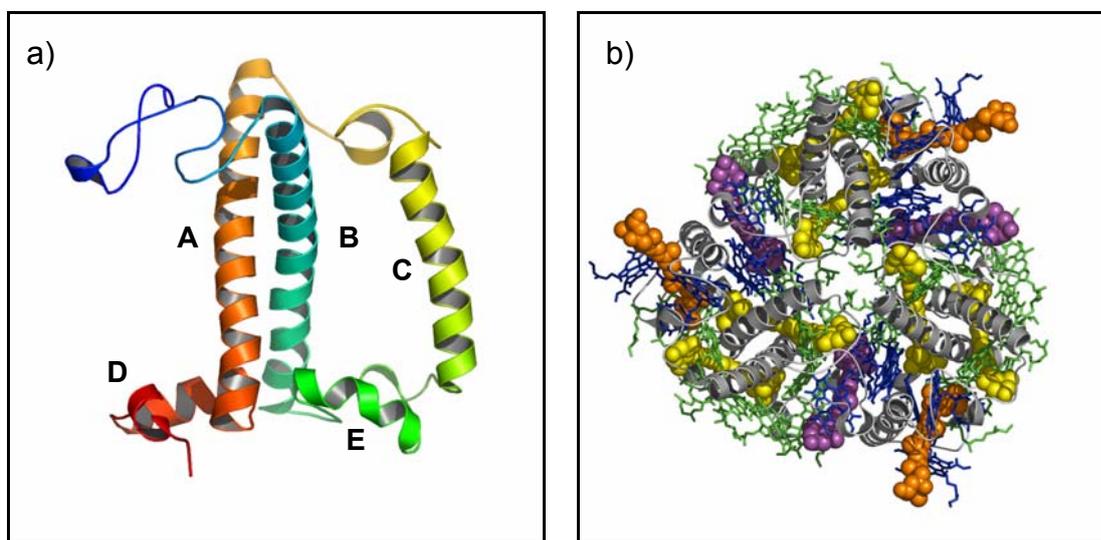


Abbildung 4:

a) Sekundärstruktur des monomeren LHCII-Komplexes, der C-Terminus ist in rot, der N-Terminus in blau dargestellt (nach Liu et al. 2004).

b) Pigmentverteilung im LHCII-Trimer (nach Liu et al. 2004). Die Chlorophylle sind grün und blau, die Luteine gelb, das Neoxanthin orange und die Xanthophyllzykluspigmente violett dargestellt.

Beide Abbildungen wurden mit Hilfe des Computerprogrammes PyMol (DeLano, 2002) erstellt.

Der monomere LHCII-Komplex besitzt drei transmembrane Helices, von denen zwei (Helix A und B) in einem Winkel von 30° zur Membrannormalen in der Membran liegen, so dass sie in der Aufsicht ein Kreuz bilden. Helix C ist in einem Winkel von 12° zur Membrannormalen in die Membran eingebettet. Zusätzlich besitzt der monomere Komplex zwei kurze Helices (D+E) an der luminalen Seite der Membran (s. Abb. 4a). Helix D verbindet den C-Terminus des Proteins mit Helix A, Helix E liegt im lumenalen Loop des Proteins zwischen Helix B und C. Der N-Terminus des Proteins liegt auf der stromalen Seite der Membran und wird aufgrund seiner positiv geladenen Aminosäurereste für die Ausbildung der Granastapel verantwortlich gemacht (Standfuß et al. 2005). Das LHCII Apoprotein koordiniert 14 Chlorophylle, die als acht Chl a und sechs Chl b Moleküle identifiziert wurden. Zusätzlich werden pro Monomer vier Carotinoide gebunden (vgl. Abb. 4b). Die beiden zentralen Luteine (Lut) waren schon zuvor mit einer Auflösung von 3.4 Å erkannt worden (Kühlbrandt et al. 1994), sie lie-

gen in den Furchen der sich kreuzenden Helices A und B, besitzen einen Winkel von 60° zur Membrannormalen und überkreuzen sich ebenfalls. Das dritte Carotinoid wurde als 9'-cis Neoxanthin (Nx) identifiziert und liegt in der Chl b-reichen Region um Helix C ebenfalls mit einem Winkel von 60° zur Membrannormalen. Der Cyclohexan-Ring des Nx ragt weit über das Proteingerüst heraus in die Lipidschicht der Membran. Die vierte Carotinoidbindestelle liegt zwischen den einzelnen Monomeren des LHCII-Trimers. Die Pigmente an dieser Position besitzen eine all-trans Konfiguration und bilden einen Winkel von 30° mit der Membrannormalen. Es wird vermutet, dass die Pigmente des Xanthophyllzyklus – Violaxanthin (Vx), Antheraxanthin (Ax) und Zeaxanthin (Zx) – an dieser Stelle lokalisiert sind.

Die pigmentbindenden Eigenschaften der Lhc-Proteine wurden anhand von *in vitro* rekonstituierten Komplexen näher untersucht. Prinzipiell besteht die Möglichkeit heterolog exprimiertes Apoprotein durch die Zugabe von isolierten Pigmenten zu Komplexen zu falten, die in

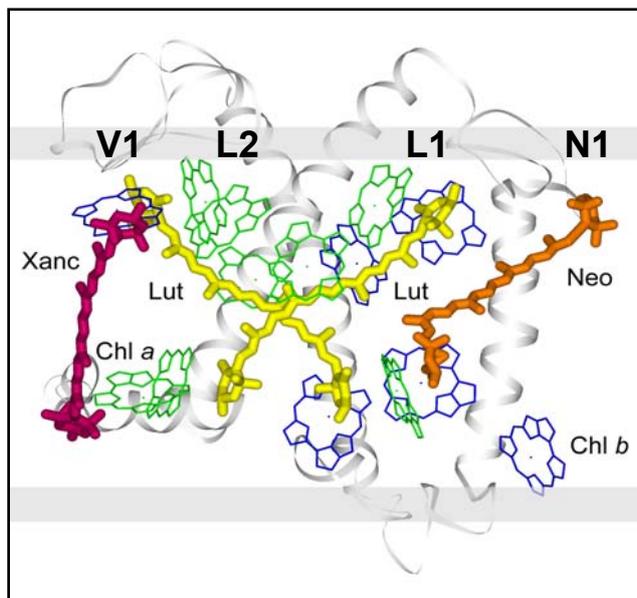


Abbildung 5: Belegung der Carotinoid-Bindestellen im LHCII-Monomer in Anlehnung an die Kristallstruktur von Liu et al. (2004).

ihren Eigenschaften den nativen sehr ähnlich sind (Plumley und Schmidt 1987, Paulsen et al. 1990). Auf diese Weise konnten durch ein selektives Pigmentangebot bzw. durch Mutationen des Apoproteins die Funktionen und Besonderheiten der einzelnen Bindestellen näher analysiert werden. Die biochemischen Untersuchungen am rekonstituierten Lhcb1 (rLhcb1) (Croce et al. 1999a+b, Hobe et al. 2000, Caffarri et al. 2001) und nativen LHCII-Monomer (Ruban et al. 1999) ergaben unterschiedliche Affinitäten der vier Carotinoidbindestellen zu den einzelnen Pig-

menten. Entsprechend ihres Bindungsverhaltens werden sie als L1 (ausschließlich Lut), L2 (bevorzugt Lut), N1 (bevorzugt Nx) und V1 (bevorzugt Vx) bezeichnet (vgl. Abb. 5).

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen den einzelnen LHC-Proteinen wurde schon früh angenommen, dass alle LHCs über eine vergleichbare Tertiärstruktur verfügen (Green et al. 1991, Jansson et al. 1994, Pichersky und Jansson 1996) und daher die Erkenntnisse aus den Untersuchungen am nativen und rekonstituierten LHCII auf die anderen LHC-Proteine übertragen werden können. Diese Annahme wurde durch die kürzlich veröffentlichte Struktur des PSI-LHCI-Superkomplexes bestätigt (Ben-Shem et al. 2003). Ebenso sind die zur Pigmentbindung am Lhcb1 identifizierten Aminosäuren (Remelli et al.

1999, Rogl et al. 1999, Yang et al. 1999) in der Sequenz anderer Lhc-Proteine konserviert (Pichersky und Jansson 1996, Jansson 1999, Bassi et al. 1999, Morosinotto et al. 2002b), was eine vergleichbare Pigmentbindung in allen LHC-Proteinen nahe legt. Biochemische Analysen der nativen und rekonstituierten Lhcs ergaben jedoch spezifische Pigment-Stöchiometrien für die einzelnen Komplexe (s. Tab. 1). Im Gegensatz zum LHCII binden die minoren Antennenproteine des PSII zwischen 8 und 10 Chlorophylle und in der Regel nur 2 Carotinoide (vgl. Übersichtsartikel Morosinotto et al. 2003). An den Antennenproteinen des PSI wurden in der Kristallstruktur 12 Chlorophylle pro Monomer identifiziert (Ben-Shem et al. 2003). Die Carotinoide konnten aufgrund der geringen Auflösung nicht zugeordnet werden, werden aber anhand der biochemischen Analysen auf 2 Carotinoide pro Monomer, bzw. 3 am Lhca3, geschätzt (vgl. Übersichtsartikel Morosinotto et al. 2003).

LHC	Nx	Vx	Lut	Chl b	Chl a	β-Car	Quelle
LHCII-Monomer	1.0	0.2	1.8	3.5	8.5	-	Croce et al. 1999
rLhcb1	1	0.15	1.85	3.5	8.5	-	Croce et al. 1999
nCP24	-	0.47	0.54	2.3	2.7	-	Pagano et al. 1998
rCP24	-	0.6	1.5	5	5	-	Pagano et al. 1998
nCP26	0.61	0.38	1.02	2.8	6.2	-	Croce et al. 2002
rCP26	0.76	0.3	1.04	2.9	6.1	-	Croce et al. 2002
nCP29	0.35	0.65	1	2.7	5.3	-	Crimi et al. 2001
rCP29	0.4	0.5	1	2.7	5.3	-	Crimi et al. 2001
LHCI-730	-	0.54	0.99	2.87	8.55	0.42	Schmid et al. 2002
LHCI-680	-	0.43	0.92	2.59	6.40	0.40	Schmid et al. 2002
rLhca1	0.34**	0.3	1.71	3.44	8.56	0.05	Schmid et al. 2002*
rLhca2	0.12**	0.22	1.67	5.26	6.74	0.05	Schmid et al. 2002*
rLhca3	0.36**	0.31	2.23	1.95	10.05	0.20	Schmid et al. 2002*
rLhca4	0.14**	0.20	1.56	4.63	7.37	0.05	Schmid et al. 2002*

Tabelle 1: Pigmentverteilung der nativen und rekombinanten Lhcb- und Lhca-Proteine. Die Mengen beziehen sich auf ein Monomer des jeweiligen Lhcs. * Die Daten basieren auf der Publikation von Schmid et al. 2002 und werden hier in der modifizierten Form, bezogen auf 12 Chl/Monomer, wiedergegeben. ** Die Apoproteine wurden mit einem Pigmenttotalextrakt rekonstituiert, der Neoxanthin enthielt.

1.3 Funktionen der Carotinoide in der Photosynthese

In photosynthetisch aktiven Organismen übernehmen Carotinoide sowohl strukturelle als auch lichtsammelnde sowie photoprotektive Funktionen.

Von struktureller Bedeutung sind die Carotinoide, insbesondere Lut, für die Lichtsammelkomplexe der Photosysteme. So konnte in *in vitro* Rekonstitutionen gezeigt werden, dass zur Bildung eines stabilen Holokomplexes die Bindung von mindestens einem Carotinoid unerlässlich ist (Plumley und Schmidt 1987, Paulsen et al. 1990). Darüber hinaus fungieren Carotinoide als Antennenpigmente und absorbieren Lichtenergie im Wellenlängenbereich zwischen 400 – 550 nm, einem Bereich in dem Chlorophylle nur schwach absorbieren. Durch Absorption in diesem Wellenlängenbereich werden die Carotinoide in den S_2 -Zustand überführt und können die Anregungsenergie auf Chlorophyll übertragen (Cogdell 1978).

Die photoprotektiven Eigenschaften der Carotinoide dienen dem Schutz der Pflanzen vor den Folgen überschüssig absorbierter Lichtenergie. Übersteigt die Menge der absorbierten Lichtenergie den Energiebedarf der Photosynthese, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit des Übergangs von Singulett-Chlorophyll ($^1\text{Chl}^*$) in den Triplett-Zustand ($^3\text{Chl}^*$). $^3\text{Chl}^*$ kann seine Energie auf molekularen Sauerstoff übertragen, der seinerseits in den reaktiven Singulett-Zustand ($^1\text{O}_2^*$) angehoben wird. $^1\text{O}_2^*$ ist ein sehr reaktives Molekül, das Proteine, Lipide und Pigmente oxidativ schädigen kann. Carotinoide sind in der Lage $^3\text{Chl}^*$ und $^1\text{O}_2^*$ in den Grundzustand zu überführen. Die dabei entstehenden Triplett-Carotinoide können ihrerseits die Anregungsenergie in Form von Wärme freisetzen (Demmig-Adams et al. 1990).

Neben den photoprotektiven Funktionen gegenüber $^3\text{Chl}^*$ und $^1\text{O}_2^*$ können Carotinoide zudem $^1\text{Chl}^*$ durch direkte Energiedissipation in den Grundzustand zurückführen. Bei diesem als nicht-photochemische Löschung der Anregungsenergie (non-photochemical quenching = NPQ) bezeichneten Prozess, kann im Überschuss absorbierte Energie in Form von Wärme abgegeben werden, bevor reaktive Spezies entstehen. NPQ setzt sich aus drei Komponenten zusammen, qT („state transition“), qI (Photoinhibition) und qE (high energy state quenching oder feedback de-excitation quenching) (Holt et al. 2004). qE stellt die Hauptkomponente des NPQ dar, durch die innerhalb von Sekunden bis Minuten bis zu 80% des $^1\text{Chl}^*$ gelöscht werden können (Holt et al. 2004). Nach heutigem Wissensstand sind für die vollständige Ausbildung von qE ein pH-Gradient über die Thylakoidmembran, die Bildung von Zx durch den Xanthophyllzyklus (s. Kapitel 1.4) und die Anwesenheit eines intakten PsbS-Proteins notwendig (Horton et al. 1996, Niyogi, K.K. 1999, Li et al. 2000, Krause und Jahns 2003). Parallel zu qE wurde eine licht-induzierte Änderung im Absorptionsspektrum von Thylakoiden bei 535 nm beobachtet (Gilmore 1997). Ruban et al. (2002b) zeigten, dass ein vergleichbares Absorptionsspektrum durch eine Rotverschiebung der Absorption von zwei Zx-Molekülen verursacht wird. Diese These wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass eine entsprechende Veränderung im Absorptionsspektrum durch die Bindung von zwei

Molekülen Zx an das PsbS-Protein induziert werden konnte (Aspinall-O'Dea et al. 2002). Unter Starklichtbedingungen kann Zx an allen Antennenproteinen nachgewiesen werden (u.a. Thayer und Björkmann 1992, Ruban et al. 1994 und 1999, Färber et al. 1997, Morosinotto et al. 2002) ohne jedoch den starken „Red-Shift“ im Absorptionsspektrum zu erfahren. *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass die Bindung von Zx an LHCs ein Löschen der Chlorophyll-Fluoreszenz bewirkt, allerdings in geringerem Maße als *in vivo* durch qE beobachtet wird (Wentworth et al. 2000, Crimi et al. 2001, Moya et al. 2001). Der genaue Mechanismus der Energieableitung konnte bisher nicht entschlüsselt werden. Für Zx wird sowohl die Rolle des direkten als auch des indirekten Löschers diskutiert. Entgegen früherer Annahmen besitzen die Carotinoide des Xanthophyllzyklus (Vx, Ax und Zx) sehr ähnliche S₁-Energieniveaus (Polívka et al. 1999, Frank et al. 2000). Daher wird vermutet, dass durch die völlig planare Molekülstruktur des Zx, im Vergleich zu Vx und Ax, Veränderungen in der Proteinkonformation hervorgerufen werden, welche die Energiedissipation begünstigen (Polívka et al. 2002). Für Zx als direkten Löscher sprechen Arbeiten, die den Energie- und/oder Elektronentransfer vom Chlorophyll auf ein Zeaxanthin-Chlorophyll-Dimer postulieren. Am Dimer wird die Ladungstrennung vermutet, die zur Bildung eines Carotinoid-Kation- und Chlorophyll-Anionradikals führt (Ma et al. 2003, Dreuw et al. 2003, Holt et al. 2005). In der Rolle des indirekten Löschers wird postuliert, dass Zx in den LHCs, eventuell als allosterischer Regulator an L2 oder V1 (Caffarri et al. 2001, Formaggio et al. 2001, Wentworth et al. 2003), die Bildung von sog. „Chlorophyll-Quenching-Sites“ induziert (Wentworth et al. 2003, Liu et al. 2004, Pascal et al. 2005).

Weiterhin schützt Zx die Thylakoidmembran vor verstärkter Lipidperoxidation (Havaux und Niyogi 1999, Havaux et al. 2004) und setzt die Membranfluidität herab, wodurch das Eindringen von molekularem Sauerstoff eingeschränkt wird (Tardy und Havaux 1997, Havaux 1998). Carotinoide gelten zusätzlich als möglicher Schutzfaktor vor licht-induziertem D1-turnover (Jahns und Miede 1996, Jahns et al. 2000, Ebbert et al. 2001, Jin et al. 2003).

1.4 Der Xanthophyllzyklus

Als Xanthophyllzyklus wird die reversible De-epoxidation von Vx, über das Intermediat Ax, zu Zx bezeichnet (s. Abb. 6, Yamamoto et al. 1962). Die De-epoxidation der beiden Epoxidgruppen des Vx wird von der Violaxanthin De-epoxidase (VDE) katalysiert, einem Enzym das im Thylakoidlumen lokalisiert ist (Yamamoto 1985, Hager und Holocher 1994). Bei der VDE handelt es sich um ein wasserlösliches (Hager 1969) 43 kDa großes kerncodiertes Protein (Arvidsson et al. 1996, Bugos und Yamamoto 1996, Rockholm und Yamamoto 1996), das der Familie der Lipocaline zugeordnet wird (Bugos und Yamamoto 1996, Bugos et al. 1998). Das Enzym benötigt Ascorbat als Cofaktor (Hager 1966) und besitzt ein pH-Optimum von 5.2 (Hager 1969). Bei luminalen pH-Werten über 6.2 ist die VDE inaktiv und im Lumen frei beweglich. Die lichtinduzierte Ansäuerung des Lumens unter pH 6.0 führt zur Aktivierung der VDE und Assoziation des Enzyms mit der Thylakoidmembran (Hager und Holocher 1994, Bratt et al. 1995). Es wird vermutet, dass die Interaktion mit der Thylakoidmembran über das Monogalaktosyldiacylglycerid (MGDG), dem Hauptlipid der Thylakoidmembran, stattfindet (Rockholm und Yamamoto 1996). *In vitro* Experimente mit isolierter VDE haben gezeigt, dass die Fähigkeit des MGDGs, inverse hexagonal Strukturen auszubilden, für die Aktivität des Enzyms ausschlaggebend ist (Latowski et al. 2004). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die VDE, insbesondere die Reaktion von Vx zu Ax, temperaturabhängig ist (Arvidsson et al. 1997, Latowski et al. 2002).

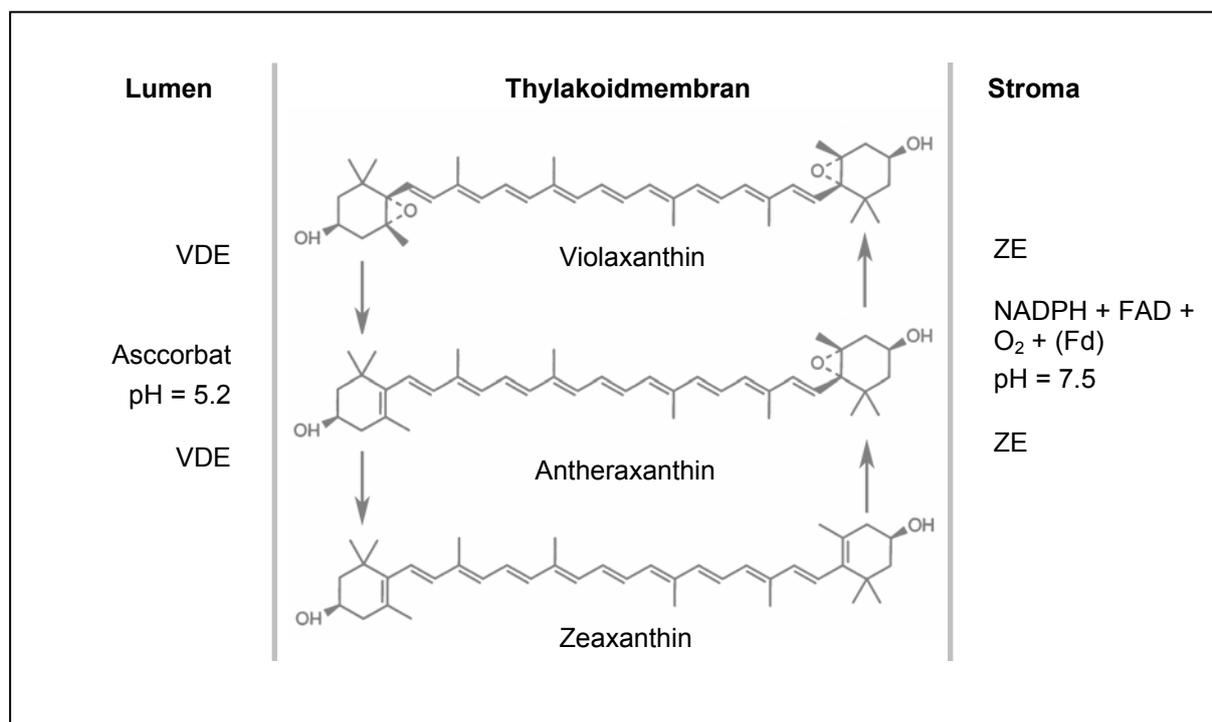


Abbildung 6: Der Xanthophyllzyklus höherer Pflanzen.

Die Epoxidation des Zx über Ax zu Vx wird durch die Zeaxanthin-Epoxidase (ZE) katalysiert. Im Vergleich zur De-epoxidation, die innerhalb von Minuten erfolgt, verläuft die Epoxidation um den Faktor 5–10 langsamer (Demmig-Adams 1996a). Sie wird durch Schwachlicht stimuliert, erfolgt aber auch im Dunkeln (Hager 1966). Das Enzym benötigt Sauerstoff (Takeuchi und Yamamoto 1986), NADPH (Siefermann und Yamamoto 1975) und FAD (Büch et al. 1995) als Cofaktoren. Ferredoxin als zusätzlicher Cofaktor der ZE wurde von Bouvier et al. (1996) vorgeschlagen. Die ZE wird, wie die VDE, der Familie der Lipocaline zugeordnet (Bugos et al. 1998). Das pH-Optimum der ZE liegt bei 7.5 (Siefermann und Yamamoto 1975), dem pH-Wert des Chloroplasten Stromas. Aufgrund dieser Eigenschaft und der Tatsache, dass die Thylakoidmembran für NADPH als Cofaktor impermeabel ist, wird vermutet, dass die ZE an der stromalen Seite der Thylakoidmembran lokalisiert ist (Hager 1975). Die ZE konnte bisher nicht isoliert werden. Es wurde jedoch ein Gen mit Homologie zum *aba*-Locus aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert, dessen Protein (ABA2) über Epoxidase-Aktivität verfügt (Marin et al. 1996). ABA2 besitzt ein Molekulargewicht von 72.5 kDa, ist an der Abscisinsäure-Biosynthese beteiligt (Marin et al. 1996) und gehört zur Familie der Lipocaline (Bugos et al. 1998).

Der Unterschied in den Reaktionsgeschwindigkeiten von VDE und ZE legt den Schluss nahe, dass die Regulation des Xanthophyllzyklus über die De-epoxidation erfolgt. Diese wiederum wird von der pH-abhängigen Aktivierung des Enzyms und der Verfügbarkeit des Substrates bestimmt. Studien zum Xanthophyllzyklus haben gezeigt, dass nur 50 – 80% des in Pflanzen vorkommenden Vx de-epoxidierbar sind (Siefermann und Yamamoto 1974, Siefermann-Harms 1984, Jahns 1995). Allerdings variieren die Größe des Xanthophyllpools und die Menge des de-epoxidierbaren Vx mit den jeweiligen Wachstumsbedingungen (Thayer und Björkmann 1990, Demmig-Adams et al. 1996b, Verhoeven et al. 1999). Untersuchungen an Pflanzen mit stark verminderter Antennengröße wiesen daraufhin, dass die Limitierung der De-epoxidation durch die Bindung des Vx an die Antennenproteine entsteht (Jahns 1995, Härtel et al. 1996). Versuche die De-epoxidation an VDE-defizienten Mutanten von *Arabidopsis thaliana* durch Zugabe von exogener VDE zu etablieren zeigten, dass frei in der Membran vorliegendes Vx als Substrat der VDE fungiert (Macko et al. 2002). Neben der Ansäuerung des Lumens und der einhergehenden Aktivierung der VDE ist somit die Freisetzung des LHC-gebundenen Vx limitierender Faktor der De-epoxidation.

In vivo wird die De-epoxidation zudem durch eine eingeschränkte Aufnahmekapazität der Lipidphase der Membran begrenzt, wodurch es zur „Feedback“-Hemmung der VDE kommt Hieber et al. (2004).

1.5 De-epoxidationsversuche an rekonstituierten Lhcb1-Komplexen

Im vorherigen Kapitel wurde darauf hingewiesen, welche grundlegende Bedeutung die LHCs für die De-epoxidation besitzen. Inwiefern die vier unterschiedlichen Carotinoidbindestellen die Verfügbarkeit des Vx für die De-epoxidation beeinflussen, konnte unter *in vitro* Bedingungen exemplarisch für das Lhcb1-Protein gezeigt werden (Jahns et al. 2001). Hierzu wurde rekombinantes Lhcb1-Protein mit unterschiedlichen Pigmentgemischen rekonstituiert. Da Lut, Nx und Vx unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen Bindestellen besitzen (Croce et al. 1999a, Hobe et al. 2000), war es möglich, Komplexe zu rekonstituieren, in denen Vx an unterschiedlichen Bindestellen koordiniert wurde. Die Strukturdaten des LHCII-Komplexes sprechen für vier Carotinoide pro Monomer (Liu et al. 2004, Standfuß et al. 2005). Allerdings können unter den verschiedensten Rekonstitutionsbedingungen *in vitro* maximal substöchiometrische Mengen eines vierten Carotinoids am Komplex detektiert werden (Dr. S. Hobe persönliche Mitteilung). Für die rekonstituierten Komplexe wurde daher eine Verteilung der Carotinoide auf die L1-, L2- und N1-Bindestellen angenommen (Jahns et al. 2001). Aus heutiger Sicht ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass an der N1-Bindestelle vorzugsweise Carotinoide in 9-*cis*-5,6-epoxy Konformation gebunden werden (Snyder et al. 2004). Die N1-Bindestelle wäre demnach für Lut und Vx nicht zugänglich.

In vitro De-epoxidationen an nativen LHCII-Trimeren, die mehr als drei Carotinoide pro Monomer enthielten, zeigten eine schnelle und vollständige De-epoxidation des Vx. Für die nativen Komplexe ist davon auszugehen, dass Vx an der V1-Bindestelle zwischen den Monomeren gebunden war (vgl. Abb. 7a). Bei den rekonstituierten Komplexen, die mit Lut und Vx rekonstituiert worden waren, konnte *in vitro* ebenfalls eine schnelle De-epoxidation und ein vollständiger Umsatz des Vx zu Zx erzielt werden (vgl. Abb. 7b). Es kann vermutet werden, dass in diesen Komplexen die L1- und L2-Bindestelle mit Lut und die V1-Bindestelle mit Vx belegt waren. Ersetzte man Lut durch Nx im Rekonstitutionsansatz wurden pro Monomer 1.6 Vx und 1.1 Nx gebunden. Nx besitzt eine hohe Affinität zur N1-Bindestelle (Croce et al. 1999b), weswegen davon auszugehen ist, dass Nx an N1 und Vx an L1 und L2 gebunden war. Die De-epoxidation dieser Komplexe war im Vergleich zu den vorherigen Komplexen verlangsamt und auf ca. 50% des Vx beschränkt (vgl. Abb. 7c).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde gefolgert, dass Vx an der peripheren V1-Bindestelle leicht verfügbar ist und vollständig de-epoxidiert werden kann. An den internen Bindestellen L1 und L2 ist Vx nur an der L2-Bindestelle mit einem langsameren Reaktionsverlauf als an V1 de-epoxidierbar. An L1, der komplex-stabilisierenden Carotinoidbindestelle, kann Vx nicht de-epoxidiert werden.

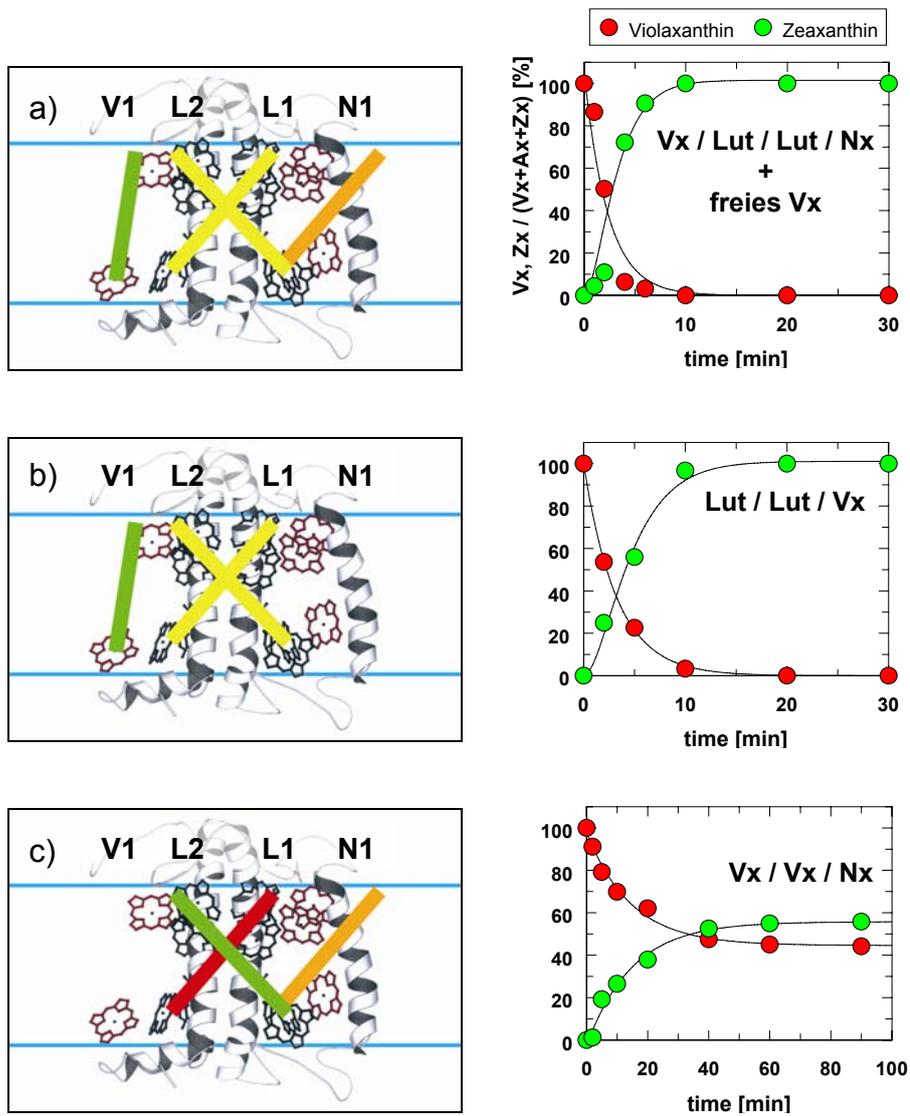


Abbildung 7: De-epoxidationskinetik an rekonstituierten Lhcb1 Komplexen, a) Lhcb1-Vx/Lut/Lut/Nx und freies Vx, b) Lhcb1-Lut/Lut/Vx, c) Lhcb1-Vx/Vx/Nx. In der linken Spalte ist die Verteilung der einzelnen Carotinoide auf die verschiedenen Carotinoidbindestellen schematisch dargestellt (gelb = Lut, orange = Nx, grün = de-epoxidierbares Vx, rot = nicht de-epoxidierbares Vx). Die zu den jeweiligen Komplex-Typen gehörigen Reaktionsverläufe sind rechts in der Spalte.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von der Beobachtung, dass *in vivo* die LHC-Proteine für die Regulation des Xanthophyllzyklus eine wichtige Rolle spielen, sollte in der vorliegenden Arbeit im Detail bestimmt werden, inwieweit die einzelnen Antennenproteine dazu beitragen.

Vorangegangene *in vivo* Studien (Färber et al. 1997, Verhoeven et al. 1999, Ruban et al. 1999) hatten gezeigt, dass sich die verschiedenen Antennenproteine in Bezug auf ihre De-epoxidationsdynamik unterscheiden. Darüber hinaus lieferten *in vitro* Experimente an rekonstituierten Lhcb1-Proteinen (Jahns et al. 2001) den Hinweis, dass zusätzlich die verschiedenen Carotinoidbindestellen der LHC-Proteine für die Geschwindigkeit und das Ausmaß der De-epoxidation von Bedeutung sind. In dieser Arbeit sollten die für den Lhcb1 durchgeführten Untersuchungen auch für alle anderen Antennenproteine beider Photosysteme (die minoren Antennenproteine Lhcb4-6 und die Antennenproteine des PSI Lhca1-4) durchgeführt werden. Anhand der Ergebnisse sollte zum einen überprüft werden, inwiefern der *in vivo* beobachtete Unterschied im DEPS der nativen Antennenproteine an den rekonstituierten Komplexen erhalten bleibt. Die De-epoxidation des gebundenen Vx wäre damit vom Protein und seinen Carotinoidbindestellen abhängig und würde *in vivo* nicht durch die Anordnung des Gesamtkomplexes bestimmt werden. Zum anderen sollte anhand der Experimente zusätzlich gezeigt werden, ob es sich bei den am Lhcb1 festgestellten Eigenschaften der verschiedenen Carotinoidbindestellen um generelle Merkmale dieser Bindestellen handelt, oder ob diese Protein-spezifisch sind.

So sollte es schließlich möglich sein, durch die *in vitro* De-epoxidation aller Antennenkomplexe ein detailliertes Bild des Xanthophyllzyklus zu entwerfen, das Aufschluss gibt über die Bedeutung der einzelnen Antennenproteine am Xanthophyllzyklus und die Rolle, welche die verschiedenen Carotinoidbindestellen dabei spielen.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation rekombinanter Antennenproteine

2.1.1 Minore Antennenproteine

2.1.1.1 Klonierung des Überexpressionsvektors

Alle zum molekularbiologischen Arbeiten verwendeten Methoden beruhen, soweit nicht anders angegeben, auf Protokollen des Laborhandbuchs „Molecular Cloning“ (Sambrook und Russel 2004). Die benötigten Lösungen wurden autoklaviert (120 °C, 20 Minuten) oder steril filtriert (Rotrandfilter, 0.2 µm Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland).

Ausgangsmaterial für die Klonierungsarbeiten waren pBS-SK(+)-Vektoren, die cDNA-Fragmente mit den codierenden Sequenzen für die einzelnen minoren Antennenproteine CP24, 26 und 29 aus *Nicotiana tabacum* enthielten (DNA-Sequenz s. Diplomarbeit Thomas Graßes, 1999). Mit Hilfe spezifischer Primer konnte die gewünschte DNA amplifiziert und die, für die weitere Klonierung wichtigen Restriktionsstellen eingebaut werden.

2.1.1.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Für die Klonierungsarbeiten wurde der *Escherichia coli* Stamm DH5 α verwendet. Die Überexpression erfolgte in Zellen des BL21(DE3) Stammes.

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ , Φ 80dlac Z Δ M15, Δ lacZYA-argF) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> λ - <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan (1983)
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B -r _B ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , (DE3)	Studier & Moffatt (1986) Davanloo et al. (1984)

Zur Überexpression wurde der pET21a-Vektor (Novagene) verwendet. Das Plasmid besitzt einen T7-Promotor, trägt Ampicillinresistenz und codiert einen C-terminalen His-Tag.

Die *E.coli* Kulturen wurden in Luria-Bertani-Medium (LB) angezogen. Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 200 Upm auf einem Schüttler, Agarplatten über Nacht bei 37 °C im

Wärmeschrank inkubiert. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde nach dem Autoklavieren Ampicillin [100 µg/ml] ins Nährmedium gegeben.

LB-Medium: 10% (w/v) Pepton, 5% (w/v) Hefeextrakt, 10% (w/v) NaCl
in H₂O bideist, mit NaOH auf pH 7.0 einstellen

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1.5% (w/v) Agar zugesetzt.

2.1.1.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Kompetente *E.coli* Zellen wurden nach der Rubidiumchlorid Methode hergestellt (Hanahan, 1983). Hierzu wurden 10 ml LB-Medium mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit 1.5 ml dieser Vorkultur wurden 30 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 0.5 bei 37 °C auf einem Schüttler angezogen. Anschließend wurde die Kultur für 10-15 Minuten auf Eis abgekühlt und mit 4 000 x g bei 4 °C für 2 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 ml RFI-Medium resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde erneut zentrifugiert (4 000 x g, 4 °C, 2 Minuten). Das Sediment wurde in 2.5 ml RFII-Medium resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis stehen gelassen. Die Zellsuspension wurde in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

RFI-Medium:

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂
10 mM CaCl₂
15% (w/v) Glycerin
30 mM Kaliumacetat

RFII-Medium:

10 mM MOPS, NaOH pH 6.8
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
15% (w/v) Glycerin

Beide Medien wurden sterilfiltriert.

2.1.1.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Als Polymerase wurde die temperaturstabile Pfu-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) verwendet. Die eingesetzten Primer wurden von der Firma Metabion (Martensried, Deutschland) synthetisiert. Die PCR Reaktionen wurden in einem Mastercycler *gradient* der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Primer:

Name	Sequenz
L65Prim BamH1 oT	5'-ATAATT GGATCC GCGGCAGCAGCTGCTCCCAAG-3'
L55Prim BamH1 oT	5'-ATAATT GGATCC AAGAAGGCTGCTGCTGCCCT-3'
L45Prim BamH1 oT	5'-GAGAGGG GGATCC CGATTCTGGATTCTGGAAAAA-3'
CP24 HindIII pET21a	5'-GCGCCG AAGCTT CAAACCAAGAGCTCCAAGGGGTAT-3'
CP26 HindIII pET21a	5'-GCGCAG AAGCTT CAAAGTGGGGGCTCTTTCAGC-3'
CP29 HindIII pET21a	5'-GCGGCG AAGCTT AGAGAAGAAGCCGAATGTGTC-3'

PCR-Ansatz:

Polymerasepuffer 10fach	10 µl
dNTPs (je 1.25 mM, Fa. Peqlab)	2 µl
Matritze (200 ng/µl)	1 µl
Forward-Primer (0.1 mM)	2 µl
Reversed-Primer (0.1 mM)	2 µl
DMSO (99.5%)	5 µl
Polymerase (2.5 U/µl)	2 µl
H ₂ O ad 100 µl	

PCR-Programm:

Denaturierung	95 °C	2 min	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	45 sec	30 Zyklen
Anlagerung der Primer	61 °C	45 sec	
Elongation	72 °C	2.30 min	
Denaturierung	95 °C	45 sec	1 Zyklus
Anlagerung der Primer	61 °C	45 sec	
finale Elongation	72 °C	7 min	

2.1.1.1.4 Aufreinigung der DNA

Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte über Agarosegelelektrophorese und anschließende Gelelution. Zur Herstellung des Gels wurde 1% (w/v) Agarose in TBE-Puffer aufgekocht und mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Der TBE-Puffer diente auch als Laufpuffer. Die Probe wurde mit $\frac{1}{10}$ Volumen Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 90 mA für 1-2 Stunden. Zum Größenvergleich der einzelnen Fragmente diente der DNA-Längenstandard Nr. IV (Roche, Mannheim, Deutschland). Die DNA konnte mit Hilfe von UV-Licht oder Blaulicht detektiert werden. Die gewünschte DNA-Bande wurde mit einem Skalpell herausgeschnitten und mit Hilfe des „NucleoSpin Extract“ Kits der Firma Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Am Ende wurde die DNA mit Wasser eluiert.

TBE-Puffer:

100 mM Tris
100 mM Borsäure
2.5 mM EDTA
in H₂O bidest.

DNA-Probenpuffer:

50% (v/v) Glycerin
0.1% (v/v) Bromphenolblau
in H₂O bidest.

2.1.1.1.5 Restriktion von DNA

Die verwendeten Restriktionsendonucleasen und die dazugehörigen Puffer stammten entweder von der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) oder wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt a.M., Deutschland) bezogen. Die Reaktionsbedingungen der einzelnen Enzyme wurden den Herstellerkatalogen entnommen. Zur qualitativen Analyse ligierter Vektor-DNA wurden ca. 2 µg DNA eingesetzt. Ein präparativer Ansatz enthielt ca. 10 µg DNA, die Mengen der anderen Bestandteile des Restriktionsansatzes wurden angepasst. Die Probe wurde bei der für das Enzym empfohlenen Temperatur für mindestens eine Stunde inkubiert. Die geschnittene DNA konnte wie unter 2.1.1.1.2 beschrieben aufgetrennt, detektiert und gegebenenfalls isoliert werden.

Restriktionsansatz: 10 µl DNA (1 µg/µl)
2 µl Puffer (10x konz.)
2 µl BSA (1 mg/ml, wenn erforderlich)
je 1-2 U Restriktionsendonuclease
ad 20 µl H₂O bidest.

2.1.1.1.6 Alkalische Phosphatase Behandlung

Um eine Religation des linearisierten Vektors während der Ligation zu vermeiden, wurden die 5'-Enden des Plasmids durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Hierzu wurden 50 ng DNA mit 1 U „Shrimp alkalische Phosphatase“ (Roche, Mannheim, Deutschland) und dem dazugehörigen Puffer gemischt und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte die Phosphatase durch eine 15 minütige Inkubation bei 65 °C deaktiviert werden. Die so behandelte Vektor-DNA konnte direkt für die Ligation verwendet werden.

Dephosphorylierungsansatz:

x µl	linearisierte Vektor-DNA (50 ng)
0.7 µl	Puffer (10x konz.)
1 µl	Phosphatase [1U/µl]

ad 7 µl H₂O bidest.

2.1.1.1.7 Ligation

Für die Ligation wurde die T4-DNA-Ligase der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Dem dephosphorylierten Vektor wurde neben der Ligase und dem entsprechenden Puffer das geschnittene DNA-Fragment in 3-5 fach molarem Überschuss zugesetzt und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Zu jedem Ligationsansatz wurden Kontrollen ohne DNA-Fragment durchgeführt, um die Menge an religiertem Vektor zu überprüfen. Nach der Reaktion wurde die Hälfte eines jeden Ligationsansatzes zur Transformation kompetenter *E.coli* Zellen verwendet.

Ligationsansatz:

7 µl	dephosphorylierter Vektor
x µl	DNA-Fragment
10 µl	Puffer (2x konz.)
1 µl	Ligase [5 U/µl]

ad 20 µl H₂O bidest.

2.1.1.1.8 Hitze-Schock Transformation

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit ca. 20 ng Vektor-DNA versetzt und vorsichtig geschwenkt. Nach 15minütiger Inkubationszeit auf Eis wurden die Ansätze für 90 Sekunden bei 42 °C erhitzt und anschließend für 2 Minuten im Eiswasser abgekühlt. Zur Regeneration wurden die Zellen mit 400 µl LB-Medium versetzt und bei 37 °C für 30 Minuten

unter Schütteln inkubiert. Die Transformationsansätze wurden auf ampicillinhaltigen LB-Platten ausgestrichen.

2.1.1.1.9 Isolierung von Plasmid DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das GFX™ *Micro* Plasmid Prep Kit der Firma Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland) genutzt, das auf dem Prinzip der alkalischen Lyse basiert. Die Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben aus den *E.coli* Zellen isoliert. Zur besseren Weiterverwendung wurde die DNA nicht mit Puffer sondern mit H₂O bidest. eluiert. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.1.1.1.10 Quantifizierung der DNA

Die isolierte DNA konnte bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt werden. Gemessen wurde die verdünnte DNA in einer Quarz-Micro Küvette gegen Wasser, wobei eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entsprach. Zur Reinheitsbestimmung der DNA wurde bei 280 nm die Proteinmenge bestimmt. Das Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ gilt als Maß für die Proteinkontamination, liegt der Wert zwischen 1.8 und 2 zeigt das eine hohe Reinheit der Nukleinsäuren an.

2.1.1.2 Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten Proteins (nach Paulsen et al. 1990)

2.1.1.2.1 Überexpression

Zur Anzucht der Vorkultur wurden 30 ml LB-Amp-Medium mit einer Kolonie (z.B. BL21-pET21a-CP24) von der Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Hauptkultur wurde im Verhältnis 1:20 mit der Vorkultur angeimpft. Das LB-Medium enthielt neben dem Ampicillin [1µg/ml] zur Selektion noch 0.5% Glukose, um basale Expression zu unterdrücken (Grossmann et al. 1998).

Die Kulturen wurden bei 37 °C bis zu einer OD₅₅₀ von 0.5 angezogen. Durch die Zugabe von 1 mM IPTG konnte die Überexpression induziert werden. Die Zellen wurden für vier weitere Stunden inkubiert, bevor sie auf Eis abgekühlt und bei 6 000 x g und 4 °C für 10 Minuten pelletiert wurden. Das Zellsediment wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.1.1.2.2 Aufreinigung

Das Pellet aus 100 ml LB-Kultur wurde in 20 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Frenchpress bei einem Druck von 1200 Psi aufgebrochen und anschließend bei 4 °C mit 6 000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Lysis-Puffer resuspendiert mit 20 µg/ml DNase, 10 mM MgCl₂ und 1 mM MnCl₂ versetzt und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37 °C wurden 2 ml Detergenz-Puffer zugeben, erneut gemischt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurde die Probe abzentrifugiert (4 °C, 10 000 x g für 10 Minuten). Das entstandene Pellet wurde in 2 ml Triton-Puffer aufgenommen und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Das letzte Pellet wurde in Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Proteine wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Lysis-Puffer	50 mM Tris, HCl pH 8.0, 25% Saccharose, 1mM EDTA
DNase-Puffer	20 mM Tris, HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 50% Glycerin
1 mg DNase / ml Puffer	
Detergenz-Puffer	200 mM NaCl, 1% (w/v) Deoxycholinsäure, 1% (w/v) Nonidet-P40, 20 mM Tris, HCl pH 7.5 2 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol
Triton-Puffer	0.5% (w/v) Triton x-100, 20 mM Tris, HCl pH 7.5, 1 mM β-Mercaptoethanol
Resuspensions-Puffer	50 mM Tris, HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol
MgCl ₂	1 M
MnCl ₂	0.1 M

2.1.1.2.3 Quantifizierung der Proteinmenge

Zur Proteinbestimmung wurde der „BioRad Protein Assay“ (BioRad, München, Deutschland) verwendet. 5 µl der Probe wurden mit H₂O bidest. auf 800 µl aufgefüllt, mit 200 µl der Reagenzlösung versetzt und gemischt. Nach fünf Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur konnte die Extinktion der Lösung bei 595 nm bestimmt werden. Als Blank wurde der Nullwert der Eichgeraden genutzt.

Eichgerade: 0/2/4/6/8/10 µg Protein (aus BSA-Standardlösung)

2.1.1.2.4 Detektion über SDS-PAGE und Western-Blot

Der qualitative Nachweis der überexprimierten Proteine erfolgte über SDS-PAGE und Western-Blot Analyse, wie in den Kapiteln 2.7 und 2.8 beschrieben.

2.1.2 Antennenproteine des PSI

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zu den rekombinanten Proteinen des LHCI, Lhca1-4, sind in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Volkmar Schmid, Universität Mainz, erstellt worden. Die Klonierung, Überexpression und spätere Rekonstitution wurden von Frau Dipl. Biologin Stefanie Storf im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt. Die verwendeten Methoden wurden in Schmid et al. (2002) erläutert.

2.2 Präparation nativer Antennenproteine

2.2.1 Minore Antennenproteine des PSII

2.2.1.1 Thylakoidisolierung aus *Nicotiana tabacum* (Graßes et al. 2001)

Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN, IPK Gatersleben) wurden im Gewächshaus mit einem 16 h Licht-/ 8 h Dunkel-Rhythmus bei einer Lichtstärke von 100 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und einer Temperatur von 24 °C für 6 - 8 Wochen angezogen.

3-4 große Blätter wurden mit 80 ml Isolationsmedium im Warring Blender homogenisiert, durch Gaze gepresst und für 5 Minuten bei 4 °C mit 1 000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 ml Schockmedium resuspendiert erneut zentrifugiert (5 Minuten, 4 °C, 2 000 x g). Das Sediment wurde in 2 ml Resuspensionsmedium aufgenommen und zum weiteren Gebrauch dunkel und auf Eis gelagert, oder bei -20 °C eingefroren.

Isolationsmedium:

5 mM MgCl₂

50 mM KH₂PO₄ / pH 7.4

300 mM Sacharose

1 mM EDTA*

0.2% (w/v) BSA*

*frisch zu setzen

Schockmedium:

5 mM MgCl₂

10 mM KH₂PO₄ / pH 7.4

5 mM Sacharose

Resuspensionsmedium:

5 mM KCl

10 mM MgCl₂

50 mM KH₂PO₄ / pH 7.4

100 mM Sacharose

2.2.1.1 BBY-Präparation (nach Berthold et al. 1981, modifiziert nach Dunahay et al. 1984)

Die PSII-Partikel wurden mit Triton X-100 aus den Thylakoiden solubilisiert. Hierzu wurde eine Chlorophyllkonzentration von 2.5 mg Chl / ml Suspension und eine Triton X-100-Konzentration von 20 mg Detergenz / mg Chl eingestellt. Das Detergenz wurde tropfenweise zugesetzt, im Anschluss wurde die Suspension im Dunkeln bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert. Die BBY-Partikel wurden mit 40 000 x g bei 4 °C für 30 Minuten sedimentiert. Das Pellet wurde in wenig Resuspensionspuffer aufgenommen und konnte bei -20 °C gelagert werden.

Inkubationspuffer:

5 mM MgCl₂
15 mM NaCl₂
20 mM HEPES / pH 7.5

Resuspensionspuffer:

5 mM MgCl₂
15 mM NaCl₂
20 mM HEPES / pH 7.5
0.4 M Saccharose

2.2.1.2 BBY Wasch- und Solubilisierungsschritt (nach Bassi et al. 1993)

Die BBY-Partikel wurden zweimal mit 1 mM EDTA / pH 8.0 gewaschen und jeweils bei 4 °C mit 40 000 x g für 30 Minuten sedimentiert. Das letzte Pellet wurde in H₂O bidest. aufgenommen und eine Chlorophyllkonzentration von 2 mg Chl / ml H₂O eingestellt. Die Suspension wurde mit dem gleichen Volumen 2% (w/v) β-Dodecylmaltosid versetzt. Die solubilierte Probe wurde für 2 Minuten bei 4 °C und 15 000 x g abzentrifugiert. Der Überstand konnte auf die Gradienten aufgetragen werden. Es wurden pro 12 ml Gradient 500 µl der solubilierten Suspension verwendet.

2.2.1.3 Dichtegradientenzentrifugation

Gradientenlösung: 0.6 M Saccharose, 5mM Tricin pH 7.6, 0.06% DM

Zur Ausbildung des Gradienten wurde die Lösung in die Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei -20 °C eingefroren. Die Schichtung des Gradienten entstand während des langsamen Auftauens bei 4 °C. Die Zentrifugation erfolgte für eine Dauer von 18 Stunden bei 300 000 x g und 4 °C. Nach dem Lauf konnten die einzelnen Banden mit einer Spritze von oben aus dem Gradienten entnommen werden.

Zur Auftrennung der rekonstituierten minoren Antennenproteine (s. Kap. 2.5.1) wurde nur eine 0.4 M Saccharoselösung verwendet.

2.2.1.4 PD10 Waschgang

Bevor die aus dem Dichtegradienten geernteten Banden weiter solubiliert und über Isoelektrische Fokussierung aufgetrennt werden konnten, wurde die Saccharose per Gelfiltration entfernt. Hierzu wurden die Proben auf eine mit dem Elutionspuffer equilibrierte PD-10-Säule (Trennmateriale Sephadex G-25, Amersham Biosciences, Freiburg Deutschland) aufgetragen. Die LHCs konnten als erste grüne Bande mit 5 mM Tricin-Puffer (pH 7.8) eluiert werden. Die Aufreinigung wurde bei 4 °C unter Schwachlicht durchgeführt.

2.2.1.5 Isoelektrische Fokussierung

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt erfolgte unter nicht-denaturierenden Bedingungen nach der von Ruban et al. (1994) beschriebenen Methode.

Anodenpuffer: 3 ml 85% H_3PO_4 mit H_2O auf 50 ml auffüllen

Kathodenpuffer: 1 M NaOH

Ampholinlösung: 2.5% (v/v) Ampholin, pH 3.5 – 5.0

Tritonlösung: 0.1% Triton x-100

Elutionspuffer: 10 mM HEPES / pH 7.6

0.06% β -Dodecylmaltosid

Detergenzlösung: 1 ml 3% (w/v) β -Dodecylmaltosid

Gel: 1 g Glycin

96 ml H_2O bidest

0.06% β -Dodecylmaltosid

2.5 ml Ampholinlösung (Stammlösung)

4 g Ultrodex

Vorbereiten der Gelapparatur:

Pro Bahn wurden 10 Elektrodenstreifen zugeschnitten, wovon 8 mit 2.5% Ampholinlösung getränkt wurden. 4 Streifen wurden auf jeder Seite der Gelform übereinandergestapelt. Das frisch angesetzte Gel wurde in die Form gegossen. Um die Gelmatrix zu festigen, wurde das Gewicht durch Verdunsten von Wasser um 30 g reduziert. Anschließend wurde je einer der zugeschnittenen Streifen mit Anoden- bzw. Kathodenlösung getränkt und auf den entsprechenden Gelstapel gelegt. Die Kühlplatte der IEF-Apparatur wurde mit Tritonlösung benetzt, die Gelform luftblasenfrei aufgesetzt, die Elektroden angeschlossen und der Vorlauf bei 4 °C und 8 W für 60 Minuten gestartet.

Probenauftrag:

Die von der PD-10 Säule eluierten LHCs wurden mit Detergenz versetzt, so dass am Ende bei einer Chlorophyllkonzentration von 1 mg/ml 1% β -Dodecylmaltosid enthalten war. Die Probe wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dabei alle 5 Minuten durchmischt.

Mit Hilfe eines Flachspatels wurde ca. 1 cm von der Kathode entfernt Gelmatrix aus der Apparatur entnommen, mit der Probe versetzt, gemischt und zurück in die Gelform gegeben. Die Elektroden und der Deckel wurden wieder aufgesetzt und der Hauptlauf für 18 h bei 8 W und 4 °C gestartet.

Am nächsten Tag wurden die Banden mit einem Flachspatel ausgekratzt. Die aufgetrennten Komplexe konnten mit Hilfe des Elutionspuffers und PEGG Elutionssäulen (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) von der Gelmatrix getrennt werden. Die so gewonnenen Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung dunkel und auf Eis gehalten.

2.2.1.6 Detektion über SDS-PAGE und Western-Blot

Der qualitative Nachweis der isolierten Proteine erfolgte über SDS-PAGE und Western-Blot Analyse (s. Kapitel 2.7 und 2.8), die Pigmente wurden nach der Butanol-Methode extrahiert und via HPLC analysiert (2.6.1.2 und 2.6.2.3).

2.2.2 Antennenproteine des PSI

Die Isolierung der nativen Antennenproteine des PSI wurde in Mainz (vgl. Kap. 2.1.2) durchgeführt. Einzige Ausnahme stellen die *in vivo* belichteten Komplexe dar. Hier erfolgte die Anzucht, Belichtung und Thylakoidisolierung in Düsseldorf. Die verwendeten Methoden wurden in Schmid et al. 1997 und 2002 erläutert.

2.2.2.1 Thylakoidisolation aus *Lycopersicon esculentum*

Die Anzucht von Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum* „Hellfrucht“, Gartenland, Aschersleben, Deutschland) erfolgte im Gewächshaus mit einem 16 h Licht-/ 8 h Dunkel-Rhythmus bei einer Lichtstärke von $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und einer Temperatur von $24 \text{ }^\circ\text{C}$. Es wurden ca. 4 Wochen alte Pflanzen geerntet.

Die Tomatenblätter wurden in einem Warring Blender mit so viel eiskaltem Homogenisierungspuffer versetzt, bis sie bedeckt waren, und zerkleinert. Das Homogenisat wurde durch Gaze filtriert und abzentrifugiert (5 Minuten, $3\,000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Das Pellet wurde in Breaklösung aufgenommen, der Chlorophyllgehalt sollte bei 0.4 mg/ml liegen. Die Suspension wurde für 3 Minuten bei $500 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert, um störende Stärke zu entfernen. Der resultierende Überstand wurde dekantiert und für 10 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit $12\,300 \times g$ pelletiert. Das Sediment wurde in wenig Resuspensionslösung aufgenommen. Die Thylakoid-suspension wurde bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Homogenisierungspuffer:

0.4 M Sorbitol

0.1 M Tricin / NaOH pH 7.8

Breaklösung:

50 mM Sorbitol

10 mM Tricin / NaOH pH 7.8

5 mM EDTA

Suspensionslösung:

30% (w/v) Saccharose

10 mM Tricin / NaOH pH 7.8

5 mM EDTA

2.3 Präparation der Violaxanthin-De-epoxidase (VDE)

2.3.1 Thylakoidisolierung (nach Jensen und Bassham, 1966, modifiziert nach Krause et al. 1985)

Die Thylakoide wurden aus 6 Wochen alten Spinatpflanzen isoliert. Der Spinat (*Spinacia oleracea*, ssp. Polka) wurde im Gewächshaus mit einem 8.5 h Licht-/ 15.5 h Dunkel-Rhythmus bei einer Lichtstärke von $150 \mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und einer Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ angezogen.

500 g Spinat wurden mit 1L Lösung A im Warring Blender homogenisiert, durch Gaze gepresst und für 10 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit $5\,000 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml MgCl_2 resuspendiert und für eine Minute hypotonisch aufgebrochen. Die Suspension wurde mit 100 ml Lösung B aufgefüllt und erneut zentrifugiert (10 Minuten, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\,000 \times g$). Das Pellet in wenig Lösung D aufnehmen, zum weiteren Gebrauch dunkel und auf Eis lagern, oder bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ einfrieren.

Lösung A:

1 mM MgCl_2
1 mM MnCl_2
10 mM NaCl
2 mM EDTA
0.8 mM KH_2PO_4
44 mM MES/ NaOH pH 6.1

frisch pro 1L

4 g BSA, 0.5 g Cystein,
0.4 g Na-Ascorbat zusetzen

Lösung C: 5 mM MgCl_2

Lösung D: 1 Volumenteil Lösung B + 1 Volumenteil Lösung C

Lösung B:

5 mM MgCl_2
10 mM NaCl
2 mM KH_2PO_4
80 mM HEPES/ NaOH pH 7.6
0.66 M Sorbitol
0.33 M Sorbitol

frisch pro 100 ml

80 mg BSA zusetzen

2.3.2 VDE-Isolierung

Zur Isolierung der VDE aus Spinat wurden Thylakoide nach der unter 2.3.1 beschriebenen Methode isoliert. Im letzten Schritt wurde das Pellet jedoch nicht in Medium D sondern in 100 ml Puffer 1 aufgenommen und eine Chlorophyllkonzentration von 1 mg /ml eingestellt.

Anschließend wurden die Membranen mittels Ultraschall aufgebrochen. Hierzu wurde die Suspension in ein 100 ml Becherglas gegeben und in Eiswasser gekühlt. Die Beschallung erfolgte für eine Dauer von 2×4 Minuten mit einer Pause von drei Minuten zum Abkühlen

der Probe. Am Gerät (Sonifer 250, Fa. Branson) wurde ein Puls von 50% und eine Intensität der Stufe 2 eingestellt. Nach der Beschallung wurde die Suspension für 30 Minuten bei 4 °C und 25 000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml Puffer 2 resuspendiert. Die Probe wurde erneut beschallt und abzentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde bei -70 °C gelagert.

Die Fällung der VDE erfolgte mit Hilfe von gesättigter Ammoniumsulfatlösung in zwei Schritten. Zuerst wurde eine Ammoniumsulfatkonzentration von 40% eingestellt. Die Zugabe der gesättigten Lösung erfolgte unter Rühren in sehr kleinen Mengen, dabei wurde die Probe im Eiswasserbad gekühlt. War eine Konzentration von 40% erreicht, musste die Probe weitere 20 Minuten rühren. Im Anschluss wurde sie für 30 Minuten bei 4 °C mit 37 000 x g abzentrifugiert. Der farblose Überstand wurde durch weitere Zugabe von Ammoniumsulfat auf 80% gebracht und für 3 Stunden im Eiswasserbad gerührt. Die Lösung wurde für eine Stunde mit 100 000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in wenig Aqua bidest. aufgenommen. Der VDE-Extrakt wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Puffer1:

0.1 M Zitronensäure, NaOH pH 5.2

Puffer2:

5 mM NaCl

1 mM KH₂PO₄

40 mM HEPES, NaOH pH 7.2

300 mM Sorbitol

2.3.3 Aktivitätsbestimmung

9 µM	Violaxanthin
0.25 mM	MGDG (Vio:MGDG = 1:28)
0.1 M	Citratpuffer / pH 5.1
60 µl	Enzymextrakt/ ml
30 mM	Ascorbat

(MGDG = Monogalaktosyldiacylglycerid, der Firma Lipid Products, Redhill, England)

Zuerst wurden Violaxanthin und MGDG gemischt, danach Puffer und Enzymextrakt zugeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ascorbat gestartet.

Probennahme: 0 / 1 / 2 / 4 / 6 / 8 / 10 / 15 / 20 Minuten

Probenvolumen: 150 µl

Die Pigmente wurden in 600 µl Aceton p.A. extrahiert (s. 2.6.1.1) und mittels HPLC quantifiziert (s. 2.6.2.3).

2.4 Isolierung von Pigmenten aus *Pisum sativum* (Chlorophylle nach Booth und Paulsen 1996 und Carotinoide nach Davies 1976)

Zur Pigmentisolierung wurden 10-14 Tage alte Pflanzen verwendet, die in einer Klimakammer bei 20 °C und einem 16 h Licht-/8 h Dunkelrhythmus bei einer Lichtintensität von 120 $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-2}$ angezogen worden waren.

2.4.1 Totalextrakt

Die Blätter der Erbsenpflanzen einer Schale (ca. 45 x 50 cm) wurden geerntet und in 1 Liter Aufschlusspuffer im Warring Blender zerkleinert. Das Homogenisat wurde durch Baumwollgaze filtriert und 3 Minuten bei 4 °C mit 7 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 400 ml Aceton aufgenommen. Die Probe wurde erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Eis gesammelt.

2.4.2 Dioxanfällung

400 ml des acetonischen Überstandes aus der Totalextraktpräparation wurden auf dem Rührer unter Eiskühlung langsam mit 60 ml Dioxan versetzt. Anschließend wurde auf gleiche Weise 127 ml H₂O zugeben. Danach wurde der Rührer ausgeschaltet und die Fällmischung noch 60 Minuten auf Eis stehen gelassen. Die Fällung wurde 10 Minuten bei 4 °C, 10 000 x g zentrifugiert. Der Xanthophyllüberstand wurde dekantiert. Die Pigmente wurden nach Überführung in Ether und Trocknung über Nacht verseift.

Das Chlorophyllpellet wurde in 50 ml Ether aufgenommen und im Schütteltrichter mindestens zweimal mit 100 ml H₂O vorsichtig ausgeschüttelt, die Phasentrennung wurde abgewartet und die annähernd farblosen wässrigen Phasen verworfen. Die Etherphase wurde in einer Schliffflasche zur Abtrennung des Restwassers über Nacht bei -20 °C eingefroren.

2.4.3 Verseifung

100 ml des carotinoidhaltigen Überstand aus der Dioxanfällung wurden in einem 500 ml Scheidetrichter mit 20 ml Ether, 30 ml H₂O und 20 ml 4M NaCl versetzt und vorsichtig geschwenkt. Die Etherphase wurde abgetrennt und kalt und dunkel aufbewahrt. Die wässrige Phase wurde noch mal mit Ether extrahiert und der Vorgang so oft wiederholt, bis die wässrige Phase farblos war. Die Etherphasen wurden vereinigt. Mit dem restlichen Überstand wurde genauso verfahren. Alle Etherphasen wurden vereinigt und mindestens zweimal mit je

75 ml H₂O gewaschen. Die gewaschene Etherphase wurde im Rotationsverdampfer bis zur vollständigen Entfernung des Ethers getrocknet.

Danach wurde die Probe in 50 ml Ethanol p.A. aufgenommen und vorsichtig unter Schwenken mit 5 ml 60% KOH versetzt. Die Probe wurde für 2 Stunden bei 30 °C inkubiert. Nach Abschluss der Verseifung wurden im Scheidetrichter 100 ml Ether und 100 ml 4 M NaCl zugesetzt. Die wässrige Phase wurde abgelassen und mit 50 ml Etherportionen nach extrahiert, bis die Färbung der Etherphase deutlich schwächer war. Umgekehrt wurden die vereinigten Etherphasen solange mit Wasser gewaschen, bis sich die untere Phase nicht mehr grün färbte.

Die Etherphase wurde einrotiert und bis zur weiteren Verwendung unter Stickstoff gelagert oder das Restwasser wurde bei -20 °C ausgefroren.

2.4.4 Präparative Trennung der Xanthophylle auf der RP-Säule

Die getrockneten Carotinoide wurden mit 10 ml 100% Aceton aufgenommen [≤ 3 mg/ml] und unter langsamen Rühren mit 2 ml Wasser versetzt. Anschließend wurde die Probe kurz abzentrifugiert (5 Minuten, 10 000 x g, RT). Der Überstand wurde auf die Säule aufgetragen und mit der 82%-Acetonlösung eluiert. Die einzelnen gelben Banden wurden nach Augenmaß fraktioniert.

Die einzelnen Fraktionen wurden im Scheidetrichter mit 100 ml Wasser in etwa 40 ml Ether überführt. Die Etherphase wurde zweimal mit 100 ml Wasser gewaschen, das Restwasser wurde über Nacht in Schliffflaschen ausgefroren.

2.4.5 Präparative Trennung der Chlorophylle auf der RP-Säule

Von der Gesamtchlorophyllfraktion wurden nach Ausfrieren des Wassers die Eiskristalle auf der vorgekühlten Fritte abfiltriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingetrocknet und sofort in 10 ml 100% Aceton aufgenommen. Die Probe wurde mit Wasser auf 86% Aceton gebracht bei einem Endvolumen von 10 ml [3 mg/ml]. Anschließend wurde die Probe kurz abzentrifugiert (5 Minuten, 10 000 x g, RT). Der Überstand wurde auf die Säule aufgetragen und mit der 86%-Acetonlösung eluiert. Die gelbgrüne Chl b-Bande, eine Zwischenbande und die blaugrüne Chl a-Bande wurden getrennt aufgefangen.

Die einzelnen Fraktionen wurden im Scheidetrichter mit 100 ml Wasser in etwa 40 ml Ether überführt. Die Etherphase wurde zweimal mit 100 ml Wasser gewaschen, das Restwasser wurde über Nacht in Schliffflaschen ausgefroren.

2.5 Rekonstitution rekombinanter Antennenproteine

2.5.1 Minore Antennenproteine

2.5.1.1 Rekonstitution über die Detergenzwechsellmethode (Paulsen et al. 1993)

Für die Rekonstitution von rekombinanten CP24 und CP29-Komplexen wurden 180 µg Protein pro Ansatz verwendet, für CP26 waren es 240 µg. Die entsprechende Menge der Proteinlösung wurde mit H₂O bidest. auf 150 µl aufgefüllt und mit 150 µl Solubilisierungspuffer versetzt. Die Probe wurde für 2 Minuten auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 3 µl 1 M DTT zugesetzt.

Zur Rekonstitution wurde ein Pigmentgemisch aus 300 µg Chlorophyll (a/b=3) und 45 µg Carotinoiden aus den zuvor isolierten Pigmenten (s. Kap. 2.4) hergestellt. Das Chlorophyll/Carotinoid-Verhältnis sowie das Chl a/b-Verhältnis waren in allen Ansätzen identisch. Die Zusammensetzung der Carotinoide wurde je nach Zielsetzung des Experimentes variiert. Die Pigmentmischungen wurden in acetonischer Lösung erstellt und anschließend unter Stickstoff getrocknet. Zur Rekonstitution wurden die Pigmente in 30 µl kaltem Ethanol p.A. resuspendiert.

Die Pigmente wurden der Proteinlösung unter kräftigem Mischen zugesetzt und noch für weitere 30 Sekunden kräftig durchmischt. Die Rekonstitutionsansätze wurden im Anschluss für 5 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Durch Zugabe von 20% Octyl-β-D-glycopyranosid (OG) wurde das Gemisch auf 2% OG gebracht, kräftig durchmischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im nächsten Schritt wurde 2 M KCl bis zu einer Endkonzentration von 200 mM zugeben und die Probe 20 Minuten auf Eis stehen gelassen. Das ausgefallene KDS wurde bei 4 °C für 10 Minuten mit 12 000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur weiteren Aufreinigung auf Ni-Säulen aufgetragen.

Solubilisierungspuffer: 4% LDS
 200 mM Tris / HCl pH 9
 10 mM ε-Aminocapronsäure
 2 mM Benzamidin
 25% Saccharose

2.5.1.2 Aufreinigung über Metallchelatchromatographie

Die Aufreinigung erfolgte über einen 6fachen Histidin-Tag am C-Terminus der rekombinanten Proteine. Der His-Tag war durch die Klonierung der minoren Antennenprotein-Sequenzen ohne Stopcodon in den pET21a-Vektor und die anschließende Überexpression angehängt worden.

Alle Arbeiten an den Ni-Säulen fanden im Kühlraum bei 4 °C unter Schwachlicht statt.

Zur Vorbereitung der Ni-Säulen wurde das Trägermaterial Chelating Sepharose™ Fast Flow, (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) in Kunststoff Säulen der Firma BioRad gefüllt. Nach Ablauf des 20% Ethanol wurde die Säule mit dem 1.2fachen Säulenvolumen (SV) 0.3 M NiCl₂ beladen und mit dem 3fachen SV 50 mM Tris (pH 7.5) gewaschen. Zur Vorbereitung des Probenauftrags wurde die Säule noch mit 1 SV OG-Puffer equilibriert.

Der letzte Überstand aus der Rekonstitution wurde aufgetragen und für 30 Minuten auf der Säule inkubiert. Zur Abtrennung unspezifisch assoziierter Pigmente wurden die gebundenen Komplexe nacheinander mit 0.3 ml OG-Puffer und 0.6 ml TX-Puffer gewaschen. Die Komplexe wurden mit 2 ml Eluat-Puffer eluiert und auf 0.4 M Saccharose-Dichtegradienten aufgetragen (Dichtegradientenzentrifugation s. Kap. 2.2.1.4)

OG-Puffer:	2% (w/v) OG	TX-Puffer :	0.0% Triton X-100
	100 mM Tris / HCl pH 9.0		100 mM Tris / HCl pH 7.5
	12.5% Saccharose		

Eluat-Puffer: 0.05% Triton X-100, 10 mM Tris / HCl pH 7.5, 300 mM Imidazol

2.5.2 Antennenproteine des PSI

Die Rekonstitution der Proteine Lhca1-4 erfolgte in Mainz nach den in Schmid et al. (2002) erläuterten Methoden.

2.6 Extraktion und Quantifizierung von Pigmenten

2.6.1 Extraktion

2.6.1.1 Aceton-Extraktion

Die Proben wurden mit dem vierfachen Volumen 100% Aceton p.A. versetzt und gründlich gemischt. Im Anschluss wurden die Proben für 2 Minuten bei Raumtemperatur mit 10 000 x g in einer Eppifuge (Zentrifuge 5410, Eppendorf) abzentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert (AnotropR 10-Einmalfilter, 0.2 µm, Merck).

2.6.1.2 Butanol Extraktion

100 µl Probe wurden mit 66 µl sec-Butanol versetzt und gründlich gemischt. Das Gemisch wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Zur besseren Phasentrennung wurden anschließend 33 µl 4 M NaCl zugesetzt. Das zweiphasige System wurde zur vollständigen Trennung für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 10 000 x g in einer Eppifuge (Zentrifuge 5410, Eppendorf) abzentrifugiert. Die obere pigmenthaltige Phase wurde abgenommen und filtriert (AnotropR 10-Einmalfilter, 0.2 µm, Merck).

2.6.2 Quantifizierung

2.6.2.1 Chlorophyllbestimmung (nach Arnon, 1949)

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes einer Suspension wurden 10 µl der Probe in 1 ml 80% (v/v) Aceton extrahiert und für zwei Minuten in einer Eppifuge (Zentrifuge 5410, Eppendorf) abzentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden mit 900 µl 80% (v/v) Aceton versetzt und photometrisch bestimmt. Der Chlorophyllgehalt in mg/ml ergab sich aus folgender Berechnung:

$$c = E_{645} \times 20.2 + E_{663} \times 8.02$$

2.6.2.2 Xanthophyllbestimmung

Eine Extinktion der extrahierten Pigmentlösung von 0.24 bei 440 nm in 80% Aceton entspricht näherungsweise einer Konzentration von 1 µg / ml.

2.6.2.3 HPLC- (High Pressure Liquid Chromatography) Analyse

Bei dem hier verwendeten Verfahren wurden die Pigmente über eine „reversed phase“-Säule (Gilmore & Yamamoto, 1991; Färber et al., 1997) getrennt. Die Elution erfolgte dabei mit abnehmender Polarität des Laufmittels, s. Elutionsprogramm.

Das computergesteuerte HPLC-System bestand aus folgenden Komponenten:

Autoamplifier L-7200	Hitachi/Merck
Sample Cooler for L-7200	Peltier/Merck
Pumpe L-7100	Hitachi/Merck
UV/VIS-Detektor L7420	Hitachi/Merck
Interface D-7000	Hitachi/Merck
Lösungsmittelentgaser Gastorr 104	Schambeck
Trennmaterial	LiChrospher 100 RP-18 5 µm
Säule	LiChroCART 250-4 (Merck)
Vorsäule	LiChroCART 4-4 (Merck)

<i>Elutionsprogramm</i>	<i>Zeit in Minuten</i>
100% A	0 – 9
linearer Gradient auf B	9 – 12.5
100% B	12.5 – 18
linearer Gradient auf A	18 – 19
100% A	19 – 23
Flussrate	2 ml/min

Die aufgetrennten Pigmente wurden bei einer Wellenlänge von 440 nm detektiert und anhand ihrer Retentionszeiten identifiziert. Die relativen Pigmentkonzentrationen werden aus den ermittelten Peakflächen mit Hilfe der durch eine Eichung der HPLC erhaltenen Umrechnungsfaktoren berechnet.

<i>Lösungsmittel</i>	<i>Volumenverhältnisse</i>
A: Acetonitril:Methanol:Tris*	87:10:3
B:Methanol: Hexan	4:1

* Tris-Puffer: 0.1 M Tris /HCl pH 8.0 (filtriert, Filter 0.2 µm Porengröße, Schleicher & Schuell)

Pigmente	Retentionszeit [min]*	Umrechnungsfaktoren [Fläche/pmol Pigment]
Neoxanthin	3.2	3434
Violaxanthin	4.2	3832
Antheraxanthin	6.3	3045
Lutein	9.3	3167
Zeaxanthin	10.3	2764
Chlorophyll b	13.3	1227
Chlorophyll a	13.9	1389
β -Carotin	16.8	2852

* Bei den Retentionszeiten handelt es sich um Richtwerte, die bis zu einer Minute um den angegeben Wert schwanken können.

2.7 Elektrophorese

2.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit diskontinuierlichen Gelen (Laemmli, 1970). Die SDS-Polyacrylamidgele bestanden aus einem 13.5%igen Trenngel und einem 5.6%igen Sammelgel. Zum Gießen der Gele und für die spätere Elektrophorese wurde das Mighty Small System (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) genutzt. Die aufgeführten Mengenangaben gelten für 4 Mini-Gele.

Trenngel:	2.5 ml H ₂ O 9.6 g Harnstoff 7.5 ml Trenngelpuffer (1.5 M Tris/ HCl pH 8.8) 0.3 ml 10% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 13.5 ml 30% Acrylamid (Acrylamid 37.5:Bisacrylamid 1) 104 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) 7.8 µl TEMED
Sammelgel:	5.6 ml H ₂ O 2.5 ml Trenngelpuffer (1.5 M Tris/ HCl pH 8.8) 0.1 ml 10% SDS 1.7 ml Acrylamid 0.1 ml APS 5 µl TEMED
Probenpuffer (5fach):	1.6% (w/w) SDS, 1M Harnstoff, 1% (v/v) β-Mercaptoethanol, 50 mM Tris/HCl pH 7.6, 12.5% (w/v) Glycerin, 0.05% (w/v) Bromphenolblau
Elektrodenpuffer:	30 g/l Harnstoff, 3 g/l Tris, 14.4 g/l Glycin, 10 ml/l 10% SDS

Von den Proben wurden pro Geltasche ca. 5 µg Protein aufgetragen. Zum Größenvergleich wurden 8 µg des Sigma-Protein-Standards VII mit aufgetrennt. Der Gellauf wurde mit 50 Volt gestartet und nach 30 Minuten bei 100 Volt fortgesetzt.

2.7.2 Native Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der LHCs unter nativen Bedingungen wurden sogenannte Grüne Gele nach dem Protokoll von Schmid und Schäfer (1994) gegossen. Die Proben aus den Dichtegradienten konnten sofort aufgetragen und unter den gleichen Spannungsbedingungen, wie für die SDS-PAGE beschrieben, aufgetrennt werden. Die Elektrophoreseapparatur wurde zum Schutz der pigmenthaltigen Komplexe während des Laufs auf 4 °C gekühlt und abgedunkelt.

Trenngel (12%):	7.5 ml H ₂ O
	6 ml Tris/HCl (2.12 M, pH 9.1)
	12 ml Acrylamid (30/1)
	150 µl 10% APS
	22.5 µl TEMED
Sammelgel (4%):	5 ml H ₂ O
	2 ml Tris/H ₂ SO ₄ (270 mM, pH 6.1)
	1.35 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30/1)
	150 µl 10% APS
	15 µl TEMED
Laufpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin,
	0.1% Deriphat (nur für Kathodenpuffer)

2.7.3 Coomassie Färbung von Proteingelen

Die Proteingele wurden für mindestens eine Stunde in der Färbelösung inkubiert. Der Hintergrund wurde durch fünfminütiges Aufkochen der gefärbten Gele in H₂O bidest. entfärbt.

Färbelösung: 0.1% (w/v) Coomassie
50% (v/v) Ethanol
10% (v/v) Essigsäure.

2.8 Western Blot Analyse

Mit Hilfe der Western Blot Analyse wurden die minoren Antennenproteine immunologisch nachgewiesen. Für den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran wurde das Semi-Dry-Blot Verfahren verwendet. Bei dieser Methode wurden das Filterpapier und die Nitrocellulosemembran mit Puffer benetzt und der Blotstapel in folgender Weise luftblasenfrei aufgebaut: Anode, 3 x Filterpapier, 1x Nitrocellulosemembran-Gel, 3 x Filterpapier-Kathode. Für den Proteintransfer aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran wurde für 45 Minuten ein Strom von 0.8 mA / cm² Gel angelegt.

Blot-Puffer: 0.84 g/l NaHCO₃
0.32 g/l Na₂CO₃
20% (v/v) Methanol

Die Nitrocellulosemembran wurde im Anschluss an den Western-Blot für 5 Minuten in Ponceaulösung gefärbt, überschüssige Färbelösung konnte mit H₂O demin. abgewaschen werden. Die Banden des Proteinmarkers wurden mit schwarzem Kugelschreiber, zur späteren Zuordnung der Antikörpersignale, markiert.

Ponceau-Lösung: 0.5% Ponceau
1% Essigsäure

Immunologischer Nachweis:

Die freien Bindestellen der Nitrocellulosemembran wurden mit 1% BSA-TBS-Tween/Triton-Lösung über Nacht abgesättigt. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBS-Tween/Triton-Lösung gewaschen. Die nachfolgende Primärantikörper-Inkubation erfolgte für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran wieder dreimal für 10 Minuten mit TBS-Tween/Triton-Lösung gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert. Zum Abschluss wurde die Membran viermal mit TBS-Tween/Triton-Lösung gewaschen.

Die Detektion der Antennenproteine erfolgte mit Hilfe des ECL-ChemolumineszenzKits-Plus (Perkin Elmer, Boston, USA) nach Herstellerangaben.

TBS (Tris buffered saline): 10 mM Tris/HCl pH 7.5
150 mM NaCl
TBS-Tween/Triton: 10 mM Tris/HCl pH 7.5
150 mM NaCl
0.05% Tween
0.2% Triton X-100

- Primärantikörper: synthetische Antikörper gegen die minoren Antennenproteine CP24, 26, 29 aus *Nicotiana tabacum*. Synthetisiert wurden die Oligopeptide von der Firma Genosphere Biotechnologies (Paris, Frankreich), der Antikörper wurde aus Kaninchen isoliert.
1:1000 verdünnt in TBS, versetzt mit 1% BSA (Fraktion V) und 0.02% NaN₃.
- Sekundärantikörper: Meerrettich Peroxidase konjugierter polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Kaninchen IgG (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
1:10 000 verdünnt in TBS, versetzt mit 1% BSA (Fraktion V)

2.9 Spektroskopie

Für die Aufnahme von Fluoreszenzemissions- und Absorptionsspektren wurden die LHCs mit Spektroskopie-Puffer (Crimi et al. 2001) verdünnt [1µg Chl/ml]. Alle spektroskopischen Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Absorptionsspektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 350 nm bis 750 nm aufgenommen (Spektralphotometer DU 640, Beckmann, Fullerton, USA).

Zur Aufnahme der Emissionsspektren wurden die Komplexe bei unterschiedlichen Wellenlängen (400 nm = Chl a, 475 nm = Chl b und 500 nm = Car) angeregt. Die Emissionsspektren wurden von 600 nm bis 750 nm aufgezeichnet. Lumineszenz Spectrometer LS 55 der Firma Perkin Elmer (Shelton, USA).

- Spektroskopie-Puffer: 10 mM HEPES
0.06% β-D-Dodecylmaltosid
20% Glycerin
200 µg/ml Glukose Oxidase
40 µg/ml Katalase

2.10 Deepoxidation

2.10.1 In vivo De-epoxidation

Zur Induktion der De-epoxidation *in vivo* wurden die Blätter von *Lycopersicon esculentum* für eine Stunde bei 20 °C mit 1000 µE (Lichtquelle Hortilux Schröder, Niederlande) belichtet. Im Anschluss an die Belichtung wurden die Blätter sofort in Eiswasser abgekühlt, um die Epoxidation des gebildeten Zeaxanthins zu vermeiden.

2.10.2 In vitro De-epoxidation an LHCs

Für die *in vitro* De-epoxidation wurde soviel der LHCs eingesetzt, dass im endgültigen Ansatz 0.1 nmol Violaxanthin pro ml Ansatz vorhanden war, dabei durfte eine Detergenzkonzentration von 0.002% β-D-Dodecylmaltosid im Ansatz nicht überschritten werden. Die LHCs wurden mit MGDG im Verhältnis Vio/MGDG = 1/28 versetzt, danach wurde der 0.1 M Citratpuffer / NaOH pH 5.1 zugegeben. Die VDE wurde im Verhältnis 1:17 – 1:30, je nach Aktivität des VDE-Extraktes, hinzugefügt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 mM Ascorbat gestartet. Die Reaktionskinetik wurde im abgedunkelten Raum bei 20 °C aufgenommen.

Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen und die Pigmente nach der Butanol-Methode extrahiert.

Probenvolumen: 1 ml

3 Ergebnisse und Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Abhängigkeit der Vx De-epoxidation sowohl in Bezug auf die verschiedenen Antennenproteine als auch den Einfluss der unterschiedlichen Carotinoidbindestellen unter *in vitro* Bedingungen untersucht werden. Aus diesem Grund wurden rekombinante Antennenproteine *in vitro* mit isolierten Pigmenten zu funktionellen Holokomplexen rekonstituiert. So war es möglich, Vx selektiv an die unterschiedlichen Carotinoidbindestellen zu binden und nach Zugabe von VDE die De-epoxidation unter *in vitro* Bedingungen zu überprüfen. Zur Kontrolle der Reaktion an den rekonstituierten Komplexen wurde die *in vitro* De-epoxidation ebenfalls an den nativen Komplexen, soweit sie in ausreichender Menge und Reinheit isoliert werden konnten, durchgeführt. Darüber hinaus wurde die De-epoxidation *in vivo* induziert und die Antennenproteine isoliert, um anschließend die *in vivo* und *in vitro* erzielten Ergebnisse zu vergleichen.

Im Folgenden werden zunächst die Überexpression der Antennenproteine und deren Rekonstitutionsverhalten dargestellt und im Anschluss daran die geernteten Komplexe charakterisiert sowie die De-epoxidationen der verschiedenen LHCs vorgestellt werden. Schließlich werden die gewonnenen Erkenntnisse noch einmal im Gesamtzusammenhang vergleichend diskutiert.

3.1 Minore Antennenproteine des PSII

3.1.1 Überexpression und Rekonstitution

Die minoren Antennenproteine des PSII wurden als unlösliche Proteine (sog. inclusion bodies) in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt. Zur Überexpression wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) und der pET21a-Vektor (Novagen) verwendet, vgl. 2.1.1. Aus 100 ml Flüssigkultur wurden je nach Protein zwischen 3 und 8 mg Protein gewonnen. Das SDS-Gel in Abbildung 8 zeigt die Proben nach dem Zellaufschluss und den anschließenden Detergenzwaschungen. Es ist zu erkennen, dass die überexprimierten Proteine mit dem angewandten Verfahren nicht vollständig aufgereinigt werden konnten. Für den Erfolg der nachfolgenden Rekonstitutionen war dies jedoch unerheblich, da *E. coli* Proteine nicht über Pigment bindende Eigenschaften verfügen und somit die Faltung der Antennenproteine in ihre funktionelle Form nicht behindern sollten.

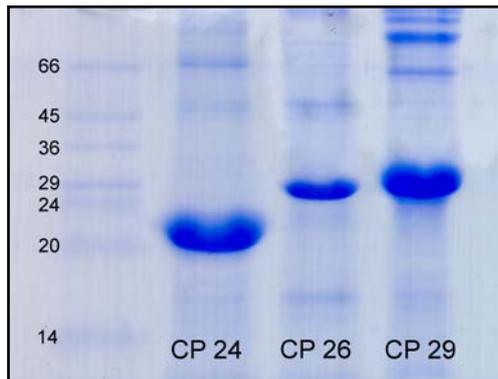


Abbildung 8: SDS-Gel der überexprimierten LHC-Proteine. Aufgetragen wurden von links nach rechts: Sigma Protein Marker VII [kDa] und jeweils 5 µg der heterolog exprimierten Antennenproteine CP24, CP26 und CP29.

Die heterolog exprimierten Proteine wurden nicht nur im SDS-Gel sondern auch im immunologischen Test nachgewiesen. Der Vergleich der Antikörpersignale von Kontrolle und Probe bestätigte, dass es sich bei den überexprimierten Proteinen um die gewünschten minoren Antennenproteine höherer Pflanzen handelt (vgl. Abb. 9). Das z.T. etwas erhöhte Molekulargewicht der rekombinanten Proteine, im Vergleich zu den nativen Antennenproteinen in der Kontrolle, erklärt sich durch den angehängten His-Tag in den überexprimierten Proteinen. Die zusätzlichen Banden, die in Abb. 9 zu erkennen sind, könnten durch Kreuzreaktionen der verunreinigenden *E. coli* Proteine mit dem für die jeweiligen minoren Antennenproteine spezifischen Antikörpern hervorgerufen werden. Es kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um Aggregationen der überexprimierten Proteine handelt, die während der Probenvorbereitung nicht vollständig solubilisiert worden waren.

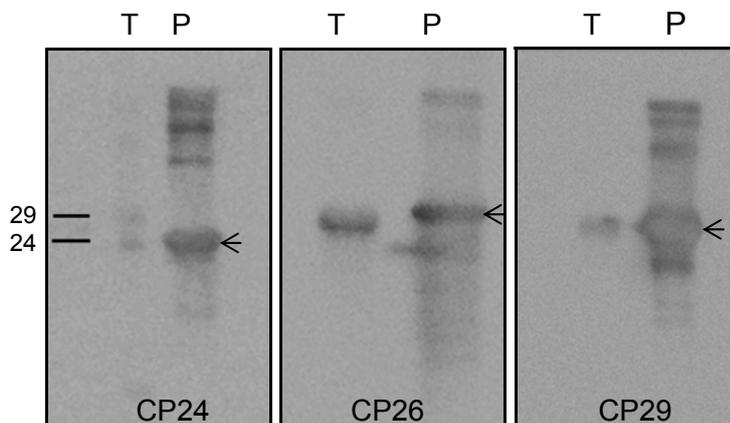


Abbildung 9: Western-Blot Analysen der überexprimierten LHC-Proteine. Aufgetragen wurden Arabidopsis Thylakoide (T) als native Kontrolle der Antikörperreaktion und das jeweils überexprimierte LHC-Protein (P). Abgebildet sind von links nach rechts die Western Blot Analysen von CP24, CP26 und CP29, zusätzlich wurden in der Abb. von CP24 die relevanten Banden des Proteinmarkers markiert kDa].

Die Rekonstitution der rekombinanten Proteine mit den Pigmenten erfolgte nach der Detergenzwechsel Methode (Paulsen et al. 1993). Zur Rekonstitution wurde entweder ein Pigment-Totalextrakt oder ein selektives Pigmentgemisch aus vorher isolierten Pigmenten verwendet, (genaue Rekonstitutionsbedingungen s. Kapitel 2.5.1.1.). Abb. 10 und Abb. 11 zeigen die rekonstituierten Komplexe nach der Dichtegradientenzentrifugation, bzw. im nativen Gel. Die Gradienten zeigen deutlich, dass sich die Proteine unterschiedlich gut rekonstituieren ließen, wobei die Ausbeute (in µg Chl pro ml geerntetem LHC) bei CP24 am

größten und bei CP26 am geringsten war. Die rekonstituierten Komplexe liefen im Dichtegradienten als eine distinkte Bande. Die Probe enthielt nach der Reinigung über die Ni-Säule kaum noch ungebundene Pigmente, die im Gradienten als obere sog. freie Pigmentbande zu erkennen gewesen wären.

CP24 CP24 CP26 CP26 CP29 CP29

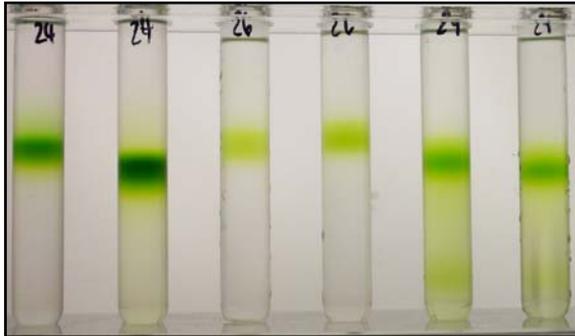


Abbildung 10: Dichtegradienten der rekonstituierten Komplexe CP24, CP26 und CP29

Im nativen Gel zerfiel ein kleiner Teil der Komplexe trotz der sehr milden Detergenzbedingungen, wodurch freie Pigmente sichtbar wurden (Abb. 11). Dasselbe Gel nach der Coomassie Färbung zeigt, dass die Verunreinigungen durch *E.coli* Proteine nach der Dichtegradientenzentrifugation fast vollständig aus den Pigment-Protein-Komplexen entfernt waren (Abb. 11).

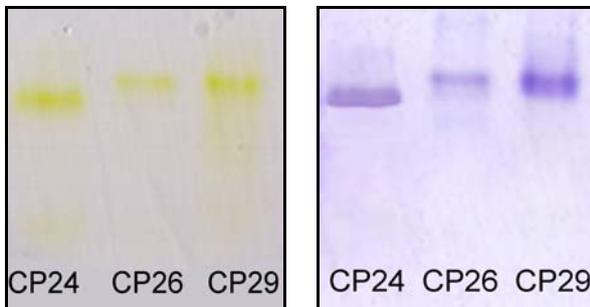


Abbildung 11: Natives Gel der LHC-Monomer-Banden aus den Dichtegradienten links: nach der Elektrophorese, rechts: gleiches Gel Coomassie gefärbt

3.1.2 Charakterisierung und De-epoxidation der minoren Antennenproteine

3.1.2.1 Charakterisierung der rekonstituierten CP24-Komplexe

Die aus den Dichtegradienten entnommenen rekonstituierten Komplexe wurden anhand ihrer Pigmentstöchiometrien sowie der Fluoreszenzemissions- und Absorptionsspektren charakterisiert.

a) Pigmentanalysen

	Chl a/b	Chl/Car	Car/10 Chl	Nx/10 Chl	Vx/10 Chl	Lut/10 Chl
CP24-LV	1.09 ± 0.04	6.08 ± 0.19	1.64 ± 0.05	—	0.84 ± 0.09	0.81 ± 0.05
CP24-Vx	1.09 ± 0.03	6.58 ± 0.10	1.52 ± 0.02	—	1.52 ± 0.02	—

Tabelle 2: HPLC Pigmentanalysen der rekonstituierten Komplexe nach der Dichtegradientenzentrifugation. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte ± SD aus 4 (CP24-LV), bzw. 3 (CP24-VX) Rekonstitutionen.

Tabelle 2 zeigt die HPLC-Analysen für die rekonstituierten CP24-Komplexe. Der Carotinoidgehalt wurde auf 10 Chl normiert, was der Menge an Chl pro Monomer entspricht (Pagano et al. 1998). Demnach wurden bei der Rekonstitution mit Lut und Vx 1.64 Car pro Monomer an den sog. **CP24-LV-Komplexen** gebunden, wobei Lut und Vx in annähernd gleichen Mengen vertreten waren. Das Chl a/b-Verhältnis lag in den **CP24-LV-Komplexen** bei 1.09. Im Vergleich zu den CP24-LV-Komplexen wurde in den Ansätzen mit Vx als einzigem Carotinoid die Carotinoidmenge auf 1.52 pro Monomer reduziert, das Chl a/b-Verhältnis änderte sich jedoch nicht. Offensichtlich konnte Lut in den **CP24-Vx-Komplexen** fast vollständig durch Vx ersetzt werden.

Die Pigmentstöchiometrien der rekonstituierten CP24-Komplexe von *Nicotiana tabacum* entsprachen in ihrem Chl a/b- und Lut/Vx-Verhältnis den aus der Literatur bekannten rekonstituierten (Pagano et al. 1998) und nativen CP24-Komplexen von *Zea mays* (Moya et al. 2001). Die Anzahl der gebundenen Carotinoide war mit 1.52 im CP24-Vx-Komplex sowie 1.64 im CP24-LV-Komplex pro 10 Chl dagegen deutlich geringer, als in den Komplexen von *Zea mays*, bei denen zwei Carotinoide detektiert worden waren.

Das rekombinante Lhcb6-Protein bindet auch bei Rekonstitutionen mit einem Pigmenttotal-extrakt, der alle in der Thylakoidmembran vertretenen Pigmente enthält, kein Nx. Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet Rekonstitutionen mit Nx im Pigmentgemisch durchzuführen. Der Ausschluss von Nx am CP24-Komplex von *Nicotiana tabacum* steht im Einklang mit der Pigmentbindung an CP24-Komplexen von *Zea mays* (Pagano et al. 1998, Moya et al. 2001).

b) Spektroskopische Charakterisierung

Anhand von Fluoreszenzemissionsspektren der rekonstituierten Komplexe lässt sich die funktionelle Kopplung der Pigmente untersuchen. Unabhängig von der Anregungswellenlänge sollte die absorbierte Energie auf Chlorophyll a übertragen und von dort emittiert werden, was ein Emissionsmaximum bei 680 nm zur Folge hätte. Bei Anregung der Chl b Moleküle in den rekonstituierten CP24-Komplexen mit 475 nm wurde zusätzlich eine deutliche Schulter bei 660 nm detektiert, die von einem Teil direkt emittierter Energie herrührte (Abb. 12). Eine leichte Schulter bei 660 nm wurde auch nach Anregung der Carotinoide (500 nm) und Chl a Moleküle (440 nm) gemessen (Abb. 12). Die Anregung der Carotinoide bewirkte eine zusätzliche Schulter bei 710 nm, die nach Anregung der Chlorophylle nicht zu beobachten war (Abb. 12). Die Fluoreszenzemissionsspektren zeigten deutlich, dass die in dieser Arbeit rekonstituierten CP24-Komplexe nur über eine ungenügende Koordinierung der Pigmente verfügten, so dass der Energietransfer gestört war. Eine direkte Chl b Emission wurde von Frank et al. (2001) auf Veränderungen in der Carotinoidzusammensetzung im Antennenkomplex zurückgeführt. Die Pigmentanalysen, s. Tabelle 2, ergaben nur 1.64, bzw. 1.52 Car pro Monomer im Vergleich zu 2 Car pro Monomer in den Komplexen von *Zea mays*. Somit könnte die reduzierte Carotinoidbindung mit der direkten Chl b Emission in den Fluoreszenzemissionsspektren zusammenhängen.

Die Absorptionsspektren von CP24-LV und CP24-Vx zeigten in der Soret-Region eine Doppelspitze bei 440 (bzw. 441) und 466 nm mit einer Schulter bei 418 nm (Abb. 12). Das Absorptionsmaximum im langwelligen Bereich lag bei 670 nm und besaß eine Schulter bei 652 nm. Im Bereich zwischen 540 und 630 nm waren noch weitere Absorptionen zu erkennen, allerdings mit geringer Amplitude (Abb. 12). Für rekonstituierte CP24-Komplexe von *Zea mays* wurde ein Absorptionsmaximum in der Q_y-Region bei 675 nm beschrieben (Pagano et al. 1998). Frühere Studien an rekonstituierten CP29-Komplexen konnten zeigen, dass das Entfernen überschüssiger Pigmente aus den rekonstituierten Komplexen eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in den längerwelligen Bereich zur Folge hatte (Giffra et al. 1996). Eine weitere Reinigung der in dieser Arbeit rekonstituierten Komplexe hätte denselben Effekt erzielen können, jedoch schien der Anteil an freien Pigmenten in den Komplex-Banden eher gering zu sein (vgl. Abb. 10), so dass darauf verzichtet wurde. Aufgrund der spektroskopischen Charakterisierung der rekonstituierten CP24-Komplexe lässt sich vermuten, dass ein Teil der, mit den Komplexen assoziierten, Chlorophylle nicht richtig koordiniert wurde. Dies könnte den gestörten Energietransfer und Änderungen im Absorptionsspektrum erklären. Alternativ ist die zusätzliche Bindung von Chlorophyllen denkbar. Dies könnte eine vergleichbare Änderung in den Spektren bewirken und auch das erhöhte Chl/Car-Verhältnis im Vergleich zu den Pigmentstöchiometrien von *Zea mays* (Pagano et al. 1998, Moya et al. 2001) erklären. Allerdings müssten Chl a und b Moleküle in gleicher Weise

beeinflusst werden, da das gemessene Chl a/b-Verhältnis den publizierten Daten entspricht und in allen Rekonstitutionen reproduzierbar war. Eine verminderte Bindung der Carotinoide scheint daher wahrscheinlicher.

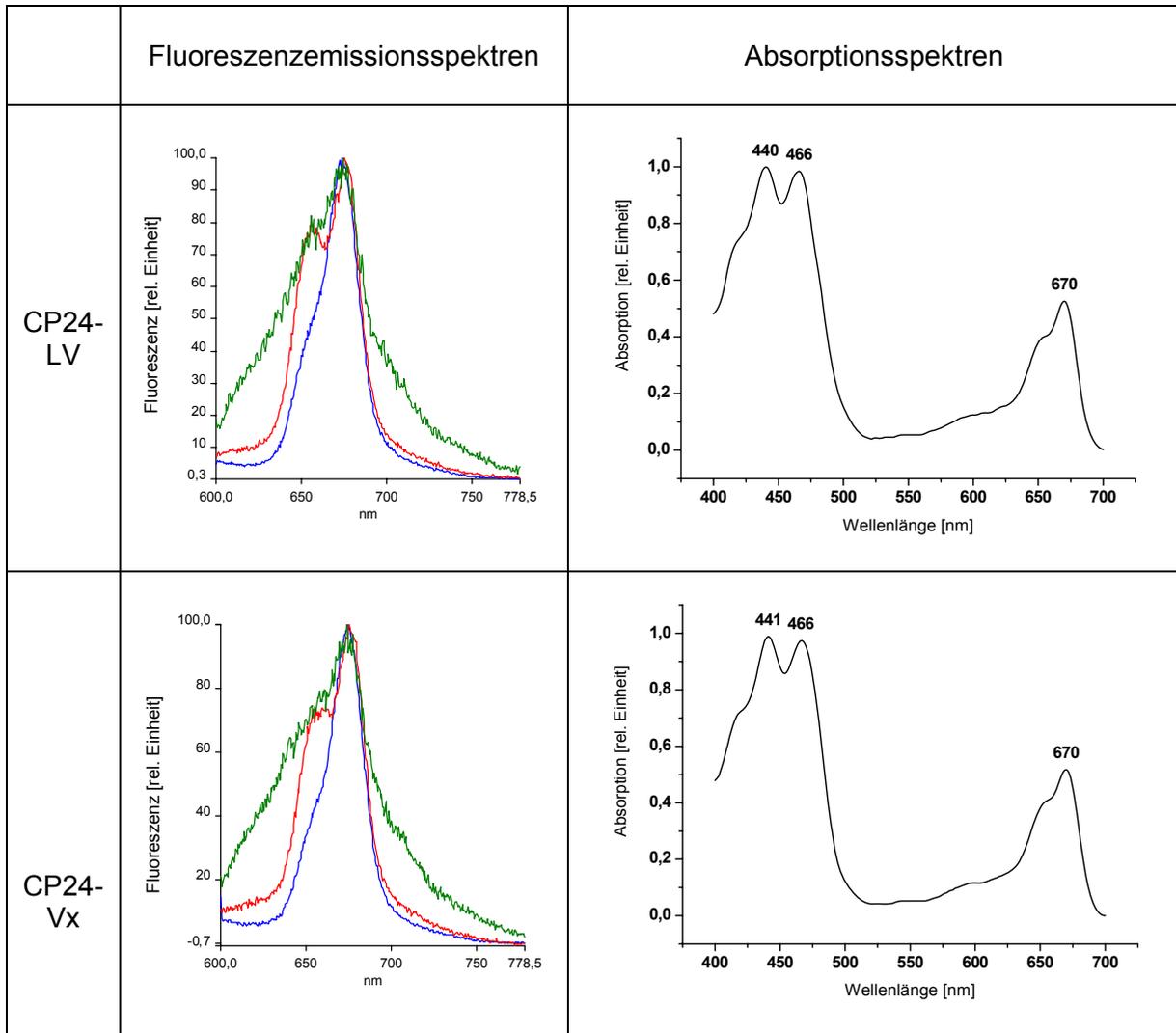


Abbildung 12: Dargestellt sind die Fluoreszenzemissions- und Absorptionsspektren von CP24-LV und CP24-VX. Zur Spektroskopie wurden die Proben entsprechend 1 µg Chl in Spektroskopiepuffer (vgl. Kap. 2.9) aufgenommen und vermessen. Fluoreszenzemissionsspektren: blau = Anregung bei 440 nm, rot = Anregung bei 475 nm, grün = Anregung bei 500 nm. Die Normierung der Fluoreszenzemissionsspektren erfolgte auf 100 im Maximum, die Absorptionsspektren wurden auf 1,0 im Maximum normiert.

3.1.2.2 Belegung der Carotinoidbindestellen in den rekonstituierten CP24-Komplexen

Native CP24-Komplexe binden zwei Carotinoide, Lut und Vx, die zu gleichen Teilen im Monomer vertreten sind. Es wurde postuliert, dass die Carotinoide am CP24 an die L1- und L2-Bindestelle gebunden werden (Morosinotto et al. 2003). Unter nativen Bedingungen erwartet man, dass Lut aufgrund seiner hohen Affinität zu dieser Bindestelle (Hobe et al. 2000, Croce et al. 1999a, Formaggio et al. 2001) an L1 gebunden wird. Die L2-Bindestelle wäre demnach mit Vx belegt. Für die L2-Bindestelle wurden, abhängig vom LHC-Protein, sowohl Lut, Vx und Nx als Liganden mit unterschiedlichen Affinitäten beschrieben (Ruban et al. 1999, Morosinotto et al. 2003). Die in dieser Arbeit rekonstituierten Komplexe CP24-LV und CP24-Vx enthielten nur 1.65, bzw. 1.52 Carotinoide pro 10 Chl. Theoretisch waren somit nur in jedem zweiten Komplex zwei Carotinoide vertreten. Bei gleicher stöchiometrischer Verteilung von Lut und Vx auf die Komplexe ist anzunehmen, dass die Komplexe mit zwei Carotinoiden Lut an L1 und Vx an L2 gebunden hatten. In den Komplexen mit nur einem Carotinoid wurde entweder Lut oder Vx an die L1-Bindestelle gebunden. In den CP24-Vx Rekonstitutionen konnte das fehlende Lut an der L1-Bindestelle durch Vx ersetzt werden (vgl. Tab. 3).

CP24-LV	50%	25%	25%
L1	Lut	Lut	Vx
L2	Vx	—	—

CP24-Vx	50%	50%
L1	Vx	Vx
L2	Vx	—

Tabelle 3: Theoretische Verteilung der Carotinoide auf die Bindestellen in den CP24-Komplexen. Nur grün markiertes Vx sollte für die De-epoxidation zugänglich sein, rot markiertes Vx dagegen nicht. Die Prozentangaben in der Tabelle entsprechen dem Vorkommen der jeweiligen Komplexvariante in der rekonstituierten Probe.

Folgt man dieser Hypothese wären in den CP24-LV-Komplexen 66% des vorhandenen Vx an der L2-Bindestelle gebunden und 33% an L1 in den Komplexen mit nur einem Carotinoid. Für CP24-Vx wären es je 66% an L1 und 33% an L2 (vgl. Tab. 3). Voran gegangene *in vitro* Studien an rekonstituierten Lhcb1-Komplexen konnten zeigen, dass Vx, gebunden an der L2-Bindestelle, de-epoxidierbar ist (vgl. Kap. 1.5, Jahns et al. 2001). An der L1-Bindestelle besitzt Vx jedoch stabilisierende Funktionen, so dass ein Herauslösen des Carotinoids den Zerfall des Komplexes zur Folge hätte (Plumley und Schmidt 1987, Paulsen et al. 1990, Formaggio et al. 2001). Vx an der L1-Bindestelle ist somit erst nach Zerfall des Komplexes für die De-epoxidation zugänglich. Theoretisch wären demnach an intakten CP24-LV-Komplexen 66% und am CP24-Vx 33% des vorhandenen Vx de-epoxidierbar.

3.1.2.3 *In vitro* De-epoxidation an rekonstituierten CP24-Komplexen

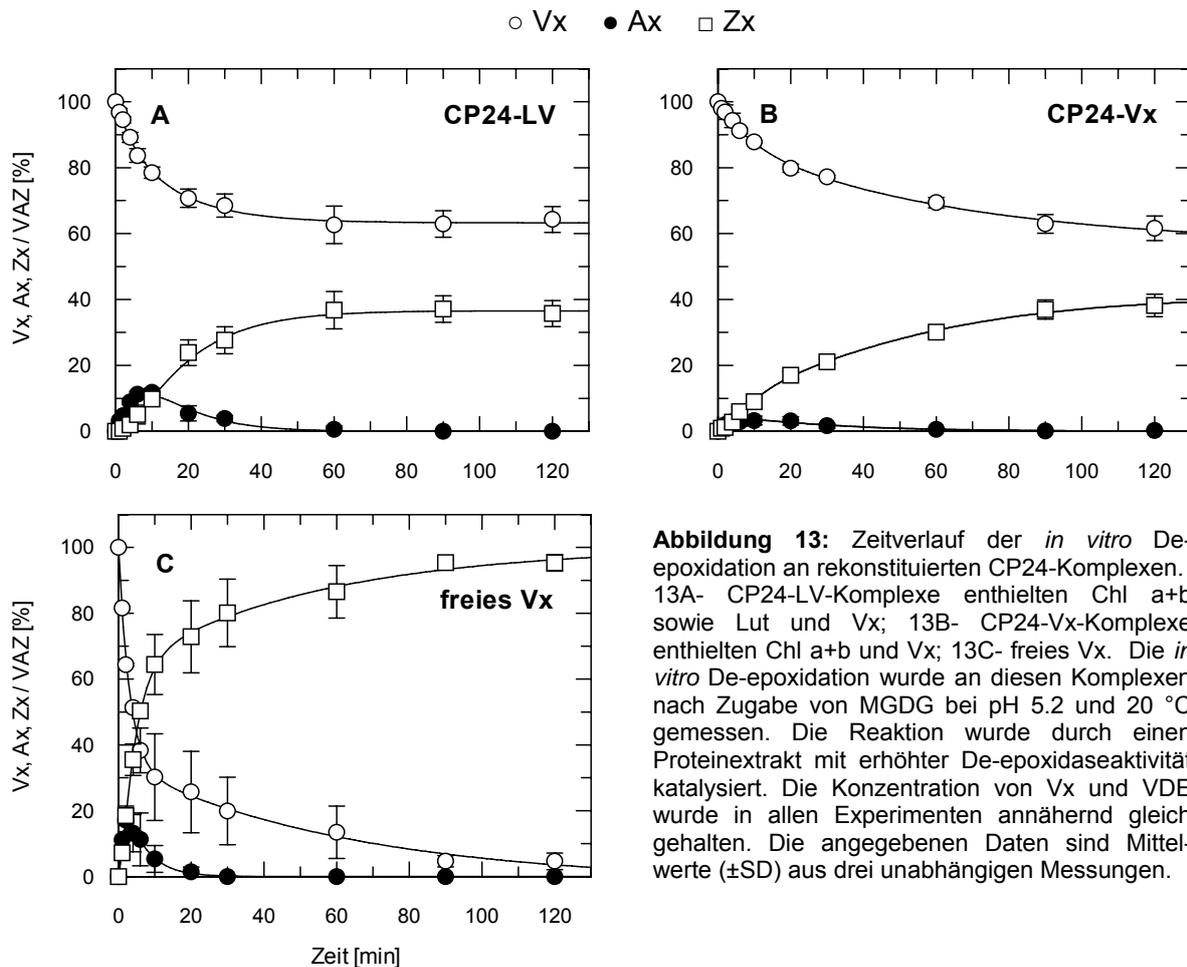


Abbildung 13: Zeitverlauf der *in vitro* De-epoxidation an rekonstituierten CP24-Komplexen. 13A- CP24-LV-Komplexe enthielten Chl a+b sowie Lut und Vx; 13B- CP24-Vx-Komplexe enthielten Chl a+b und Vx; 13C- freies Vx. Die *in vitro* De-epoxidation wurde an diesen Komplexen nach Zugabe von MGDG bei pH 5.2 und 20 °C gemessen. Die Reaktion wurde durch einen Proteinextrakt mit erhöhter De-epoxidaseaktivität katalysiert. Die Konzentration von Vx und VDE wurde in allen Experimenten annähernd gleich gehalten. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte (±SD) aus drei unabhängigen Messungen.

Der Verlauf der *in vitro* De-epoxidation an den rekonstituierten CP24-Komplexen ist in Abb. 13 dargestellt. Die Kontrolle mit nicht proteingebundenem Vx als Substrat zeigte eine schnelle und vollständige Umsetzung des Vx zu Zx. Bereits nach 5 Minuten war etwa die Hälfte des freien Vx zu Zx umgesetzt (Abb. 13C). Diese Beobachtung steht im Einklang mit früheren Untersuchungen unter ähnlichen Reaktionsbedingungen (Jahns et al. 2001, vgl. Abb. 7A). Am **CP24-LV-Komplex** (Abb. 13A) konnten knapp 40% des gebundenen Vx umgesetzt werden, wobei die Kinetik dem Reaktionslauf des freien Vx stark ähnelte. So waren nach etwa 7 Minuten am CP24-LV-Komplex schon 50% des zugänglichen Vx umgesetzt worden. Bei der Überlegungen zur Verteilung des Vx auf die Carotinoidbindestellen wurden 66% als de-epoxidierbares Vx an L2 und nur 33% als nicht zugänglich an der L1-Bindestelle vermutet. Der Reaktionsverlauf zeigte jedoch eindeutig, dass ein größerer Teil als theoretisch angenommen von der De-epoxidation ausgeschlossen war. Demzufolge war in den CP24-LV-Komplexen Vx an L2 im Gegensatz zu den Beobachtungen am Lhcb1-Komplex (Jahns et al. 2001) nicht vollständig zugänglich.

Im **CP24-Vx-Komplex** war Vx als einziges Carotinoid gebunden. In diesem Fall war die De-epoxidation um etwa den Faktor 3 im Vergleich zur Reaktion mit freiem Vx verlangsamt (vgl. Abb. 13B). Die Kinetik ist vergleichbar mit der De-epoxidation des L2-gebundenen Vx am Lhcb1 (Jahns et al. 2001, vgl. Abb. 7C). Nach zwei Stunden waren am CP24-Vx-Komplex knapp 40% des gesamten Vx umgesetzt, obwohl die Reaktion zu diesem Zeitpunkt noch nicht eindeutig gesättigt schien. Der Umsatz von 40% entspricht näherungsweise dem theoretischen Erwartungswert. Beim Vergleich der De-epoxidationen an CP24-LV und CP24-Vx fällt auf, dass sich das an L2 postulierte Vx unterschiedlich gut umsetzen lässt. In den Komplexen mit Lut erfolgt die De-epoxidation zwar schnell, ist jedoch auf einen Teil des Vx begrenzt. In den Komplexen ohne Lut wurde eine langsame Reaktion beobachtet, in der das an L2 vermutete Vx vollständig umgesetzt wurde. Es kann spekuliert werden, dass die Bindung von Lut an L1 die Verfügbarkeit von Vx an L2 beeinflusst. Hierdurch wäre die Limitierung der De-epoxidation in den CP24-LV-Komplexen zu erklären. Bei der Deutung der De-epoxidationsergebnisse muss jedoch bedacht werden, dass die Rekonstitutionen der CP24-Apoproteine zu Komplexen führte, die nur über einen gestörten Energietransfer verfügten (vgl. Abb. 12). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass sich die Schwierigkeiten bei der Rekonstitution der Komplexe auch auf die De-epoxidation des gebundenen Vx auswirken. So könnte der in den CP24-LV Proben schnell de-epoxidierbare Teil des Vx fehlerhaft an die Komplex koordiniert worden sein, wodurch eine bessere Verfügbarkeit denkbar wäre.

Parallel zur Kinetik der De-epoxidationsreaktionen wurde untersucht, inwieweit das gebildete Zx wieder an die Komplexe zurückgebunden wurde. Hierzu wurden Versuche mit und ohne Zusatz von VDE durchgeführt. Nach Ablauf der zweistündigen De-epoxidation wurden die Proben aufkonzentriert und erneut über einen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Durch die Gradienten konnte zusätzlich die Stabilität der rekonstituierten Komplexe während der zweistündigen Inkubationszeit überprüft werden. Die Bildung einer freien Pigmentbande und Veränderungen in den Pigmentstöchiometrien sind Anzeichen für die Instabilität der Komplexe. Die Pigmentanalysen der resultierenden freien Pigment-, bzw. Monomer-Banden sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Auch ohne Einwirkung des Enzyms wurden bei beiden Komplex-Typen 30% der Gesamt-Pigmente in der freien Pigmentbande gefunden. Die unterschiedliche Carotinoid-Ausstattung beeinflusste somit die Stabilität der CP24-Komplexe nicht. Wie zuvor anhand der Spektren (Abb. 12) bereits vermutet, scheint der reduzierte Carotinoidgehalt sowohl CP24-LV als auch CP24-Vx zu destabilisieren. Die freie Pigmentbande zeichnete sich für beide Komplex-Typen im Vergleich zu den jeweiligen Monomer-Banden durch ein erhöhtes Chl a/b- und Car/Chl-Verhältnis sowie die höchsten DEPS aus. Diese Beobachtungen zeigen, dass speziell Chl a

Moleküle und Carotinoide, insbesondere Zx in den Proben mit VDE-Zusatz, im Laufe des Experimentes aus den Komplexen herausgelöst wurden.

Probe	Chl a/b	Chl/Car	Car/10 Chl	Lut/10 Chl	Vx/10 Chl	Ax/10 Chl	Zx/10 Chl	VAZ/10 Chl	DEPS	Vol. [%]	
CP24-LV	epoxidiert	1.09	6.08	1.64	0.81	0.83	—	—	0.83	0.00	—
	FP - VDE	1.62	5.62	1.78	0.85	0.93	0.00	0.00	0.93	0.00	30
	de-epoxidiert - VDE	0.99	6.45	1.55	0.74	0.81	0.00	0.00	0.81	0.00	70
	FP + VDE	1.73	5.31	1.87	0.92	0.53	0.01	0.41	0.95	0.43	30
	de-epoxidiert + VDE	1.04	6.24	1.60	0.76	0.70	0.00	0.14	0.84	0.17	70
CP24-Vx	epoxidiert	1.09	6.58	1.52	—	1.52	—	—	1.52	0.00	—
	FP - VDE	1.70	6.95	1.44	—	1.44	0.00	0.00	1.44	0.00	30
	de-epoxidiert - VDE	1.04	8.29	1.21	—	1.21	0.00	0.00	1.21	0.00	70
	FP + VDE	1.48	8.14	1.23	—	1.07	0.00	0.16	1.23	0.13	30
	de-epoxidiert + VDE	1.10	8.53	1.17	—	1.10	0.00	0.07	1.17	0.06	70

Tabelle 4: Pigmentanalysen der jeweiligen CP24-Monomerbanden, bzw. freien Pigmentbanden, vor und nach der De-epoxidation. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die Standardabweichungen betragen nicht mehr als 15% des jeweiligen Wertes. Die erneute Aufreinigung der de-epoxidierten Komplexe durch Dichtegradientenzentrifugation ergab Banden von sehr geringer Intensität, weshalb eine genaue Volumen Bestimmung nicht möglich war. Um trotzdem Angaben zur relativen Verteilung der Pigmente machen zu können, wurden die Volumina der einzelnen Banden geschätzt.

Für die Monomere lässt sich festhalten, dass auch ohne Enzymwirkung allein durch die zweistündige Inkubationszeit der Carotinoidgehalt im Verhältnis zu den Chl reduziert wurde. Das Chl a/b-Verhältnis blieb dagegen annähernd stabil. Auffällig ist, dass in den CP24-LV-Komplexen der Lut-Gehalt, obwohl Lut an der stabilisierenden L1-Bindestelle vermutet wird, stärker reduziert wurde als der des VAZ-Pools, was ebenfalls für die Instabilität der Komplexe spricht. Die Pigmentanalyse der de-epoxidierten Monomer-Banden zeigte, dass Zx an beide Komplex-Typen rückgebunden wurde. Der DEPS der de-epoxidierten CP24-LV-Komplexe war mit 0.17 allerdings deutlich geringer, als der theoretisch mögliche von 0.66 und lag auch noch weit unter dem des Gesamtextraktes der Kinetik (DEPS nach 120 Min: 0.36). Da der Carotinoidgehalt pro Komplex nicht wesentlich reduziert wurde, ist davon auszugehen, dass weniger als 20% des komplexgebundenen VAZ-Pools für das Enzym zugänglich waren. Die restliche De-epoxidation, die *in vitro* gemessen werden konnte, fand demnach an Vx aus zerfallenen Komplexen statt.

An den CP24-Vx Komplexen wurde ein DEPS von 0.06 gemessen, ebenfalls weniger als theoretisch erwartet (0.33) und in dem Gesamtextrakt der Kinetik gemessen wurde (0.38). Zusätzlich zeigte die Pigmentanalyse der erneut aufgereinigten CP24-Vx Komplexe die Reduktion des Carotinoidgehaltes auf 1.2 pro Monomer. Theoretisch verfügte somit nur noch jeder fünfte Komplex über 2 Carotinoide. Der sehr hohe Vx-Gehalt in der freien Pigmentbande lässt dabei vermuten, dass ein Großteil des Vx erst nach Abschluss der De-epoxidationsexperimente, während der erneuten Auftrennung der Proben, aus dem Komplex herausgelöst wurde. Wäre das Vx schon während der De-epoxidation freigesetzt worden, hätte es wie freies Vx (Abb. 13 C) vollständig zu Zx umgesetzt werden müssen.

Obwohl sowohl die Pigmentstöchiometrien als auch das Volumen der freien Pigment- und der Monomer-Bande bestimmt wurden, entspricht die Summe der Pigmente aus den beiden Banden nicht den Pigmentverhältnissen aus dem Gesamtextrakt der Kinetik. Diese Abweichungen wurden durch den Versuchsablauf bedingt. Die starke Verdünnung während der De-epoxidation, das anschließende Aufkonzentrieren und die letztliche Dichtegradientenzentrifugation führen gerade bei labilen Komplexen wie dem rekonstituierten CP24 zu unvermeidbaren Fehlerquellen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sowohl das freie als auch das komplexgebundene Vx in gleicher Weise betroffen waren und somit der grundlegende Charakter der De-epoxidation an den CP24-Komplexen in den Versuchen erhalten blieb.

Zusammenfassend lässt sich für die De-epoxidation an CP24-Komplexen feststellen, dass vor allem an den CP24-LV-Komplexen, welche die natürliche Pigmentbindung widerspiegeln, weniger als die Hälfte des an L2 vermuteten Vx zu Zx umgesetzt werden konnte. Somit scheint der Anteil der CP24-Komplexe an der Gesamt-De-epoxidation eher begrenzt zu sein.

3.1.2.4 Charakterisierung der rekonstituierten CP26-Komplexe

a) Pigmentanalysen

Die Pigmentanalysen der CP26-Komplexe sind in Tabelle 5 dargestellt. Der Carotinoidgehalt wurde auf 9 Chl normiert, was der Menge an Chl pro CP26 Monomer entspricht (Croce et al. 2002).

	Chl a/b	Chl/Car	Car/9 Chl	Nx/9 Chl	Vx/9 Chl	Lut/9 Chl
CP26-LVN	2.51 ± 0.27	4.01 ± 0.09	2.25 ± 0.05	0.73 ± 0.04	0.23 ± 0.04	1.28 ± 0.05
CP26-LV	1.98 ± 0.15	4.74 ± 0.21	1.90 ± 0.09	—	0.37 ± 0.06	1.53 ± 0.08
CP26-NV	1.75 ± 0.12	3.92 ± 0.20	2.30 ± 0.12	0.99 ± 0.10	1.31 ± 0.02	—

Tabelle 5: Pigmentanalysen der rekonstituierten Komplexe nach der Dichtegradientenzentrifugation. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte ± SD aus 6-12 Rekonstitutionen.

Die Analysen ergaben für die *in vitro* rekonstituierten **CP26-LVN-Komplexe** von *Nicotiana tabacum* ein Chl a/b-Verhältnis von 2.51 und ein Car/Chl-Verhältnis von 2.25. Diese Werte sind höher als die zuvor publizierten Daten für *in vitro* rekonstituierte CP26-Komplexe von *Zea mays* (Frank et al. 2001, Croce et al. 2002a). Allerdings glichen die rekonstituierten Komplexe von *Nicotiana tabacum* in ihren Stöchiometrien den nativen CP26-Komplexen anderer Spezies und Präparationen (Peter und Thornber 1991, Bassi et al. 1993, Ruban et al. 1994 & 1999, Moya et al. 2001, Croce et al. 2002a, Das et al. 2002). Innerhalb der verschiedenen Publikationen schwanken darüber hinaus die Angaben zur Bindung der verschiedenen Carotinoide. In der vorliegenden Arbeit konnten an die rekonstituierten **CP26-LVN-Komplexe** 1.28 Lut, 0.73 Nx und 0.23 Vx pro Monomer gebunden werden. In ähnlichem Verhältnis wurden die Carotinoide an nativen und rekonstituierten CP26-Komplexen von *Zea mays* (Bassi et al. 1993, Croce et al. 2002a) und nativen CP26-Komplexen von *Hordeum vulgare* (Peter und Thornber 1991) detektiert. Im Gegensatz dazu stehen Isolationen nativer Komplexe, bei denen gleich viel Vx und Nx gefunden wurden (Ruban et al. 1994 & 1999, Frank et al. 2001, Moya et al. 2001, Das et al. 2002).

Die Tabelle zeigt eindeutig, dass durch die Variation der Carotinoidezusammensetzung im Rekonstitutionsansatz die gesamte Pigmentbindung in den CP26-Komplexen verändert wurde. So wurde an den **CP26-LV-Komplexen**, denen Nx fehlte, das Chl a/b- und das Car/Chl-Verhältnis, verglichen mit den CP26-LVN-Komplexen, deutlich reduziert (Chl a/b = 1.98 zu 2.51; Car/Chl = 1.90 zu 2.25). Die Reduktion des Nx-Gehaltes wurde somit nur zum Teil durch einen erhöhten Einbau von Lut und Vx kompensiert. Aufgrund der Stöchiometrien im Rekonstitutionsansatz hätte man, bei gleicher Affinität der Pigmente zu den Carotinoid-Bindestellen, einen Ausgleich durch Vx oder Lut erwartet. Es ist allerdings bekannt, dass Lut

am Lhcb1 keine Affinität zur N1-Bindestelle besitzt (Hobe et al. 2000). Demzufolge standen zur Bindung des Lut unabhängig vom Pigmentangebot nur die L1- und L2-Bindestelle zur Verfügung, an der N1-Bindestelle wäre Nx demnach nur durch Vx zu ersetzen. Der Gehalt des Vx blieb jedoch auf 0.37 pro CP26-LV Monomer beschränkt und war damit nur halb so groß wie der Nx-Anteil im CP26-LVN-Komplex (0.73). Dies lässt vermuten, dass auch Vx nicht an die N1-Bindestelle der CP26-Komplexe binden konnte. Die Bedeutung des Nx für die Rekonstitution des CP26-Komplexes wurde schon von Ros et al. (1998) beschrieben. Es wurde beobachtet, dass Rekonstitutionen mit nur einem Carotinoid oder Mischungen aus Lut und Vx nur 40-50% der Ausbeute erreichten im Vergleich zu Rekonstitutionen mit vollständigem Carotinoidangebot. 80-90% der Ausbeute ergaben dagegen Ansätze mit Carotinoidmischungen aus Nx und Lut oder Nx und Vx. Offensichtlich besitzt Nx eine essentielle Funktion für die Stabilität von CP26. Die gesteigerte Stabilität von Nx-haltigen CP26-Komplexen gegenüber erhöhten Temperaturen konnte von Croce et al. (2002a) festgestellt werden.

Das Chl a/b-Verhältnis wurde in den **CP26-NV-Komplexen** im Vergleich zu den LVN-Komplexen noch stärker reduziert (1.75, respektive 2.51), als es zuvor für die LV-Komplexe beobachtet worden war. Der Carotinoidgehalt glich jedoch dem der CP26-LVN-Komplexe. Vx scheint hier das fehlende Lut als Hauptcarotinoid im Komplex zu ersetzen. Nx konnte in ähnlichem Verhältnis, wie im CP26-LVN-Komplex, mit annähernd einem Nx/Monomer gebunden werden (0.99 CP26-NV und 0.73 CP26-LVN).

Anhand dieser Beobachtungen können zwei konträre Vermutungen angestellt werden: 1. Nx besitzt im CP26-Komplex eine viel höhere Affinität zur L2-Bindestelle als Vx oder 2. bei der Bindestelle des Nx im CP26-Komplex handelt es sich um eine spezifische Nx-Bindestelle, die für Lut und Vx nicht zugänglich ist. Beide Hypothesen wurden auch schon von Croce et al. (2002a) aufgestellt, die vergleichbare Beobachtungen machten: Gesteigerter Carotinoidgehalt und erhöhte Stabilität der Komplexe bei Nx-Bindung. Die zweite These ist jedoch zu bevorzugen, da eine spezifische Nx-Bindestelle am CP26 mit der postulierten Selektivität der N1-Bindestelle für Carotinoide in 9-*cis*-5,6-epoxy Konformation (Snyder et al. 2004) übereinstimmt. Folgerichtig würde die Selektivität der N1-Bindestelle für Nx die Beobachtungen erklären, warum in den Komplexen mit Nx etwas mehr als zwei Carotinoide pro Monomer gebunden werden konnten (CP26-LVN 2.25, CP26-NV 2.30).

Eine Auswirkung der veränderten Carotinoidzusammensetzung auf die Bindung der Chlorophylle ist bisher nicht beobachtet worden (Ros et al. 1998, Frank et al. 2001, Croce et al. 2002a). Eventuell erleichtert aber die veränderte Carotinoidzusammensetzung in den **CP26-LV-** und **CP26-NV-Komplexen** ein Herauslösen von Chl a während des Waschganges auf der Ni-Säule, wodurch die in dieser Arbeit beobachtete Reduktion des Chl a/b-Verhältnisses zu erklären wäre. Der Reinigungsschritt mittels Metallchelatchromatographie ist in den Rekonstitutionen, die den vorherigen Publikationen zugrunde liegen, nicht durchgeführt worden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es im Gegensatz zu rekonstituierten CP26-Holokomplexen von *Zea mays* (Frank et al. 2001, Morosinotto et al. 2002) nicht gelungen, stabile CP26-Komplexe mit Vx als einzigem Carotinoid zu rekonstituieren. Die Rekonstitution der Lhcb5 Proteine mit einem Vx-Chl-Pigmentgemisch ergab sehr instabile Komplexe, die größtenteils beim Waschgang auf der Ni-Säule zerfielen.

b) Spektroskopische Charakterisierung

Das Fluoreszenzemissionsspektrum von **CP26-LVN** zeigte eine gute energetische Kopplung der Pigmente, was an einem deutlichen Emissionsmaximum bei 680 nm nach Anregung der Chlorophylle (a+b) und der Carotinoide abzulesen ist (Abb. 14). Es konnte nur eine sehr schwach ausgeprägte Schulter bei 660 nm nach Anregung der Carotinoide und Chl b-Moleküle detektiert werden. Diese Schulter wurde bei den Emissionsspektren von **CP26-NV** zu **CP26-LV** immer deutlicher. Die Generierung von ungekoppelter Chl b-Emission wurde bereits von Frank et al. (2001) für CP26-Komplexen beschrieben, die mit Zx als einzigem Carotinoid rekonstituiert worden waren. Die veränderte Carotinoidbindung in den **CP26-LV** und **CP26-NV-Komplexen** könnte auch in dieser Arbeit der Grund für den veränderten Energietransfer sein. Aufgrund des stark reduzierten Chl a/b-Verhältnisses ist jedoch ebenfalls denkbar, dass in den Komplexen Chl a-Moleküle fehlen, die als Akzeptor für die vom Chl b emittierte Energie fungieren könnten.

Das Absorptionsspektrum von **CP26-LVN** zeigte Maxima bei 437, 469 und 674 nm und eine leichte Schulter bei 418 nm (Abb. 14). Im Spektrum von **CP26-LV** ist das erste Maximum um 1 nm in den kurzwelligen Bereich verschoben, die Schulter im Anstieg zu diesem Maximum ist deutlicher ausgeprägt als bei **CP26-LVN**. Das Absorptionsspektrum von **CP26-NV** unterscheidet sich deutlicher von den ersten beiden. Hier liegen die Maxima bei 438, 465 und 673 nm. Besonders auffällig ist der Anstieg der Amplitude des zweiten Maximums, von 0.7 bei den beiden vorherigen Komplexen auf 0.9 bei **CP26-NV**, der auf das reduzierte Chl a/b-Verhältnis zurück geführt werden kann. In allen drei Komplexen sind im Wellenlängenbereich zwischen 540 und 630 nm noch weitere Absorptionen mit geringer Amplitude zu erkennen, wie sie auch schon für CP-24 beschrieben wurden.

Wie zu erwarten war, wurden die Veränderungen im Chl a/b-Verhältnis der verschiedenen CP26-Komplexe auch anhand der Absorptionsspektren deutlich. Ein Vergleich der **CP26-LVN** (Chl a/b = 2.51) und **CP26-NV** (Chl a/b = 1.75) Absorptionsspektren ergab eine Verschiebung des Maximums bei 469 auf 465 nm. Eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in den kurzwelligeren Bereich wurde schon von Croce et al. (2002a) in CP26-Absorptionsspektren bei Rückgang des Chl a/b-Verhältnisses von 2 auf 1 beobachtet.

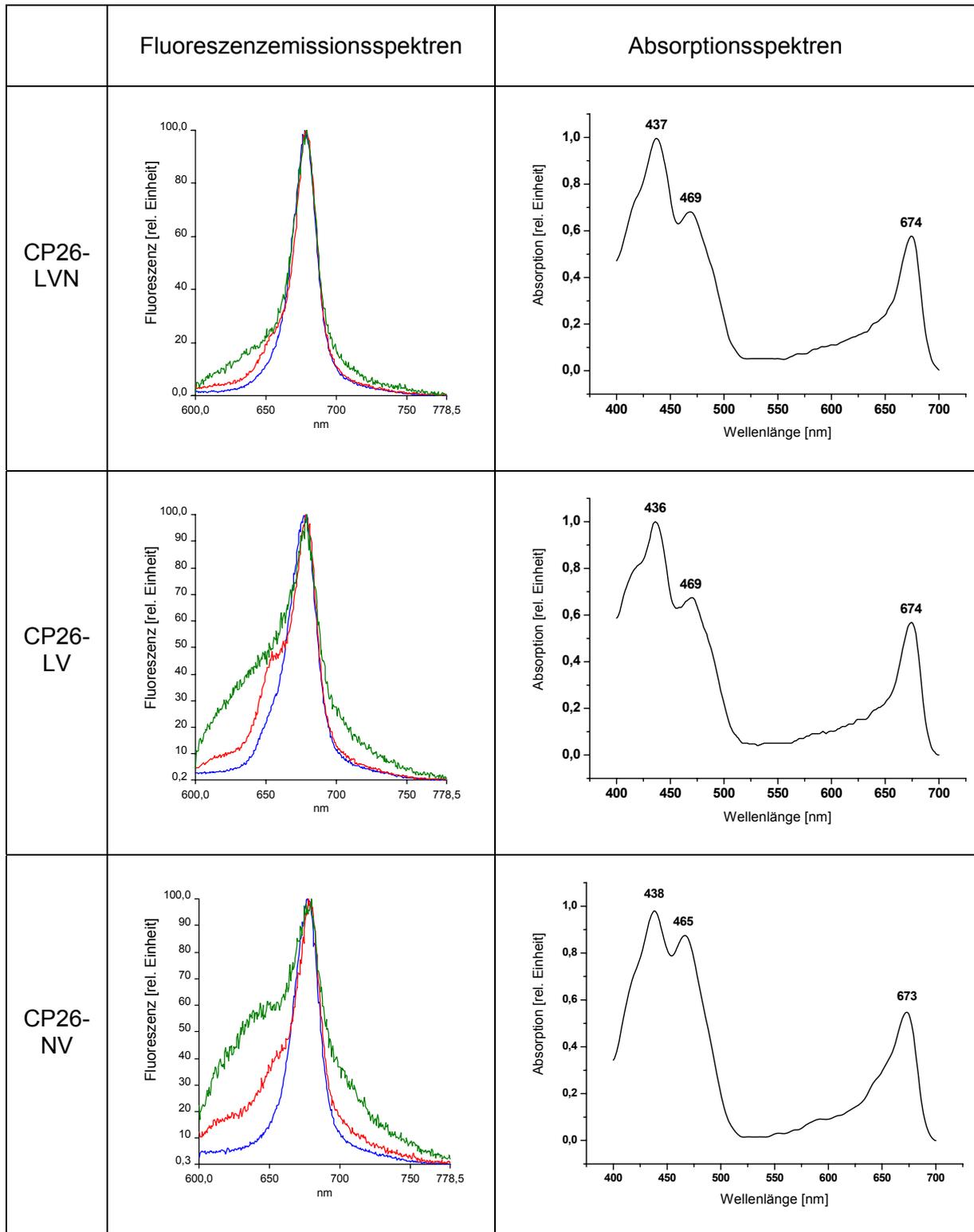


Abbildung 14: Dargestellt sind die Fluoreszenzemissions- und Absorptionsspektren von CP26-LVN, CP26-LV und CP26-NV. Zur Spektroskopie wurden die Proben entsprechend 1 µg Chl in Spektroskopiepuffer (vgl. Kap. 2.9) aufgenommen und vermessen. Fluoreszenzemissionsspektren: blau = Anregung bei 440 nm, rot = Anregung bei 475 nm, grün = Anregung bei 500 nm. Die Normierung der Fluoreszenzemissionsspektren erfolgte auf 100 im Maximum, die Absorptionsspektren wurden auf 1,0 im Maximum normiert.

3.1.2.5 Belegung der Carotinoidbindestellen in den rekonstituierten CP26-Komplexen

Für die Verteilung der Carotinoide im CP26-Komplex wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt. Zum einen wird vermutet, dass zwei Carotinoide pro Komplex an L1 und L2 binden. Dabei wird eine heterogene Belegung der L2-Bindestelle mit Vx oder Nx vorgeschlagen, während Lut an L1 gebunden ist (Frank et al. 2001, Morosinotto et al. 2003). Demzufolge würden sowohl Lut/Vx- bzw. Lut/Nx-Komplexe existieren. Zum anderen wurde beobachtet, dass mehr als 2 Carotinoide an den Komplex binden können. Neben der Belegung von L1 und L2 wurde für Nx an diesen Komplexen N1 als zusätzliche Bindestelle, allerdings mit geringerer Affinität als im LHCII, vorgeschlagen (Ruban et al. 1999, Croce et al. 2002a). Ruban et al. (1999) postulierten darüber hinaus die lockere Bindung von einem Molekül Vx pro CP26 Monomer an V1 vergleichbar mit der Bindung des Vx an den monomeren LHCII-Komplexen. Dabei wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die L2-Bindestelle frei bleibt (Ruban et al. 1999).

Die Analyse der Pigmentstöchiometrien der verschiedenen Komplexe aus dieser Arbeit ergab folgende Beobachtungen: 1. Wenn Nx gebunden wurde, konnten mehr als 2 Carotinoide am Komplex detektiert werden. 2. Lut und Vx konkurrierten um dieselben Bindestellen, wobei Lut eine viel höhere Affinität besaß als Vx. Für die in dieser Arbeit rekonstituierten CP26-Komplexe aus *Nicotiana tabacum* werden daher die in Tab.6 zusammengefassten Belegungen der Carotinoid-Bindestellen vorgeschlagen. Die Verteilung der einzelnen Pigmente auf die verschiedenen Komplexe entspricht dabei den gemessenen Stöchiometrien der epoxidierten Komplexe.

CP26-LVN	50%	25%	25%
L1	Lut	Lut	Lut
L2	–	Lut	Vx
N1	Nx		Nx

CP26-LV	60%	40%
L1	Lut	Lut
L2	Lut	Vx

CP26-NV	66%	33%
L1	Vx	Vx
L2	–	Vx
N1	Nx	Nx

Tabelle 6: Theoretische Verteilung der Carotinoide auf die Bindestellen in den CP26-Komplexen. Nur grün markiertes Vx sollte für die De-epoxidation zugänglich sein, rot markiertes Vx dagegen nicht. Die Prozentangaben in der Tabelle entsprechen dem Vorkommen der jeweiligen Komplexvariante in der rekonstituierten Probe.

CP26-LVN hat 2.25 Carotinoide pro Komplex gebunden, d.h. drei von vier Komplexen hatten zwei und einer drei Carotinoide gebunden. Aufgrund der hohen Affinität von Lut zur L1-Bindestelle erwartet man in allen Komplexen eine Belegung dieser Bindestelle durch Lut. Die L2-Bindestelle hätte theoretisch von allen drei Carotinoiden belegt werden können. Die beobachteten Besonderheiten bei Bindung von Nx an das CP26 Apoprotein lassen jedoch die Bindung von Nx an N1 bevorzugen (vgl. Kap. 3.1.2.4), so dass als mögliche Liganden der L2-Bindestelle nur Lut und Vx in Betracht kommen. In den Komplexen mit 3 Carotinoiden wäre Nx zusätzlich an N1 gebunden worden (vgl. Tab. 6).

Am **CP26-LV-Komplex** wurden 2 Carotinoide pro 9 Chl detektiert. Vx machte 20% der Carotinoide aus. Es ist davon auszugehen, dass unter diesen Umständen zwei von fünf Komplexen Vx an L2 gebunden hatten (vgl. Tab. 6).

An die **CP26-NV-Komplexe** wurden 2.3 Carotinoide pro 9 Chl gebunden, was in zwei von drei Komplexen zwei Carotinoide und in dem dritten Komplex drei Carotinoide vermuten lässt. Aufgrund der Affinitäten und Pigmentstöchiometrien ist zu erwarten, dass Vx in allen Komplexen an der L1-Bindestelle gebunden wurde und nur in einem von drei Komplexen zusätzlich an der L2-Bindestelle vertreten war. Für Nx wird in den CP26-VN Komplexen wieder die Bindung an N1 vorgeschlagen (vgl. Tab. 6).

Bei der Verteilung der Pigmente auf die einzelnen Bindestellen kann prinzipiell nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass Vx (bei belegter L1-Bindestelle) an V1 gebunden wurde. Für die De-epoxidation würde die Bindung des Vx an einer peripheren Bindestelle die schnellere Verfügbarkeit des Substrates im Gegensatz zur Bindung an L2 oder gar L1 und damit die Voraussetzung für einen schnellen enzymatischen Umsatz bedeuten. Die Möglichkeit der Vx-Bindung an V1, bei unbelegter L2-Bindestelle, wurde allerdings in dieser Arbeit außer Acht gelassen. Schon am Lhcb1, für den die V1-Bindestelle eindeutig nachgewiesen ist (Liu et al. 2004, Standfuß et al. 2005), konnten durch *in vitro* Rekonstitution keine vier Carotinoide pro Monomer gebunden werden (Dr. S. Hobe, pers. Mitteilung). Daher erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass in den hier durchgeführten Rekonstitutionen des CP26 LHCs mit belegter V1 aber leerer L2-Bindestelle entstanden sein sollten. Dieses hätte eine höhere Affinität der V1-Bindestelle am CP26 im Vergleich zum Lhcb1-Protein vorausgesetzt.

3.1.2.6 *In vitro* De-epoxidation an rekonstituierten CP26-Komplexen

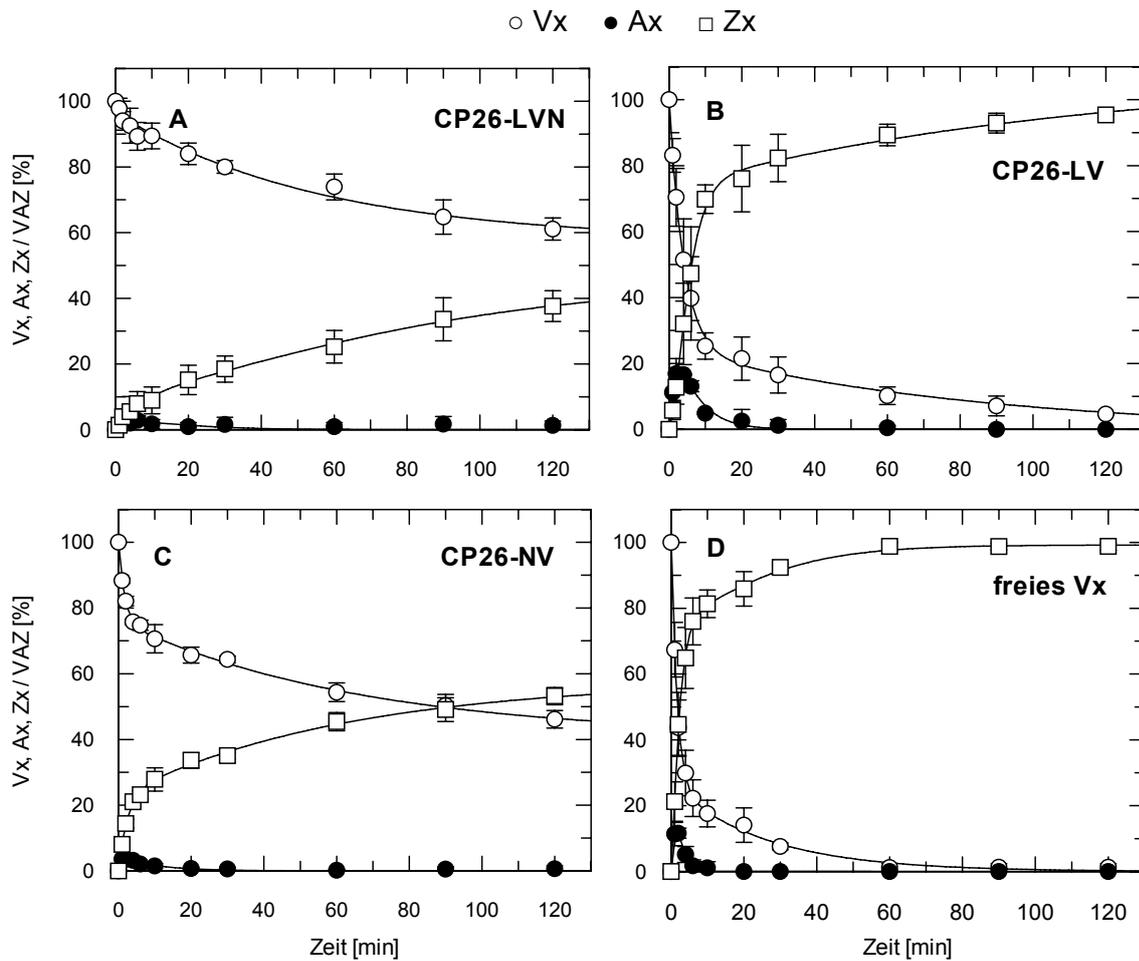


Abbildung 15: Zeitverlauf der *in vitro* De-epoxidation an rekonstituierten CP26-Komplexen. 15A- CP26-LVN Komplexe enthielten Chl a+b sowie Lut, Vx, Nx; 15B- CP26-LV-Komplexe enthielten Chl a+b Lut und Vx; 15C- CP26-NV-Komplexe enthielten Chl a+b sowie Vx, Nx; 15D- freies Vx. Die Bedingungen für die *in vitro* De-epoxidation an den CP26-Komplexen entsprechen den Angaben in der Legende zu Abbildung 13. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte (\pm SD) aus drei unabhängigen Messungen.

Die De-epoxidationskinetiken der verschiedenen CP26-Komplexe sind in Abbildung 15 dargestellt. Anhand der Abb. 15A zeigt sich, dass Vx gebunden am **CP26-LVN-Komplex** langsam umgesetzt wurde. Innerhalb der zweistündigen Reaktionsdauer wurden nur 40% des gesamten Vx-Pools de-epoxidiert, die Reaktion war jedoch in diesem Zeitraum noch nicht abgeschlossen. Die vorangegangenen Überlegungen zur Belegung der Carotinoidbindstellen am CP26-LVN-Komplex ließen vermuten, dass Vx an der L2-Bindestelle gebunden war. Aufgrund der am Lhcb1 gewonnenen Erkenntnisse wäre Vx demnach langsam aber vollständig de-epoxidierbar. Entgegen dieser Annahme wurde Vx am CP26-LVN zwar langsam aber nur unvollständig de-epoxidiert. Die nach der De-epoxidation erneut aufgetrennten Monomere besaßen einen DEPS von 0.51 (vgl. Tab. 7). Folglich wurde nur die Hälfte des theoretisch möglichen Vx zu Zx umgesetzt und an den Komplex gebunden. Es ist

bekannt, dass die Bindung von Nx stabilisierende Wirkung auf den CP26-Komplex besitzt (Ros et al. 1998, Croce et al. 2002a). Eine Belegung der N1-Bindestelle könnte somit das Herauslösen von Vx an L2 und damit den Zugang des Enzyms zum Substrat erschweren. Der langsame Verlauf der Reaktion sowie die fehlende Akkumulation des Ax zu Beginn der Reaktion sind weitere Anzeichen für die reduzierte Verfügbarkeit des Substrates. Aufgrund dieser Beobachtungen an den CP26-LVN-Komplexen, die die Pigmentbindung der nativen Komplexe widerspiegeln, ist es sehr unwahrscheinlich, dass Vx *in vivo* am CP26, wie von Ruban et al. (1999) vorgeschlagen, an der exponierten V1-Bindestelle gebunden wird. Die Bindung von Vx an L2, wie hier für die rekonstituierten CP26-LVN Komplexe von *Nicotiana tabacum* vorgeschlagen, scheint demnach wahrscheinlicher.

An den **CP26-LV-Komplexen** ergab sich ein völlig veränderter Reaktionsverlauf (vgl. Abb. 15B). Das gebundene Vx wurde sehr schnell und nahezu vollständig umgesetzt. Schon nach sechs Minuten waren knapp 50% des Vx de-epoxidiert. Am CP26-LV-Komplex wurde Vx an der L2-Bindestelle vermutet (vgl. Tab. 6), was zu einer vollständigen aber langsamen Umsetzung des Vx zu Zx führen sollte (Jahns et al. 2001). Entgegen dieser Vermutung wurde eine schnelle und vollständige De-epoxidation von Vx in den CP26-LV-Komplexen beobachtet, die sich durch die fehlende Bindung des Nx an der N1-Bindestelle erklären lässt. Anscheinend kann Vx in Abwesenheit von Nx schnell und effizient aus seiner postulierten L2-Bindestelle herausgelöst werden. Zusätzlich zum fehlenden Nx würde eine geringe Affinität von Vx zum CP26-Apoprotein die De-epoxidierbarkeit erleichtern. Die sehr ähnlichen Reaktionsverläufe der De-epoxidationen von Vx gebunden an CP26-LV und freiem Vx unterstützen die Vermutung, dass Vx nur eine sehr geringe Affinität zu seiner Bindestelle am CP26-Komplex besitzt und daher sehr schnell de-epoxidiert werden konnte.

Im **CP26-NV-Komplex** wurde das Protein ohne Lut rekonstituiert. Es ist anzunehmen, dass unter diesen Bedingungen die stabilisierende Funktion an L1 von Vx übernommen wurde (vgl. Tab. 6). Dadurch bedingt wären an den CP26-NV-Komplexen nur 20% des Vx an L2 gebunden und demzufolge de-epoxidierbar. Der De-epoxidationsverlauf für diesen Komplex-Typ zeigte in der Tat einen schnellen Abbau von circa 25% des Vx, was die, schon für die CP26-LV-Komplexe postulierte, geringe Affinität des Vx zu L2 zu bestätigen scheint (vgl. Abb. 15C). Die restlichen 30% des zugänglichen Pigmentes wurden langsam de-epoxidiert. Unter der Annahme, dass Vx nicht an N1, sondern nur an L1 und L2 bindet, müsste der Anteil des langsam umgesetzten Vx aus der L1-Bindestelle stammen. Dies würde für eine erhöhte Instabilität der Komplexe in Abwesenheit von Lut sprechen, so dass die langsame De-epoxidation von Vx zerfallenden Komplexen zugeordnet werden könnte. Der langsame und stetige (die Reaktion war nach 2 Stunden noch nicht abgeschlossen) De-epoxidationsverlauf sowie die ausgeprägte freie Pigmentbande nach erneuter Dichtegradientenzentri-

fugation (vgl. Tab. 7) bestätigen die Vermutung, dass das langsam umgesetzte Vx erst durch den Zerfall der Komplexe für das Enzym erreichbar wurde.

Im Anschluss an die zweistündige De-epoxidation wurden die inkubierten Ansätze aufkonzentriert und die Komplexe erneut über Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die Pigmentanalysen der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 7 dargestellt.

Die Monomer-Banden fast aller Komplex-Typen zeichneten sich durch reduzierte Chl a/b- sowie Chl/Car-Verhältnisse, was für ein verstärktes Herauslösen von Chl a während des Experimentes spricht. Eine Ausnahme bildet der CP26-NV-Komplex, bei dem parallel zur Reduktion des Chl a/b-Verhältnisses durch den Verlust von Carotinoiden auch das Chl/Car-Verhältnis erhöht wurde. Eine Besonderheit stellt außerdem der CP26-LVN-Komplex dar. Trotz Veränderungen in den Pigmentstöchiometrien konnte hier keine freie Pigmentbande detektiert werden. Dieses Phänomen ist nur durch einen Verlust der freigesetzten Pigmente während der Aufreinigung zu erklären.

Verglichen mit den epoxidierten Monomeren änderte sich in den de-epoxidierten Monomeren die Verteilung der gebundenen Carotinoide zueinander nur geringfügig. An allen Komplex-Typen konnte nach der De-epoxidation Zx detektiert werden. Der DEPS in den Komplexen entsprach dem DEPS des Gesamtextraktes nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit. Demzufolge konnte das heraus gelöste Vx durch Zx an den Komplexen ersetzt werden. Ein deutlich erhöhter DEPS konnte in der freien Pigmentbande verglichen mit der Monomer-Bande am CP26-NV-Komplexe festgestellt werden. Dies ist im Einklang mit dem hohen Prozentsatz freier Pigmente in dieser Probe. Es ist zu erwarten, dass freies, aus zerfallenen Komplexen stammendes Vx vollständig de-epoxidiert werden konnte.

In Bezug auf die Stabilität zeigten die rekonstituierten CP26-Komplexe nach der De-epoxidation große Unterschiede. Dabei besaß der Komplex mit vollständiger Carotinoid-Ausstattung (LVN) die größte Stabilität, da eine freie Pigmentbande im Gradienten nicht detektiert werden konnte. In den Komplexen ohne Nx war der Pigmentgehalt in der freien Pigmentbande und in der Monomer-Bande gleich groß. Die freie Pigmentbande im CP26-Komplex ohne Lut enthielt etwa 70% aller Pigmente. Das deutet auf eine verstärkte Instabilität der CP26-NV-Komplexe hin. Wie schon bei der Betrachtung der De-epoxidationsverläufe erwähnt wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass wie beim LHCII die Belegung der L2-Bindestelle für die Stabilität der CP26-Komplexe von Bedeutung ist (Croce et al. 1999). Darüber hinaus ist zu vermuten, dass die CP26-Komplexe eine für Nx selektive N1-Bindestelle besitzen, deren Belegung die Stabilität des Komplexes ebenfalls bestimmt.

Probe	Chl a/b	Chl/Car	Car/ 9 Chl	Lut/ 9 Chl	Nx/ 9 Chl	Vx/ 9 Chl	Ax/ 9 Chl	Zx/ 9 Chl	VAZ/ 9 Chl	DEPS	Vol. [%]	
CP26- LVN	epoxidiert	2.51	4.01	2.25	1.28	0.73	0.23	—	—	0.23	0.00	0.00
	FP - VDE	nicht sichtbar										
	de- epoxidiert - VDE	1.75	3.49	2.58	1.57	0.81	0.20	0.00	0.00	0.20	0.00	100
	FP + VDE	nicht sichtbar										
	de- epoxidiert + VDE	1.74	3.54	2.54	1.57	0.81	0.10	0.00	0.10	0.20	0.51	100
CP26- LV	epoxidiert	1.98	4.74	1.90	1.53	—	0.37	—	—	0.37	0.00	—
	FP - VDE	1.79	2.84	3.15	2.53	—	0.61	0.00	0.00	0.61	0.00	50
	de- epoxidiert - VDE	1.36	4.13	2.17	1.82	—	0.35	0.00	0.00	0.35	0.00	50
	FP + VDE	1.00	2.64	3.40	2.52	—	0.01	0.12	0.57	0.70	0.90	50
	de- epoxidiert + VDE	1.45	3.98	2.25	1.85	—	0.03	0.06	0.31	0.40	0.86	50
CP26- NV	epoxidiert	1.75	3.92	2.30	—	0.99	1.31	—	—	1.31	0.00	—
	FP - VDE	1.90	1.68	5.34	—	3.49	1.85	0.00	0.00	1.85	0.00	70
	de- epoxidiert - VDE	1.26	4.45	2.02	—	1.05	0.98	0.00	0.00	0.98	0.00	30
	FP + VDE	0.17	5.62	1.60	—	0.95	0.10	0.06	0.50	0.66	0.80	70
	de- epoxidiert + VDE	1.27	4.21	2.14	—	1.08	0.54	0.05	0.47	1.06	0.47	30

Tabelle 7: Pigmentanalysen der jeweiligen CP26-Monomerbanden, bzw. freien Pigmentbanden, vor und nach der De-epoxidation. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die Standardabweichungen betragen nicht mehr als 15% des jeweiligen Wertes. Die erneute Aufreinigung der de-epoxidierten Komplexe durch Dichtegradientenzentrifugation ergab Banden von sehr geringer Intensität, weshalb eine genaue Volumen Bestimmung nicht möglich war. Um trotzdem Angaben zur relativen Verteilung der Pigmente machen zu können, wurden die Volumina der einzelnen Banden geschätzt.

Die verschiedenen Rekonstitutions- und De-epoxidationsexperimente haben gezeigt, dass Vx nur eine geringe Affinität zur L2-Bindestelle der CP26-Komplexe besitzt. Abhängig von der Affinität zur Bindestelle und der Stabilität des Komplexes, konnte Vx freigesetzt und de-epoxidiert werden. Die Stabilität der CP26-Komplexe wurde sehr stark von der Pigmentbindung, insbesondere des Nx an N1, beeinflusst. In den de-epoxidierten Proben konnte das gebildete Zx an die intakten Komplexe zurückbinden. Die Stöchiometrien entsprachen hierbei in etwa den Pigmentverhältnissen des Gesamt-Pigmentextraktes aus der De-epoxidation.

3.1.2.7 Charakterisierung der rekonstituierten CP29-Komplexe

a) Pigmentanalysen

Die Ergebnisse der Pigmentanalysen für die verschiedenen CP29-Komplexe sind in Tabelle 8 aufgelistet. Wie schon bei CP24 und CP26 erfolgte eine Normierung der Carotinoid-Werte auf die Anzahl der gebundenen Chlorophylle pro Monomer. Für den CP29 wurde die Koordinierung von 8 Chl/Monomer postuliert (Giuffra et al. 1996).

	Chl a/b	Chl/Car	Car/8 Chl	Nx/8 Chl	Vx/8 Chl	Lut/8 Chl
CP29-LVN	3.37 ± 0.42	4.22 ± 0.25	1.90 ± 0.11	0.53 ± 0.03	0.51 ± 0.05	0.86 ± 0.13
CP29-LV	2.56 ± 0.23	5.33 ± 0.20	1.50 ± 0.05	—	0.70 ± 0.04	0.81 ± 0.08
CP29-NV	3.47 ± 0.18	4.95 ± 0.26	1.62 ± 0.08	0.56 ± 0.02	1.06 ± 0.06	—
CP29-V	3.00 ± 0.12	6.41 ± 0.65	1.26 ± 0.13	—	1.26 ± 0.13	—

Tabelle 8: Pigmentanalysen der rekonstituierten Komplexe nach der Dichtegradientenzentrifugation. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte aus 4-8 Rekonstitutionen (± SD).

Bei der Rekonstitution des rekombinanten *lhcb4* Genproduktes von *Nicotiana tabacum* mit Chl und vollständigem Carotinoidangebot (LVN) wurden Komplexe erzielt, die ein Chl a/b-Verhältnis von 3.37 und ein Chl/Car-Verhältnis von 4.22 aufwiesen. Die gebundenen Carotinoide setzten sich aus 0.86 Lut, 0.53 Nx und 0.51 Vx pro Monomer zusammen. In ihren Pigmentstöchiometrien entsprachen die rekonstituierten Komplexe aus dieser Arbeit somit den nativen und rekonstituierten CP29-Komplexen von *Zea mays* (Crimi et al. 2001, Moya et al. 2001, Gastaldelli et al. 2003).

Wie schon bei CP26 zu beobachten war, beeinflusste auch bei CP29 die Veränderung der Carotinoidzusammensetzung im Rekonstitutionsansatz die Pigmentstöchiometrien der rekonstituierten Komplexe. So verringerte sich das Chl a/b-Verhältnis von 3.47 im CP29-NV-Komplex über 3.37 (CP29-LVN) und 3.00 (CP29-Vx) bis auf 2.56 im CP29-LV-Komplex (vgl. Tab. 8). Die Menge an gebundenen Carotinoiden variierte gleichzeitig von 1.90 bei vollständiger Carotinoid-Ausstattung (LVN) bis auf 1.26 in den reinen Vx-Komplexen (vgl. Tab. 8). Für die einzelnen Carotinoide konnte dabei ein recht unterschiedliches Bindungsverhalten beobachtet werden. Es zeigte sich, dass Lut und Nx unabhängig von der Pigmentzusammensetzung im Rekonstitutionsansatz in festen Stöchiometrien an das CP29 Apoprotein koordiniert werden konnten. So wurden im CP29-LVN-Komplex 0.86 Lut und im LV-Komplex 0.81 Lut gebunden. Für Nx konnten Werte von 0.53 im LVN-Komplex und 0.56 im NV-Komplex ermittelt werden. Folglich konnte an jedem CP29-Komplex, falls es im Rekonstitutionsgemisch vertreten war, nahezu ein Lut und ein halbes Nx koordinieren. Die Bindung des Vx an CP29 war variabler. So konnten in Abhängigkeit vom Pigmentgemisch von 0.51 im LVN-Komplex über 0.7 im LV-Komplex zu 1.06 im NV-Komplex bis 1.26 Vx im Vx-Komplex

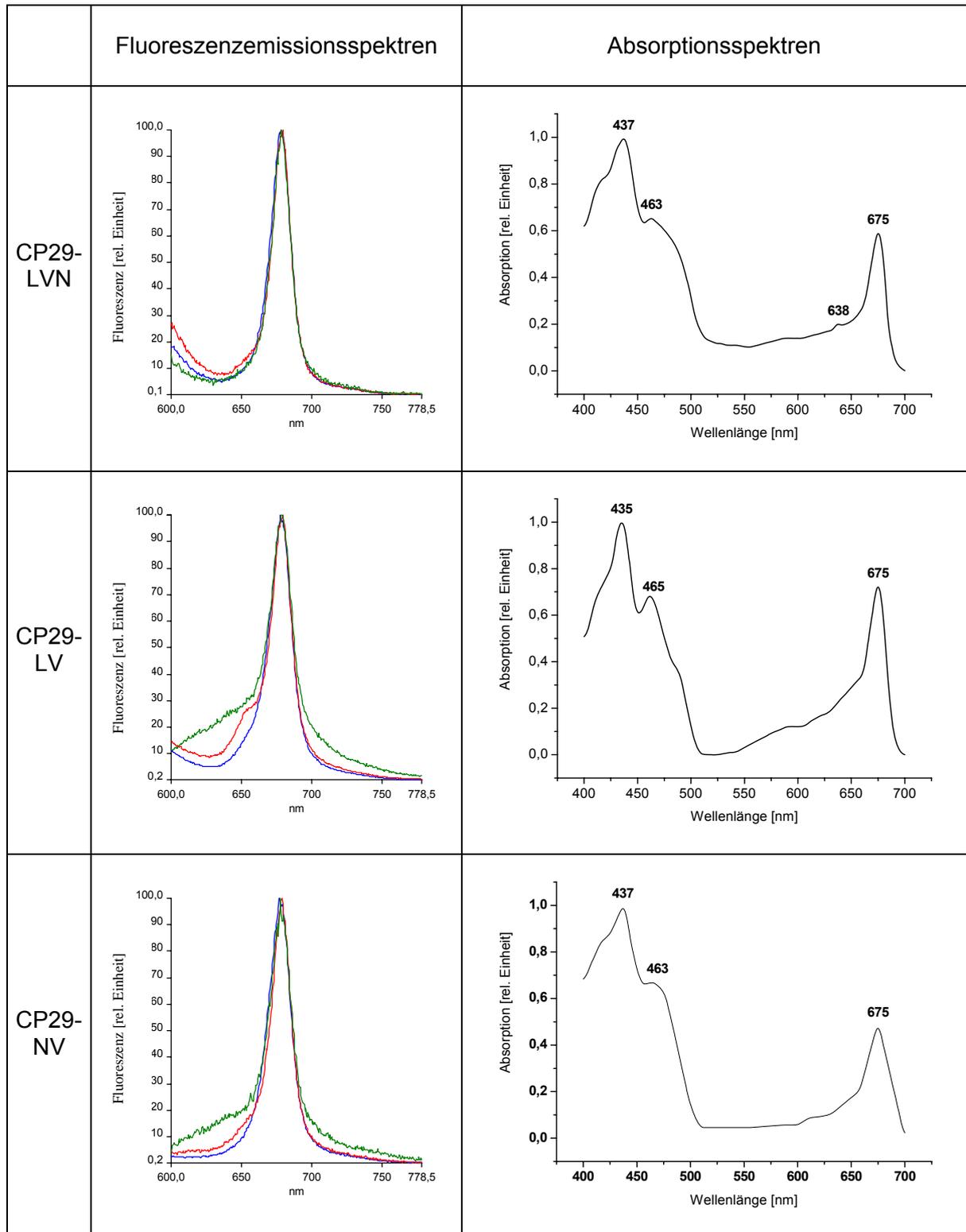
pro Monomer gebunden werden. (Weitere Überlegungen zur Belegung der Bindestellen unter Kap. 3.2.8)

In vergleichbaren Studien am Lhcb4 Apoprotein von *Zea mays* wurden allerdings unabhängig von der Carotinoidzusammensetzung im Rekonstitutionsansatz jeweils 2 Carotinoide pro Monomer gebunden. Das Chl a/b-Verhältnis lag ebenfalls unverändert bei 2 (Crimi et al. 2001, Morosinotto et al. 2002a, Gastaldelli et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Reinigung der Komplexe von überschüssigen Pigmenten nach der Rekonstitution eine Metallchelatchromatographie durchgeführt. Bei diesem Verfahren könnten verstärkt locker assoziierte Pigmente abgelöst worden sein. Dieser Reinigungsschritt wurde in den vorherigen Arbeiten nicht durchgeführt, wodurch die Abweichungen zu erklären wären.

Es kann außerdem vermutet werden, dass die Veränderungen in der Pigmentbindung die Stabilität der Komplexe beeinflussten und die Komplexe daher während der Reinigung über die Ni-Säule einem verstärkten Verlust von Pigmenten ausgesetzt waren. Ein Stabilitätsverlust von CP29-Komplexen mit unterschiedlicher Carotinoid-Ausstattung wurde von Gastaldelli et al. (2003) beschrieben. Es war untersucht worden, inwiefern sich die Stabilität der Komplexe gegenüber Wärmeeinwirkung unterschied. Der Studie zu Folge nahm die Stabilität in der Reihenfolge CP29-LV > CP29-LVN > CP29-NV > CP29-Vx ab. Allerdings wird die Auswirkung von Wärme auf die Komplexe eine andere sein als die des Detergenz in den Waschlösungen während der Metallchelatchromatographie, so dass die Erkenntnisse aus der vorherigen Studie sich nicht eindeutig auf diese Arbeit übertragen lassen.

b) Spektroskopische Charakterisierung

Das Fluoreszenzemissionsspektrum der **CP29-LVN-Komplexe** zeigte einen nahezu vollständigen Energietransfer der absorbierten Energie aller Pigmente auf Chl a. Die Koordination der Pigmente im rekonstituierten CP29-LVN-Komplex schien somit fast einwandfrei dielichtsammelnden Funktionen des nativen Antennenkomplexes zu erfüllen. Eine gute energetische Kopplung der Pigmente konnte auch am **CP29-NV-Komplex** erzielt werden. Dahingegen zeigte sich im Fluoreszenzemissionsspektrum nach Anregung der **CP29-LV-Komplexe** mit Licht einer Wellenlänge von 475 nm eine leichte Schulter bei 660 nm, die auf direkte Chl b-Emission zurückzuführen ist. Sehr deutlich war diese direkte Emission nach Anregung der Chl b-Moleküle im **CP29-Vx-Komplex**. Der beobachtete unzulängliche Energietransfer wurde wahrscheinlich durch die veränderten Pigmentstöchiometrien in den unterschiedlichen Komplex-Typen verursacht. Die Pigmentanalysen der CP29-Komplexe haben gezeigt, dass das Chl a/b-Verhältnis in den Rekonstitutionen ohne Nx besonders stark reduziert wurde. Zusätzlich wiesen die Fluoreszenzemissionsspektren der Komplexe ohne Nx auf einen gestörten Energietransfer innerhalb der Komplexe hin. Daher kann postuliert werden, dass insbesondere die Bindung des Nx am CP29 für die korrekte Koordinierung der Pigmente und die richtige Faltung des Komplexes von Bedeutung ist.



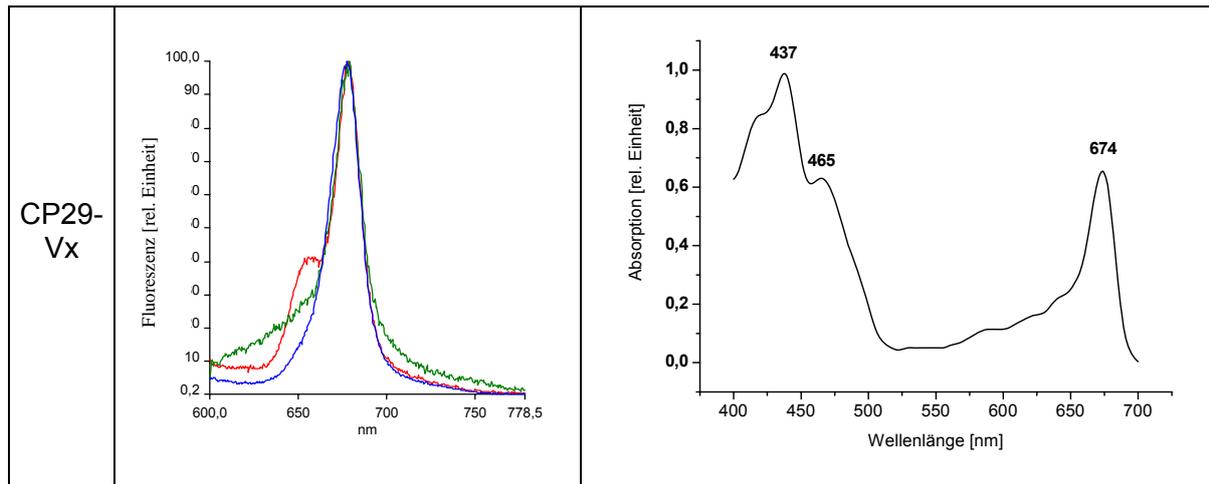


Abbildung 16: Dargestellt sind die Fluoreszenzemissions- und Absorptionsspektren von CP29-LVN, CP29-LV, CP29-NV und CP29-Vx. Zur Spektroskopie wurden die Proben entsprechend 1 µg Chl in Spektroskopiepuffer (vgl. Kap. 2.9) aufgenommen und vermessen. Fluoreszenzemissionsspektren: blau = Anregung bei 440 nm, rot = Anregung bei 475 nm, grün = Anregung bei 500 nm. Die Normierung der Fluoreszenzemissionsspektren erfolgte auf 100 im Maximum, die Absorptionsspektren wurden auf 1,0 im Maximum normiert.

Die Absorptionsspektren der vier verschiedenen CP29-Komplexe zeigten im kurzwelligen Bereich Maxima um 437 und 465 (bzw. 463) nm. Im langwelligeren Bereich sind Absorptionen mit geringer Amplitude zwischen 520 und 640 nm und ein Maximum bei 675 nm (bzw. 674 nm bei CP29-Vx) zu erkennen.

Die Maxima des **CP29-LVN** Absorptionsspektrums zeigten im Vergleich zu nativen und rekonstituierten Spektren anderer Präparationen insbesondere in der Q_y -Region eine Verschiebung um 1-3 nm in den kurzwelligen Bereich (Henrysson et al. 1989, Giuffra et al. 1996, Crimi et al. 2001, Moya et al. 2001, Voigt et al. 2002, Gastaldelli et al. 2003). In einer früheren Arbeit wurde ein solcher „blue-shift“ in den Absorptionsspektren isolierter Antennenproteine auf den Einfluss von Detergenz zurückgeführt (Ruban et al. 2002a). Eine Verschiebung der Maxima in der Q_y -Region im Absorptionsspektrum von CP29 wurde auch durch Senkung der Messtemperatur beobachtet (Pascal et al. 1999). Allerdings wurden in dieser Arbeit die Spektren bezüglich der Detergenzkonzentration und der Messtemperatur unter ähnlichen Versuchsbedingungen aufgenommen, wie sie in der oben zitierten Literatur verwendet worden waren. Es ist daher zu vermuten, dass hier, wie schon bei CP24, die Verschiebung der Maxima wahrscheinlich auf die Assoziation unspezifisch an den Komplex gebundener Pigmente zurückgeführt werden muss (Giuffra et al. 1996).

3.1.2.8 Belegung der Carotinoidbindestellen in den rekonstituierten CP29-Komplexen

Isolationen von nativem CP29 verschiedener Spezies belegten die Bindung von 2-3 Carotinoiden pro Komplex (Peter und Thornber 1991, Bassi et al. 1993, Ruban et al. 1999, Das und Frank 2002). Für die Verteilung der Carotinoide auf die Bindestellen am CP29 werden verschiedene Modelle diskutiert. Ruban et al. (1999) favorisieren eine Belegung von L1 mit Lut, L2 mit Vx und N1 mit Nx oder Vx. Im Gegensatz dazu wird in anderen Arbeiten die Bindung von Lut an L1 und entweder Vx oder Nx an L2 postuliert (Bassi et al. 1999, Moya et al. 2001, Gastaldelli et al. 2003, Morosinotto et al. 2003). Um die Existenz der N1-Bindestelle zu überprüfen, konstruierten Gastaldelli et al. (2003) chimäre LHC-Proteine, bei denen die C-Helix Domäne von CP29 mit der von LHCI ausgetauscht wurde. Als Folge konnte das rekombinante chimäre Protein kein Nx binden. Die Autoren schlossen daraus, dass die N1-Bindestelle am CP29 nicht präsent ist. Das Kontrollexperiment, Induktion der N1-Bindestelle durch Transfer der LHCI-Sequenz in die CP29-Sequenz, blieb jedoch aus. Aus diesem Grund scheint der Verlust der N1-Bindestelle zwar als sehr wahrscheinlich, kann jedoch nicht als eindeutig bewiesen betrachtet werden.

In den Rekonstitutionen der CP29-Komplexe von *Nicotiana tabacum* wurden maximal 1.9 Carotinoide pro Komplex gebunden. Wie zuvor erwähnt schienen Lut und Nx in festen Stöchiometrien an CP29 zu binden, so dass jeweils annähernd 1 Lut und 0.5 Nx pro Monomer gefunden wurden. Aufgrund der bekannten Affinität von Lut zur L1-Bindestelle in verschiedenen Antennenproteinen höherer Pflanzen kann davon ausgegangen werden, dass auch am CP29-Komplex von *Nicotiana tabacum* Lut an L1 gebunden wurde. Die beobachtete Bindung eines halben Moleküls Nx pro CP29 Monomer lässt darauf schließen, dass Nx sich die Bindestelle am CP29 mit einem anderen Pigment teilen musste. Es kann spekuliert werden, dass es sich bei dieser Bindestelle um L2 handeln muss. Würde Nx im CP29-Komplex an N1 und nicht an L2 binden, wäre zu erwarten, dass pro Monomer, wie am Lhcb1 und am CP26 beobachtet, 1 Molekül Nx binden könnte. Da jedoch nur 0.5 Nx pro Monomer detektiert wurden, kann vermutet werden, dass an die N1-Bindestelle am CP29 von *Nicotiana tabacum* durch *in vitro* Rekonstitution keine Pigmente gebunden werden konnten. Es lässt sich sogar nicht ausschließen, dass die N1-Bindestelle, wie von Gastaldelli et al. (2003) gefordert, im CP29-Komplex nicht existiert.

Die Pigmentanalysen der verschiedenen Komplex-Typen haben gezeigt, dass Vx in sehr unterschiedlichen Stöchiometrien an CP29 binden konnte. Die vorangegangenen Überlegungen zu Lut und Nx ergeben für Vx die potentielle Bindung an L2 und/oder L1. An L2 würde Vx mit Nx und an L1 mit Lut um die Bindestelle konkurrieren.

Die Annahmen zur Pigmentbindung am CP29 lassen in den verschiedenen Komplex-Typen folgende Belegungen der Carotinoide-Bindestellen erwarten (vgl. Tab. 9, die Angaben sind in Übereinstimmung mit den Stöchiometrien der Pigmentanalysen):

CP29-LVN	50%	40%	10%
L1	Lut	Lut	Vx
L2	Nx	Vx	—

CP29-LV	50%	25%	25%
L1	Lut	Lut	Vx
L2	Vx	—	—

CP29-NV	50%	50%
L1	Vx	Vx
L2	Nx	—

CP29-Vx	75%	25%
L1	Vx	Vx
L2	—	Vx

Tabelle 9: Theoretische Verteilung der Carotinoide auf die Bindestellen in den CP29-Komplexen. Nur grün markiertes Vx sollte für die De-epoxidation zugänglich sein, rot markiertes Vx dagegen nicht. Die Prozentangaben in der Tabelle entsprechen dem Vorkommen der jeweiligen Komplexvariante in der rekonstituierten Probe.

Am **CP29-LVN-Komplex** konnten 1.9 Car/8 Chl gebunden werden. Damit besaßen 9 von 10 Komplexen zwei und nur ein Komplex 1 Carotinoide. Die Bindung von Lut an L1 scheint aufgrund der hohen Affinität als sehr wahrscheinlich. Nx und Vx werden dementsprechend an L2 vermutet. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch Lut an L2 binden konnte, wodurch die L1-Bindestelle von einem anderen Pigment belegt worden wäre. Am Lhcb1-Protein konnte jedoch gezeigt werden, dass Nx so gut wie keine Affinität zur L1-Bindestelle besitzt (Hobe et al. 2000). Falls sich diese Beobachtung auf CP29 übertragen lässt, würde nur die Bindung von Vx an L1 in Betracht kommen. Aufgrund der bekannten Affinitätsunterschiede von Lut und Vx am Lhcb1 wurde die Möglichkeit von Lut und Vx als gleichberechtigte Bindungspartner an L1 in der obenstehenden Tabelle außer Acht gelassen. Der **CP29-LV-Komplex** koordinierte 1.5 Car pro Monomer, d.h. nur in jedem zweiten Komplex konnten 2 Carotinoide gebunden werden. Lut und Vx waren zu gleichen Teilen in den Komplexen vertreten. Wiederum lassen sich vergleichbare Affinitäten der beiden Carotinoide zu L1 und L2 nicht ausschließen. Aus den oben erläuterten Gründen wird aber die bevorzugte Bindung von Lut an L1 und somit die vorrangige Bindung von Vx an L2 favorisiert.

Für den **CP29-NV-Komplex** wurde die Bindung von 1.62 Car pro Monomer beschrieben, was näherungsweise wieder nur in jedem zweiten Komplex 2 Carotinoide vermuten lässt. In den Komplexen ohne Lut ist davon auszugehen, dass Vx die stabilisierende Funktion an L1 übernimmt. Nx würde demnach in den Komplexen mit 2 Carotinoiden an L2 gebunden sein.

Der **CP29-Vx-Komplex** besaß nur 1.26 Carotinoide pro 8 Chl. Somit schien in den Rekonstitutionen mit Vx als einzigem Carotinoid nur jeder vierte Komplex 2 Carotinoide zu binden.

3.1.2.9 *In vitro* De-epoxidation an rekonstituierten CP29-Komplexen

Der zweistündige De-epoxidationsverlauf für die verschiedenen CP29-Komplexe ist in Abbildung 17 dargestellt. Abb. 17A zeigt das De-epoxidationsverhalten für das rekonstituierte CP29-Protein mit nativer Pigmentausrüstung (**CP29-LVN**). In diesem Fall waren nur 13% des gebundenen Vx für die De-epoxidase zugänglich. Anhand des Reaktionsverlaufes ist abzulesen, dass die Umsetzung des verfügbaren Vx schon nach 10 Minuten abgeschlossen war. Den vorangegangenen Überlegungen zufolge war der größte Teil des Vx an L2 gebunden und wäre somit zwar langsam aber vollständig de-epoxidierbar gewesen. Entgegen dieser Erwartung konnte der größte Teil des Vx im CP29-LVN-Komplex nicht de-epoxidiert werden. Daher scheint die Verfügbarkeit von Vx für die De-epoxidation an der L2-Bindestelle von CP29 geringer zu sein als am Lhcb1-Protein, vorausgesetzt dass Vx im CP29-LVN-Komplex tatsächlich an L2 gebunden wurde. Die verminderte Verfügbarkeit könnte durch eine erhöhte Affinität von Vx zur Bindestelle oder durch eine andere Faltung des Proteins bedingt sein.

Die schnelle Zugänglichkeit des de-epoxidierbaren Vx spricht für eine zusätzliche lockere Vx-Bindung an den Komplex, die bei der theoretischen Verteilung der Carotinoide auf die Bindestellen noch nicht mit einbezogen werden konnte. Es bleibt anhand der Ergebnisse jedoch unklar, ob das de-epoxidierbare Vx an einer Carotinoidbindestelle im Komplex koordiniert werden konnte oder nur unspezifisch mit dem Komplex assoziiert war.

Am **CP29-LV-Komplex** (Abb. 17B) wurden 30% des vorhandenen Vx de-epoxidiert. Damit konnte in den Komplexen ohne Nx der de-epoxidierbare Anteil des Vx im Vergleich zu den LVN-Komplexen verdoppelt werden. Auch diese Reaktion erreichte schon nach zehn Minuten die Sättigung. Die *in vitro* De-epoxidation blieb auch in diesem Fall hinter der theoretischen Erwartung, von 66% de-epoxidierbarem Vx, weit zurück.

In den **CP29-NV** (Abb. 17C) Komplexen war kein Lut vorhanden, so dass postuliert worden war, dass Vx die stabilisierende Funktion an L1 übernimmt, wodurch es von der De-epoxidation so gut wie ausgeschlossen sein sollte. Der Reaktionsverlauf erwies sich jedoch als sehr vergleichbar mit der De-epoxidation am CP29-LVN-Komplex, bei dem Vx an L2 vermutet worden war. Die Umsetzung war jedoch auf 15% des Vx beschränkt und nach 10 Minuten abgeschlossen.

Die De-epoxidation am **CP29-Vx** (Abb. 17D) zeigte im Vergleich zu den drei oben beschriebenen Komplexen einen veränderten Reaktionsverlauf. Eine Sättigung wurde bei diesem Komplex-Typ erst am Ende der 120 minütigen Versuchsdauer erreicht. Ähnlich wie

beim VN-Komplex war die De-epoxidation auf 30% des Vx beschränkt. Theoretisch waren am CP29-Vx Komplex nur 20% des Vx an L2 gebunden und damit de-epoxidierbar. Allerdings haben schon die De-epoxidationsverläufe an den vorherigen Komplexen gezeigt, dass die Reaktionen am CP29 nicht direkt mit denen am Lhcb1 verglichen werden können. Es ist daher anzunehmen, dass der De-epoxidation am CP29 mit Vx als einzigem Car eventuell ein anderer Mechanismus als in den vorherigen Komplexen zugrunde liegt. Dieser wird bei der Betrachtung der erneut aufgereinigten de-epoxidierten Komplexe detaillierter erläutert.

Zur Kontrolle der Enzymaktivität in den Ansätzen wurde jeweils gleichzeitig die De-epoxidationskinetik von freiem Vx untersucht (Abb. 17E). Im Gegensatz zu den limitiert ablaufenden De-epoxidationen an den CP29-Komplexen, konnte freies Vx mit dem verwendeten VDE-Rohextrakt schnell und vollständig de-epoxidiert werden.

Das beobachtete De-epoxidationsverhalten an den verschiedenen CP29-Komplexen legt die Vermutung nahe, dass es am CP29 zwei verschiedene Vx-Bindestellen existieren. Die eine Bindestelle vermag den größten Anteil des Vx zu binden, hier scheint das Pigment für die De-epoxidation nicht zugänglich zu sein. Die andere Bindestelle besitzt dagegen nur eine geringe Affinität zu Vx, was sich in der reduzierten Vx-Bindung und der sehr guten De-epoxidierbarkeit des Pigmentes äußert. Die Vermutung von zwei unterschiedlichen Vx-Bindestellen am CP29 deckt sich mit Beobachtungen von Ruban et al. (1999). Dieser postulierte für CP29 eine Population von fest an den Komplex gebundenem Vx und eine zusätzliche mit locker gebundenem Vx, welches für die De-epoxidation zugänglich ist.

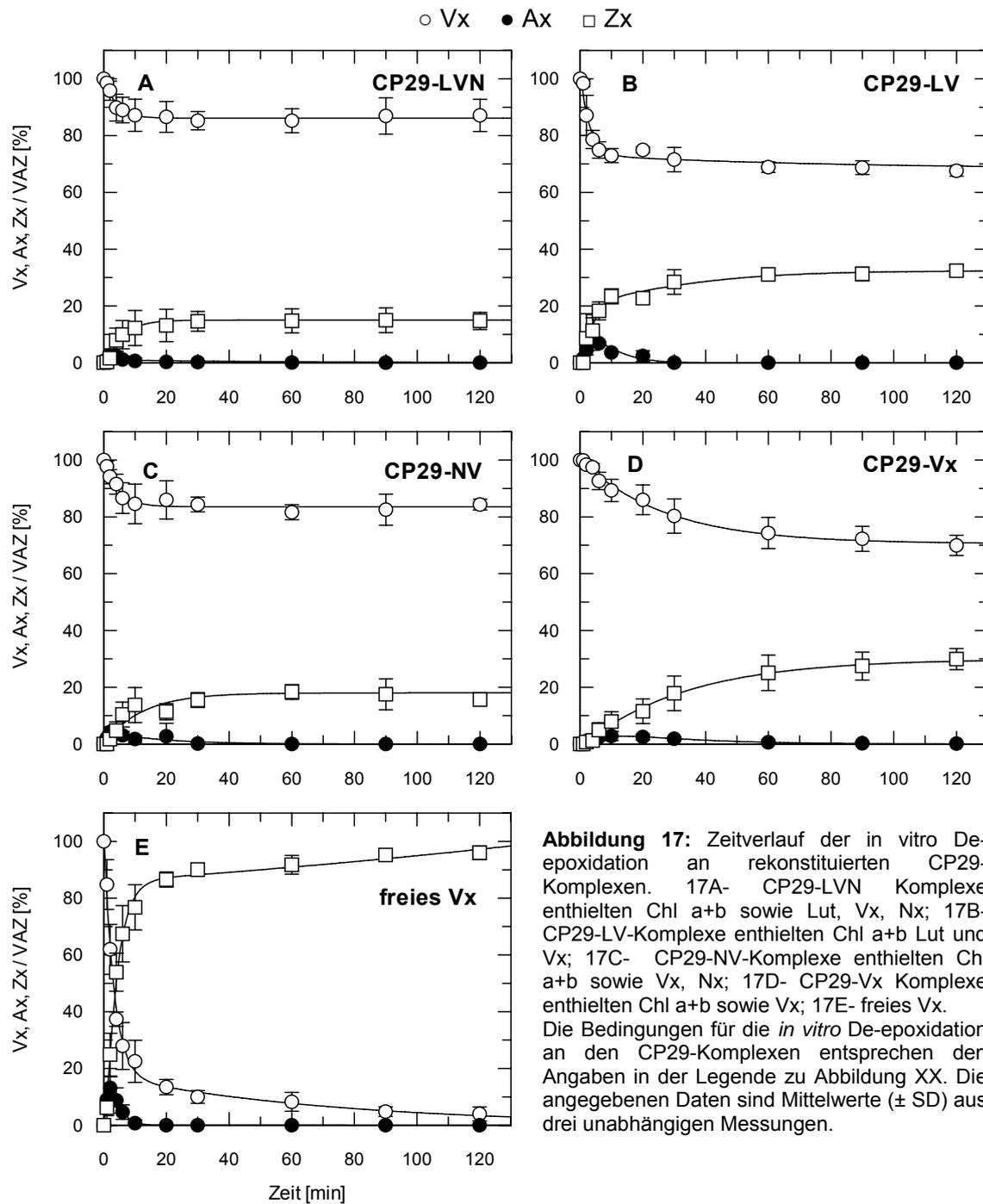


Abbildung 17: Zeitverlauf der *in vitro* De-epoxidation an rekonstituierten CP29-Komplexen. 17A- CP29-LVN Komplexe enthielten Chl a+b sowie Lut, Vx, Nx; 17B- CP29-LV-Komplexe enthielten Chl a+b Lut und Vx; 17C- CP29-NV-Komplexe enthielten Chl a+b sowie Vx, Nx; 17D- CP29-Vx Komplexe enthielten Chl a+b sowie Vx; 17E- freies Vx. Die Bedingungen für die *in vitro* De-epoxidation an den CP29-Komplexen entsprechen den Angaben in der Legende zu Abbildung XX. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte (\pm SD) aus drei unabhängigen Messungen.

Wie schon für die anderen minoren Antennenkomplexe beschrieben, wurden auch bei den CP29-Komplexen im Anschluss an die De-epoxidation Parallelproben aufkonzentriert und erneut über einen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Die Pigmentanalysen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Probe		Chl a/b	Chl/ Car	Car/ 8 Chl	Lut/ 8 Chl	Nx/ 8 Chl	Vx/ 8 Chl	Ax/ 8 Chl	Zx/ 8 Chl	VAZ/ 8 Chl	DEPS	Vol. [%]
CP29 -LVN	epoxidiert	3.37	4.22	1.90	0.86	0.53	0.51	—	—	0.51	—	—
	FP - VDE	nicht sichtbar										
	de- epoxidiert - VDE	3.42	3.47	2.31	1.01	0.67	0.62	0.00	0.00	0.62	0.00	100
	FP + VDE	nicht sichtbar										
	de- epoxidiert + VDE	3.40	3.26	2.46	1.07	0.66	0.62	0.00	0.11	0.73	0.15	100
CP29 -LV	epoxidiert	2.56	5.33	1.50	0.81	—	0.70	—	—	0.70	—	—
	FP - VDE	3.03	3.95	2.02	1.43	—	0.59	0.00	0.00	0.59	0.00	10
	de- epoxidiert - VDE	2.39	5.80	1.38	0.74	—	0.64	0.00	0.00	0.64	0.00	90
	FP + VDE	3.13	3.40	2.36	1.38	—	0.18	0.03	0.76	0.97	0.80	10
	de- epoxidiert + VDE	2.54	5.28	1.52	0.87	—	0.45	0.00	0.20	0.67	0.29	90
CP29 -NV	epoxidiert	3.47	4.95	1.62	—	0.56	1.06	—	—	1.06	—	—
	FP - VDE	nicht sichtbar										
	de- epoxidiert - VDE	2.92	5.13	1.57	—	0.52	1.05	0.00	0.00	1.05	0.00	100
	FP + VDE	nicht sichtbar										
	de- epoxidiert + VDE	2.89	5.17	1.55	—	0.54	0.88	0.00	0.14	1.02	0.13	100
CP29 -Vx	epoxidiert	3.00	6.41	1.26	—	—	1.26	—	—	1.26	—	—
	FP - VDE	nicht sichtbar										
	de- epoxidiert - VDE	2.70	7.27	1.10	—	—	1.10	—	0.00	1.10	0.00	100
	FP + VDE	nicht sichtbar										
	de- epoxidiert + VDE	2.67	7.36	1.09	—	—	0.76	—	0.33	1.09	0.30	100

Tabelle 10: Pigmentanalysen der jeweiligen CP29-Monomerbanden, bzw. freien Pigmentbanden, vor und nach der De-epoxidation. Die Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die Standardabweichungen betragen nicht mehr als 15% des jeweiligen Wertes. Die erneute Aufreinigung der de-epoxidierten Komplexe durch Dichtegradientenzentrifugation ergab Banden von sehr geringer Intensität, weshalb eine genaue Volumen Bestimmung nicht möglich war. Um trotzdem Angaben zur relativen Verteilung der Pigmente machen zu können, wurden die Volumina der einzelnen Banden geschätzt.

Eine freie Pigmentbande konnte nach der Zentrifugation nur aus den Gradienten der CP29-LV-Komplexe entnommen werden. Die freie Pigmentbande zeichnete sich im Vergleich zu den Ausgangskomplexen, unabhängig von der Enzymaktivität, durch ein erhöhtes Chl a/b- und Car/Chl-Verhältnis aus. Auch das Verhältnis der einzelnen Carotinoide zueinander war

in der freien Pigmentphase verändert. Im epoxidierten Komplex waren Lut und Vx zu fast gleichen Teilen vertreten, wohingegen in der freien Pigmentphase hauptsächlich Lut gefunden wurde. Diese Beobachtung spricht für die feste Bindung des Vx an den CP29-Komplex, wie sie schon zuvor aus den limitierten De-epoxidationsreaktionen abgeleitet worden war.

Die Stabilität der CP29-Komplexe wird durch die fehlende freie Pigmentbande nach erneuter Dichtegradientenzentrifugation deutlich. Allerdings zeigten die Pigmentanalysen der Komplexe im Vergleich zu den epoxidierten Proben, dass es während des Versuches zu Veränderungen innerhalb der Pigmentstöchiometrien gekommen war. Es kann vermutet werden, dass der Verlust einzelner Pigmente aus den Komplexen zu gering war, als dass die freigesetzten Pigmente im Gradienten als Bande zu erkennen gewesen wären.

Besonders hervorzuheben ist, dass an allen CP29-Komplex-Typen nach der De-epoxidation ein Zx-Gehalt entsprechend des De-epoxidationsversuches detektiert werden konnte. Demzufolge konnte das gebildete Zx nahezu vollständig an die Komplexe binden, ob es dabei an die Stelle des freigesetzten Vx zurückbinden, oder evtl. andere Pigmente an deren Bindestellen verdrängen konnte, war mithilfe der durchgeführten Untersuchungen nicht zu klären. Die Beschränkung der De-epoxidationsreaktionen an den LVN-, LV sowie NV-Komplexen auf einen sehr kleinen Teil des Vx legt jedoch die Vermutung nahe, dass die Entstehung von Zx an diesen Komplex-Typen nicht zur Freisetzung von neuem Substrat für die De-epoxidation führte. Daher kann zumindest ein Verdrängen von Vx durch das gebildete Zx ausgeschlossen werden.

Für die De-epoxidation des Vx an den CP29-Vx Komplexen stellte sich eine leicht veränderte Situation dar. Im Vergleich zu den anderen Komplexen verlief die Reaktion zum einen viel langsamer und zum anderen koordinierte der Komplex weit aus weniger Carotinoide als die anderen Komplex-Typen. So konnten am de-epoxidierten CP29-Vx nur noch 1.09 Car/ 8 Chl detektiert werden. Damit besaßen die meisten der CP29-Vx Komplexe nach der De-epoxidation nur noch ein Carotinoid, wahrscheinlich an der stabilisierenden L1-Bindestelle. Da auch für den CP29-Vx Komplex keine freie Pigmentbande detektiert worden ist, kann davon ausgegangen werden, dass die De-epoxidation nicht durch den Zerfall der Komplexe ermöglicht worden war. Folgendes Modell wäre für den Ablauf der De-epoxidation am CP29-Vx denkbar: Vx, gebunden an L2, kann mit einer langsamen Kinetik de-epoxidiert werden. Die gebildeten Zx-Moleküle könnten Vx an der L1-Bindestelle ersetzen, das herausgelöste Vx kann wiederum zu Ax und Zx umgesetzt werden, was den langsamen Reaktionsverlauf erklären würde. An rekonstituierten Lhcb1-Komplexen konnte gezeigt werden, dass Zx im Vergleich zu Vx eine höhere Affinität zu den Bindestellen des Komplexes besitzt (Hobe et al. 2000), wodurch das Verdrängen von Vx an L1 durch Zx ermöglicht wäre. Allerdings ist fraglich, ob Affinitätsunterschiede, die während der Rekonstitution des Komplexes von Bedeutung sind, sich auf schon gefaltete Komplexe übertragen lassen. Die Möglichkeit eines Austausches von Zx gegen gebundenes Vx wurde von Morosinotto et al. (2002) für Lhcb5

und Lhca4 untersucht. Allerdings wurde in dieser Studie nach Bindung des Zx ein deutlich erhöhter VAZ-Pool an den Komplexen gemessen, was eher für die unspezifische Assoziation als für den Austausch von Pigmenten spricht. In der hier vorgelegten Studie wurde jedoch nach der De-epoxidation eine Reduktion und nicht die Erhöhung des VAZ-Pools festgestellt, so dass in der Tat ein Austausch von Vx gegen Zx am CP29-Vx Komplex postuliert werden kann. Es ist denkbar, dass in den anderen Komplex-Typen dieser Austausch durch die kompaktere Faltung des Komplexes, bedingt durch die Bindung von mehr als einem Carotinoid pro Monomer, verhindert worden war.

Die *in vitro* De-epoxidation an rekonstituierten CP29-Komplexen ergab eine sehr begrenzte Verfügbarkeit des Vx. Es kann postuliert werden, dass CP29 zwei verschiedene Bindestellen für Vx besitzt. Die eine Bindestelle koordiniert den größten Teil des Vx, der für die De-epoxidation nicht zugänglich ist. Ein kleinerer substöchiometrischer Teil des Vx wird an der zweiten Vx-Bindestelle gebunden und kann sehr leicht de-epoxidiert werden. Das entstandene Zx konnte an die Komplexe zurück gebunden werden.

3.1.3 Isolierung und Charakterisierung nativer PSII-Antennenproteine

Zur Kontrolle der rekonstituierten Antennenkomplexe wurde in dieser Arbeit versucht, die nativen Antennenproteine aus *Nicotiana tabacum* zu isolieren. Hierzu wurden Methoden verwandt, die für die Aufreinigung nativer Antennenkomplexe aus *Spinacia oleracea* und *Zea mays* beschrieben worden waren. Zur Aufreinigung der nativen Antennenproteine wurden aus dunkeladaptierten Tabakpflanzen zuerst Thylakoide und dann PSII-Partikel isoliert. Die PSII-Partikel wurden durch Zugabe von Detergenz solubilisiert und über eine Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 wiedergegeben.

Die PSII-Partikel konnten in sieben Fraktionen separiert werden. Die zu isolierenden Antennenproteine befanden sich in der 2. und 3. Bande von oben als LHC-Monomere, bzw. LHCII-Trimere. Zur weiteren Auftrennung der einzelnen Proteine musste zuerst die Saccharose aus der Probe entfernt werden. Hierzu wurde die aus dem Gradienten geerntete Bande mittels Gelchromatographie gereinigt. Das Eluat wurde solubilisiert und auf ein horizontales IEF-Gel aufgetragen. Die einzelnen Fraktionen wurden entsprechend ihres isoelektrischen Punktes im Bereich zwischen pH 4.37 und pH 4.85 fokussiert. Das Ergebnis ist in Abb. 18 dargestellt. Die resultierenden Banden wurden aus der Gelmatrix eluiert und analysiert.

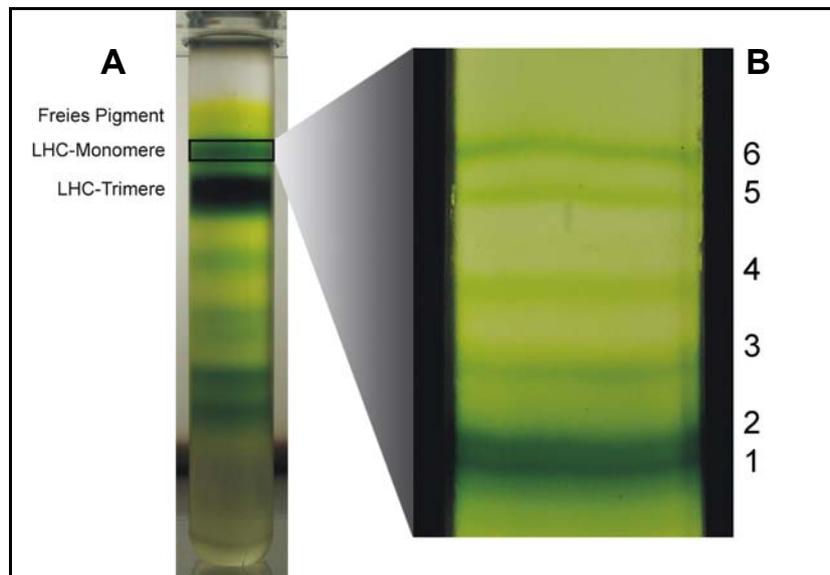


Abbildung 18:

Dichtegradient der solubilisier-
ten PSII-Partikel (A) und IEF-
Gel (B) der solubilisierten LHC-
Bande. Die fokussierten Banden
wurden mit 1-6 zur leichten

Die einzelnen Banden aus der IEF wurden auf ihre Pigmentzusammensetzung untersucht (s. Tab. 11). Hierbei wurde ein Chl a/b-Verhältnis von 1.2 in Nähe der Anode ermittelt, dass mit Annäherung an die Kathode auf 2.8 anstieg. Dagegen fiel das Chl/Car-Verhältnis von 4.7 auf 2.0 ab. Die Analyse der Carotinoide ergab, dass in jeder Bande Lut am häufigsten vertreten war. Der Vx-Gehalt stieg parallel mit dem Chl a/b-Verhältnis an. Nx war in den Banden 1-5 mit ungefähr 10 mol / 100 mol Chl a vertreten. In Bande 6 sank der Wert auf 4.1 mol / 100 mol Chl a.

IEF-Bande	pI	Chl a/b	Chl/Car	Nx	Vx	Lut	Chl b
				[mol /100 mol Chl a]			
1	4.37	1.2	4.7	11.0	1.2	27.4	86.7
2	4.47	1.2	4.7	10.7	1.7	26.6	83.5
3	4.56	1.6	3.3	9.8	8.7	30.5	61.3
4	4.68	2.0	2.7	10.0	12.2	32.9	50.6
5	4.78	2.2	2.5	9.7	15.6	33.3	44.9
6	4.85	2.8	2.0	4.1	17.8	47.9	36.2

Tabelle 11: Pigmentdaten der HPLC-Analysen der einzelnen IEF-Banden sowie die pH-Werte der isoelektrischen Punkte.

Auf Proteinebene ergab sich folgendes Bild für die einzelnen IEF-Banden (vgl. Abb. 19): In Bande 1 und 2 kann vor allem LHCII nachgewiesen werden, ein sehr schwaches Signal erhält man für diese Banden auch mit einem CP26 Antikörper. Bande 3 zeigte ein eindeutiges Signal für CP26 sowie eine sehr schwache Bande mit dem CP24 Antikörper. Die Banden vier und fünf schienen Gemische aus CP26 und CP29 zu sein, wobei in Bande 4 auch noch eine Spur von CP24 zu finden war. Bande 6 zeigte ein eindeutiges Signal für CP29 mit sehr geringer Verunreinigung durch CP26.

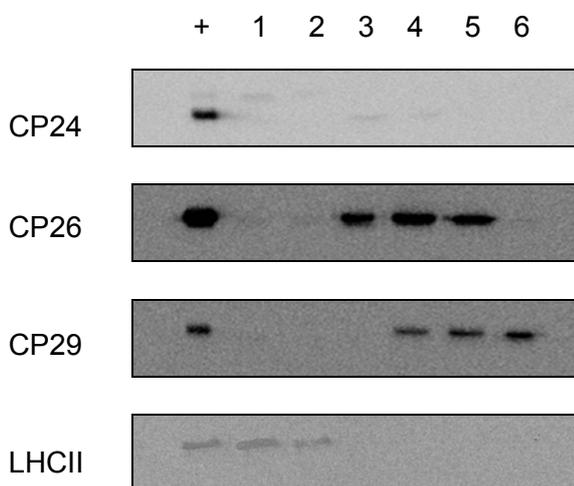


Abbildung 19: Western-Blotanalysen der sechs IEF-Banden mit den jeweiligen Antikörpern. Aufgetragen wurden eine positiv Kontrolle (Thylakoide von *Nicotiana tabacum*) sowie Proben der eluierten IEF-Banden 1-6.

Die Western-Blotanalysen zeigten, dass die minoren Antennenproteine des PSII nur in Bande 3 und 6 in ausreichender Reinheit vertreten waren. Mit diesen Proben wurden spektroskopische Messungen zur weiteren Charakterisierung durchgeführt (s. Abb. 20).

Die Fluoreszenzspektren ergaben für CP26 (Bande 3) eine gute energetische Kopplung der Pigmente. Nach Anregung der Carotinoide (500 nm) und Chlorophylle (440, bzw. 475 nm) wurde nur eine kleine Schulter bei 660 nm in den Emissionsspektren detektiert (Abb. 20).

Sehr viel deutlicher war diese direkte Emission der Energie durch Chl b-Moleküle in der Fraktion, die hauptsächlich CP29 enthielt.

Die Absorptionsspektren beider Proben zeigten ein Maximum in der Soret-Region bei 439 nm. Das zweite Maximum in diesem Bereich erreichte in der CP26-Probe eine Amplitude von circa 90% im Vergleich zum kurzwelligeren Maximum, wohingegen bei der CP29-Probe anstelle eines zweiten Maximums eine sehr deutlich ausgeprägte Schulter aufgenommen wurde. Im langwelligen Bereich des Spektrums wurde ein Maximum bei 674 nm, bzw. CP29 675 nm, aufgezeichnet. Im Anstieg wurde eine Schulter bei ungefähr 640 nm detektiert, die bei CP26 stärker ausfiel als bei CP29.

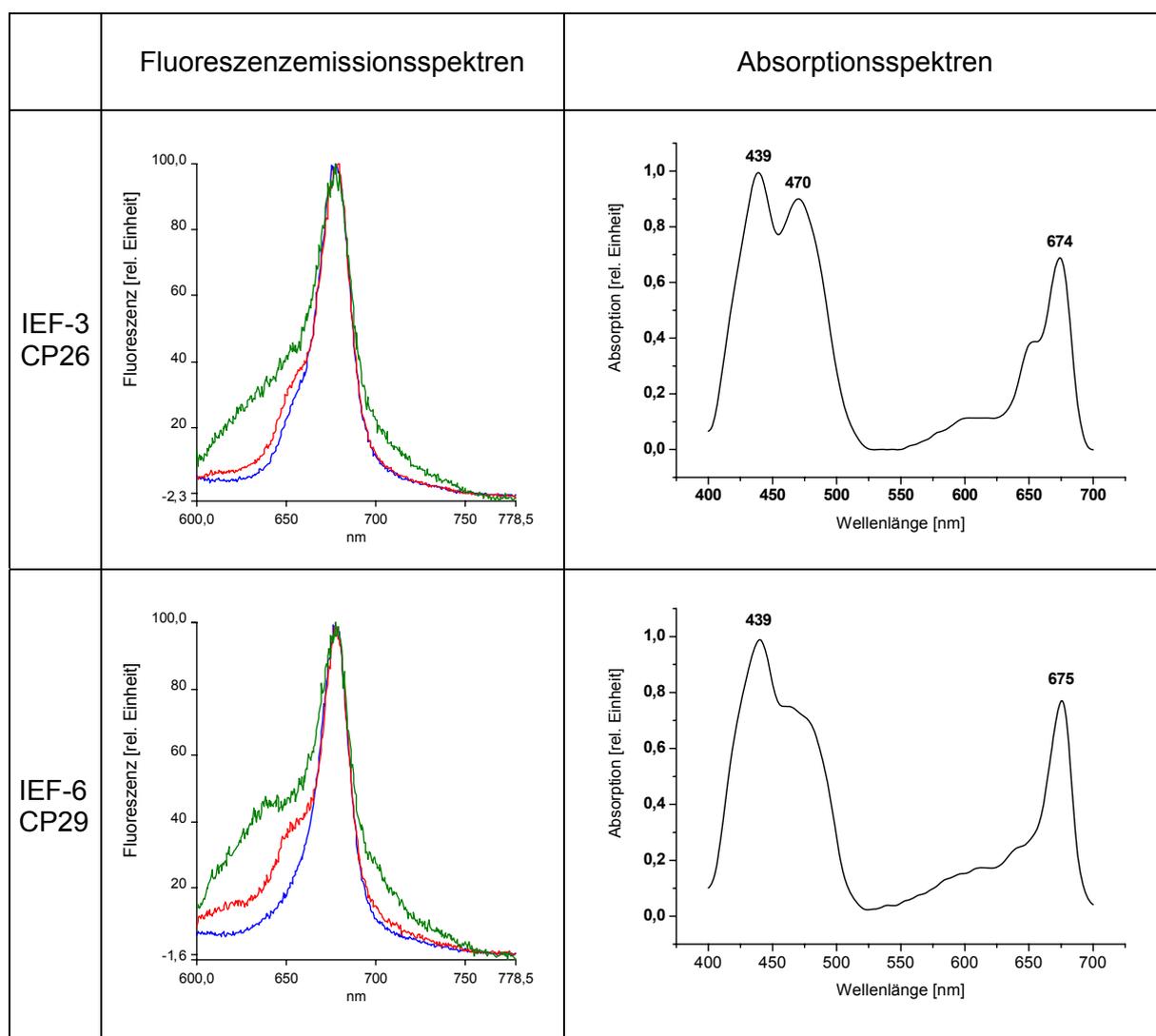


Abbildung 20: Dargestellt sind die Fluoreszenzemissions- und Absorptionsspektren der IEF-Banden 3 und 6. Zur Spektroskopie wurden die Proben entsprechend 1 µg Chl in Spektroskopiepuffer (vgl. Kap. 2.9) aufgenommen und vermessen. Fluoreszenzemissionsspektren: blau = Anregung bei 440 nm, rot = Anregung bei 475 nm, grün = Anregung bei 500 nm. Die Normierung der Fluoreszenzemissionsspektren erfolgte auf 100 im Maximum, die Absorptionsspektren wurden auf 1,0 im Maximum normiert.

Die Charakterisierung der verschiedenen Banden aus der IEF zeigte, dass eine vollständige Aufreinigung der minoren Antennenproteine mit dem verwendeten Verfahren nicht erreicht werden konnte. Die recht eindeutigen Ergebnisse der Western-Blotanalysen ließen vermuten, dass die gesuchten Antennenproteine in Bande 3 (CP26) und Bande 6 (CP29) in relativ hoher Reinheit enthalten waren. Die Pigmentanalysen und Absorptionsspektren deuteten jedoch auf einen unvollständigen Pigmentgehalt der jeweiligen Proteinkomplexe hin. So zeigte die 3. Bande im Vergleich zu anderen Aufreinigungen von CP26 (Das und Frank 2002) ein deutlich reduziertes Chl *a/b*-Verhältnis, was sich auch im Absorptionsspektrum widerspiegelte. In beiden Banden, jedoch besonders ausgeprägt in Bande 6, wurde ein geringeres Chl/Car-Verhältnis detektiert, als zuvor publiziert worden war. Die stöchiometrische Verteilung der unterschiedlichen Carotinoide lag dabei im Rahmen dessen, was für CP26 und CP29 publiziert worden war (Das und Frank 2002). Eine Ausnahme stellte jedoch der sehr niedrige Nx-Gehalt in Bande 6 dar. Da eine Anlagerung freier Pigmente während der verschiedenen Solubilisierungsschritte unwahrscheinlich ist, kann man davon ausgehen, dass verstärkt Chlorophylle aus den Komplexen herausgelöst wurden. Die unzulängliche Pigmentbindung wird auch in den Fluoreszenzemissionsspektren durch den unvollständigen Energietransfer sichtbar.

Größere Mengen des dritten minoren Antennenproteins, CP24, konnten nur durch direkte isoelektrische Fokussierung solubilisierter PSII-Partikel erlangt werden. In diesen Aufreinigungen wurde die Auftrennung über den Dichtegradienten übersprungen, was zur Folge hatte, dass in den Banden der minoren Antennenproteine zusätzlich Lhcb1-3- und D1-Proteine nachgewiesen wurden. Ein ähnliches Ergebnis war nach isoelektrischer Fokussierung solubilisierter Thylakoide von Färber et al. (1997) erzielt worden.

Aufgrund der unvollständigen Aufreinigung der minoren Antennenproteine wurde die De-epoxidation an nativen Komplexen von *Nicotiana tabacum* nicht durchgeführt.

3.1.4 Vergleich der *in vitro* De-epoxidation an rekonstituierten minoren Antennenproteinen von *Nicotiana tabacum* mit der *in vitro* und *in vivo* erzielten De-epoxidation an Antennenproteinen anderer Spezies

Die De-epoxidation von Vx an den rekonstituierten minoren Antennenproteinen von *Nicotiana tabacum* ergab, dass nur ein Teil des gebundenen Pigmentes umgesetzt werden konnte. Zum Vergleich der minoren Antennenproteine untereinander werden im Folgenden nur die Komplexe herangezogen, die in ihrer Pigmentausrüstung den nativen Komplexen entsprechen. In den de-epoxidierten CP24-LV-Komplexen wurde ein DEPS von 0.17 festgestellt, an CP26-LVN und CP29-LVN waren es 0.51 respektive 0.15. Betrachtet man jedoch die Bindung des Zx pro Monomer zeigt sich ein anderes Bild. Pro Komplex konnten am

CP24 0.14, am CP26 0.10 und am CP29 0.11 Moleküle Zx gebunden werden. Diese Zahlen zeigen, dass der DEPS im CP26-Komplex zwar am höchsten war, der absolute Zx-Gehalt bei CP24 jedoch höher war als bei CP26 und 29. Demzufolge ließ sich Vx gebunden an CP26 zwar leichter de-epoxidieren als an CP24 und CP29, dennoch wurde pro Komplex das meiste Zx am CP24 gefunden.

Mit einem ähnlichen experimentellen Ansatz wurde die *in vitro* De-epoxidation an rekonstituierten Lhcb4- und Lhcb5-Komplexen von *Zea mays* untersucht (Morosinotto et al. 2002a). Allerdings unterschieden sich die Arbeit von Morosinotto et al. (2002) und diese Arbeit in ihren Versuchsbedingungen. So wurden die Experimente in der früheren Arbeit bei höherer Temperatur und nur an reinen Vx-Chl-Komplexen durchgeführt. Außerdem handelte es sich bei dem verwendeten Enzym um in *E. coli* überexprimierte VDE, welche eine deutlich geringere Aktivität besitzt als das native Enzym (Hieber et al. 2002). Die geringere Enzymaktivität lässt sich im direkten Vergleich der CP29-Vx Komplexe erkennen. In der hier vorgelegten Arbeit konnte nach 30 Minuten ein DEPS von 0.2 erreicht werden, wohingegen Morosinotto et al. (2002) mit 0.07 weniger als die Hälfte erzielten. Trotz der geringeren De-epoxidation wurde auch an den Komplexen von *Zea mays* am CP26 der höchste DEPS detektiert.

Für die De-epoxidation von nativen Antennenkomplexen wurden in früheren Arbeiten unterschiedliche Ansätze gewählt. Zum einen wurden Antennenkomplexe aus vorbelichteten Blättern isoliert (Ruban et al. 1994, 1999, Morosinotto et al. 2002a), zum anderen wurden erst die isolierten Thylakoide dem Lichtstress ausgesetzt (Ruban et al. 1999, 2002). Die einzelnen Antennenkomplexe konnten in den oben aufgeführten Arbeiten zu einem unterschiedlichen Ausmaß de-epoxidiert werden. So wurden z.B. für native CP29-Komplexe ein DEPS zwischen 0.15 und 0.51 beschrieben (Ruban et al. 1999). Die Abweichungen lassen sich auf unterschiedliche Induktion der De-epoxidation und veränderte Isolationsmethoden zurückführen. Daher ist die direkte Gegenüberstellung der erzielten De-epoxidation an nativen Komplexen vorheriger Publikationen mit den Ergebnissen der rekonstituierten Komplexe in dieser Arbeit nicht sinnvoll. Allerdings ist in allen De-epoxidationen die gleiche Tendenz zu erkennen: Im Vergleich der De-epoxidationszustände der verschiedenen minoren Antennenproteine zeigte jeweils der CP26-Komplex den höchsten und CP29 den niedrigsten DEPS.

3.2 Antennenproteine des PSI

3.2.1 Charakterisierung rekonstituierter Lhca-Proteine

a) Pigmentanalysen

Die Rekonstitution der heterolog exprimierten Apoproteine Lhca1-4 von *Lycopersicon esculentum* erfolgte ausschließlich mit Pigmentmischungen bestehend aus Lut, Vx, Chl a und Chl b. In Tabelle 12 sind die Pigmentanalysen der rekonstituierten Komplexe im Vergleich mit Komplexen aus vorherigen Rekonstitutionen, bei denen Pigment-Totalextrakte von Thylakoiden verwendet worden waren (Schmid et al. 2002), aufgeführt. In der Tabelle werden sowohl die einzelnen Carotinoide als auch die Summe aller Carotinoide auf 12 Chlorophylle bezogen. Diese Chlorophyllanzahl beruht auf Kristallstrukturanalysen des PSI-Holo Komplexes von *Pisum sativum* (Ben-Shem et al. 2003), die durchschnittlich 12 Chlorophylle pro Lhca-Monomer ergaben.

Protein	Pigmentangebot	Chl a/b	Car	Nx	Lut	Vx	β-Car
		pro 12 Chl					
Lhca1	Total	3.48	2.41	0.34	1.71	0.30	0.05
	Lut/Vx	3.05	2.49	—	1.68	0.81	—
Lhca2	Total	2.28	2.06	0.12	1.67	0.22	0.05
	Lut/Vx	2.54	2.14	—	1.57	0.58	—
Lhca3	Total	6.14	3.10	0.36	2.23	0.31	0.20
	Lut/Vx	5.17	3.39	—	2.51	0.88	—
Lhca4	Total	2.59	1.96	0.14	1.56	0.20	0.05
	Lut/Vx	2.49	2.12	—	1.66	0.46	—

Tabelle 12: Pigmentanalysen der rekonstituierten Proteine Lhca1-4.

Die Proteine wurden entweder mit einem Pigmenttotalextrakt aus Thylakoiden von *Lycopersicon esculentum* (Total) oder einem Pigmentgemisch aus zuvor isolierten Pigmenten rekonstituiert (Lut/Vx). Verwendet wurden jeweils 167 µg des entsprechenden Proteins. Der Pigmentextrakt enthielt jeweils 200 µg Chl (a+b). In den Lut/Vx-Ansätzen wurden die Pigmente in folgenden Stöchiometrien verwendet: Chl a/b = 3 und Chl/Car = 6:1, wobei Lut und Vx zu gleichen Teilen vertreten waren. Im Anschluss an die Rekonstitution wurden die Komplexe über einen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt, die Pigmente der resultierenden Banden mit sec-Butanol extrahiert und mittels HPLC analysiert. Die Angaben sind Mittelwerte aus 6-10 unabhängigen Rekonstitutionen (SD < ± 12%).

Die Pigmentanalysen zeigten, dass durch die fehlenden Pigmente Nx und β -Carotin das Rekonstitutionsverhalten der jeweiligen Apoproteine nicht wesentlich beeinflusst wurde. Es konnten unabhängig vom Pigmentangebot Holokomplexe mit vergleichbaren Chl a/b- sowie Car/Chl-Verhältnissen erzielt werden, dabei wurden Nx und β -Car durch Vx ersetzt. Allerdings ergaben sich zwischen den vier Lhca-Proteinen deutliche Unterschiede. So betrug das Chl a/b-Verhältnis circa 2.5 in den Lhca2 Komplexen und war in den Lhca3 Komplexen größer als 5. Auch die Anzahl der gebundenen Carotinoide pro Monomer variierte: An die rekombinanten Lhca2 und Lhca4 Proteine konnten pro Komplex je zwei Carotinoide gebunden werden. An den Lhca1 Proteinen waren es dagegen zwei oder drei und die Lhca3 Proteine koordinierten sogar mindestens drei Carotinoide pro Monomer. Das reduzierte Pigmentangebot in den Lut/Vx-Rekonstitutionen (es fehlten Nx und β -Carotin) bewirkte eine veränderte Carotinoidzusammensetzung an den Komplexen. Im Vergleich zu den Rekonstitutionen mit vollständigem Pigmentangebot wurde in den LV-Komplexen verstärkt Vx gebunden, wohingegen der Gehalt an Lut nahezu unverändert blieb. Somit konnte in den Lhca2-LV und Lhca4-LV-Komplexen ein halbes Vx, in Lhca3-LV und Lhca1-LV dagegen knapp ein Vx pro Monomer gebunden werden.

Das beschriebene Bindungsverhalten deutet daraufhin, dass die verschiedenen β - β -Carotinoide (Nx, Vx, β -Car) sich in ihren Affinitäten zu den jeweiligen Bindestellen an den Lhca-Proteinen kaum unterscheiden. Als Indiz für die unspezifischen Affinitäten kann auch die Bindung von Nx an die rekombinanten Lhca-Proteine gewertet werden. Obwohl Nx an nativen LHCI-Komplexen bisher nicht nachgewiesen wurde (Schmid et al. 1997, Croce et al. 2002b), konnte es durch *in vitro* Rekonstitutionen an Lhca1-4 gebunden werden (Schmid et al. 2002). Somit schien für die Rekonstitution funktioneller LHCI-Komplexe das Verhältnis von gebundenen β - β -Carotinoiden zu β - ϵ -Carotinoiden (Lut) entscheidender zu sein als die Bindung der einzelnen Pigmente. Entsprechend dieser These konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass durch das Fehlen von Lut im Rekonstitutionsansatz die Ausbeute an Lhca1-, Lhca3-, Lhca4-Holokomplexen stark reduziert wurde (Schmid et al. 2002).

b) Spektroskopische Charakterisierung

Die Funktionalität der aus den Dichtegradienten isolierten Komplexe wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Es wurden 77-K-Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen, die in Abb. 21 wiedergegeben sind. Die Komplexe wurden bei zwei verschiedenen Wellenlängen angeregt (410 nm = Anregung der Chl a-Moleküle und 470 nm = Anregung der Chl b-Moleküle). Auffällig sind die Emissionsspektren nach Anregung mit 470 nm. Dabei zeigten alle Spektren ein Chl b-Emissionspeak bei 650 nm, was auf unvollständigen Energietransfer von Chl b auf Chl a hindeutet. Dieses war bei Lhca3 am deutlichsten, wohingegen es bei Lhca1 und Lhca2 kaum von Bedeutung war. In den beiden zuletzt genannten Komplexen wurde die Energie hauptsächlich bei 690 nm emittiert. Bei Lhca3 und

Lhca4 wurde zusätzlich ein langwelliges Emissionsmaximum bei 720, bzw. 730 nm gefunden. Am Lhca4 wurde der größte Teil der Energie im langwelligeren Bereich emittiert.

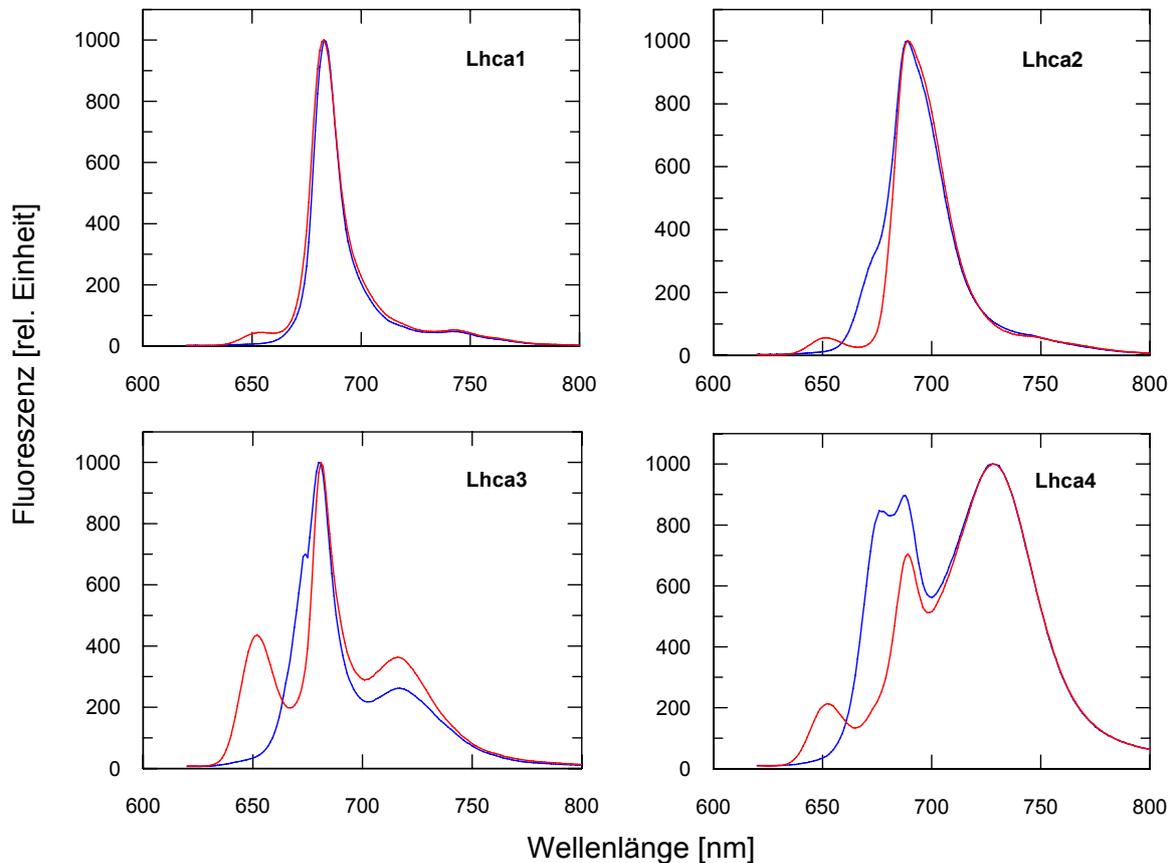


Abbildung 21 : 77 K-Fluoreszenzemissionsspektren der rekonstituierten Lhca-LV-Komplexe. Die Anregung erfolgte bei 410 (blau) und 470 (rot) nm. Die Fluoreszenzemissionsspektren wurden in Mainz von Frau Dr. S. Storf (AG Schmid) aufgenommen, die Maxima wurden auf 1000 normiert.

Die Emissionsspektren der LV-Komplexe entsprechen in ihren Charakteristika den Emissionsspektren der entsprechenden Lhca-Proteine von *Lycopersicon esculentum* mit vollständiger Pigmentausstattung (Schmid et al. 1997, Schmid et al. 2002 sowie nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe von PD Dr. Volkmar Schmid). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass trotz des eingeschränkten Pigmentangebotes funktionsfähige Holokomplexe rekonstituiert worden waren, die zur *in vitro* De-epoxidation eingesetzt werden konnten.

3.2.2 Belegung der Carotinoidbindestellen in den rekonstituierten Lhca-Komplexen

Die Analyse der Kristallstruktur des nativen PSI-Komplexes von *Pisum sativum* ergab durchschnittlich 12 gebundene Chlorophylle pro Lhca-Monomer (Ben-Shem et al. 2003). Bezogen auf 12 Chlorophylle wurden in dieser Arbeit 2-3 Carotinoide pro rekonstituiertem Lhca-Protein gebunden (vgl. Tab. 12). Aufgrund der hohen Sequenzhomologien zwischen den einzelnen Antennenproteinen der beiden Photosysteme (Jansson 1994, Pichersky und Jansson 1996, Jansson 1999) werden für die Bindung der Carotinoide an LHCI-Proteine die vier bekannten Carotinoidbindestellen L1, L2, N1 und V1 des LHCII (Liu et al. 2004) postuliert (Croce et al. 2002b, Schmid et al. 2002, Casteletti et al. 2003, Morosinotto et al. 2003). In den Pigmentanalysen wurde an allen rekonstituierten Lhca-Monomeren mehr als ein Molekül Lut pro Komplex detektiert. Zusammen mit der Beobachtung, dass ohne Lut (mit Ausnahme des Lhca2-Proteins) keine stabilen Lhca-Komplexe rekonstituiert werden können (Schmid et al. 2002), legt dies die Vermutung nahe, dass Lut in allen LHCI-Komplexen die stabilisierende Funktion an L1 übernimmt. Die Belegung der L1-Bindestelle mit Lut wird durch Rekonstitutionsstudien an Mutanten von Lhca1 und Lhca4 unterstützt, in denen gezeigt wurde, dass bei fehlender L2-Bindestelle monomere Komplexe gebildet werden können (Rupprecht et al. 2000). Im Gegensatz dazu bestätigen Morosinotto et al. (2002) zwar die höchste Affinität von Lut zu der L1-Bindestelle, vermuteten aber, aufgrund von Mutationsstudien am Lhca1, die stabilisierende und schützende Funktion des Lut nicht an der L1-Bindestelle sondern eher an L2. Im Unterschied zu den Lhcb-Proteinen, bei denen die stabilisierende Funktion der Luteine an L1 von Vx und Zx übernommen werden kann (u.a. Croce et al. 1999a, Hobe et al. 2000, Frank et al. 2001, Gastaldelli et al. 2003), scheint für die Rekonstitution stabiler Lhca-Proteine Lut allerdings essentiell zu sein (Schmid et al. 2002).

Am **Lhca1-Komplex** wurden insgesamt 2.5 Carotinoide gebunden. Theoretisch verfügen die Lhca1-Holokomplexe somit über 2 oder 3 Carotinoide. Abzüglich des einen Moleküls Lut an L1 verbleiben folglich 0.7 Moleküle Lut und 0.8 Moleküle Vx zur Bindung an L2 und die peripheren Bindestellen N1 und V1. Da Lut eine hohe Affinität zu den zentralen Bindestellen besitzt (Croce et al. 1999a, Hobe et al. 2000), ist anzunehmen, dass in den Komplexen mit 3 Carotinoiden Lut an L1 und L2, Vx dagegen an eine der peripheren Bindestellen gebunden wird. In Komplexen mit 2 Carotinoiden sollten sowohl Lut als auch Vx an L2 binden (s. Tab. 13). Vergleichbare Vermutungen zur Verteilung der Pigmente auf die Bindestellen L1, L2 und N1 wurden auch von Morosinotto et al. (2002b) aufgrund von Mutationsstudien am Lhca1-Protein angestellt.

Am **Lhca2-Protein** wurden nach der Rekonstitution mit Lut und Vx 2 Carotinoide pro Komplex detektiert. Lut machte dabei 73%, Vx 27% der Carotinoide aus. Die Verteilung der Pigmente auf die putativen Carotinoidbindestellen ergibt Lut an L1 und entweder Lut oder Vx, mit ähnlicher Affinität zur Bindestelle, an L2 (vgl. Tab. 13). Ein entsprechendes Bild ergab die Rekonstitution des rekombinanten **Lhca4-Proteins**. Auch hier wurden 2 Carotinoide

pro Komplex, im vergleichbaren stöchiometrischen Verhältnis wie beim Lhca2, gefunden (s. Tab. 13). Für die rekombinanten Lhca2- und Lhca4-Proteine von *Arabidopsis thaliana* wurde ebenfalls die Belegung der L1-Bindestelle mit Lut und L2 mit Lut oder Vx postuliert (Croce et al. 2002b, Casteletti et al. 2003).

Die Pigmentanalysen der **Lhca3-Komplexe** ergaben 3 Carotinoide pro Monomer. Die gebundenen Carotinoide bestanden zu 74% aus Lut und zu 26% aus Vx. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die zentralen Carotinoidbindestellen L1 und L2 mit Lut belegt sind. Wohingegen für die Bindung des Vx sowohl die N1 als auch die V1-Bindestelle in Frage kommen. Castelletti et al. (2003) vermuten aufgrund von spektroskopischen Untersuchungen am Lhca3-Komplex von *Arabidopsis thaliana* die Bindung des Vx an V1. Die Sequenzhomologien zwischen den gleichen Antennenproteinen verschiedener Spezies (Jansson 1994) erlauben die Übernahme dieser Beobachtung, so dass, auch für den Lhca3-Komplex von *Lycopersicon esculentum* von einer Vx Bindung an V1 ausgegangen werden kann. Für Lut wurde ebenfalls eine geringe Affinität zur V1-Bindestelle beschrieben (Caffarri et al. 2001). Es ist daher wahrscheinlich, dass ebenfalls Lhca3-Komplexe mit 3 Lut existieren. Aufgrund der stöchiometrischen Verteilung der Carotinoide ist somit anzunehmen, dass nach den LV-Rekonstitutionen jeder vierte Lhca3-Komplex 3 Moleküle Lut enthält (vgl. Tab. 13). Eine geringfügige Belegung der V1-Bindestelle mit Lut wurde ebenfalls für die Lhca3-Komplexe von *Arabidopsis thaliana* postuliert (Castelletti et al. 2003, Morosinotto et al. 2003). Zur besseren Übersicht werden die vorangegangenen Überlegungen noch einmal tabellarisch wiedergeben:

Lhca1	50%	25%	25%
L1	Lut	Lut	Lut
L2	Lut	Lut	Vx
N1 oder V1	Vx	—	—
Lhca2	50%	50%	
L1	Lut	Lut	
L2	Lut	Vx	
Lhca3	75%	25%	
L1	Lut	Lut	
L2	Lut	Lut	
V1	Vx	Lut	
Lhca4	50%	50%	
L1	Lut	Lut	
L2	Lut	Vx	

Tabelle 13: Theoretische Verteilung der Carotinoide auf die Bindestellen in den Lhca-Komplexen. Nur grün markiertes Vx sollte für die De-epoxidation zugänglich sein, rot markiertes Vx dagegen nicht. Die Prozentangaben in der Tabelle entsprechen dem Vorkommen der jeweiligen Komplexvariante in der rekonstituierten Probe.

3.2.3 De-epoxidation rekonstituierter Lhca-Proteine

Die *in vitro* De-epoxidation wurde an LHCI-Komplexen gemessen, die mit Chlorophyllen, Lut und Vx rekonstituiert worden waren. Die Reaktionsbedingungen ermöglichten eine vollständige De-epoxidation von freiem Vx innerhalb von 30 Minuten (Abb. 22 A).

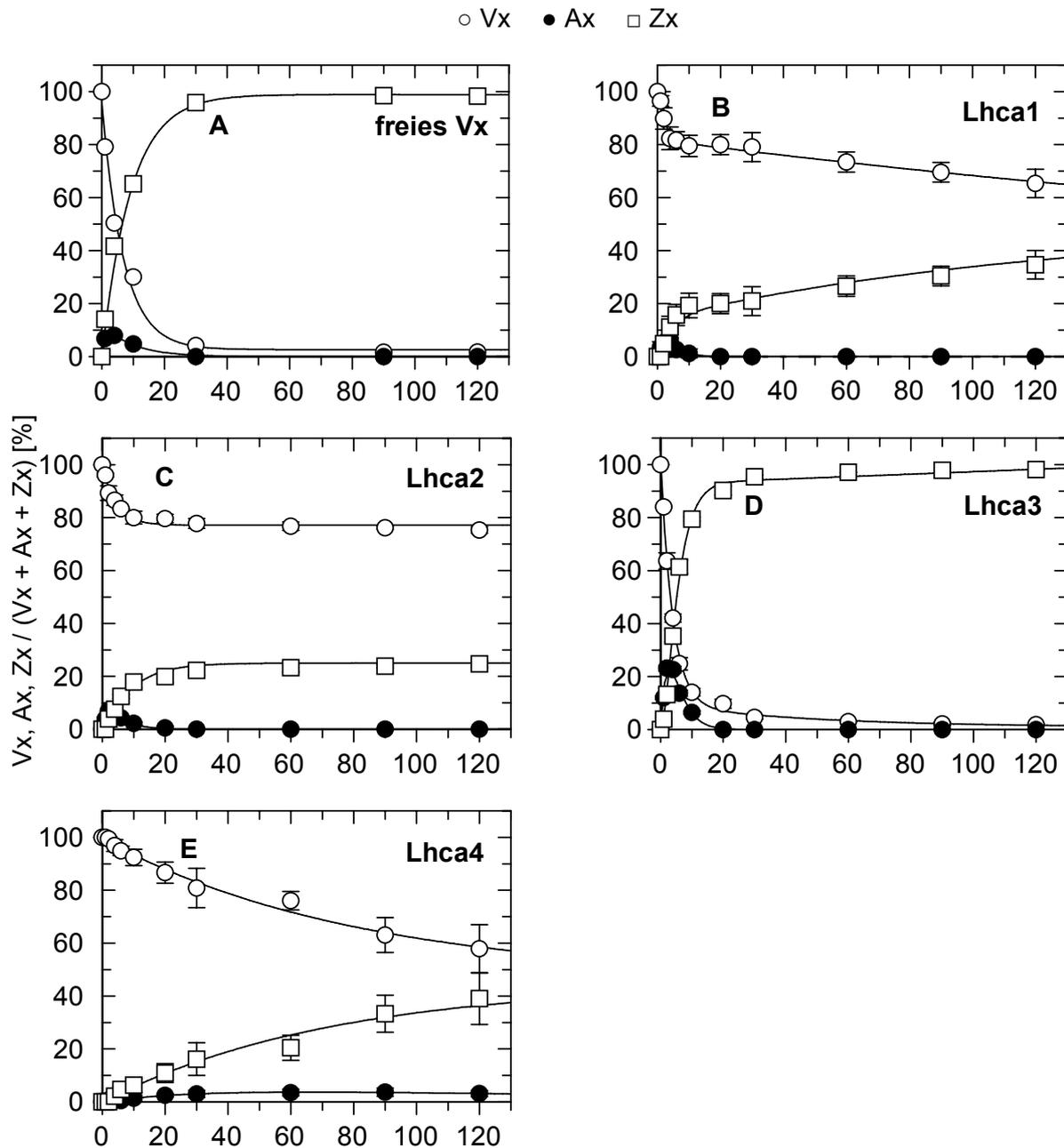


Abbildung 22: *In vitro* De-epoxidation an rekonstituierten Lhca1-4 Komplexen. Die Bedingungen für die *in vitro* De-epoxidation an den Lhca1-4 Komplexen entsprechen den Angaben in der Legende zu Abbildung 13. Die präsentierten Daten sind Mittelwerte (\pm S.D.) aus drei unabhängigen Experimenten.

Am **Lhca3-Protein** wurde das gebundene Vx sehr schnell und vollständig zu Zx de-epoxidiert (s. Abb. 22D). Der Reaktionsverlauf ähnelte der De-epoxidation von freiem Vx, die Reaktionsgeschwindigkeit war jedoch höher als bei freiem Vx. So wurden bei der De-epoxidation von freiem Vx nach 10 Minuten noch 30% Vx/VAZ gemessen, am Lhca3 waren es dagegen nur noch 15% Vx/VAZ. Für den Lhca3-Komplex wurde die Bindung des Vx an die V1-Bindestelle postuliert. Die V1-Bindestelle wird als lockere Bindestelle zwischen den einzelnen Monomeren im trimeren LHCII-Komplex beschrieben (Caffarri et al. 2001, Liu et al. 2004, Standfuß et al. 2005). Die geringe Affinität des Pigmentes zur Bindestelle und die exponierte Lage der V1-Bindestelle sollten ein leichtes Ablösen des Substrates und somit einen schnellen Umsatz durch das Enzym so, wie es am Lhca3 beobachtet worden war, ermöglichen. Die geringe Affinität der V1-Bindestelle zu den VAZ-Pigmenten zeigte sich ebenfalls im Lut/VAZ-Verhältnis (vgl. Tab. 14) der de-epoxidierten Proben. Dieser Quotient war im Vergleich der de-epoxidierten mit den epoxidierten Lhca3-Komplexen um den Faktor 2.5 erhöht. Dabei ist jedoch zu beachten, dass anhand der starken freien Pigmentbande nach Auftrennung der de-epoxidierten Proben eine große Instabilität des Lhca3-Komplexes abzulesen war. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass ein Großteil des umgesetzten Pigmentes aus zerfallenen Lhca3-Komplexen stammte. Für die V1-Bindestelle sind jedoch keine stabilisierenden Eigenschaften innerhalb des monomeren Komplexes beschrieben. Die vollständige De-epoxidation des Vx am Lhca3 wird daher allein durch die geringe Affinität, unabhängig von der Stabilität des Komplexes, ermöglicht worden sein. Als Beleg hierfür kann auch der vergleichbare DEPS in der freien Pigmentbande und der de-epoxidierten Komplex-Bande gewertet werden (vgl. Tab. 14).

Eine sehr schnelle De-epoxidation zu Beginn der Reaktion wurde auch am **Lhca2** (Abb. 22C) detektiert. Allerdings waren hier nur 20% des Vx für die De-epoxidation verfügbar, so dass die Reaktion schon nach 10 Minuten abgeschlossen war. Am Lhca2 wurde die Bindung des Vx an L2 postuliert. Aufgrund der De-epoxidationsexperimente am Lhcb1-Protein wurde für Vx an L2 eine langsame De-epoxidation erwartet. Im Gegensatz dazu zeigte sich am Lhca2 jedoch ein gänzlich unterschiedlicher De-epoxidationsverlauf. Der schnelle und limitierte Umsatz des Vx lassen daher vermuten, dass 20% des Vx nicht an L2 gebunden wurden, sondern mit N1 oder V1 assoziiert waren. An einer dieser peripheren Bindestellen wäre Vx leicht für den enzymatischen Umsatz verfügbar. Die restlichen 80% des Vx-Pools können zwar an L2 vermutet werden, besitzen aber am Lhca2 eine sehr hohe Affinität zur Bindestelle, so dass keine De-epoxidation erfolgte.

Am **Lhca1** Komplex (vgl. Abb. 22B) wurde eine zweiphasige De-epoxidationsreaktion gemessen. Innerhalb der ersten fünf Minuten wurden, ähnlich wie beim Lhca2, circa 20% des Vx sehr schnell de-epoxidiert. In der zweiten langsameren Phase, die in der zweistündigen Inkubationszeit die Sättigung nicht erreichte, konnten noch weitere 15% des Vx abgebaut werden. Die theoretischen Überlegungen zur Verteilung des Vx auf die verschiedenen

Carotinoidbindestellen am Lhca1 legten die Vermutung nahe, dass 66% des Vx an einer peripheren und 33% an der L2-Bindestelle gebunden waren. Demzufolge wären 66% des Vx mit einer schnellen und 33% mit einer langsamen Reaktion de-epoxidierbar. Der Verlauf der *in vitro* De-epoxidation ergab aber nur einen Anteil von 20% des Vx, der mit einer schnellen Reaktion, vergleichbar mit den Reaktionen am Lhca2 und Lhca3, zu Zx umgesetzt werden konnte. Daher kann postuliert werden, dass nur 20% des Vx am Lhca1 an eine der peripheren Carotinoidbindestellen gebunden waren, von wo aus sie schnell de-epoxidiert werden konnten. Die restlichen 80% müssten demnach mit einer der internen Bindestellen, vorzugsweise der L2-Bindestelle, assoziiert gewesen sein. Im Gegensatz zu den Experimenten an den Lhca2-Komplexen war Vx an L2 jedoch in den Lhca1-Komplexen für die De-epoxidation zugänglich. Die Reaktion erfolgte langsam, so wie sie für Vx an L2 beschrieben worden war (Jahns et al. 2001), allerdings konnten nur 15% der vermeintlichen 80% des Vx an L2 zu Zx umgesetzt werden.

Der De-epoxidationsreaktion am **Lhca4** (Abb. 22E) fehlte die erste schnelle Phase, wie sie zuvor für die drei vorherigen Lhca-Komplexe beschrieben worden ist. Die schnelle De-epoxidation wurde von Jahns et al. (2001) am Lhcb1-Protein einer peripheren Bindestelle zugeordnet, wohingegen die Bindung an die interne L2-Bindestelle zu einer langsameren De-epoxidation führte. Demnach schien das Lhca4-Protein im Gegensatz zu den anderen Lhca-Proteinen kein Vx an einer der peripheren Bindestellen zu koordinieren. Die interne L2-Bindestelle war zuvor für die Bindung des Vx an das Lhca4-Apoprotein postuliert worden (vgl. Tab. 13). Entsprechend dieser Vorhersage wurde eine langsame De-epoxidation des Vx zu Zx erwartet, die in der Tat zu beobachten war. Die Reaktion war nach zwei Stunden noch nicht abgeschlossen, so dass der erzielte Wert von 40% Zx/VAZ noch nicht den Endpunkt der Reaktion widerspiegelt. Dies spricht für eine langsame aber vollständige Verfügbarkeit des Vx am Lhca4 so, wie es für die L2-Bindestelle beschrieben wurde (Jahns et al. 2001).

Die *in vitro* De-epoxidation an rekonstituierten Lhca1- und Lhca4-Proteinen wurde ebenfalls von Morosinotto et al. (2002a) an Komplexen von *Arabidopsis thaliana* untersucht. Diese Studie von lieferte vergleichbare Resultate, wie in der vorliegenden Arbeit. So war Vx sowohl in den Komplexen von *L. esculentum* als auch in denen von *A. thaliana* am Lhca4 leichter für die De-epoxidation zugänglich als am Lhca1.

Zusammenfassend zeigte die De-epoxidation an den rekonstituierten Lhca-Proteinen eine schnelle Phase innerhalb der ersten 10 Minuten (bei Lhca1, Lhca2 und Lhca3) und eine zweite langsamere Phase (bei Lhca1 und Lhca4), die in den *in vitro* Experimenten innerhalb der 120 Minuten Reaktionszeit noch nicht abgeschlossen war. Die schnelle Reaktion kann den peripheren Bindestellen und die langsamere der L2-Bindestelle zugeordnet werden. Dabei muss beachtet werden, dass sich die De-epoxidationsreaktionen nicht nur in Bezug auf die Bindestellen unterscheiden, sondern auch von den einzelnen Proteinen abhängen.

Die Verfügbarkeit des Substrates für das Enzym ist somit nicht nur von der Lage der Bindestelle im Komplex sondern auch vom LHC-Protein abhängig.

Nach der De-epoxidation wurden die Komplexe erneut aufgetrennt und mittels HPLC auf ihre Pigmentgehalte analysiert. Die Daten aus den Pigmentanalysen, sind in Tab. 14 aufgeführt. Die freie Pigmentphase der Gradienten enthielt weniger als 20% der aufgetragenen Gesamtpigmente. Eine Ausnahme bildete der Lhca3. Bei diesem Komplex lag der Großteil der Pigmente in der freien Pigmentbande vor. Der Lhca3-Komplex schien demnach, wie schon zuvor erwähnt, instabiler zu sein als die anderen *in vitro* rekonstituierten Lhca-Komplexe. Im Vergleich zur Monomer-Bande besaß die freie Pigmentbande einen höheren DEPS und ein geringeres Chl/Car- sowie Lut/VAZ-Verhältnis. Dies deutet auf eine Freisetzung von Carotinoiden insbesondere von Zx hin.

Probe		Chl a/b	Chl/Car	Lut/Chl	Lut/VAZ	DEPS	Volumen [%]
Lhca1	epoxidiert	2.86	4.60	0.16	2.70	0.00	—
	FP + VDE	2.92	3.29	0.24	3.16	0.85	10
	deepoxidiert + VDE	2.97	4.09	0.16	2.01	0.27	90
Lhca2	epoxidiert	3.21	5.76	0.13	2.63	0.00	—
	FP + VDE	3.53	2.37	0.24	1.32	0.66	10
	de-epoxidiert + VDE	2.18	4.95	0.14	2.01	0.18	90
Lhca3	epoxidiert	4.64	3.46	0.20	2.13	0.00	—
	FP + VDE	2.88	1.58	0.40	1.90	0.89	65
	de-epoxidiert + VDE	4.41	2.77	0.33	5.37	0.87	35
Lhca4	epoxidiert	3.04	6.02	0.13	3.57	0.00	—
	FP + VDE	3.11	2.81	0.23	1.62	0.67	20
	de-epoxidiert + VDE	2.38	5.36	0.16	5.77	0.36	80

Tabelle 14: Pigmentgehalte vor und nach der De-epoxidation an Lhca1-4-Komplexen. Die Abweichungen in den Stöchiometrien der epoxidierten Komplexe im Vergleich zu den Angaben aus Tab. 12 sind durch Pigmentverluste während eines zusätzlichen Aufkonzentrierungsschrittes im Anschluss an die Rekonstitution zu erklären. Dieses war notwendig, da die Lhca-Komplexe nach der Rekonstitution nicht in der für die De-epoxidation notwendigen Konzentration vorlagen. Alle Daten sind Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen, deren SD nicht größer als 15% waren.

Der Vergleich der Monomere im jeweils epoxidierten und de-epoxidierten Zustand ergab unterschiedliche Ergebnisse für die einzelnen Lhca-Komplexe. Am **Lhca1** wurde nach der De-epoxidation ein geringfügig erhöhtes Chl a/b-Verhältnis festgestellt, parallel dazu wurden das Chl/Car- und das Lut/VAZ-Verhältnis gesenkt. Bei einem gleichzeitig unveränderten Lut/Chl-Verhältnis kann demzufolge darauf geschlossen werden, dass es während der De-epoxidation zu einem Verlust von Chlorophyllen, insbesondere Chl b, und Lut gekommen war. Am **Lhca2** bewirkte die De-epoxidation ein Sinken des Chl a/b-, des Chl/Car- und des Lut/VAZ-Verhältnisses, wobei das Lut/Chl-Verhältnis nahezu stabil blieb. Diese Beobachtungen lassen vermuten,

dass das De-epoxidationsexperiment am Lhca2 den Verlust von Chl a- und Lutein-Molekülen zur Folge hatte. Sowohl beim Lhca1 als auch beim Lhca2 war jedoch der Pigmentgehalt in der freien Pigmentphase nicht größer als 10%, was für die Stabilität der Komplexe spricht. Hierbei ist hervorzuheben, dass an diesen beiden Lhca-Komplexen auch nur eine geringe *in vitro* De-epoxidation induziert werden konnte (vgl. Abb. 22).

An den de-epoxidierten **Lhca4**-Komplexen wurden geringere Chl a/b- und Chl/Car-Verhältnisse gemessen als in der epoxidierten Form. Dies verweist auf den Verlust von Chl a-Molekülen, der entweder während der De-epoxidation oder der anschließenden Auftrennung erfolgte und sich auch im gesteigerten Lut/Chl-Verhältnis widerspiegelt. Das Chl a/b-Verhältnis des **Lhca3** blieb dagegen nahezu konstant, wobei das Chl/Car-Verhältnis jedoch reduziert wurde. Demzufolge wurden am Lhca3 zu gleichen Teilen Chl a und b Moleküle aus den Komplexen herausgelöst. Das Lut/VAZ-Verhältnis wurde dagegen sowohl am Lhca3 als auch am Lhca4 drastisch erhöht. An diesen Komplexen konnten auch die höchsten De-epoxidationszustände erzielt werden. Folglich führte die De-epoxidation des Vx zur deutlichen Reduktion des VAZ-Pools an Lhca3 und Lhca4. In beiden Komplex-Typen konnten nach der De-epoxidation nur noch knapp die Hälfte der zuvor Vx bindenden Komplexe VAZ-Pigmente koordinieren.

In Bezug auf die Zx Bindung der de-epoxidierten Komplexe ist festzustellen, dass in allen vier Lhca-Komplexen der DEPS nur geringfügig niedriger war als der DEPS des Gesamtextraktes nach Ablauf der Reaktionszeit. Somit konnte das gebildete Zx entsprechend der Pigmentverhältnisse in der Probe an die Lhca-Proteine zurück gebunden werden. Mit Ausnahme des Lhca3-Komplexes lag daher in allen Lhca-Komplexen der überwiegende Teil des Zx nach der De-epoxidation komplex-gebunden vor.

Vergleicht man das De-epoxidationsverhalten der rekonstituierten Lhca-Monomere mit dem ihrer Partner in den nativen LHCI-Dimeren (LHCI-730 = Lhca1 und Lhca4; LHCI-680 = Lhca2 und Lhca3) fällt auf, dass sich bei jeweils einem der rekonstituierten Komplexe *in vitro* eine gute Verfügbarkeit des Vx für die De-epoxidation zeigte, wohingegen die Reaktion am „Partner“-Protein stark limitiert war. Photoprotektive Eigenschaften würde demnach im LHCI-680 von Lhca3 und im LHCI-730 von Lhca4 übernommen werden. In Übereinstimmung zu dieser Hypothese wird vermutet, dass der Energietransfer im PSI von der Antenne zum Reaktionszentrum über Lhca3 oder Lhca4 stattfindet (Schmid et al. 2000). Darüber hinaus konnte an rekonstituierten Lhca4-Komplexen gezeigt werden, dass *in vitro* unter Bildung von Carotinoid-Triplett-Zuständen die Löschung von $^3\text{Chl}^*$ induziert werden konnte (Carbonera et al. 2005). Diese Beobachtungen untermauern die aufgrund der De-epoxidationsergebnisse aufgestellte Vermutung, dass die Lhca3- und Lhca4-Komplexe eine Schlüsselrolle am PSI in der Regulation des Energietransfers zwischen Antenne und Reaktionszentrum einnehmen.

3.2.4 Charakterisierung nativer LHCI-Komplexe

Zur Überprüfung der *in vitro* erzielten De-epoxidationen an rekonstituierten Antennenkomplexen des PSI wurden native LHCI-Komplexe isoliert und ebenfalls mit Hilfe des *in vitro* Ansatzes de-epoxidiert. Darüber hinaus sollte die De-epoxidation unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen verglichen werden. Hierzu wurden ganze Blätter belichtet und erst im Anschluss die Antennenproteine isoliert. Im Folgenden werden zuerst die isolierten Komplexe charakterisiert und anschließend der Verlauf der De-epoxidationen an den verschiedenen Komplexen vorgestellt.

a) Pigmentanalysen

Zur Isolierung nativer LHCI-Komplexe wurden zunächst Thylakoide aus Tomatenblättern präpariert und in mehreren Solubilisierungsschritten die LHCI-Komplexe herausgelöst. Die Daten aus den Pigmentanalysen der im letzten Schritt gewonnenen Komplexe sind in Tabelle 15 dargestellt.

Die LHCI-Komplexe unterschieden sich sowohl in der Anzahl der gebundenen VAZ-Pigmente als auch in ihrem Chl a/b-Verhältnis kaum voneinander. Allein der Gehalt an Lut und β -Carotin schien im LHCI-680 Komplex höher zu sein als beim LHCI-730. Die Pigmentstöchiometrien der nativen Komplexe weichen leicht von dem ab, was aufgrund der Summe der rekonstituierten Einzelproteine für die Dimere erwartet werden konnte. Diese Abweichungen sind durch die unterschiedlichen Aufreinigungsbedingungen während der Isolation bzw. Rekonstitution zu erklären. Der VAZ-Pool des PSI-Holokomplexes lag mit 3.1 ein wenig über der Summe aus LHCI-730 und LHCI-680. Da der Kernkomplex des PSI keine VAZ-Pigmente bindet (Jordan et al. 2001), kann diese Abweichung auf den Verlust von VAZ-Pigmenten während der Solubilisierung der LHCI-Komplexe zurückgeführt werden.

Protein	Chl a/b	Chl / Car	Lut	Vx	Ax	Zx	β -Car
	pro Dimer (= 24 Chl)						
LHCI-680	2.73	5.27	3.27	1.09	0.08	0.12	1.79
LHCI-730	2.76	6.08	2.67	1.30	0.04	0.00	1.00
PSI-Holokomplex	pro 167 Chl						
	7.35	17.55	6.43	2.84	0.26	0.00	20.94

Tabelle 15: Pigmentanalysen der solubilisierten LHCI-Komplexe, bzw. des PSI-Holokomplexes. Im Anschluss an die Solubilisierung wurden die nativen Komplexe über einen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt, die Pigmente der resultierenden Banden mit sec-Butanol extrahiert und mittels HPLC analysiert. Die Angaben sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Isolationen (SD < \pm 16%).

b) Spektroskopische Charakterisierung

Zur Überprüfung der Funktionalität der isolierten LHCI-Komplexe wurden Fluoreszenzmissionsspektren aufgenommen (Abb. 23). Der LHCI-680 Komplex zeigte sowohl nach Anregung von Chl a (410 nm) als auch Chl b (470 nm) ein Emissionsmaximum bei 690 nm mit einer leichten Schulter im langwelligen Bereich. Zusätzlich wurde nach Anregung der Chl b-Moleküle in den LHCI-680 Komplexen ein geringer Teil der Energie direkt emittiert, der anhand des Peaks bei 650 nm sichtbar wird.

Die LHCI-730 Komplexe zeigten nach Anregung mit 410 und 470 nm ein Emissionsmaximum im langwelligen Bereich bei 730 nm. Durch Anregung der Chl a-Moleküle war außerdem ein Maximum bei 680 nm zuerkennen. Die Anregung der Chl b-Moleküle ergab zusätzliche Emissionen bei 650 und 690 nm.

Die Fluoreszenzmissionsspektren der nativen LHCI-Komplexe entsprachen in ihren vorgestellten charakteristischen Eigenschaften den aus Schmid et al. (2002) bekannten Fluoreszenzmissionsspektren für native LHCI-Komplexe von *Lycopersicon esculentum*.

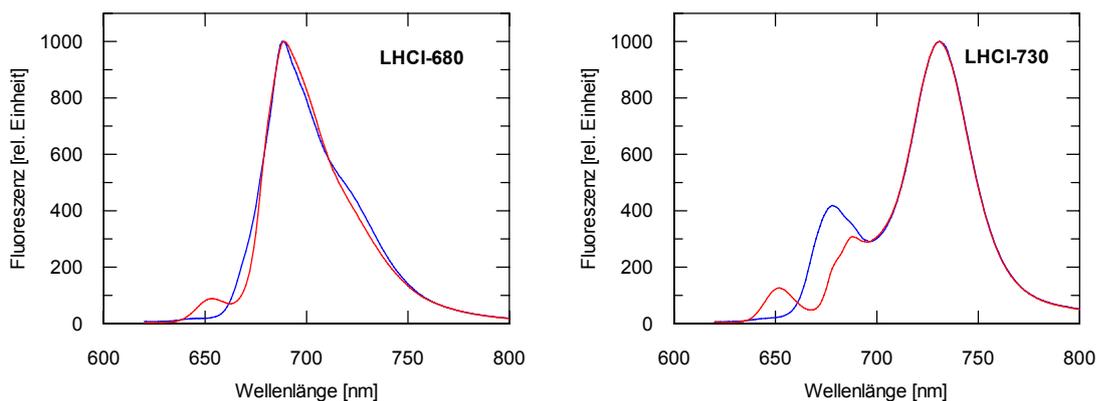


Abbildung 23: 77K-Fluoreszenzmissionsspektren der nativen LHCI-Komplexe. Die Fluoreszenzmissionsspektren wurden in Mainz von Frau Dr. S. Storf (AG Schmid) aufgenommen, die Maxima wurden auf 1000 normiert. Die Anregung erfolgte bei 410 (Chl a, blau) und 470 (Chl b, rot) nm.

3.2.5 De-epoxidation von LHCI-Komplexen

In Abbildung 24 ist die *in vitro* De-epoxidation an nativen LHCI-Komplexen dargestellt. Die nativen Antennenproteine des PSI wurden als Heterodimer (LHCI-730 bestehend aus Lhca1 und Lhca4), bzw. als Gemisch verschiedener Monomere (LHCI-680 bestehend aus Lhca2 und Lhca3) isoliert. An diesen Heterodimeren, Monomeren sowie an den PSI-Holo-komplexen wurde mit Hilfe der extrahierten VDE aus *Spinacia oleracea* die De-epoxidation des gebundenen Vx induziert. Es ist zu beachten, dass trotz der Dunkeladaptation vor Beginn der Isolation die Komplexe nicht vollständig epoxidiert vorlagen, vgl. auch Tabelle 15. Dies könnte den Reaktionsverlauf an den nativen LHCI-Komplexen im Vergleich zu den De-epoxidationen der vollständig epoxidierten rekonstituierten Komplexe verändern.

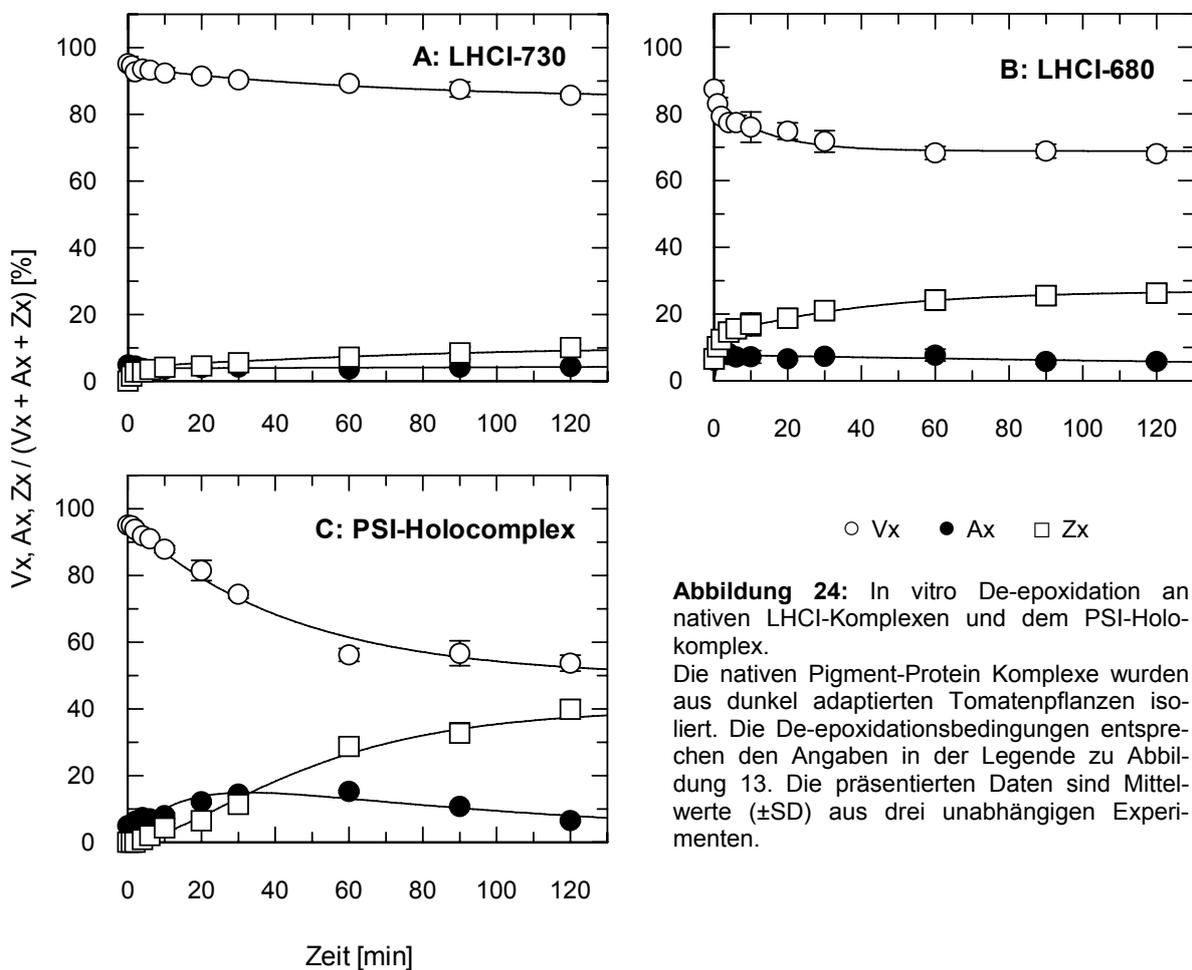


Abbildung 24: In vitro De-epoxidation an nativen LHCI-Komplexen und dem PSI-Holo-komplex.

Die nativen Pigment-Protein Komplexe wurden aus dunkel adaptierten Tomatenpflanzen isoliert. Die De-epoxidationsbedingungen entsprechen den Angaben in der Legende zu Abbildung 13. Die präsentierten Daten sind Mittelwerte (\pm SD) aus drei unabhängigen Experimenten.

Am LHCI-730 konnten nur knapp 15% des Vx in einer sehr langsamen Reaktion, ähnlich wie am rekonstituierten Lhca4, de-epoxidiert werden. Die De-epoxidation der LHCI-680 Fraktion zeigte eine schnelle Anfangsreaktion, durch welche der Vx-Gehalt von 90% auf 80%/VAZ reduziert wurde. Es folgte eine langsamere Umsetzung von weiteren 10%, so dass insgesamt eine maximale Umwandlung von 30% des Vx erreicht werden konnte. Allerdings lagen

zu Beginn des *in vitro* Experimentes schon circa 10% des VAZ-Pools in de-epoxidierter Form vor. Am PSI-Holokomplex wurden ungefähr 50% des vorhandenen Vx durch eine langsame Reaktion de-epoxidiert. Besonders auffällig war in diesem Fall der verzögerte zweite De-epoxidationsschritt. Hierbei wurde das gebildete Ax nur langsam zu Zx umgesetzt, so dass auch nach 120 Minuten noch circa 10% Ax/VAZ detektiert werden konnten.

Nach der De-epoxidation wurden die nativen Komplexe, wie zuvor die rekonstituierten, erneut aufgetrennt und mittels HPLC auf ihre Pigmentgehalte analysiert. Tabelle 16 zeigt die Daten aus den Pigmentanalysen. Die freie Pigmentphase der Gradienten enthielt auch bei den nativen Komplexproben nicht mehr als 20% der aufgetragenen Gesamtpigmente und besaß ebenfalls einen höheren DEPS und ein geringeres Chl/Car- sowie Lut/VAZ-Verhältnis im Vergleich zur entsprechenden Monomer-Bande aus den Gradienten. Somit wurde auch an den nativen LHCI-Komplexen verstärkt Zx freigesetzt.

Probe		Chl a/b	Chl/Car	Lut/Chl	Lut/VAZ	DEPS	Volumen [%]
LHCI-680	epoxidiert	2.73	5.27	0.13	2.45	0.12	
	FP + VDE	4.19	1.72	0.40	2.20	0.86	20
	de-epoxidiert + VDE	2.24	5.39	0.13	2.37	0.26	80
LHCI-730	epoxidiert	2.76	6.08	0.12	2.03	0.02	
	FP + VDE	4.32	2.31	0.27	1.61	0.71	<10
	de-epoxidiert + VDE	2.82	5.67	0.12	2.11	0.17	>90
PSI-Holokomplex	epoxidiert	7.35	17.55	0.04	2.04	0.04	
	FP + VDE	6.19	3.26	0.20	1.74	0.96	10
	de-epoxidiert + VDE	8.33	23.04	0.04	2.31	0.35	90

Tabelle 16: Pigmentgehalte vor und nach der De-epoxidation an nativen LHCI-Komplexen. Die Angaben sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Isolationen (SD $\pm 15\%$).

Der Vergleich von epoxidierten und de-epoxidierten LHCI-730 Komplexen zeigte kaum Unterschiede in den Pigmentstöchiometrien. Dies spricht für die Stabilität der isolierten LHCI-730 Heterodimere, wie auch der sehr geringe Anteil an freigesetzten Pigmenten in der freien Pigmentbande auf sehr stabile Holokomplexe hinweist. Dagegen wurde an den LHCI-680 Komplexen nach der De-epoxidation ein geringeres Chl a/b-Verhältnis gemessen als an den epoxidierten Komplexen. Es kann jedoch keine Aussage darüber gemacht werden, ob der Verlust von Chl a-Molekülen aus den LHCI-680 Komplexen schon während der De-epoxidation oder erst bei der anschließenden Dichtegradientenzentrifugation erfolgte. Am PSI-Holokomplex stiegen sowohl das Chl/Car- als auch das Chl a/b-Verhältnis an. Der Verlust von Chl b-Molekülen und Xanthophyllen kann hierbei durch die Abtrennung von LHC-Proteinen aus dem Gesamtkomplex hervorgerufen worden sein, da am PSI Kernkomplex kein Chl b gebunden wird. Für alle drei Komplex-typen lässt sich anhand des DEPS und der prozentualen Pigmentverteilung feststellen, dass der größte Teil des gebildeten Zx mit den Komplexen assoziiert war und nicht in die freie Pigmentbande abgegeben wurde.

Zum Vergleich der De-epoxidation *in vitro* mit der De-epoxidation *in vivo* wurden Blätter von Tomatenpflanzen für eine Stunde sättigender Lichtintensität ausgesetzt. Dadurch wurde ein maximaler DEPS erreicht. Im Anschluss an die Belichtung wurden die Komplexe isoliert. Darauf folgten Pigmentanalysen der Komplexe mittels HPLC, deren Ergebnisse in Tabelle 17 zusammengefasst sind. Die Gegenüberstellung der DEPS zeigt eindeutig, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vergleichbare De-epoxidationen erzielt werden konnten. So wurde unabhängig von der Induktionsweise am PSI-Holokomplex der höchste und am LHCI-730 der niedrigste DEPS erlangt.

Proteinkomplex	De-epoxidationszustand	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
LHCI-680	0.26	0.25
LHCI-730	0.17	0.18
PSI-Holokomplex	0.35	0.29

Tabelle 17: Vergleich der *in vitro* und *in vivo* DEPS. Die Angaben sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Isolationen, deren SD nicht größer als 8% war.

Im Vergleich der *in vivo* und *in vitro* Experimente sowohl an den nativen als auch an den rekonstituierten LHCI-Komplexen ist festzustellen, dass die erzielten De-epoxidationen an den nativen Komplexen deutlich geringer waren als nach der *in vitro* De-epoxidation der jeweiligen rekonstituierten Einzelkomplexe zu erwarten war. Am LHCI-730 konnte nach zwei Stunden ein DEPS von 0.17 erreicht werden, obwohl am Lhca1 und Lhca4 ein DEPS von 0.27, respektive 0.36 gemessen worden war. Das Vx am LHCI-680 schien im Vergleich zum LHCI-730 für die De-epoxidation etwas zugänglicher zu sein, so dass ein DEPS von 0.26 erlangt werden konnte. Aufgrund der vollständigen Verfügbarkeit des Vx am rekonstituierten Lhca3-Komplex ist der höhere Umsatz am LHCI-680 nicht überraschend. Jedoch blieb auch hier der DEPS mit 0.26 hinter dem für ein Mischprotein aus Lhca2 (DEPS 0.18) und Lhca3 (DEPS 0.89) zu erwartenden DEPS (0.53) zurück. Ein weiterer Grund für den stärkeren Umsatz des Vx am LHCI-680 im Vergleich zum LHCI-730 könnten strukturelle Veränderungen im Komplex aufgrund der Monomerisierung während der Isolation sein. Diese Hypothese kann jedoch verworfen werden, da auch nach der *in vivo* De-epoxidation an ganzen Blättern und anschließender Aufreinigung der LHCI-Proteine vergleichbar niedrige DEPS vorlagen (s. Tabelle 17).

Die geringere De-epoxidation der nativen Komplexe im Vergleich zu den rekonstituierten lässt sich auf den Verlust von locker an den Komplex gebundenem Vx zurückführen. Dieses leicht zur De-epoxidation verfügbare Vx wird durch die Aufreinigung nach Rekonstitution der rekombinanten Proteine nicht vom Komplex entfernt. Die zur Isolierung der nativen Komplexe notwendigen Solubilisierungsschritte werden aber gerade locker assoziierte Pigmente

leicht aus dem Komplex ablösen. Folgerichtig zeigte auch die *in vitro* De-epoxidation des PSI-Holokomplexes einen deutlich höheren DEPS als die Einzelkomplexe LHCI-680 und LHCI-730. Die Bildung und Bindung von Zx am PSI-Holokomplex wurde *in vivo* und *in vitro* an unterschiedlichen Spezies gezeigt (Thayer und Björkmann 1992, Schäfer et al. 1994, Lee und Thornber 1995, Färber et al. 1997, Zhu et al. 1997, Verhoeven et al. 1999). Die in der zitierten Literatur erzielten De-epoxidationszustände zwischen 0.26 und 0.45 entsprechen den Werten, die *in vitro* und *in vivo* an den LHCI-Komplexen von *Lycopersicon esculentum* erzielt werden konnten (vgl. Tab. 14, 16, 17).

3.3 Welchen Einfluss haben die Carotinoidbindestellen auf das Ausmaß und die Kinetik der De-epoxidation?

Die *in vitro* De-epoxidationsexperimente an den unterschiedlich rekonstituierten Lhcb1-Komplexen haben gezeigt, dass Vx an der L2-Bindestelle nur langsam zu Zx umgesetzt werden konnte, wohingegen Vx an einer der peripheren Bindestellen sehr schnell de-epoxidiert wurde. In den damaligen Experimenten wurde davon ausgegangen, dass bei der Bindung von 3 Carotinoiden pro Komplex die intrinsischen Lut-Bindestellen und die periphere Nx-Bindestelle belegt sein müssten. Der Nachweis von einem Molekül Vx pro Monomer in den Strukturanalysen des LHCII-Trimers (Liu et al. 2004, Standfuß und Kühlbrandt 2005) sowie die Erkenntnis, dass vorzugsweise Carotinoide in 9-*cis*-5,6-epoxy Konformation an die N1-Bindestelle binden (Snyder et al. 2004) lassen vermuten, dass das leicht de-epoxidierbare Vx am Lhcb1-Komplex jedoch der V1-Bindestelle zuzuschreiben ist.

Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, konnte die Rolle der verschiedenen Bindestellen in ihrer Bedeutung für die De-epoxidation verfeinert werden und soll im Folgenden unter dem Aspekt der jeweiligen Bindestelle zusammengefasst werden.

Eine Bindung von Vx an V1 wurde für den Lhca3-Komplex postuliert. An diesem Komplex konnte eine schnelle und vollständige De-epoxidation des Vx induziert werden. Die Belegung der zweiten peripheren Bindestelle, der N1-Bindestelle, mit Vx wurde für einen Teil des Vx am Lhca1-Komplex vorgeschlagen. Die *in vitro* De-epoxidation dieser Komplexe zeigte ebenfalls einen sehr schnellen Verlauf für den Teil des Vx, der einer peripheren Bindestelle zugeschrieben wird. Trifft jedoch die Vermutung zu, dass N1 nur als Bindestelle für Carotinoide in 9-*cis*-5,6-epoxy Konformation in Frage kommt, wäre auch für den schnell de-epoxidierbaren Teil des Vx am Lhca1 die Bindung an V1 zu postulieren. Demzufolge bestätigten die Reaktionen an den Lhca-Komplexen die Vermutung, dass an V1-gebundenes Vx schnell und vollständig de-epoxidiert werden kann.

Die Bindung von Vx an die L2-Bindestelle wurde für Lhca2, Lhca4, CP24 und CP26 sowie für den Großteil des Vx in den Lhca1- und CP29-Komplexen beschrieben. An dieser Bindestelle zeigte Vx kein einheitliches De-epoxidationsverhalten. An den Lhca4-Komplexen sowie an den, unter natürlichen Bedingungen rekonstituierten, Komplexen von CP24 und CP26 war Vx nur langsam de-epoxidierbar. Im Gegensatz zur vollständigen De-epoxidation des L2-gebundenen Vx am Lhcb1-Komplex war in den oben genannten Komplexen jedoch nur ein Teil des gebundenen Pigmentes für das Enzym zugänglich. Am Lhca2- und CP29-Komplex schien sogar der größte Teil des gebundenen Vx von der *in vitro* De-epoxidation ausgeschlossen zu sein. An der internen L2-Bindestelle zeigte das gebundene Vx demnach kein einheitliches De-epoxidationsverhalten. Die Reaktion war sowohl von der Bindestelle als auch von dem jeweiligen Apoprotein abhängig.

Die De-epoxidation des Vx an der L1-Bindestelle war nur in einem instabilen Gesamtkomplex möglich, wie es zum Beispiel der artifizielle CP26-NV-Komplex darstellt. Das

Herauslösen des Carotinoids bewirkte den Zerfall des Komplexes. Unter *in vivo* Bedingungen besitzt die L1-Bindestelle für die De-epoxidation keine Bedeutung. Es ist allgemein akzeptiert, dass in allen Antennenproteinen von PSI und PSII Lut in der L1-Bindestelle gebunden wird (Bassi und Caffarri 2000, Morosinotto et al. 2003).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen an den Lhcb1-Komplexen wurde in dieser Arbeit an den minoren Antennenproteinen des PSII und an den Antennenproteinen des PSI somit eine schnelle De-epoxidation für Vx, gebunden an einer peripheren Bindestelle, und eine langsamere Konversion zu Zx für Vx einer zentralen Carotinoidbindestelle festgestellt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen am Lhcb1-Protein war an L2-gebundenes Vx in den minoren Antennenproteinen und in den LHCI-Komplexen jedoch nicht vollständig de-epoxidierbar. Der Vergleich der verschiedenen De-epoxidationen zeigte eindeutig, dass die Affinität der Bindestelle durch das jeweilige Protein modifiziert wird. Trotz der Unterschiede an den einzelnen Proteinen kann festgehalten werden, dass Vx an einer peripheren Bindestelle schnell und an einer internen nur langsam oder gar nicht de-epoxidiert werden kann.

Diese Beobachtung wird durch spektroskopische Analysen untermauert, die zwei verschiedene Vx-Populationen in Thylakoiden detektierten (Ruban et al. 2001). Es wurde gezeigt, dass die Pigmente beider Gruppen proteingebunden in der Membran vorkommen und für die De-epoxidation zugänglich sind (Ruban et al. 2001). In einer späteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass der de-epoxidierbare Anteil des Vx nur locker an die Komplexe bindet und in seinen spektroskopischen Eigenschaften zwischen denen von freien Pigmenten und komplexen Membransystemen steht (Ruban et al. 2002a). Auch biochemische Analysen hatten zuvor schon auf die geringe Affinität des de-epoxidierbaren Vx an einer peripheren Bindestelle hingewiesen so, wie sie in den *in vitro* De-epoxidationsexperimenten zu beobachten war (Ruban et al. 1999, Verhoeven et al. 1999). Die Existenz einer V1-Bindestelle mit geringer Affinität zu ihren Carotinoid-Liganden war am rekonstituierten Lhcb1-Protein nachgewiesen worden (Caffarri et al. 2001). Für diesen Komplex konnte gezeigt werden, dass an V1 gebundene Pigmente nicht am Energietransfer innerhalb des Komplexes teilhaben, so dass ihre Funktion als leicht verfügbare Quelle für den Xanthophyllzyklus verstanden wurde (Caffarri et al. 2001).

3.4 Welche Bedeutung besitzen die verschiedenen Antennenproteine für die De-epoxidation?

Anhand der durchgeführten *in vitro* Experimente an rekonstituierten Antennenkomplexen lassen sich große Unterschiede in der De-epoxidierbarkeit des Vx in Abhängigkeit vom Apoprotein erkennen. Eine schnelle und vollständige Umsetzung des gebundenen Vx wurde am Lhca3 und Lhcb1 Protein erreicht. Der schnelle Reaktionsverlauf wurde ebenfalls für einen Teil des Vx am Lhca1, Lhca2 und CP29 gemessen, wobei der größte Teil des Vx an Lhca2 und CP29 nicht de-epoxidiert werden konnte. Im Gegensatz zu der schnellen De-epoxidation an den vorherigen Komplexen wurde am CP24, CP26 und Lhca4 sowie bei dem Großteil des Vx am Lhca1 ausschließlich ein langsamer Reaktionsablauf detektiert. Hierbei schien wenigstens die Hälfte des gebundenen Vx am CP24, CP26 und Lhca4 von dem enzymatischen Umsatz ausgeschlossen zu sein. Demzufolge können die Antennenproteine höherer Pflanzen in Bezug auf die De-epoxidation in drei Gruppen eingeteilt werden: I. Proteine mit geringer Affinität zu Vx (gebunden an V1), die De-epoxidation erfolgt schnell und vollständig. Hierzu gehören Lhcb1 (stellvertretend für den gesamten LHCI-Trimer) und Lhca3. II. Proteine mit mittlerer Affinität (L2) und langsamer De-epoxidation, bestehend aus CP24, CP26, Lhca1 und Lhca4. III. Proteine mit hoher Affinität (L2) und sehr stark eingeschränkter De-epoxidation, hierzu zählen CP29 und Lhca2.

Um sich den Einfluss einzelner Antennenproteine auf die *in vivo* De-epoxidation vor Augen zu führen, muss der Anteil der gebundenen Vx Moleküle pro Antennenprotein am gesamten Vx-Pool sowie das Verhältnis der Antennenproteine zu einander betrachtet werden. Innerhalb der Thylakoide wurde unter moderaten Lichtverhältnissen ein PSI/PSII-Verhältnis von 1.13 bestimmt (Danielsson et al. 2004). Die am PSI equimolar assoziierten Antennenproteine Lhca1-4 binden 0.5 Moleküle Vx pro Monomer (Schmid et al. 2002). Ebenfalls 0.5 Moleküle Vx pro Monomer werden für CP26 und CP29 kalkuliert (Croce et al. 2002a, Crimi et al. 2001). Am CP24 und an den trimeren LHCI-Komplexen wurde ein Molekül Vx pro Monomer detektiert (Pagano et al. 1998, Liu et al. 2004). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass 80% des Vx in PSII-Partikeln an den Trimeren und nur 20% an den Monomeren gefunden wurden (Ruban et al. 1999). Folglich ist der überwiegende Teil des in den Thylakoiden vorkommenden Vx am LHCI-Trimer lokalisiert. Dieses Vx ist an V1 gebunden und kann schnell und vollständig de-epoxidiert werden. Verschiedene De-epoxidationsstudien an isolierten Thylakoiden und ganzen Blättern haben gezeigt, dass ca. 70% des vorhandenen Vx de-epoxidierbar sind, wovon 2/3 mit einer schnellen und 1/3 mit einer langsamen Kinetik umgesetzt werden (Jahns 1995). Mit Hilfe der vorangegangenen Überlegung lassen sich die 2/3 des schnell de-epoxidierbaren Vx den LHCI-Trimeren und in geringem Maß dem Lhca3-Protein zuordnen. Die langsame Umsetzung wird an den minoren Antennenproteinen CP24 und CP26 sowie an Lhca1 und Lhca4 des PSI stattfinden. Nicht umwandelbares Vx kann demnach an CP29 und Lhca2 vermutet werden.

3.5 Physiologische Bedeutung der De-epoxidation

Durch die Auftrennung der de-epoxidierten Proben in freie Pigmente und Komplex-Banden wurde für alle untersuchten Antennenkomplexe nachgewiesen, dass das unter *in vitro* Bedingungen gebildete Zx an die Komplexe zurückbinden kann. Mit Hilfe der verwendeten Analysemethoden ließ sich allerdings nicht näher klären, ob Zx die Bindestelle des umgesetzten Vx oder eine andere Stelle im Komplex belegt hatte.

Spektroskopische Analysen wiesen daraufhin, dass Zx in Thylakoiden eine stärkere Konformationsänderung im Vergleich zum freien Pigment erfährt als Vx (Ruban et al. 2002a). Die Tatsache kann zum einen durch eine höhere Affinität des Pigmentes zur vorherigen Vx-Bindestelle oder durch eine andere Bindestelle hervorgerufen werden.

Morosinotto et al. (2002a) folgerten aus der spektroskopischen Analyse *in vitro* de-epoxidierten Komplexe, dass der Austausch von Vx gegen Zx an der L2-Bindestelle stattfinden kann. In der zitierten Arbeit wurden jedoch Komplexe verwendet, die mit Vx als einzigem Carotinoid rekonstituiert worden waren. Es bleibt daher offen, ob die Aussage auch auf Komplexe zu übertragen ist, deren L2-Bindestelle mit anderen Carotinoiden belegt ist. In den reinen Vx-Chl-Komplexen wurde die L2-Bindestelle durch Ablösen des Vx während der De-epoxidation vakant und konnte das neu gebildete Zx binden. Rekonstitutionsstudien haben gezeigt, dass Zx eine hohe Affinität zu den intrinsischen Bindestellen besitzt (Croce et al. 1999a, Hobe et al. 2000). Ob diese allerdings ausreicht, um ein anderes Pigment im gefalteten Komplex aus dieser Bindestelle zu verdrängen ist fraglich. Für den Lhcb3-Komplex wurde ein vergleichbarer Prozess postuliert: Unter Lichtstress soll Lut an der L2-Bindestelle durch Zx verdrängt werden, ein gleichzeitiger Verlust von Nx an N1 würde die Konformationsänderung in den dissipativen Status erleichtern (Caffarri et al. 2004). Die Autoren sahen in diesem Verhalten jedoch eine Besonderheit des Lhcb3-Proteins.

Der Bindung von Zx an die L2-Bindestelle wird eine physiologische Bedeutung zugeschrieben. So wurde gezeigt, dass Zx an L2 in rekombinanten LutZxNx-Komplexen von Lhcb1 (Formaggio et al. 2001), Lhcb4 (Crimi et al. 2001), Lhcb5 (Frank et al. 2001) sowie in nativen LHCII-Komplexen von *Arabidopsis aba-3 Mutanten* (Moya et al. 2001) im Vergleich zu Komplexen mit Lut oder Vx an L2 eine Reduktion der Fluoreszenzemission bewirkte. Die L2-Bindestelle wird als allosterische Bindestelle für Zx diskutiert (Bassi und Caffarri 2000, Formaggio et al. 2001), die vor allem im trimeren Komplex die Energiedissipation allosterisch kontrolliert (Wentworth et al. 2004). Der Austausch von Zx gegen Vx an V1 blieb dagegen ohne Effekt (Caffarri et al. 2001). Die neueren Strukturanalysen der LHCII-Trimere (Liu et al. 2004, Standfuß et al. 2005) wiesen jedoch darauf hin, dass auch die V1-Bindestelle in unmittelbarer Nähe zu den potentiellen „Quenching-sites“ liegt, sodass auch für Zx an V1 die Rolle als allosterischer Regulator postuliert wird (Horten et al. 2005).

Zx wurde jedoch nicht nur in den Komplex-Banden detektiert, sondern auch in der freien Pigmentbande. Unabhängig von der Bindung an LHC-Proteine besitzt Zx weitere Schutzfunktionen gegen photo-oxidativen Stress. Zum einen wurde durch Bindung von Zx an das PsbS-Protein eine Änderung im Absorptionsspektrum des Pigmentes erzeugt, die im Zusammenhang mit der pH-abhängigen Energiedissipation beobachtet wird (Aspinall-O'Dea et al. 2002, Ruban et al. 2002b). Zum anderen nimmt Zx in der Lipidphase der Thylakoidmembran Einfluss auf die Membranfluidität (Havaux und Niyogi 1999) und Lipidperoxidation (Havaux et al. 2000).

In vivo korreliert die De-epoxidation von Vx zu Zx mit der nicht-photochemischen Löschung überschüssiger Anregungsenergie (Demmig-Adams 1990, Gilmore und Yamamoto 1993). Studien an verschiedenen Mutanten von *Arabidopsis thaliana* (*npq1*, *vtc2*) zeigten, dass ein defizitärer Xanthophyllzyklus zur Reduktion des NPQ führt (Niyogi, et al. 1998, Müller-Moulé et al. 2002). Eine genauere Analyse des De-epoxidationsverhaltens der Vx-bindenden Membrankomplexe wies darauf hin, dass die Kinetik der De-epoxidation an Lhcb1-3, CP26 und CP24 der Bildung von qE entspricht, wohingegen der DEPS an CP29 eher mit der Ausbildung der Photoinhibition (qi) gleichzusetzen ist (Färber et al. 1997). Entsprechend werden die beobachteten Unterschiede in der De-epoxidation von Vx gebunden an CP26 und CP29 von Morosinotto et al. (2002a) als schnelle respektive langsame Akklimatisierung an Lichtstress gedeutet. Parallel zu den pH-induzierten Änderungen am CP29 wurde *in vivo* die Phosphorylierung eines Threonin-Restes beobachtet, wodurch die Konformation verändert und das Quenchen überschüssiger Energie induziert wurde (Mauro et al. 1997). Voraussetzung für die Phosphorylierung von CP29 ist eine starke Reduktion des Plastochinonpools, wie sie unter Starklicht Bedingungen auftritt (Purisheimo et al. 2003).

Die Anzucht von Pflanzen in vollem Sonnenlicht führt insbesondere an den LHCI-Trimern zu einer drastischen Steigerung des Xanthophyllpools (Verhoeven et al. 1999). Zusätzlich zur De-epoxidation des gebundenen Vx kommt es bei lang anhaltendem Stress (Kälte und hohe Lichtintensität) zur Neusynthese von Xanthophyllzykluspigmenten, die verstärkt an den monomeren Antennenkomplexen des PSII gefunden werden (Verhoeven et al. 1999). *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass durch zusätzlich gebundenes Zx die Fluoreszenzemission in solubilisierten Antennenproteinen (CP26, CP29 und LHCI) deutlich reduziert werden kann (Wentworth et al. 2000). Holt et al. (2004) wiesen jedoch daraufhin, dass die Summe des Quenchens an den Einzelkomplexen nicht ausreicht, um das *in vivo* erzielte Quenchen zu erzielen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass an allen Antennenproteinen Vx zu Zx umgesetzt wird und das Produkt erneut an den Komplex binden kann. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass *in vivo* der vollständig dissipative Status des PSII-LHCI-Superkomplexes nur im Zusammenspiel aller Faktoren zu erreichen ist: Durch Ansäuerung des

Thylakoidlumens kommt es zur Protonierung von exponierten AS-Resten der Antennenproteine und des PsbS-Proteins. Gleichzeitig wird die VDE aktiviert und Vx zu Zx umgesetzt. Das gebildete Zx kann sowohl am PsbS-Protein als auch an den LHCs binden. Als Folge könnte durch Protein-Protein Interaktion und/oder durch die Bindung von Zx, als allosterischem Regulator, an die L2-Bindestellen in den LHCII-Trimeren das Lut an L1 in den „Quench-Modus“ überführt werden, wie es im Modell von Wentworth et al. (2003, 2004) vorgeschlagen wird. Inwieweit die Protonierung der LHCs das Ablösen des Vx beeinflusst, oder ob Vx, zu mindest an der V1-Bindestelle, im ständigen Gleichgewicht mit der Lipidphase der Membran steht, wie es von Ruban et al. (1999) postuliert wurde, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Die Kristallisationsstudien von Liu et al. (2004) sowie Standfuß und Kühlbrandt (2005) enthielten trotz unterschiedlicher pH-Werte, 7.5 respektive 5.5, Vx an der V1-Bindestelle der LHCII-Trimere, allerdings ist zu vermuten, dass sich die Komplexe in der isolierten Form anders verhalten als im Verband des Gesamtkomplexes.

Im Gegensatz zum PSII ist die physiologische Bedeutung des Xanthophyllzyklus am PSI noch unklar. Bisher konnte kein Zx-abhängiges NPQ am PSI beobachtet werden. Aufgrund der geringeren Fluoreszenzemission der Lhca-Proteine im Vergleich zu den Lhcb-Proteinen vermuten Morosinotto et al. (2002b), dass die Konformation der Lhca-Komplexe im epoxidierten Zustand dem dissipativen Modus entspricht, der bei den Lhcb-Proteinen erst durch Umwandlung von Vx zu Zx induziert wird. Die Funktion von Zx an LHCI wäre demnach eine andere als in LHCII. Photoinhibition des PSI wurde bisher *in vivo* nur bei niedrigen Temperaturen an kälte-sensitiven Pflanzen beobachtet (Havaux und Davaud 1994, Sonoike und Terashima 1994). An kälte-resistenten Haferpflanzen wurde Photoinhibition am PSI durch den Zusatz von KCN induziert (Tjus et al. 1998). KCN ist ein Inhibitor der Cu,Zn-Superoxid-dismutase und Ascorbatperoxidase. Die Inaktivierung des PSI kann daher durch die verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) erklärt werden. Die Bildung von ROS an der reduzierenden Seite des PSI wirkt ebenfalls schädigend auf PSII (Tjus et al. 2001). Eine potentielle Funktion des Zx am PSI könnte somit in der Detoxifikation der gebildeten ROS zum Schutz beider Photosysteme liegen.

3.6 Bedeutung einzelner Antennenproteine für den Schutz des Photosyntheseapparates

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten deutlich, inwiefern sich die einzelnen Antennenkomplexe in Bezug auf die De-epoxidation unterscheiden. Allerdings wurde hier nur am isolierten Komplex in einer künstlich hergestellten Lipidschicht gearbeitet. Wie aber verhält sich das System *in vivo*, bei Verlust eines Antennenproteins? Dieser Fragestellung wurde mit Hilfe von Antisense-Pflanzen und Knock-out Mutanten der entsprechenden Gene nachgegangen. Ganeteg et al. (2001) untersuchten die $\Delta Lhca2$ und $\Delta Lhca3$ -Linien von *Arabidopsis thaliana* unter Laborbedingungen. In den beiden Linien wurde der gleichzeitige Verlust des jeweiligen Coproteins im LHCl-680 Komplex festgestellt. Die Belichtung mit 700 μE bewirkte in beiden Linien, verglichen mit dem Wildtyp, weder nach 5 noch nach 60 Minuten einen Unterschied im DEPS. In ähnlichen Studien wurde festgestellt, dass auch der Verlust von Lhcb1 und Lhcb2 sowie CP26, CP29 und CP24 ohne Folgen für den Xanthophyllzyklus blieb (Andersson et al. 2003, Andersson et al. 2001). Versuchsreihen an *npq1* und *npq4* Mutanten von *Arabidopsis thaliana* haben gezeigt, dass unter Freilandbedingungen die Fitness der Mutanten deutlich geschwächt ist, auch wenn unter Laborbedingungen kein phänotypischer Unterschied zum Wildtyp zu detektieren war (Kühlheim et al. 2002). Vor diesem Hintergrund wurden die verschiedenen LHC-Mutanten im Freiland untersucht. Keine der Mutanten zeigte eine verstärkte Photoinhibition des PSII. Die Gesamt-Fitness der Pflanzen, gemessen an ihrer Samenproduktion, war aber sehr wohl reduziert (Ganeteg et al. 2004). Verschiedene Mutanten von *Arabidopsis thaliana* mit Defekten in der Synthese von Antioxidantien wiesen auf eine große Flexibilität des photoprotektiven Systems hin (Kanwischer et al. 2005). Der Schutz höherer Pflanzen gegen photooxidative Schädigung scheint somit nicht auf einzelne Proteine festgelegt zu sein, sondern unterliegt einer Flexibilität, die es der Pflanze erlaubt, sich an die unterschiedlichsten Bedingungen anzupassen.

3.7 Zusammenfassung

Die sessile Lebensform von Pflanzen bedingt, dass sie schnell wechselnden Lichtintensitäten ausgesetzt sind. Um den schädigenden Effekten überschüssig absorbiertes Lichtenergie zu begegnen, haben Pflanzen verschiedene photoprotektive Schutzmechanismen entwickelt. Hierbei ist die De-epoxidation von Vx zu Zx über die VDE durch den sog. Xanthophyllzyklus von vielfältiger Bedeutung. Das Substrat dieser Reaktion, das Vx, ist in unterschiedlichen Stöchiometrien in den Lichtsammelkomplexen beider Photosysteme vertreten. Vorangegangene De-epoxidations-Studien hatten gezeigt, dass nur ein Teil des Vx-Pools zu Zx umgesetzt werden kann. Zusätzlich schien es Unterschiede in der Verfügbarkeit des umsetzbaren Vx zu geben, so waren 2/3 des Vx mit einer schnellen und 1/3 mit einer langsamen Kinetik de-epoxidiert worden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, welche Faktoren die De-epoxidation des Vx limitieren. Anhand von *in vitro* Studien an rekonstituierten Lhcb1-Proteinen war zuvor festgestellt worden, dass Vx an den verschiedenen Carotinoidbindestellen des Lhcb1-Proteins mit unterschiedlicher Kinetik de-epoxiert werden kann. In der hier vorgelegten Studie wurde nun sowohl der Einfluss der verschiedenen Apoproteine als auch die Bedeutung der jeweiligen Vx-Bindestelle auf die De-epoxidation des gebundenen Vx untersucht. Hierzu wurden rekombinante Apoproteine der minoren Antennenproteine von PSII und der Antennenproteine von PSI *in vitro* mit isolierten Pigmenten zu funktionsfähigen Holokomplexen rekonstituiert. Mit Hilfe von isolierter VDE wurden diese Komplexe de-epoxidiert und sowohl der Reaktionsverlauf als auch die mögliche Bindung des gebildeten Zx an den Komplex analysiert.

Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass die De-epoxidation an allen Antennenkomplexen induziert werden und Zx an die Komplexe zurückbinden konnte. Anhand der beobachteten Reaktionen konnte festgestellt werden, dass sich Vx gebunden an einer peripheren Carotinoidbindestelle schnell und vollständig, an einer internen Bindestelle jedoch nur langsam und zum Teil stark eingeschränkt de-epoxidieren lässt. Die verschiedenen Antennenkomplexe beider Photosysteme konnten in Bezug auf die De-epoxidierbarkeit des gebundenen Vx in drei Gruppen eingeteilt werden: I. Proteine mit geringer Affinität zu Vx, die De-epoxidation erfolgte schnell und vollständig. Hierzu gehören Lhcb1 und Lhca3, II. Proteine mit mittlerer Affinität und langsamer De-epoxidation, bestehend aus CP24, CP26, Lhca1 und Lhca4 und III. Proteine mit hoher Affinität und sehr stark eingeschränkter De-epoxidation, hierzu zählen CP29 und Lhca2. Aufgrund dieser Einteilung und der Vx-Bindung an die verschiedenen Antennenkomplexen, bzw. der Häufigkeit der Komplexe in der Thylakoidmembran kann die *in vivo* beobachtete schnelle De-epoxidation der Gruppe I, der langsamere Teil der Gruppe II und der von der De-epoxidation ausgeschlossene Teil des Vx der Gruppe III zugeordnet werden.

4 Literatur

- Adamska, I. (2001):** The Elip family of stress proteins in the thylakoid membranes of Pro- and Eukaryota. in Regulation of Photosynthesis. (Aro, E. M. Hrsg.) Vol. 8, pp. 487-505, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL.
- Andersson, J., Walters, R.G., Horton, P., Jansson, S. (2001):** Antisense inhibition of the photosynthetic antenna proteins CP29 and CP26: Implications for the mechanism of protective energy dissipation. *Plant Cell* 13, pp. 1193–1204.
- Andersson, J., Wentworth, M., Walters, R.G., Howard, C.A., Ruban, A.V., Horton, P., Jansson, S. (2003):** Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II - effects on photosynthesis, grana stacking and fitness. *Plant J.* 35, pp. 350-361.
- Arvidsson, P.-O., Bratt, C.M., Carlsson, M., Åkerlund, H.-E. (1996):** Purification and identification of the violaxanthin de-epoxidase as a 43 kDa protein. *Photosynth. Res.* 49, pp.119–129.
- Arvidsson, P.-O., Carlsson, M., Stefánsson, H., Albertsson, P.-A., Åkerlund, H.-E. (1997):** Violaxanthin accessibility and temperature dependency for de-epoxidation in spinach thylakoid membranes. *Photosynth. Res.* 52, pp. 39–48.
- Arnon, D.I. (1949):** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, pp. 1-15.
- Aspinall-O’Dea, M., Wentworth, M., Pascal, A., Robert, B., Ruban, A., Horton, P. (2002):** *In vitro* reconstitution of the activated zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16331-16335.
- Bailey, S., Walters, R. G., Jansson, S., Horton, P. (2001):** Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* 213, pp. 794-801.
- Ballottari, M., Govoni, C., Caffarri, S., Morosinotto, T. (2004):** Stoichiometry of LHCl antenna polypeptides and characterization of gap and linker pigments in higher plants photosystem I. *Eur. J. Biochem.* 271, pp. 4659-4665.
- Bassi, R., Machold, O., Simpson, D. (1985):** Chlorophyll-proteins of two photosystem I preparations from maize. *Carlsberg Res. Commun.* 50, pp. 145-162.
- Bassi, R. und Dainese p. (1992):** A supramolecular light-harvesting complex from chloroplast photosystem-II membranes. *Eur.J. Biochem.* 204, pp.317-326.
- Bassi, R., Pineau, B., Dainese, P., Marquardt, J. (1993):** Carotenoid-binding proteins of photosystem II. *Eur. J. Biochem.* 212, pp. 297-303.
- Bassi, R., Croce, R., Cugini, D., Sandona, D. (1999):** Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides identification of chromophores bound into multiple sites. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 96, pp. 10056-10061.
- Bassi, R., Caffarri, S. (2000):** Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light harvesting function by xanthophylls. *Photosyn. Res.* 64, pp. 243-256.
- Ben-Shem, A., Frolow, F., Nelson, N. (2003):** Crystal structure of plant photosystem I. *Nature*, Vol. 426, pp.630-635.
- Bergantino, E., Segalla, A., Brunetta, A., Teardo, E., Rigoni, F., Giacometti, G.M., Szabo,I. (2003):** Light- and pH-dependent structural changes in the PsbS subunit of photosystem II, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 100, No. 24, pp. 15265-15270.
- Berthold, D.A., Babcock, G.T., Yocum, C.F. (1981):** A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS lett.* 134, pp.231-234.

- Boekema, E.J., Hankamer, B., Bald, D., Kruij, J., Nield, J., Boonstra, A.F., Barber, J., Rögner, M. (1995):** Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, pp.175– 179.
- Boekema, E.J., van Roon, H., Calkoen, F., Bassi, R., Dekker, J.P. (1999):** Multiple types of association of photosystem II and its lightharvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Biochemistry* 38, pp. 2233–2239.
- Booth, P.J. und Paulsen, H. (1996):** Assembly of light harvesting chlorophyll *a/b* complex *in vitro*. Time-resolved fluorescence measurements. *Biochemistry*, Vol. 35, pp. 5103-5108.
- Bouvier F, D’Harlingue A, Hugueney P, Marin E, Marion-Poll A, Camara B. (1996):** Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstruction, and regulation of b-cyclohexanol carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91, pp. 28861–28867.
- Bratt, C. E., Arvidsson, P.-O., Carlsson, M., Åkerlund, H.-E. (1995):** Regulation of violaxanthin deepoxidase activity by pH and ascorbate concentration. *Photosynth. Res.* 45, 169-175.
- Büch, K., Stransky, H., Hager, A. (1995):** FAD is a further essential cofactor of the NAD(P)H and O₂-dependent zeaxanthin-epoxidase. *FEBS letters* 376, pp. 45-48.
- Bugos, R.C., Yamamoto, H. Y. (1996):** Molecular cloning of violaxanthin de-epoxidase from romaine lettuce and expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, pp. 6320-6325.
- Bugos, R.C., Hieber, A.D. and Yamamoto, H.Y. (1998):** Xanthophyll cycle enzymes are members of the lipocalin family, the first identified from plants. *J. Biol. Chem.*, Vol. 273, pp. 15321–15324.
- Caffarri, S., Croce, R., Breton, J., Bassi, R. (2001):** The major antenna complex of photosystem II has a xanthophyll binding site not involved in light harvesting. *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, No. 38, pp. 35924-35933.
- Carbonera, D., Agostini, G., Morosinotto, T., Bassi, R. (2005):** Quenching of chlorophyll triplet states by carotenoids in reconstituted Lhca4 subunit of peripheral light-harvesting complex of PSI. *Biochemistry*, Vol. 44, pp. 8337-8346.
- Castelletti, S., Morosinotto, T., Robert, B., Caffarri, S., Bassi, R., Croce, R. (2003):** Recombinant Lhca2 and Lhca3 subunits of Photosystem I antenna system. *Biochemistry*, Vol. 42, pp. 4226-4234.
- Cogdell, R. J. (1978):** Carotenoids in photosynthesis. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 284, pp. 569-579.
- Crimi, M., Dorra, D., Böisinger, C.S., Giuffra, E., Holzwarth, A.R., Bassi, R. (2001):** Time-resolved fluorescence analysis of the recombinant photosystem II antenna complex CP29. *Eur. J. Biochem.* 268, pp. 260-267.
- Croce, R., Weiss, S., Bassi, R. (1999a):** Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants. *J. Biol. Chem.* Vol. 274, No. 42, pp. 29613-29623.
- Croce, R., Remelli, R., Varotto, C., Breton, J., Bassi, R. (1999b):** The neoxanthin binding site of the major lightharvesting complex (LHCII) from higher plants. *FEBS Letters* 456, pp. 1-6.
- Croce, R., Müller, M., Bassi, R., Holzwarth, A.R. (2001):** Carotenoid-to-chlorophyll energy transfer in recombinant major light-harvesting complex (LHCII) of higher plants. I. Femtosecond transient absorption measurements. *Biophys. J.* 80, pp. 901-915.
- Croce, R., Canino, G., Ros, F., Bassi, R. (2002a):** Chromophore organization in the higher-plant photosystem II antenna protein CP26. *Biochemistry* 41, pp. 7334-7343.
- Croce, R., Morosinotto, T., Castelletti, S., Breton, J., Bassi, R. (2002b):** The Lhca antenna complexes of higher plants photosystem I. *Biochem. Biophys. Acta* 1556, pp. 29-40.

- Danielsson, R., Albertsson, P-Å., Mamedov, F., Styring, S. (2004):** Quantification of photosystem I and II in different parts of the thylakoid membrane from spinach. *Biochim. et Biophys. Acta* 1608, pp. 53–61.
- Das, S.K., Frank, H.A. (2002):** Pigment compositions, spectral properties, and energy transfer efficiencies between the Xanthophylls and chlorophylls in the major and minor pigment-protein complexes of photosystem II. *Biochemistry* 41, pp. 13087-13095.
- Davanloo, P. et al. (1984):** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, pp. 2035–9.
- Davies, B.H. (1976):** Carotenoids, in *Chemistry and biochemistry of plant pigments* (Goodwin, T.W., Ed.), Academic Press, London, Vol. 2, pp. 38-165.
- Dekker, J.P., Boekema, E.J. (2005):** Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. et Biophys. Acta* 1706, pp. 12-39.
- DeLano, W.L. (2002):** The PyMol molecular graphics system. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA, <http://pymol.sourceforge.net/>
- Demmig-Adams, B. (1990):** Carotenoid and photoprotection in plants: A role for the xanthophylls zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020, pp. 1-24.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A.M. and Adams, W.W. (1996a):** In vivo functions of carotenoids in higher plants. *FASEB J.* 10, pp. 403-412.
- Demmig-Adams, B., and Adams, W. W., III (1996b):** The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1, pp. 21-26.
- Dominici, P., Caffarri, S., Armenante, F., Ceoldo, S., Crimi, M., Bassi, R. (2002):** Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant. *J. Biol. Chem.* 277, pp. 22750-22758.
- Dreuw, A., Fleming, G. R., and Head-Gordon, M. (2003):** Charge-transfer state as a possible signature of a zeaxanthin-chlorophyll dimer in the non-photochemical quenching process in green plants. *J. Phys. Chem. B*, Vol. 107, pp. 6500-6503.
- Dunahay, T.G., Staehelin, L.A., Seibert, M., Oglivie, P.D., Berg, S.P. (1984):** Structural, biochemical and biophysical characterization of four oxygen-evolving photosystem II preparations from spinach. *Biochim. Biophys. Acta* 764, pp. 179-193.
- Ebbert, V., Demmig-Adams, B., Adams, W.W., Mueh, K.E., Staehelin, L.A. (2001):** Correlation between persistent forms of zeaxanthin-independent energy dissipation and thylakoid protein phosphorylation. *Photosynthesis Research* 67, pp. 63–78.
- Färber, A., Young, A.J., Ruban, A.V., Horton, P., Jahns, P. (1997):** Dynamics of xanthophyll-cycle activity in different antenna subcomplexes in the photosynthetic membranes of higher plants. *Plant Physiol.* 115, pp. 1609-1618.
- Formaggio, E., Cinque, G., Bassi, R. (2001):** Functional architecture of the major light-harvesting complex from higher plants. *J. Mol. Biol.* 314, pp. 1157-1166.
- Frank, H. A., Bautista, J. A., Josue, J. S., and Young, A. J. (2000):** Mechanism of nonphotochemical quenching in green plants: energies of the lowest excited singlet states of violaxanthin and zeaxanthin, *Biochemistry*, Vol. 39, pp. 2831-2837.
- Frank, H.A., Das, S.K., Bautista, J.A., Bruce, D., Vasil'ev, S., Crimi, M., Croce, R., Bassi, R. (2001):** Photochemical behaviour of xanthophylls in the recombinant photosystem II antenna complex, CP26. *Biochemistry*, Vol. 40, pp. 1220-1225.
- Funk, C., Adamska, I., Green, B. R., Andersson, G., Renger, G. (1995):** The nuclear-encoded chlorophyll-binding photosystem II-S protein is stable in the absence of pigments. *J. Biol. Chem.* 270, pp. 30141-30147.

- Ganeteg, U., Strand, A., Gustafsson, G., Jansson, S. (2001):** The Properties of the Chlorophyll *a/b*-Binding Proteins Lhca2 and Lhca3 Studied in Vivo Using Antisense Inhibition. *Plant Physiol.*, Vol. 127, pp. 150–158.
- Ganeteg, U., Kühlheim, C., Andersson, J., Jansson, S. (2004):** Is each light-harvesting complex protein important for plant fitness? *Plant Physiol.*, Vol. 134, pp. 502-509.
- Gastaldelli, M., Canino, G., Croce, R., Bassi, R. (2003):** Xanthophyll binding sites of the CP29 (Lhcb4) subunit of higher plant photosystem II investigated by domain swapping and mutation analysis. *J. Biol. Chem.* Vol. 278, No. 21, pp. 19190-19198.
- Gilmore, A.M. und Yamamoto, H.Y. (1991):** Resolution of Lutein and Zeaxanthin using a non-encapped lightly carbon loaded C18 high-performance liquid chromatographic column. *J. Chromatogr.* 543, pp. 137-145.
- Gilmore, A. M. (1997):** Mechanistic aspects of xanthophyll cycle dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plant.* 99, pp. 197-209.
- Giuffra, E., Cugini, D., Croce, R., Bassi, R. (1996):** Reconstitution and pigment-binding properties of recombinant CP29. *Eur. J. Biochem.* 238, pp. 112-120.
- Graßes, Thomas (1999):** Herstellung und Analyse von transgenen Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) mit Defekten in den Pigmentproteinkomplexen. Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Pflanzen der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Graßes, T., Grimm, B., Koroleva, O., Jahns, P. (2001):** Loss of alpha-tocopherol in tobacco plants with decreased geranylgeranyl reductase activity does not modify photosynthesis in optimal growth conditions but increases sensitivity to high-light stress. *Planta* 213, pp.620-628.
- Green, B. R., Pichersky, E., Kloppstech, K. (1991):** Chlorophyll *a/b*-binding proteins: an extended family. *TIBS* 16, pp. 181-186.
- Härtel, H., Lokstein, H., Grimm, B. and Rank, B. (1996):** Kinetic studies on the xanthophyll cycle in barley leaves. Influence of antenna size and relations to nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching. *Plant Physiol.* 110, pp. 471-482.
- Hager, A. (1966):** Die Zusammenhänge zwischen lichtinduzierten Xanthophyll-Umwandlungen und der Hill-Reaktion. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 79, pp. 94-107.
- Hager, A. (1969):** Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin-Zeaxanthin-Umwandlungen; Beziehungen zur Photophosphorylierung. *Planta* 89, pp. 224-243.
- Hager, A. (1975):** Die reversiblen lichtabhängigen Xanthophyll-Umwandlungen im Chloroplasten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 88, pp. 27-44.
- Hager, A. and Holocher, K. (1994):** Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light dependent) pH decrease. *Planta* 192, pp. 581–589.
- Hanahan, D. (1983):** *J. Mol. Biol.* 166, pp. 557-580.
- Hankamer, B., Nield, J., Zheleva, D., Boekema, E.J., Jansson, S., Barber, J. (1997):** Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II in vivo. *Eur. J. Biochem.* 243, pp. 422–429.
- Hankamer, B., Morris, E., Nield, J., Carne, A., James Barber, J. (2001):** Subunit positioning and transmembrane helix organisation in the core dimer of photosystem II. *FEBS Letters* 504, pp. 142-151.
- Harrer, R., Bassi, R., Testi, M.G., Schäfer, C. (1998):** Nearest-neighbor analysis of a photosystem II complex from *Marchantia polymorpha* L. (liverwort), which contains reaction center and antenna proteins, *Eur. J. Biochem.* 255, pp. 196–205.

- Havaux, M., Davaud, A. (1994):** Photoinhibition of photosynthesis in chilled potato leaves is not correlated with a loss of Photosystem II activity: preferential inactivation of Photosystem I. *Photosynth. Res.* 40, pp. 75-92.
- Havaux, M. (1998):** Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in Plant Sci.* 3, pp. 147-150.
- Havaux, M., Niyogi, K.K. (1999):** the violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, pp. 8762-8767.
- Havaux, M., Bonfils, J.-P., Lütz, C. and Niyogi, K.K. (2000):** Photodamage of the photosynthetic Apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the *npq1* Arabidopsis mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiol.* 124, pp. 273–284.
- Havaux, M., Dall’Osto, L. Cuine, S., Giuliano, G. and Bassi, R. (2004):** The Effect of zeaxanthin as the only xanthophyll on the structure and function of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, Vol. 279, No. 14, pp. 13878–13888.
- Haworth, P., Watson, J. L., Arntzen, C. J. (1983):** The detection, isolation, and characterization of a light-harvesting complex which is specifically associated with photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 724, pp. 151-158.
- Henrysson, T., Schröder W.P., Spangfort, M., Åkerlund H.-E. (1989):** Isolation and characterization of the chlorophyll *a/b* CP29 from spinach. *Biochem. Biophys. Acta* 977, pp. 301-308.
- Hieber, A.D., Bugos, R.C., Verhoeven, A.S., Yamamoto, H.Y. (2002):** Overexpression of violaxanthin de-epoxidase: properties of C-terminal deletions on activity and pH-dependent lipid binding. *Planta* 214, pp. 476-483.
- Hieber, A.D., Kawabata, O. and Yamamoto, H.Y. (2004):** Significance of the lipid phase in the dynamics and functions of the xanthophyll cycle as revealed by PsbS overexpression in tobacco and in-vitro de-epoxidation in monogalactosyldiacylglycerol micelles. *Plant Cell Physiol.* 45, pp. 92–102.
- Hobe, S., Niemeier, H., Bender, A., Paulsen, H. (2000):** Carotenoid binding sites in LHCIIb. Relative affinities towards major xanthophylls of higher plants. *Eur. J. Biochem.* 267, pp. 616-624.
- Holt, N., Fleming, G.R., Niyogi, K.K. (2004):** Toward an understanding of the mechanism of nonphotochemical quenching in green plants. *Biochemistry*, Vol. 43, No. 26, pp. 8281-8289.
- Holt, N.E., Zigmantas, D., Valkunas, L., Li, X.-P., Niyogi, K.K., Fleming, G.R. (2005):** Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science*, Vol. 307, pp. 433-436.
- Horton, P., Ruban, A. V., Walters, R. G. (1996):** Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 655 684.
- Horten, P., Wentworth, M., Ruban, A. (2005):** Control of light harvesting function of chloroplast membranes: The LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *FEBS Letters* 579, pp. 4201-4206.
- Ihalainen, J. A., Gobets, B., Sznee, K., Brazzoli, M., Croce, R., Bassi, R., van Grondelle, R., Korppi-Tommola, J. E. I., Dekker, J. P. (2000):** Evidence for two spectroscopically different dimers of light-harvesting complex I from green plants. *Biochemistry* 39, pp. 8625-8631.
- Ikeuchi, M., Hirano, A., Inoue, Y. (1991):** Correspondence of apoproteins of light-harvesting chlorophyll *a/b* complexes associated with Photosystem I to cab genes: evidence for a novel type IV apoprotein. *Plant Cell Physiol.* 32, pp. 103-111.
- Jahns, P. (1995):** The xanthophylls cycle in intermittent light grown pea plants. Possible functions of chlorophyll *a/b* binding proteins. *Plant Physiol.* 108, pp. 149-156.

- Jahns, P. and Miehe, B. (1996):** Kinetic correlation of recovery from photoinhibition and zeaxanthin epoxidation. *Planta* 198, pp. 202–210.
- Jahns, P., Depka, B., Trebst, A. (2000):** Xanthophyll cycle mutants from *Chl amydomonas reinhardtii* indicate a role of zeaxanthin in the D1 protein turnover. *Plant Physiol. Biochem.* 38. pp. 371-376.
- Jahns, P., Wehner, A., Paulsen, H., Hobe, S. (2001):** De-epoxidation of violaxanthin after reconstitution into different carotenoid binding sites of light-harvesting complex II. *J. Biol. Chem.* Vol. 276, No. 25, pp. 22154-22159.
- Jansson, S. (1994):** The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins. *Biochim. et Biophys. Acta* 1184, pp. 1–19.
- Jansson, S., Andersen, B., Scheller, H. V. (1996):** Nearest-neighbor analysis of higher-plant Photosystem I holocomplex. *Plant Physiol.* 112, pp. 409-420.
- Jansson, S. (1999):** A guide to the *Lhc* genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 4, No. 6, pp. 236-240.
- Jensen, R.G., Bassham, J.A. (1966):** Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56, pp. 1095-1101.
- Jensen, P. E., Haldrup, A., Rosgaard, L., Scheller, H. V. (2003):** Molecular dissection of photosystem I in higher plants: topology, structure and function. *Physiol. Plant.* 119, pp. 313-321.
- Jin, E.S., Yokthongwattana, K., Polle, J.E.W. and Melis, A. (2003):** Role of the reversible xanthophyll cycle in the photosystem II damage and repair cycle in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 132, pp. 352–364.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Kuklas, O., Saenger, W., Krauss, N. (2001):** Three dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411, pp. 901-917.
- Kanwischer, M., Porfirova, S., Bergmüller, E., Dörmann, P. (2005):** Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. *Plant Physiol.* 137, pp. 713-723.
- Klimmek, F., Ganeteg, U., Ihalainen, J.A., van Roon, H., Jensen, P.E., Scheller, H.V., Dekker, J.P. and Jansson, S. (2005):** Structure of the higher plant light harvesting complex I: in vivo characterization and structural interdependence of the Lhca proteins. *Biochemistry* Vol. 44, pp. 3065-3073.
- Knoetzel, J., Svendsen, I., Simpson, D. J. (1992):** Identification of the photosystem-I antenna polypeptides in barley - isolation of 3 pigment-binding antenna complexes. *Eur. J. Biochem.* 206, pp. 209-215.
- Krause, G.H., Köster, S., Wong, S.Y. (1985):** Photoinhibition of photosynthesis under anaerobic conditions studied with leaves and chloroplasts of *Spinacia oleracea* L. *Planta*, 165, pp. 430-438.
- Krause, G.H. und Jahns, P. (2003):** Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science. In: Green, B.R., Parson, W.W. (Eds.) *Light-harvesting antennas in photosynthesis*. Kluwer, Dordrecht, pp. 373-399.
- Kühlbrandt, W, Wang, D. N., Fujiyoshi, Y. (1994):** Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367, pp. 614-621.
- Kühlheim, C., Ågren, J., Janson, S. (2002):** Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field. *Science*, Vol. 297, pp. 91-93.
- Laemmli, U. K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, pp. 680-685
- Lam, E., Ortiz, W., Malkin, R. (1984):** Chlorophyll a/b proteins of photosystem I. *FEBS Lett* 168, pp.10-14.

- Latowski, D., Kruk, J., Burda, K., Skrzynecka-Jaskier, M., KostECKA-GUGATA, A. and Strzałka, D. (2002):** Kinetics of violaxanthin de-epoxidation by violaxanthin de-epoxidase, a xanthophyll cycle enzyme, is regulated by membrane fluidity in model lipid bilayers. *Eur. J. Biochem.* 269, pp. 4656–4665.
- Latowski, D., Åkerlund, H.-E., Strzałka, K. (2004):** Violaxanthin de-epoxidase, the xanthophyll cycle enzyme, requires lipid inverted hexagonal structures for its activity. *Biochemistry* 43, pp. 4417–4420.
- Lee, A.I., Thornber, J.P. (1995):** Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from barley (*Hordeum vulgare*). The xanthophylls cycle intermediates occur mainly in the light-harvesting complexes of photosystem I and photosystem II. *Plant Physiol.* 107, 565-574.
- Li, X.-P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K. K. (2000):** A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403, pp. 391-395.
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, Z., Gui, L., An, X., Chang, W. (2004):** Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, Vol. 428, pp. 287–291.
- Ma, Y. Z., Holt, N.E., Li, X. P., Niyogi, K. K., Fleming, G. R. (2003):** Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, pp. 4377-4382.
- Macko, S., Wehner, A., Jahns, P. (2002):** Comparison of violaxanthin de-epoxidation from the stroma and lumen sides of isolated thylakoid membranes from *Arabidopsis*: implications for the mechanism of de-epoxidation. *Planta*, Vol. 216, pp. 309-314.
- Mauro S., Dainese P., Lannoye R., Bassi R. (1997):** Cold-resistant and cold-sensitive maize lines differ in the phosphorylation of the photosystem II subunit, CP29. *Plant Physiol.* 115, pp. 171-180.
- Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Fey, A., Marion-Poll, A. (1996):** Molecular identification of zeaxanthine epoxidase of *Nicotina plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 15, pp. 2331-2342.
- Morosinotto, T., Baronio, R., Bassi, R. (2002a):** Dynamics of chromophore binding to Lhc proteins *in vivo* and *in vitro* during operation of the xanthophyll cycle. *J. Biol. Chem.* Vol. 277, No. 40, pp. 36913-36920.
- Morosinotto, T., Castelletti, S., Breton, J., Bassi, R. Croce, R. (2002b):** Mutation analysis of Lhca1 antenna complex. Low energy absorption forms originate from pigment-pigment interactions. *J. Biol. Chem.* 277, No. 39, pp. 36253-36261.
- Morosinotto, T., Caffarri, S., Dall'Osto, L., Bassi, R. (2003):** Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiol. Plantarum* 119, pp. 347-354.
- Moya, I., Silvestri, M., Vallon, O., Cinque, G., Bassi, R. (2001):** Time-resolved fluorescence analysis of the photosystem II antenna proteins in detergent micells and liposomes. *Biochemistry*, Vol. 40, pp. 12552-12561.
- Müller-Moulé, P., Conklin, P.L., Niyogi, K.K. (2002):** Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity *in vivo*. *Plant Physiology*, Vol. 128, pp. 970–977.
- Nield, J., Funk, C., Barber, J. (2000):** Supermolecular structure of photosystem II and location of the PsbS protein, *Proc. R. Soc. Lond.* 355, pp.1337– 1344.
- Niyogi, K.K., Grossman, A.R., Björkman, O. (1998):** *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophylls cycle in the regulation of the photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10, pp. 1121-1134.

- Niyogi, K.K. (1999):** Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, pp. 333-359.
- Pagano, A., Cinque, G., Bassi, R. (1998):** In vitro reconstitution of recombinant photosystem II light-harvesting complex CP24 and its spectroscopic characterization. *J. Biol. Chem.*, Vol. 273, No. 27, pp. 17154-17165.
- Paulsen, H., Rümmler, U., Rüdiger, W. (1990):** Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* 181, pp. 204-211.
- Paulsen, H., Finkenzeller, B. and Kühnlein, N. (1993):** Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur. J. Biochem.* 215, pp. 809-816.
- Pascal, A., Gradinaru, C., Wacker, U., Peterman, E., Calkoen, F., Irrgang, K.-D., Horton, P., Renger, G., van Grondelle, R., Robert, B., van Amerongen, H. (1999):** Spectroscopic characterization of the spinach Lhcb4 protein (CP29), a minor light-harvesting complex of photosystem II. *Eur. J. Biochem.* 262, pp. 817-823.
- Pascal, A.A., Liu, Z., Broess, K., van Oort, B., van Amerongen, H., Wang, C., Horton, P., Robert, B., Chang, W. and Ruban, A. (2005):** Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting. *Nature*, Vol. 436, pp. 134-137.
- Pesaresi, P., Sandonà, D., Giuffra, E., Bassi, R. (1997):** A single point mutation (E 166 Q) prevents dicyclohexylcarbodiimide binding to the photosystem II subunit CP29. *FEBS Letters* 402, pp. 151-156.
- Peter, G.F., Thornber, J.P. (1991):** Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J. Biol. Chem.* 266, pp. 16745-16754.
- Pichersky, E., Jansson, S. (1996):** The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding polypeptides and their genes in angiosperm and gymnosperm species. In: D.R. Ort and C.F. Yocum (Eds.), *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 507-521.
- Plumley, F.G., Schmidt, G.W. (1987):** Reconstitution of chlorophyll *a/b*-binding-light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, pp. 146-150.
- Polívka, T., Zigmantas, D., Sundström, V., Formaggio, E., Cinque, G., and Bassi, R. (2002):** Carotenoid S1 state in a recombinant light-harvesting complex of photosystem II. *Biochemistry*, Vol. 41, pp. 439-450.
- Polívka, T., Herek, J. L., Zigmantas, D., Åkerlund, H.-E., and Sundström, V. (1999):** Direct observation of the (forbidden) S1 state in carotenoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, pp. 4914-4917.
- Purisheimo, S. Martinsuo, P., Rintamäki, E., Aro, E.-M. (2003):** Photosystem II phosphorylation follows four distinctly different regulatory patterns induced by environmental cues. *Plant, Cell and Environment* 26, pp. 1995-2003.
- Remelli, R., Varotto, C., Sandonà, D., Croce, R., Bassi, R. (1999):** Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex. *J. Biol. Chem.* 274, pp. 33510-33521.
- Rockholm, D.C. and Yamamoto, H.Y. (1996):** Violaxanthin de-epoxidase: Purification of a 43-kilodalton lumenol protein from lettuce by lipid-affinity precipitation with monogalactosyldiacylglyceride. *Plant Physiol.* 110, pp. 687-703.
- Ros, F., Bassi, R., Paulsen H. (1998):** Pigment-binding properties of recombinant photosystem II subunit CP26 reconstituted in vitro. *Eur. J. Biochem.* 253, pp. 653-658.
- Rogl, H. and Kühlbrandt, W. (1999):** Mutant trimers of light-harvesting complex II exhibit altered pigment content and spectroscopic features. *Biochemistry* 38, pp. 16214-22.

- Ruban, A.V., Walters, R.G., Horton, P. (1992):** The molecular mechanism of the control of excitation energy dissipation in chloroplast membranes. Inhibition of Δ pH-dependent quenching of chlorophyll fluorescence by dicyclohexylcarbodiimide. *FEBS Letters* Vol. 309, No. 2, pp. 175-179.
- Ruban, A.V., Young, A.J., Pascal, A.A., Horton, P. (1994):** The effect of the xanthophyll composition of the photosystem II light-harvesting complexes of spinach thylakoid membranes. *Plant Physiol.* 104, pp. 227-234.
- Ruban, A.V., Lee, P.J., Wentworth, M., Young, A.J., Horton, P. (1999):** Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light-harvesting complexes. *J. Biol. Chem.* Vol. 274, No. 15, pp. 10458-10465.
- Ruban, A.V., Pascal, A.A., Robert, B., Horton, P. (2001):** Configuration and dynamics of xanthophylls in light-harvesting antennae of higher plants. *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, No. 27, pp. 24862-24870.
- Ruban, A.V., Pascal, A., Lee, P.J., Robert, B., Horton, P. (2002a):** Molecular Configuration of Xanthophyll Cycle Carotenoids in Photosystem II Antenna Complexes. *J. Biol. Chem.* Vol. 277, No. 45, pp. 42937-42942.
- Ruban, A.V., Pascal, A.A., Robert, B., Horton, P. (2002b):** Activation of Zeaxanthin is an obligatory event in the regulation of photosynthetic light harvesting. *J. Biol. Chem.*, Vol 277, No. 10, pp. 7785-7789.
- Ruban, A.V., Wentworth, M., Yakushevskaya, A.E., Andersson, J., Lee, P.J., Keegstra, W., Dekker, J.P., Boekema, E.J., Jansson, S., Horton, P. (2003):** Plants lacking the main light-harvesting complex retain photosystem II macro-organization, *Nature* 421, pp. 648-652.
- Rupprecht, J., Paulsen, H., Schmid, V.H.R. (2000):** Protein domains required for formation of stable monomeric Lhca1 and Lhca4 complexes. *Photosynthesis Research* Vol. 63, pp. 217-224.
- Sambrook, J., Russel, D. W. (2004):** *Molecular Cloning: A laboratory manual.* Vol. 1-3, 3rd edition, ColdSpring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY, USA).
- Siefermann-Harms, D. (1984):** Evidence for a heterogeneous organization of violaxanthin in thylakoid membranes. *Photochem. Photobiol.* 40, pp. 507-512.
- Siefermann, D., and Yamamoto, H. Y. (1975):** Light-induced deepoxidation of violaxanthin in lettuce chloroplasts. IV. The effects of electron-transport conditions on violaxanthin availability. *Biochim. et Biophys. Acta* 387, pp. 149-158.
- Schäfer, C., Schmid, V.H.R., Roos, M. (1994):** Characterization of high light induced increases in xanthophyll cycle pigment and lutein contents in photoautotrophic cell cultures. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 22, pp. 67-75.
- Scheller, H. V., Jensen, P. E., Haldrup, A., Lunde, C., Knoetzel, J. (2001):** Role of subunits in eukaryotic Photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1507, pp. 41-60.
- Schmid, V. H. R. and Schäfer, C. (1994):** Alterations of the chlorophyll-pattern in chronically photoinhibited *Cenophobium rubrum* cells. *Planta* 192, 473-479
- Schmid, V.H.R., Cammarata, K.V., Burns, B.U., Schmidt, G.W. (1997):** *In vitro* reconstitution of photosystem I light-harvesting complex LHCl-730: Heterodimerization is required for antenna pigment organization. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, Vol. 94, pp. 7667-7672.
- Schmid, V.H.R., Potthast, S., Wiener, M., Bergauer, V., Paulsen, H., Storf, S. (2002):** Pigment binding of photosystem I light-harvesting proteins. *J. Biol. Chem.* Vol. 277, No. 40, pp. 37307-37314.
- Snyder, A.M., Clark, B.M., Robert, B., Ruban, A.V., Bungard, R.A. (2004):** Carotenoid specificity of light-harvesting complex II binding sites. *J. Biol. Chem.*, Vol. 279, No. 7, pp. 5162-5168.
- Sonoike, K. und Terashima, I. (1994):** Mechanism of the photosystem I photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. *Planta* 194, pp. 287-293.

- Standfuß, J., van Scheltinga, A.C.T., Lamborghini, M., Kühlbrandt, W. (2005):** Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *Embo J.* 24, pp. 919-928.
- Storf, S., Stauber, E. J., Hippler, M., Schmid, V. H. R. (2004):** Proteomic Analysis of the Photosystem I Light-Harvesting Antenna in Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Biochemistry* 43, pp. 9214–9224.
- Storf, S., Jansson, S., Schmid, V. H. R. (2005):** Pigment binding, fluorescence properties and oligomerization behavior of Lhca5, a novel light-harvesting protein. *J. Biol. Chem.* Vol. 280, No. 7, pp. 5163-5168.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986):** *J. Mol. Biol.* 189, pp. 113–30.
- Takeuchi, C.A. und Yamamoto, H.Y. (1986):** Light-induced $^{18}\text{O}_2$ uptake by epoxy xanthophylls in New Zealand spinach leaves (tetra expans). *Biochim. et Biophys Acta* 153, pp. 459-465.
- Tardy, F. and Havaux, H. (1997):** Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophyll cycle in higher-plant chloroplasts. *Biochim. et Biophys. Acta* 1330, pp. 179–193.
- Thayer, S.S. and Björkman, O. (1990):** Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynth. Res.* 23, pp. 331–343.
- Thayer, S.S., Björkman, O. (1992):** Carotenoid distribution and deepoxidation in thylakoid pigment-protein complexes from cotton leaves and bundle-sheath cells of maize. *Photosyn. Res.* Vol. 33, pp. 213-225.
- Thidholm, E., Lindström, V., Tissier, C., Robinson, C., Schröder, W.P., Funk, C. (2002):** Novel approach reveals localisation and assembly pathway of the PsbS and PsbW proteins into the photosystem II dimer, *FEBS Lett.* 513, pp. 217– 222.
- Tjus, S. E., Roobol-Boza, M., Palsson, L. O., Andersson, B. (1995):** Rapid isolation of photosystem I chlorophyll-binding proteins by anion exchange perfusion chromatography. *Photosynth. Res* 45, pp. 41-49
- Tjus, S.E., Møller, B.L., Scheller, H.V. (1998):** Photosystem I is an early target of photoinhibition in barley illuminated at chilling temperatures. *Plant Physiol.* Vol. 116, pp. 755–764.
- Tjus, S.E., Scheller, H.V., Andersson, B., Møller, B.L. (2001):** Active oxygen produced during selective excitation of photosystem I is damaging not only to photosystem I, but also to photosystem II. *Plant Physiol.* 125, pp. 2007-2015.
- Verhoeven, A.S., Adams III, W.W., Demmig-Adams, B., Croce, R., Bassi, R. (1999):** Xanthophyll cycle pigment localization and dynamics during exposure to low temperatures and light stress in *Vinca major*. *Plant Physiology*, Vol. 120, pp. 727-737
- Voigt, B., Irrgang, K.-D., Ehlert, J., Beenken, G., Renger, G., Leupold, D., Lokstein, H. (2002):** Spectral substructure and excitonic interactions in the minor photosystem II antenna complex CP29 as revealed by nonlinear polarization spectroscopy in the frequency domain. *Biochemistry* 41, pp. 3049-3056.
- Walters, R.G., Horton, P. (1995):** in *Photosynthesis: From Light to Biosphere* (Mathis, P., Ed.) Vol. 1, 299-302.
- Wentworth, M., Ruban, A.V., Horton, P. (2000):** Chlorophyll fluorescence quenching in isolated light harvesting complexes induced by zeaxanthin. *FEBS Letters* No. 471, pp. 71-74.
- Wentworth, M., Ruban, A.V., Horton, P. (2003):** Thermodynamic investigation into the mechanism of the chlorophyll fluorescence quenching in isolated photosystem II light-harvesting complexes. *J. Biol. Chem.*, Vol. 278, No. 24, pp. 21845-21850.

- Wentworth, M., Ruban, A.V., Horton, P. (2004):** The functional significance of the monomeric and trimeric states of the photosystem II light harvesting complexes. *Biochemistry*, Vol. 43, pp. 501-509.
- Yakushevskaya, A.E., Keegstra, W., Boekema, E.J., Dekker, J.P., Andersson, J., Jansson, S., Ruban, A.V., Horton, P. (2003):** The structure of photosystem II in *Arabidopsis*: localization of the CP26 and CP29 antenna complexes, *Biochemistry* 42, pp. 608– 613.
- Yang, C., Kosemund, K., Cornet, C., Paulsen, H. (1999):** Exchange of pigment-binding amino acids in light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein. *Biochemistry* 38, pp. 16205-16213.
- Yamamoto, H. Y., Nakayama, T. O. M., Chichester, C. O. (1962):** Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Arch. Biochem. Biophys.* 97, pp.168 173.
- Yamamoto, H.Y. (1985):** Xanthophyll cycles. *Methods Enzymol.* 110, pp. 303–312.
- Zhu, J., Gómez, S.M., Mawson, B.T., Jin, X., Zeiger, E. (1997):** The coleoptile chloroplast: Distinct distribution of xanthophylls cycle pigments, and enrichment in photosystem II. *Photosynth. Res.* 51, pp. 137-147.

5 Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

A ₀	Chlorophyll a
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Ax	Antheraxanthin
BSA	Rinderserumalbumin
CAB	Chlorophyll a/b-bindend
Car	Carotinoide
Chl	Chlorophyll
¹ Chl*	Singulett Chlorophyll
³ Chl*	Triplet-Chlorophyll
CO ₂	Kohlendioxid
DEPS	De-epoxidationszustand (Zx+0.5Ax/VAZ)
dNTP	Deoxynucleosidtriphosphat
β-DM	n-Dodecyl-β-D-Maltosid
DMSO	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ELIP	engl. <i>early light-induced protein</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
Fd	Ferredoxin
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl)-1piperazinyl]-ethansulfonsäure
HLIPS	engl. <i>high light induced protein</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktosid
K	Kelvin
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KDS	Kaliumdodecylsulfat
LB	Luria-Bertani-Medium
LHC	Lichtsammelkomplex (engl. <i>light-harvesting complex</i>)
LHCI	engl. <i>light-harvesting complex I</i>
LHCII	engl. <i>light-harvesting complex II</i>
Lhca	Proteine des PSI Lichtsammelkomplexes
<i>lhca</i>	Gene für Lichtsammelkomplexe des PSI
Lhcb	Proteine des PSII Lichtsammelkomplexes
<i>lhcb</i>	Gene für Lichtsammelkomplexe des PSII
L1	Lutein-Bindestelle 1
L2	Lutein-Bindestelle 2

LDS	Lithiumdodecylsulfat
Lut	Lutein
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MGDG	Monogalaktosyldiacylglycerid
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
N1	Neoxanthin Bindestelle
Nx	Neoxanthin
NPQ	engl. <i>non photochemical quenching</i>
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OG	Octyl- β -D-glycopyranosid
OEC	engl. <i>oxygen-evolving-complex</i>
PC	Plastocyanin
PCR	Polymerasekettenreaktion
ΔpH	pH-Gradient
pI	isoelektrischer Punkt
PQ	Plastochinon
PS	Photosysteme
qE	pH-abhängige Fluoreszenzlöschung
qI	photoinhibitorische Fluoreszenzlöschung
qT	Fluoreszenzlöschung durch state transition
RT	Raumtemperatur
ROS	reaktiven Sauerstoffspezies
RZ	Reaktionszentrum
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEPS	engl. <i>stress enhanced protein</i>
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS	engl. TRIS buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
TRIS	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	engl. <i>unit</i>
UV	ultraviolett
V1	Violaxanthin Bindestelle
VAZ	Summe der Xanthophyllzykluspigmente Vx, Ax, Zx
VDE	Violaxanthin-De-epoxidase
Vol.	Volumen
Vx	Violaxanthin
(v/v)	volume per volume
W	Watt
(w/v)	weight per volume
ZE	Zeaxanthin-Epoxidase
Zx	Zeaxanthin

Danksagung

Herrn Prof. Dr. P. Jahns danke ich für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe die Violaxanthin-De-epoxidation an Antennenkomplexen höherer Pflanzen zu untersuchen. Insbesondere möchte ich ihm für den Freiraum danken, den er mir in meiner Arbeitsweise gewährte und dabei jeder Zeit für die verschiedenen Fragestellungen offen war.

Herrn Prof. Dr. A.W. Holzwarth möchte ich für die freundliche Übernahme des Koreferates danken.

Ein besonderer Dank geht an Prof. H. Paulsen der Universität Mainz, in dessen Labor ich während meiner Doktorarbeit sehr häufig zu Gast sein durfte.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. S. Hobe bedanken, der mich in Mainz betreut hat und mir in Diskussionen oft wertvolle Anregungen geben konnte. Darüber hinaus danke ich ihm und seiner Familie für die herzliche Gastfreundschaft, mit der sie mich immer wieder in ihrer Familie aufgenommen haben.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. V.H.R. Schmid und Frau Dr. S. Storf möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit im LHCI-Projekt bedanken.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie der Pflanzen für die sehr freundschaftliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre bedanken, die mir über manche Durststrecke im Laboralltag hinweg geholfen hat.

Maria und Thomas danke ich für die vielen Gespräche und Diskussionen, die wir in unserem kleinen „Denkraum“ geführt haben.

Ein besonderes Dankeschön geht an Heike, Sylvia und Thomas für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner Familie, insbesondere Andreas und Tjabbo, für ihr Verständnis und ihre tatkräftige Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie Zitate kenntlich gemacht wurden.

Wuppertal, den 13. Oktober 2005

Antje Wehner