

**Biogenese photosynthetischer Elektronentransport-
Komplexe in Plastiden der Gerste
(*Hordeum vulgare L.*)**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Veronika Reisinger
aus Zorneding

Januar 2008

Erstgutachter Prof. Dr. L. A. Eichacker

Zweitgutachter: Prof. Dr. H. Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juni 2008

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Lutz Eichacker durchgeführt.

Ihm danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit in seinem gut ausgestatteten Labor durchführen zu können. Dank des entspannten Arbeitsklimas und der geistigen und materiellen Freiheit, die er mir sowohl bei der Gestaltung des Labors als auch der Versuchsplanung und -durchführung ließ, konnte ich alle Dinge, die ich mir vorstellte, auch ausprobieren.. Ich hoffe, dass es uns gemeinsam gelungen ist, die Technik der Blue native PAGE erfolgreich an viele andere Wissenschaftler zu vermitteln.

Außerdem vielen Dank an:

- Meinen langjährigen Mitstreitern für die selbstverständliche Hilfe bei Problemen im Laboralltag und die freundschaftliche und meist sehr heitere Arbeitsatmosphäre...

...Bernhard, der sich am häufigsten mit mir und meiner Arbeit auseinandersetzen musste, für die beständige Bereitschaft, alle auftauchenden Herausforderungen und Probleme gemeinsam zu meistern und sein offenes Ohr, für alles, was mich beschäftigte, auch wenn es ihn (vermutlich) nicht immer interessiert hat. Außerdem für die geduldige Einweisung in die Massenspektrometrie und die immerwährende Hilfestellung, nicht nur bei der Identifizierung von Proteinen. Und dass er das Labor nicht vor mir verlassen hat.

...Mikael für den ihm eigenen Humor, der mich nahezu vom ersten Tag an begleitete und die stetige Hilfe, besonders beim Auf- und Einräumen des Labors. Mit seiner Fähigkeit, bisher noch unentdeckte Ecken und Schubladen für die Aufbewahrung für Laborutensilien zu nutzen, hat er für eine gewisse Abwechslung in der Laborroutine gesorgt. Außerdem für die Hingabe bei der Pflege aller Laborgeräte, die kein anderer von uns erreichte.

...Axel für seine Computerkenntnisse, die selbst den widerspenstigsten Computer wieder zum Arbeiten brachten und mich dazu, den Kugelschreiber gegen die Tastatur zu tauschen. Danke für den Kicker, der mir eine Schwäche beim Torschuß offenbarte. Außerdem danke ich ihm dafür, dass er mich beim Kickern auch mal gewinnen hat lassen. Ohne ihn wüsste ich nicht, wie man mit möglichst wenig Geld möglichst angenehm lebt.

- Den weiteren, aktuellen Labormitarbeitern....

...Matthias, dass er trotz seines straffen Zeitplans immer Zeit für meine MS-Proben gefunden hat und für das aufgereinigte Protochlorophyllid. Von seiner Fähigkeit, trotz seiner schlanken Figur immense Mengen an Schokolade zu vertilgen, haben alle profitiert, da er

- uns großzügig mit Schokoladentafeln versorgte und damit auch einen entscheidenden Beitrag bei der Vervollständigung der Ritter Sport und Co-Sammlung leistete.
- ...Nora, für die Hilfe beim Versuch, Ordnung in das Labor zu bringen und den unermüdlichen Einsatz bei der Entsorgung der zahllosen Versuchsansätze prähistorischer Forschung und dem überflüssigen Eis in diversen Kühl- und Eisschränken. Außerdem für den gemeinsamen Sieg beim Kickern, der im Vorfeld so nicht zu erwarten war.
- ...Oliver, dass er sich der Massenspektrometer annehmen wird und die Erkenntnis, dass man sich nie genug aufschreiben kann.
- „meinen“ Diplomanden....
- ...Maria und Karin für die stetige Versorgung mit Süßigkeiten und den erfolgreichen Kampf mit Antikörpern, die ein durchaus mysteriöses Eigenleben zeigten und die Erkenntnis der „positiven Verstärkung“.
- ...Uli, für ihre temperamentvolle Art und den Schwung, mit der sie an alle Arbeiten heranging.
- ...Alex für die Arbeiten am Cytochrom-Komplex und die Betrachtung der Welt aus der Sicht der Plastide.
- Des weiteren....
- ...Dr. Kay Teja Junghanns und Dr. Burghardt Scheibe von GE Healthcare für die tatkräftige Hilfe zu Beginn der Arbeit mit dem DIGE-System, die in den ersten Monaten die Fluoreszenzscans erst ermöglichte.
- ...der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Scheer für die Referenzpigmente.
- ...der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Soll für die Erbsenpflanzen.
- ...und allen anderen, die für eine kürzere oder längere Zeit den Laboralltag auf die eine oder andere Weise bereichert haben.
- meinen Eltern für ihre Geduld und die Unterstützung in jeglicher Art und Weise, die es mir immer ermöglichten, meine Vorstellungen verwirklichen zu können. Außerdem meinen Schwestern, für die abwechslungsreiche Gestaltung zahlreicher Abende und das Gefühl, zumindest manch Alltagsnahe in den letzten Jahren fürs Leben gelernt zu haben.

Publikationen

Reisinger, V., Hertle, A.P., Plösch, M., Eichacker, L.A. (2008). Cyt b_6f is a dimeric protochlorophyll a binding complex in etioplasts. FEBS J, angenommen

Reisinger, V. and Eichacker, L.A. (2008). Membrane proteome analysis by Blue native PAGE, in: Proteomics of the Nervous System. (Nothwang, H. G. /Pfeiffer, S. E. Hrsg.), Wiley-VCH, Weinheim, angenommen

Reisinger, V. and Eichacker, L.A. (2008). Isolation of membrane protein complexes by Blue Native Electrophoresis, in: Methods in Molecular Biology: Sample Preparation and Pre-Fractionation for 2D PAGE Methods and Protocols in Expression Proteomics. (Posch, A., Hrsg.), Humana Press, New York, 423-31, im Druck

Reisinger, V. and Eichacker, L.A. (2007). How to Analyze Protein Complexes by 2D Blue Native SDS-PAGE. Proteomics, **7** (S1), 6-16

Moslavac S., Reisinger V., Berg M., Mirus O., Vovsky O., Ploscher M., Flores E., Eichacker L.A., Schleiff E. (2007). The proteome of the heterocyst cell wall in *Anabaena* sp. PCC 7120. Biol Chem, **388** (8), 823-9

Reisinger, V. and Eichacker, L.A. (2006). Analysis of Membrane Protein Complexes by Blue Native PAGE. Proteomics, **6** (S2), 6-15

Granvogl B., Reisinger V., Eichacker L.A. (2006). Mapping the proteome of thylakoid membranes by de novo sequencing of intermembrane peptide domains. Proteomics. **6** (12), 3681-95

Komenda J., Reisinger V., Muller B.C., Dobakova M., Granvogl B., Eichacker L.A. (2004). Accumulation of the D2 protein is a key regulatory step for assembly of the photosystem II reaction center complex in *Synechocystis PCC 6803*. J Biol Chem., **279** (47), 48620-9

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μE	Mikroeinstein
μl	Mikroliter
μm	Mikroeinstein
Abb	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP- Synthase- Komplex
BL	Beladungslösung
BN	blau nativ
BP	band pass
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	circa
Chl	Chlorophyll
Chlid	Chlorophyllid
cm	Centimeter
CN	farblos nativ
CNL	farblos nativ mit Lithium-Dodecylsulfat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cytb ₆ f	Cytochrom b ₆ f
DCIP	2,6-Dichloroindophenol
ddH ₂ O	zweifach über Ionenaustauscher entsalztes Wasser
DIGE	differentielle Gelelektrophorese
DM	n-Dodecyl-β-D-maltosid
DMF	Dimethylformamid
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylen
Em.	Emission
Exc.	Anregung
Fe	Eisen
g	Konstante der Erdanziehungskraft
GroEL	Chaperonkomplex des Chloroplasts bestehend aus einer großen und kleinen Untereinheit
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HMW	high molecular weight
HRP	Horse radish peroxidase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
L	Licht
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LHC	Lichtsammelkomplex
Lil	Lichtsammelkomplexprotein ähnliches Protein
m/z	Masse pro Ladung
m ²	Quadratmeter

mA	Milliampere
MBP	Maltose-Bindeprotein
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MTBS	Milchpulver in Tris buffered saline
NaCO ₃	Natriumcarbonat
NADPH/H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.A.	pro analysi
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PChl	Protochlorophyll
PChlid	Protochlorophyllid
Ph	potentia hydrogenii
PLB	Prolamellarkörper
pmol	Pikomol
POR	Protochlorophyllid-Oxidoreduktase
PS	Photosystem
RC	Reaktionszentrum
RCCII	Reaktionszentrum des Photosystems II
R _f	ratio front
RubisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
s	Sekunde
SB	Solubilisierungspuffer
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMK	Tris-Magnesium-Kalium
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
W	Watt

Zusammenfassung

Es wurde die Biogenese von Pigment-bindenden Proteinkomplexen der Plastidenmembran während der Ergrünung untersucht. Dabei dienten im Dunkeln angezogene Keimlinge bzw. die daraus isolierten Etioplasten und deren Membranproteinkomplexe als Startpunkt der Untersuchung. Die Biogenese der einzelnen Komplexe wurde bei Erreichen einer Assemblierungsstufe als abgeschlossen betrachtet, wenn diese im Chloroplasten als komplexeste Assemblierungsform identifiziert worden war.

I. Zur Identifikation und Charakterisierung der Pigment-bindenden Komplexe wurden folgende Methoden weiterentwickelt.

1. Die Methode der differentiellen Gelelektrophorese wurde für Membranproteinkomplexe etabliert, um verschiedene Assemblierungsintermediate zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Ergrünung direkt miteinander vergleichen zu können.
2. Es wurde ein natives PAGE-System entwickelt, welches in seinen Trenneigenschaften dem System der blue native PAGE entspricht, um neue Daten mit Ergebnissen, die zu einem früheren Zeitpunkt durch blue native PAGE erzielt wurden, direkt vergleichen zu können.
3. Farblose, native PAGE und in-Gel Absorptionsspektroskopie wurden kombiniert, um den Zeitpunkt der Bindung von Pigmenten an einzelne Komplexe nachzuweisen und die gebundenen Pigmente charakterisieren zu können.

II. Durch die Kombination aller Techniken konnten folgende Aussagen zur Situation im Etioplasten und zum Ablauf der *de novo* Assemblierung von Pigment-bindenden Komplexen während der Ergrünung getroffen werden.

1. Der ATP-Synthase- und der Cytochrom b_6f -Komplex liegen bereits im Etioplasten in der aus dem Chloroplasten bekannten hochmolekularen Assemblierungsstufe vor.
2. Im dimeren Cytochrom b_6f -Komplex kann im Etioplasten anstelle von Chlorophyll a Protochlorophyll a nachgewiesen werden.
3. Unmittelbar nach der Initiation der Chlorophyllbiosynthese ist der Großteil des *de novo* synthetisierten Chlorophylls in der Membran nicht mit Photosystemkomplexen assoziiert, sondern transient mit dem membranintegralen Lil 3-Protein.
4. Nach einer Stunde Belichtung können sowohl Photosystem I wie auch Photosystem II-Komplexe nachgewiesen werden.

5. Erste LHC- Komplexe sind nach zweistündiger Belichtung zu detektieren. Die Assemblierung der LHC II- Proteine erfolgt im Gegensatz zu den LHC I- Proteinen über die Bildung mehrerer Assemblierungsintermediate.
6. Nach vierstündiger Belichtung hat die Assemblierung aller Thylakoidmembrankomplexe die komplexeste Assemblierungsstufe erreicht, welche aus dem Chloroplasten bekannt ist.

III. Aufgrund dieser Aussagen wurde ein Modell zur Chronologie der *de novo* Assemblierung der Pigment-bindenden Proteine während der Ergrünung entwickelt, welches folgende Hauptaussagen enthält.

1. Der Cytochrom b_6/f -Komplex ist der einzige Chlorophyll-bindende Komplex, der bereits in der Abwesenheit von Chlorophyll unter Ersatz des Chlorophylls durch ein Chlorophyllderivat akkumulieren kann.
2. Die Identifikation des Lil 3-Proteins als Chlorophyll-bindendes Protein weist erstmals auf eine mögliche Funktion dieses Proteins als temporärer Chlorophyllspeicher hin.
3. Sowohl während der Assemblierung des Photosystems I wie auch des Photosystems II können mehrere Assemblierungsintermediate nachgewiesen werden.
4. Die Assemblierung des Photosystems I hat zeitlich die aus dem Chloroplasten bekannte Assemblierungsstufe vor der Assemblierung des Photosystems II erreicht, wobei die Anlagerung der LHC-Proteine bei beiden Photosystemen den finalen Assemblierungsschritt darstellt.
5. Nach einer Belichtungszeit von vier Stunden kann die Biogenese der vier an der Lichtreaktion beteiligten Thylakoidmembrankomplexe von proteinbiochemischer Seite als abgeschlossen betrachtet werden.

Inhaltsverzeichnis

A	EINLEITUNG	1
1	Der Aufbau der Chloroplasten.....	1
1.1	Der Ablauf der Licht- und Dunkelreaktion.....	1
1.2	Der Aufbau der strukturellen Komponenten der Lichtreaktion	2
1.2.1	Das Photosystem I.....	3
1.2.2	Das Photosystem II.....	4
1.2.3	Der Cytochrom b_6f -Komplex	5
1.2.4	Die ATP-Synthase.....	7
2	Die Chlorophyll-abhängige Entwicklung der Chloroplasten.....	8
2.1	Die lichtabhängige Chlorophyllsynthese in Angiospermen.....	8
2.2	Der Prozess der Ergrünung	9
2.2.1	Einfluss von Licht auf Akkumulation der Chlorophyll-bindenden Proteine	9
2.2.2	Assemblierung der Chlorophyll-bindenden Proteinkomplexe während der Ergrünung.....	9
3	Aufgabenstellung.....	11
B	MATERIAL UND METHODEN	12
1	Material.....	12
1.1	Chemikalien	12
1.2	Pflanzenmaterial.....	12
1.3	Molekularmassenstandard	12
1.4	Antikörper	13
1.5	Referenzpigmente.....	13
1.6	Geräte	13
2	Methoden.....	14
2.1	Anzucht der Gerstenkeimlinge.....	14
2.1.1	Etiolierte Keimlinge	14
2.1.2	Ergrünende Keimlinge	14
2.1.3	Grüne Keimlinge	14
2.2	Anzucht der Erbsenpflanzen	15
2.3	Plastidenisolation	15

Inhaltsverzeichnis

2.3.1	Isolation intakter Plastiden	15
2.3.2	Bestimmung der Gerstenplastidenkonzentration	16
2.3.3	Bestimmung der Erbsenplastidenkonzentration.....	16
2.4	Isolation von Membranproteinen	17
2.4.1	Isolation der inneren Plastidenmembranen	17
2.4.2	Isolation nativer Membrankomplexe	17
2.4.3	Isolation von Einzelproteinen.....	19
2.5	Native Elektrophorese	19
2.5.1	Blue native Polyacrylamidelektrophorese (BN-PAGE).....	20
2.5.2	Colourless native Polyacrylamidelektrophorese (CN-PAGE).....	20
2.5.3	Colourless native LDS Polyacrylamidelektrophorese (CNL-PAGE)	20
2.6	Denaturierende Elektrophorese	21
2.6.1	Eindimensionale SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE).....	22
2.6.2	SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) im Anschluss an native PAGE	22
2.7	Detektion von Proteinen.....	22
2.7.1	Autofluoreszenz	23
2.7.2	CyDye-Markierung	23
2.7.3	Coomassiefärbung.....	25
2.7.4	Colloidale Coomassiefärbung	25
2.7.5	Silberfärbung.....	26
2.8	Identifikation von Proteinen.....	27
2.8.1	Immunodetektion	27
2.8.2	<i>De novo</i> Sequenzierung.....	28
2.9	Identifikation von Pigmenten	29
2.9.1	Absorptionsspektroskopie	29
2.9.2	Dünnschichtchromatographie (DC)	29
2.9.3	Massenspektrometrie.....	30
C	ERGEBNISSE	31
1	Vergleich von Membranproteinkomplexen des Etio- und Chloroplasten	31
1.1	Trennung der Membranproteinkomplexe über BN-PAGE	31
1.2	Zusammensetzung der Thylakoidmembrankomplexe	33
1.3	Zusammensetzung der Membrankomplexe des Etioplasten	36

2	Membranproteinkomplexe und DIGE	37
2.1	Membrangängigkeit von CyDyes.....	38
2.2	Vergleich unterschiedlicher Färbeverfahren	41
2.3	Vergleich von Etio- und Chloroplasten mittels DIGE	43
3	Farblose native PAGE (CNL-PAGE)	46
3.1	Vergleich von BN- und CNL-PAGE	48
3.1.1	Zusammensetzung der Proteinkomplexe nach BN- oder CNL-PAGE	49
3.1.2	Fluoreszenzeigenschaften der Proteinkomplexe nach nativer PAGE	50
3.1.3	Fluoreszenzeigenschaften von Proteinuntereinheiten nach CNL/ SDS-PAGE ...	52
3.1.4	In Gel Absorptionsspektroskopie von Proteinkomplexen nach nativer PAGE....	53
3.1.5	Immunodetektion von Proteinkomplexen nach nativer PAGE	54
4	Biogenese von Membranproteinkomplexen während der Ergrünung	56
4.1	Charakterisierung der Proteinkomplexe des Chloroplasten	56
4.1.1	Fluoreszenzdetektion.....	57
4.1.2	Immunodetektion	60
4.1.3	Absorptionsspektroskopie	62
4.2	Charakterisierung der Proteinkomplexe des Etioplasten	64
4.2.1	Fluoreszenzdetektion.....	65
4.2.2	Absorptionsspektroskopie	67
4.2.3	Dünnschichtchromatographie (DC)	69
4.2.4	Massenspektrometrie.....	70
4.2.5	Immunodetektion	71
4.3	Charakterisierung von Proteinkomplexen nach einstündiger Belichtung von etiolierten Keimlingen.....	73
4.3.1	DIGE von Membrankomplexen des Etioplasten und Plastiden aus etiolierten Keimlingen nach einstündiger Belichtung (1h L)	74
4.3.2	Fluoreszenzdetektion der Pigment-bindenden Proteine in Komplexen bzw. Komplexuntereinheiten	75
4.3.3	Identifikation der Pigment-bindenden Komplexuntereinheiten.....	77
4.3.4	Absorptionsspektroskopie	81
4.4	Verteilung von de novo synthetisierten Chlorophyll auf die Membran- proteinkomplexe.....	83
4.4.1	Identifikation der gebundenen Pigmente.....	83
4.4.2	Identifikation der Chlorophyll a-bindenden Proteinkomplexe.....	84

4.5	Charakterisierung der Membrankomplexe nach zweistündiger Belichtung etiologierter Keimlinge.....	86
4.5.1	DIGE von Membrankomplexen nach einstündiger und zweistündiger Belichtung etiologierter Keimlinge	86
4.5.2	Nachweis der Pigment-bindenden Proteine in Komplexen bzw. Komplexuntereinheiten anhand endogener Fluoreszenz.....	88
4.5.3	Identifikation der Pigment-bindenden Komplexuntereinheiten.....	90
4.5.4	Charakterisierung der an die Proteinkomplexe gebundenen Pigmente.....	94
4.6	Charakterisierung der Membrankomplexe nach vierstündiger Belichtung etiologierter Keimlinge.....	96
4.6.1	DIGE von Membrankomplexen nach zweistündiger und vierstündiger Belichtung etiologierter Keimlinge	96
4.6.2	Nachweis der Pigment-bindenden Proteine in Komplexen bzw. Komplexuntereinheiten anhand endogener Fluoreszenz.....	98
4.6.3	Identifikation der Pigment-bindenden Komplexuntereinheiten.....	100
4.6.4	Identifikation der Pigmente durch Absorptionsspektroskopie.....	105
4.7	Vergleich der Membrankomplexe nach vierstündiger Belichtung mit den Komplexen des Chloroplasten	107
4.8	Überblick über die zeitliche Abfolge der Assemblierung der Pigment-bindenden Membrankomplexe während der Ergrünung	108
D	DISKUSSION	111
1	DIGE und Membranproteinkomplexe.....	111
1.1	Die Methode der DIGE ist auch mit nativen Gelsystemen koppelbar	111
1.2	Prä- und postelektrophoretische Färbetechniken liefern ein sich ergänzendes Bandenmuster.....	112
2	Spektrale Eigenschaften der Proteinkomplexe und Einzelproteine.....	114
2.1	Die Detektion der Chlorophyll-bindenden Proteine aufgrund von Chlorophyllfluoreszenz ist nach SDS-PAGE noch teilweise möglich	114
2.2	Die Mischung von anionischen und nicht-ionischen Detergenzien ermöglicht die Auftrennung von nativen Proteinkomplexen	115
2.2.1	BN-PAGE eignet sich nicht für spektrale Untersuchungen von Pigment-bindenden Komplexen	115

2.2.2	Die CN-PAGE liefert für die Thylakoidmembrankomplexe keine gute Auflösung	116
2.2.3	Durch die Mischung mit nicht-ionischen Detergenzien wird die denaturierende Wirkung von LDS deutlich abgeschwächt.....	117
3	Der Cyt b₆f-Komplex liegt bereits im Etioplasten als Dimer vor	118
3.1	Im Etioplasten wird anstelle des Chlorophylls Protochlorophyll in den dimeren Cyt b ₆ f-Komplex eingebaut.....	119
3.1.1	Protochlorophyll scheint eine essentielle Rolle im etioplastidären Cyt b ₆ f-Komplex zu besitzen	119
3.1.2	Protochlorophyll scheint ein Bestandteil sowohl des dimeren wie auch des monomeren Cyt b ₆ f-Komplexes zu sein.....	120
3.1.3	Protochlorophyll wird wie Chlorophyll a mit der Untereinheit b ₆ isoliert.....	121
3.1.4	Protochlorophyll erfüllt eine strukturelle Rolle im Cyt b ₆ f-Komplex.....	121
3.2	Gibt es bereits eine funktionelle Elektronentransportkette im Etioplasten?	123
4	Der Lil 3-Komplex ist einer der ersten Komplexe, in denen der Nachweis von Chlorophyll möglich ist	124
4.1	Das Lil 3-Protein ist ein Mitglied der Familie der Chlorophyll a/b-bindenden Proteine	124
4.1.1	Handelt es sich bei dem im Lil 3-Komplex nachgewiesenen Protochlorophyll um einen Komplexbestandteil oder eine Kontamination?	124
4.2	Die Lil 3-Komplexe könnten verschiedene Aufgaben während der Ergrünung besitzen.....	125
4.2.1	Die Lil 3-Komplexe könnten als temporärer Chlorophyllspeicher genutzt werden	126
4.2.2	Lil 3 könnte eine Rolle beim Chlorophylltransfer auf Chlorophyll-bindende Proteine spielen	127
4.3	Die genaue Zusammensetzung der Lil-Komplexe ist noch ungeklärt	128
5	Die POR ist in etiolierten und ergrünendem Gewebe in mehreren Aggregationsformen nachweisbar	129
5.1	Die membranassoziierte POR wird mit der Membranfraktion isoliert	129
5.1.1	Die POR könnte über ein membranständiges Protein am PLB gebunden sein..	129
5.1.2	Die POR könnte je nach Aggregationsform am oder im PLB lokalisiert sein...	130
5.2	Es gibt verschiedene photoaktive Assemblierungsstufen der POR	130

5.2.1	Nach der Elektrophorese ist Pigment nur noch an die monomere Form der POR gebunden	131
5.2.2	Die niedermolekularen POR-Protein-Komplexe bleiben während der Ergrünung am längsten detektierbar	132
6	Bindung der Chlorophylle an die Photosystemproteine	133
6.1.1	Die Bindung des Chlorophylls an die Proteine könnte direkt oder indirekt durch Chlorophylltransferproteine bewerkstelligt werden.....	133
6.1.2	Nach einer Stunde Belichtung ist keine hierarchische Chlorophyll a-Verteilung nachweisbar	134
6.1.3	Die Reaktionszentrumsproteine des PS II weisen eine geringe Affinität zu Chlorophyll auf	135
6.1.4	Der Zeitpunkt der Chlorophyllbindung an D2 ist offen.....	136
7	Assemblierung der Photosystem-Komplexe	137
7.1	Die Assemblierung von PS II kann durch native/SDS-PAGE in mehr Einzelschritte aufgelöst werden als von PS I	137
7.2	Die Assemblierung der Komplexe des linearen Elektronentransports ist nach vier Stunden Belichtung abgeschlossen	138
7.2.1	Der PS I-Reaktionszentrumskomplex ist nach einstündiger Belichtung assembliert.....	138
7.2.2	Die Assemblierung des PS I-LHC-Komplex ist nach zweistündiger Belichtung abgeschlossen	139
7.2.3	PS II liegt nach einstündiger Belichtung als monomerer PS II-Komplex vor ...	140
7.2.4	Ist die Assemblierung des dimeren PS II-Komplexes während der Ergrünung mit der Existenz von Granathylakoiden gekoppelt?.....	141
7.2.5	Die LHC II-Komplexe assemblieren nach vierstündiger Belichtung an das PS II	142
7.3	Möglicher zeitlicher Verlauf der Ergrünung.....	143
E	LITERATURVERZEICHNIS	146
F	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	168

A Einleitung

1 Der Aufbau der Chloroplasten

Chloroplasten sind semiautonome Organellen der Pflanzenzelle, welche von einer Doppelmembran umgeben sind. Im Inneren der Chloroplasten befinden sich das Stroma und die Thylakoidmembranen, die entweder dicht gestapelt als Granathylakoide oder den Plastideninnenraum durchziehend, als Stromathylakoide vorliegen. Die Chloroplasten sind der Ort der Photosynthese.

1.1 Der Ablauf der Licht- und Dunkelreaktion

Die Photosynthese ist in zwei verschiedene Reaktionen, die sogenannte Licht- und die Dunkelreaktion gegliedert. Während die meisten Prozesse der Lichtreaktion an der Thylakoidmembran ablaufen, findet die Dunkelreaktion im Stroma statt. Bei der Lichtreaktion wird Lichtenergie in chemische Energie umgewandelt. Die von Chlorophyll absorbierte Strahlungsenergie ermöglicht die Bildung des Reduktionsäquivalents NADPH/H^+ und des Energieäquivalents ATP. Bei diesem Vorgang wird Wasser gespalten und der im Wasser gebundene Sauerstoff in molekularer Form freigesetzt.

In den daran anschließenden Dunkelreaktionen werden die aus der Lichtreaktion stammenden energiereichen Verbindungen NADPH/H^+ und ATP zur Bildung organischer Verbindungen verwendet. CO_2 , das vom Enzym RubisCo fixiert wird, dient dabei als Kohlenstoffquelle. Unter Aufnahme von Elektronen wird der so gebundene Kohlenstoff zu den energiereichen organischen Verbindungen, den Kohlehydraten, reduziert.

1.2 Der Aufbau der strukturellen Komponenten der Lichtreaktion

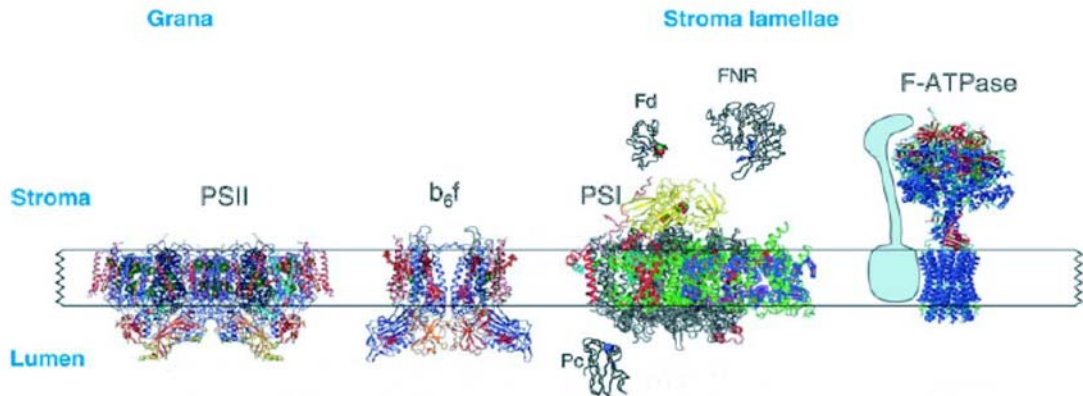


Abb.1 Der Aufbau der Thylakoidmembrankomplexe und löslicher Komponenten der Lichtreaktion auf der Basis verschiedener Röntgenkristallstrukturen (Nelson et al., 2006)

Dabei werden die einzelnen Komponenten wie folgt bezeichnet: PSII bezeichnet den Photosystem II-Gesamtkomplex, b₆f den Cytochrom b₆f-Gesamtkomplex, PSI den Photosystem I-Gesamtkomplex und F-ATPase den ATP-Synthase-Gesamtkomplex. Die Strukturen der löslichen Komponenten Plastocyanin, Ferredoxin, Ferredoxin:NADP⁺-Oxidoreduktase werden mit PC, Fd bzw. FNR abgekürzt.

An der Lichtreaktion sind vier große membranständige Komplexe und drei mobile Elektronentransporter beteiligt (Abb.1). Dabei werden die Elektronen zum einen in einer linearen Elektronentransportkette über die Membrankomplexe Photosystem II (PS II), Cytochrom b₆f (Cyt b₆f) und Photosystem I (PS I) sowie die mobilen Überträger Plastochinon und Plastocyanin und Ferredoxin auf NADP⁺ übertragen. Alternativ kann die Energiegewinnung durch zyklischen Elektronentransport zwischen PS I und dem Cyt b₆f-Komplex stattfinden. Durch die Koppelung der Elektronentransportprozesse mit Protonentranslokation wird ein elektrochemischer Gradient an der Thylakoidmembran erzeugt, welcher schließlich zur Energiegewinnung durch die ATP-Synthase (ATPase) herangezogen wird.

Die Verteilung der Komplexe in der Thylakoidmembran ist ungleichmäßig (Anderson et al., 1983; Anderson, 2002). Während sich das PS I und die ATP-Synthase vor allem in den Stromathylakoiden befinden, ist das PS II fast ausschließlich in den Granathylakoiden lokalisiert. Dagegen verteilt sich der Cyt b₆f-Komplex nahezu gleichmäßig auf Stroma- und Granathylakoide.

Durch die in den letzten Jahren gewonnenen Kristallstrukturen aller vier Membrankomplexe konnten neben der Struktur der Komplexe und ihrer Untereinheiten auch Rückschlüsse auf die Funktion gezogen werden (Ben-Shem et al., 2003; Jordan et al., 2001; Liu et al., 2004; Kurisu et al., 2003; Zouni et al., 2001; Loll et al., 2005; Stroebel et al., 2003; Groth et al., 2001). Zusätzliche Informationen zur Funktion einzelner Untereinheiten liefert auch die Analyse

diverser Strukturmutanten (Hansson et al., 2007; Iwai et al., 2006; Komenda et al., 2005; Mannan et al., 1994; Morais et al., 1998; Schwenkert et al., 2006; Loll et al., 2005; Xu et al., 1994; Yi et al., 2006).

1.2.1 Das Photosystem I

Das PS I kann als lichtabhängige Plastocyanin-Ferredoxin-Oxidoreduktase bezeichnet werden. Da der PS I-Komplex das negativste Redoxpotential in der Natur generiert, bestimmt es großenteils die globale Entalpie lebender Systeme (Nelson et al., 2005). Die Quantenausbeute des PS I-Komplexes liegt nahe 1.0. Dies auch in künstlichen Systemen zu erreichen, ist ein ehrgeiziges Ziel der Wissenschaft, welches bis jetzt allerdings noch nicht erreicht werden konnte.

Der Gesamtkomplex besteht in Cyanobakterien und Eukaryonten aus dem Reaktionszentrum (RC) und den dazugehörigen Lichtsammel (LHC)-Proteinen. In höheren Pflanzen sind am Aufbau des RCs 14 (PsaA-L, PsaN, PsaO), und am Aufbau des LHC I-Komplexes vier (Lhca1-4) verschiedene Untereinheiten beteiligt (Chitnis, 2001). Insgesamt sind im Gesamtkomplex ungefähr 200 Chlorophylle, zwei Phyllochinone, drei [4Fe-4S]-Cluster und β -Carotin gebunden, wobei ca. die Hälfte der Chlorophylle auf das RC entfallen (Jordan et al., 2001; Ben-Shem et al., 2003).

Durch Absorption von Lichtenergie wird die Translokation eines Elektrons von Plastocyanin auf der Membraninnenseite (Lumen) auf Ferredoxin auf der Membranaußenseite (Stroma) ausgelöst. Der Elektronentransport über die Membran wird durch spezielle an den Reaktionszentrumsproteinen PsaA (P700 A) und PsaB (P700 B) gebundenen Chlorophylle und Phyllochinone bewerkstelligt.

Um die Oxidation von P 700 auszulösen, ist mindestens ein Komplex aus PsaA und PsaB mit ungefähr 80 Molekülen Chlorophyll nötig (Bengis et al., 1975; Bengis et al., 1977). Dabei werden die Elektronen über die beiden quasi symmetrischen Äste des P700-RCs zum primären Elektronenakzeptor Chlorophyll a (A_0)-Paar geleitet. Aufgrund des symmetrischen Aufbaus könnte der Elektronentransport über beide Äste laufen; durch Mutantanalysen wurde aber gezeigt, dass die PsaB-Seite eine höhere Elektronenspendichte besitzt (Krabben et al., 2000; Webber et al., 1996). Dies deutet auf Unterschiede in den elektronischen Eigenschaften hin. Allerdings gibt es bislang kontroverse Ergebnisse, da es sowohl Hinweise auf eine spezifische Psa B-Aktivität als auch auf eine aktive Beteiligung beider Äste am Elektronentransport gibt (Fairclough et al., 2003; Guergova-Kuras et al., 2001).

Die kleineren Untereinheiten des PS I stellen zum Teil die Verbindung zwischen den LHC-Proteinen und dem Reaktionszentrum sicher, zum anderen wird ihnen eine Rolle bei der Stabilisierung des Komplexes zugeschrieben (Dekker et al., 2005). Die Funktion als „Verbindungsstück“ zwischen RC- und LHC-Proteinen erklärt die Bindung von Chlorophyll an einige der kleinen Untereinheiten.

Die Fähigkeit des Gesamtkomplexes zur Bildung höhermolekularer Assemblierungsstufen ist in Cyanobakterien und höheren Pflanzen unterschiedlich ausgeprägt. Aus der Kristallstruktur des PS I der Erbse wird gefolgert, dass höhermolekulare Assemblierungsstufen des PS I in höheren Pflanzen nicht möglich sind. Während PsaL in Cyanobakterien die Trimerisierung des PS I vermittelt, ist diese Funktion im Komplex von *Pisum sativum* durch die Bindung von PsaH an PsaL blockiert (Jolley et al., 2005). PsaH, welches nur in höheren Pflanzen ein Bestandteil des PS I ist, scheint eine Rolle bei der Bindung von LHC II-Proteinen an PS I zu besitzen. Daher wird davon ausgegangen, dass es sich bei den hochmolekularen Assemblierungsprodukten des PS I in höheren Pflanzen, welche nach nativer Elektrophorese detektiert wurden, um Artefakte und keine PS I-Superkomplexe handelt (Nelson et al., 2006).

1.2.2 Das Photosystem II

Im Gegensatz zum PS I, welches in höheren Pflanzen nur als Monomer existiert, wird der dimere PS II-Komplex in allen Organisationsstufen als die photosynthetisch aktive Form angesehen (Danielsson et al., 2006). Die Kristallstruktur aus *Thermosynechococcus* zeigt für den dimeren Komplex aus 20 verschiedenen Untereinheiten die Bindung von 35 Chlorophyll a-Molekülen, elf β -Carotinen, je zwei Pheophytinen, Plastochinonen und Haemgruppen, je eines Bicarbonat- und Eisen (II)-Ions und des aus vier Mangan-Ionen und vermutlich einem Calcium-Ion bestehenden Clusters, an dem das Wasser oxidiert wird (Loll et al., 2005). Eine eindeutige Identifizierung aller kleinen Untereinheiten in der Kristallstruktur steht noch aus, so dass bisher nicht alle Proteinstrukturen des Kristalls den bisher 23 bekannten Untereinheiten (PsbA-F, PsbH-Z) eindeutig zugeordnet werden konnten.

An das Photosystem II ist der Lichtsammelapparat (LHC II) aus den äußeren Antennenproteinen (LHCb1-3) angelagert. Die LHC II-Proteine sind in trimeren Komplexen wechselnder Zusammensetzung organisiert und über die minoren LHC II-Proteine (LHCb4-6) mit dem PS II-Komplex verbunden. Zusammen mit dem PS II-Komplex bilden die LHCII-Proteine die PS II-Superkomplexe. Die Anzahl der LHC II-Trimere variiert dabei je nach Literaturstelle zwischen zwei und acht Trimeren pro PS II-Dimer, so dass im Gesamtkomplex

zwischen 200 und 340 Chlorophyllen gebunden sind (Nield et al., 2006; Dekker et al., 2005; Caffarri et al., 2005). Dabei macht Chlorophyll b nur etwa ein Viertel der gesamten Chlorophyllmenge aus.

Die lineare Elektronentransportkette beginnt am PS II. Dabei wird die Anregungsenergie vom äußeren Antennensystem aus LHC II-Proteinen über die inneren Antennenproteine CP43 (PsbC) und CP47 (PsbB) auf das Reaktionszentrum aus D1 (PsbA), D2 (PsbD), α -Cytochrom b_{559} (PsbE), β -Cytochrom b_{559} (PsbF) und PsbI übertragen (Ikeuchi et al., 1988). Durch die Anregungsenergie wird dort ein Elektron vom primären Elektronendonator P680* abgegeben und über Pheophytin a und Plastochinon schließlich an den Cyt b_6f -Komplex weitergeleitet. Durch ein Elektron, welches aus der Wasserspaltung stammt, wird P680* wieder in seinen ursprünglichen Zustand rückgeführt. Diese Oxidation des Wassers benötigt das positivste elektrochemische Potential, das bisher in einem Organismus gefunden wurde.

Die kleinen Untereinheiten des PS II sind nicht direkt am Elektronentransport beteiligt. Im Gegensatz zu den kleinen Untereinheiten des PS I binden sie im Allgemeinen keine Chlorophylle und stellen keine direkte Verbindung zwischen den LHC II-Komplexen und dem PS II her. Eventuell könnten einige von ihnen an der Bindung der im Komplex enthaltenen Carotinoide beteiligt sein (Loll et al., 2005). Für den Großteil der kleinen Untereinheiten wird allerdings hauptsächlich eine Funktion bei der Assemblierung des Gesamtkomplexes angenommen (Rokka et al., 2005).

Eine Ausnahme stellt möglicherweise die Untereinheit PsbS dar. Für diese Untereinheit wurde die Bindung von Chlorophyll und Xanthophyllen gezeigt (Funk et al., 1995). Diese Ergebnisse werden aber durch *in vitro* Experimente mit aufgereinigtem oder rekombinantem PsbS in Frage gestellt, bei denen weder Chlorophyllbindung noch die Faltung des Proteins in Gegenwart von Pigment beobachtet werden konnte (Dominici et al., 2002). Unstrittig ist dagegen eine Rolle von PsbS bei der Photoprotektion des PS II (Li et al., 2004; Li et al., 2002).

1.2.3 Der Cytochrom b_6f -Komplex

Der Cyt b_6f -Komplex ist eine Plastohydrochinon-Plastocyanin-Oxidoreduktase und gehört zur Superfamilie der bc-Komplexe. Diese Familie beinhaltet neben dem plastidären Cyt b_6f -Komplex den mitochondrialen bc_1 -Komplex und den bakteriellen bc-Komplex. Allen Komplexen gemeinsam ist eine Kopplung von Elektronentransportprozessen an die Translokation von Protonen über die Membran.

Bei dieser Kopplung werden im Cyt b_6f -Komplex pro Elektron zwei Protonen über die Membran transportiert, welche am Aufbau des elektrochemischen Gradienten teilnehmen. Die Elektronen werden im Cyt b_6f -Komplex durch Oxidation und Reduktion lipophiler Chinone auf Plastocyanin und schließlich auf das PS I übertragen. Die Oxidation von Plastochinon durch den Cyt b_6f -Komplex ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im photosynthetischen Elektronentransport (Lee et al., 1989). Aus diesem Grund ist der Cyt b_6f -Komplex ein potentieller Regulationspunkt der Elektronentransportketten.

In den letzten Jahren konnte sowohl aus Cyanobakterien als auch aus Grünalgen der Cyt b_6f -Komplex kristallisiert werden (Stroebel et al., 2003; Kurisu et al., 2003). Ein Vergleich der Kristallstrukturen von Cyanobakterien und Grünalgen macht deutlich, dass sich die Komplexzusammensetzung im Laufe der Evolution nicht stark geändert hat.

Mit Hilfe der Kristallstruktur wurden für den dimeren Komplex aus *Chlamydomonas reinhardtii*, welcher eine Molekularmasse von ca. 220 kDa besitzt, acht verschiedene transmembrane Untereinheiten (Pet A-D,G,L,M,N) beschrieben. In frühen Schritten der Komplexisolierung kann in *Chlamydomonas* eine weitere Untereinheit, Pet O, mit dem Komplex aufgereinigt werden. Diese Untereinheit geht allerdings im weiteren Verlauf der Aufreinigung verloren (Hamel et al., 2000). In der Kristallstruktur kann Pet O nicht mehr nachgewiesen werden. Neben Pet O wird auch über die Ferredoxin:NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR) als möglicher Bestandteil des dimeren Cyt b_6f -Komplexes diskutiert (Zhang et al., 2001). Dieses Enzym wird mit der Rolle des Cyt b_6f -Komplexes beim zyklischen Elektronentransport in Verbindung gebracht.

Während die großen Untereinheiten Pet A-D am Elektronentransport beteiligt sind, wird für die kleinen Untereinheiten Pet G, Pet L, Pet M und Pet N entweder eine den Komplex stabilisierende Aufgabe oder eine Hilfsfunktion bei der Assemblierung des Cyt b_6f -Komplexes angenommen (Cramer et al., 2004).

Zusätzlich zu den Proteinen sind mindestens sieben verschiedene prosthetische Gruppen im Komplex gebunden. Neben einem 2 Fe-2 S-Cluster und vier Hämen (ein c-Typ-, zwei b-Typ-, ein x-Typ-Häm) sind auch ein Chlorophyll a und ein β -Carotin in Grünalgen und höheren Pflanzen gebunden (Cramer et al., 2004). In Cyanobakterien ist das β -Carotin durch Echinenon ersetzt (Boronowsky et al., 2001). Während für die Häme die Funktion beim Elektronentransport unstrittig ist, ist die Funktion des β -Carotins und des Chlorophylls a nicht eindeutig geklärt. Nach seiner ersten Beschreibung bei der Isolierung des Cyt b_6f -Komplex wurde Chlorophyll a zuerst als mögliche Kontamination während der Komplexisolierung angesehen. Diese Ansicht hat sich durch die Auswertung der Kristallstrukturen heute

gewandelt. Ob Chlorophyll a eine strukturelle oder funktionelle Rolle spielt, ist bisher noch unklar. Gleiches gilt für das β -Carotin.

1.2.4 Die ATP-Synthase

Die ATP-Synthase der Thylakoidmembran gehört zu den F-Typ ATP-Synthasen, die auch in Prokaryonten und Mitochondrien existieren. Aus evolutionärer Sicht weisen die Enzyme des ATP-Synthase-Komplexes eine sehr starke Konservierung auf. In allen Organisationsstufen ist der Komplex aus drei charakteristischen Teilen aufgebaut: einem hydrophilen „Kopf“ (F1), der über einen „Stiel“ mit dem hydrophoben Membranteil (F0) verbunden ist. Der Stiel ist seinerseits aus dem zentralen Stiel und einem peripheren Verbindungsstück aufgebaut. Insgesamt besteht der Gesamtkomplex aus neun verschiedenen Untereinheiten (Dekker et al., 2005).

Bisher ist es noch nicht gelungen, die ATP-Synthase als Gesamtkomplex zu kristallisieren. Als Grund wird u.a. die fragile Struktur des stabilisierenden Stiels vermutet (Dekker et al., 2005). Allerdings gibt es Kristallstrukturen der F1-Untereinheit und NMR-Daten weiterer Untereinheiten, so dass über den Gesamtaufbau ein guter Überblick gegeben ist (Groth et al., 2001; Carbajo et al., 2005; Carbajo et al., 2004; Wilkens et al., 2005).

Die F1-Untereinheit besteht aus drei nicht katalytisch aktiven α -Untereinheiten, welche abwechselnd mit den drei katalytisch aktiven β -Untereinheiten in einem Sechseck angeordnet sind. Das Innere des Sechsecks wird hauptsächlich durch die γ -Untereinheit ausgefüllt. Die γ -Untereinheit ist im Chloroplasten mit der Untereinheit III verbunden, welche einen Ring aus 14 Untereinheiten bildet (Seelert et al., 2000). Dieser Ring wird durch den pH-Gradienten bewegt. Dessen Rotation bewirkt über die γ -Untereinheit letztendlich die ATP-Synthese durch die β -Untereinheit. Die restlichen Untereinheiten sind an der Regulation der enzymatischen Aktivität beteiligt.

Lange Zeit war nur die monomere Assemblierungsstufe des Gesamtkomplexes bekannt. Durch Blue-Native-Polyacrylamidelektrophorese (BN-PAGE) wurde aus Mitochondrien erstmals eine dimere Form der ATP-Synthase isoliert (Arnold et al., 1998). Dieses Dimer enthält drei zusätzliche Untereinheiten, wovon mindestens zwei für die Dimerisierung essentiell sind. Allerdings gibt es bis jetzt noch keine Hinweise darauf, dass im Chloroplasten ebenfalls ein dimerer ATP-Synthasekomplex existiert.

2 Die Chlorophyll-abhängige Entwicklung der Chloroplasten

2.1 Die lichtabhängige Chlorophyllsynthese in Angiospermen

Die Synthese von Chlorophyll ist in Angiospermen ein streng lichtabhängiger Prozess (Griffiths, 1978; Apel et al., 1980). Deshalb entstehen nur im Licht aus den undifferenzierten Proplastiden Chloroplasten. Dabei entwickeln sich aus den Prothylakoiden durch Umstrukturierungsvorgänge die Thylakoidmembranen, in welchen sich die Chlorophyll-bindenden Komplexe der Lichtreaktion befinden.

Keimlinge, welche im Dunkeln angezogen werden, bilden anstelle der (grünen) Chloroplasten (gelb-orange) Etioplasten. In diesen ist die Thylakoidmembran durch den parakristallinen Prolamellarkörper (PLB) und einige Prothylakoidmembranen (PT) ersetzt. PLB und PT unterscheiden sich zwar in ihrer Struktur und Lipidzusammensetzung, enthalten aber beide das Pigment Protochlorophyllid (PChlid) (Ryberg et al., 1982). Die Akkumulation von PChlid ist mit der Gegenwart des Enzyms NADPH: Protochlorophyllid Oxidoreduktase (POR) korreliert, welches in Angiospermen in einer streng lichtabhängigen Reaktion die Umsetzung von PChlid zu Chlorophyllid a (Chlid a) katalysiert (Griffiths, 1978; Apel et al., 1980). Dabei handelt es sich bei der POR nicht um ein membranintegrales, sondern um membranassoziiertes Protein.

Im Etioplasten bildet die POR zusammen mit dem Substrat PChlid und dem Co-Faktor NADPH einen ternären Komplex (Griffiths, 1978). Über den Assemblierungszustand des POR-Enzyms im Etioplasten und seine Entwicklung während der Ergrünung ist bisher wenig bekannt. BN-PAGE-Analysen zeigen für den Etioplasten neben der monomeren und dimeren Assemblierungsstufe auch hochmolekulare Aggregate, welche im Laufe der Ergrünung verschwinden (Scherer, 2005). Nach vier Stunden kann die POR nur noch in monomerer Organisationsform nachgewiesen werden.

Unter dem Oberbegriff POR werden bisher drei verschiedene Isozyme zusammengefasst. POR A ist das dominierende Protein des PLB und kann ausschließlich dort nachgewiesen werden (Lindsten et al., 1988). Mit einsetzender Belichtung und der damit verbundenen Umsetzung von PChlid nimmt die Menge an POR A drastisch ab. Dies liegt zum einen an der Degradierung des Komplexes nach der Ablösung des Chlid a und zum anderen an der negativen Kontrolle der mRNA-Expression der POR A durch Licht (Batschauer et al., 1984; Reinbothe et al., 1995). Nach vierstündiger Belichtung ist in Gerste keine POR A-Expression mehr nachzuweisen.

In Chloroplasten wird die Chlorophyllsynthese durch POR B bewerkstelligt. Im Gegensatz zur mRNA von POR A bleibt die mRNA von POR B auch während der Ergrünung weitgehend stabil, so dass POR B auch im Chloroplasten zur Verfügung steht (Holtorf et al., 1996).

Bei *Arabidopsis* findet sich ein drittes POR-Enzym, welches bei Gerste bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte. POR C scheint vor allem für den Lichtschutz während der Ergrünung Bedeutung zu besitzen (Oosawa et al., 2000; Masuda et al., 2003).

2.2 Der Prozess der Ergrünung

2.2.1 Einfluss von Licht auf Akkumulation der Chlorophyll-bindenden Proteine

Mit der Belichtung von etioliertem Gewebe setzt neben dem Verlust der POR A auch der Abbau des PLB und die Bildung der Thylakoidmembranen ein (Von Wettstein et al., 1995). Diese Umstrukturierung des inneren Membransystems geht mit der Assemblierung der Photosystemkomplexe einher.

Auf Ebene der Proteine kann zwar bereits im Dunkeln die Translation aller plastidencodierten Chlorophyll-bindenden Proteine nachgewiesen werden, allerdings werden diese mit Ausnahme des D2-Proteins in Abwesenheit von Chlorophyll sofort wieder degradiert (Eichacker et al., 1990; Kim et al., 1994; Müller et al., 1999). Erst nach dem Einsetzen der Chlorophyllsynthese bzw. durch die Zugabe von Chlorophyllanaloga werden diese gegen Proteolyse geschützt und akkumuliert (Eichacker et al., 1996; Eichacker et al., 1996).

Für die kerncodierten Proteine des Lichtsammelapparats ist dagegen eine Lichtregulation bereits auf der Ebene der Transkription zu beobachten (Apel et al., 1978; Silverthorne et al., 1984). So kommt es erst nach der Belichtung zur Transkription der LHC-Proteine, welche anschließend in die Plastide importiert werden. Dort findet schließlich die Integration in die Membran und die Bindung des Chlorophylls statt, wobei im Moment noch unklar ist, ob die Chlorophyllbindung der Membraninsertion vorangeht oder umgekehrt (Hooper et al., 1999; Horn et al., 2007).

2.2.2 Assemblierung der Chlorophyll-bindenden Proteinkomplexe während der Ergrünung

Der genaue Ablauf der *de novo* Assemblierung der Chlorophyll-bindenden Proteinkomplexe ist bisher nicht vollständig geklärt. Die Analyse diverser Strukturmutanten und der Kristallstrukturen der beiden Photosysteme gibt zwar einen Einblick über die Funktion

einzelner Proteinuntereinheiten (Übersichtsartikel: Nield et al., 2006), allerdings kann daraus nicht zwingend auf die dynamischen Abläufe, die während der Ergrünung stattfinden, geschlossen werden.

Neben der Untersuchung der strukturell an der Assemblierung beteiligten Komponenten wurden in den vergangenen Jahren eine Anzahl von Faktoren identifiziert, die kein Bestandteil der maturen Komplexe sind, aber für dessen vollständige und korrekte Assemblierung benötigt werden. Derartige Faktoren sind sowohl aus höheren Pflanzen wie auch aus *Synechocystis* bekannt und betreffen beide Photosysteme (Plücker et al., 2002; Klinkert et al., 2004; Stockel et al., 2004; Amann et al., 2004; Rochaix et al., 2004; Peng et al., 2006; Ma et al., 2007). Da diese, wie bereits erwähnt keine Bestandteile der maturen Komplexe darstellen und nicht unmittelbar an der Chlorophyllsynthese oder -verteilung beteiligt zu sein scheinen, wird auf diese im Folgenden nicht mehr eingegangen. Gleiches gilt für Proteasen, denen eine Funktion der D1 Prozessierung zugeschrieben wird (Adam et al., 2006; Komenda et al., 2007).

Die bisher zu diesem Thema durchgeführten Analysen beschäftigen sich vor allem mit der *de novo* Assemblierung der äußeren Antennenproteine. Dabei schwanken die Angaben für den Nachweis der *de novo* synthetisierten und akkumulierten LHC-Proteine zwischen 2-8 Stunden nach Einsetzen der Belichtung (Mathis et al., 1987; Preiss et al., 1995; Anandan et al., 1993; Sigrist et al., 1994). Auf alle Fälle scheint klar zu sein, dass die Bindung von Chlorophyll a an das Protein der Bindung von Chlorophyll b vorausgeht (Horn et al., 2002; Horn et al., 2007). Nach der Bindung des Chlorophylls erfolgt die Assemblierung der LHC-Proteine in höhermolekulare Komplexe, wobei die Assemblierung der LHC-Proteine beider Photosysteme von der monomeren Assemblierungsstufe ausgeht (Dreyfuss et al., 1994; Dreyfuss et al., 1994).

Die *de novo* Assemblierung der beiden Photosysteme ist noch nicht umfassend untersucht. Durch Funktionsanalysen des linearen Elektronentransportes in ergrünenden Keimlingen konnte gezeigt werden, dass bereits vier Stunden nach Beginn der Belichtung Elektronentransportaktivität vorliegt (Ohashi et al., 1989).

Auf Ebene der Proteinanalyse ist vom Photosystem II-Reaktionszentrum bisher bekannt, dass bereits im Dunkeln Prä-Komplexe, welche D2 enthalten, gebildet werden (Müller et al., 1999). In welcher zeitlichen Abfolge die daran anschließenden Assemblierungsschritte zum funktionellen Photosystemkomplex ablaufen, welche nach der Belichtung etiolierter Keimlinge einsetzen, ist dagegen noch nicht abschließend geklärt. Gleiches gilt für den Komplex des PS I.

3 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die *de novo* Assemblierung der Thylakoidmembrankomplexe näher untersucht werden. Dabei sollte zum einen die zeitliche Reihenfolge geklärt werden, in welcher die Assemblierung bis zur Bildung maturer Komplexe abläuft. Ein Komplex sollte in diesem Zusammenhang als matur angesehen werden, wenn sowohl seine Molekularmasse als auch die Zusammensetzung der des Chloroplasten entsprach. Zum anderen sollte die Frage beantwortet werden, welches der Chlorophyll-bindenden Proteine zuerst durch die Bindung von Chlorophyll akkumuliert. Bisherige proteinbiochemische Arbeiten zur Assemblierung der Thylakoidmembrankomplexe basieren vor allem auf der Analyse verschiedener Strukturmutanten (siehe auch 1.2). Da die Akkumulation der beiden Photosystemkomplexe in Angiospermen einen lichtabhängigen Prozess darstellt (siehe 2.2.1), bietet sich durch die Dunkelanzucht dieser Keimlinge die Möglichkeit, die *de novo* Assemblierung Chlorophyll-bindender Proteine direkt an Wildtyppflanzen durch Belichtung etiolierter Keimlinge zu verfolgen.

Dazu sollte neben dem bereits im Labor etablierten System der BN-PAGE weitere Techniken zum Einsatz kommen, die neben der Komplexanalyse auf Proteinebene auch die Analyse der gebundenen Co-Faktoren ermöglichen. Des Weiteren sollte der Zeitpunkt ermittelt werden, an welchem die Komplexausstattung in ergrünenden Plastiden der in Chloroplasten entspricht, um damit den Prozess der *de novo* Assemblierung der Thylakoidmembrankomplexe als abgeschlossen betrachten zu können.

B Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität und wurden von den Firmen Aldrich, Applichem, Biomol, Fluka, GE Healthcare, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen.

1.2 Pflanzenmaterial

Sommergerste (<i>Hordeum vulgare L, cultivar. Steffi</i>)	Saatzucht Ackermann &Co, Irlbach
Erbse (<i>Pisum sativum L, var.Violetta/var.Golf</i>)	Bayerische Futtersaatbau, Ismaning

1.3 Molekularmassenstandard

High molecular weight (HMW) marker (BN/CNL-PAGE) GE Healthcare, Buckinghamshire

Protein	Molekularmasse
---------	----------------

Thyroglobulin	669 kDa
---------------	---------

Ferritin	440 kDa
----------	---------

Katalase	232 kDa
----------	---------

Laktat-Dehydrogenase	140 kDa
----------------------	---------

BSA	67 kDa
-----	--------

Protein Marker, broad range (SDS-PAGE)	New England Biolabs, Ipswich
--	------------------------------

Protein	Molekularmasse
---------	----------------

Myosin	212 kDa
--------	---------

MBP- β -Galaktosidase	158 kDa
-----------------------------	---------

β -Galaktosidase	116 kDa
------------------------	---------

Phosphorylase b	97,2 kDa
-----------------	----------

BSA	66,4 kDa
-----	----------

Glutamat-Dehydrogenase	55,6 kDa
------------------------	----------

MBP	42,7 kDa
-----	----------

Thioredoxinreduktase	34,6 kDa
----------------------	----------

Triosephosphat-Isomerase	27,0 kDa
--------------------------	----------

Trypsininhibitor	20,1 kDa
Lysozym	14,3 kDa
Aprotinin	6,5 kDa
Insulin (A-Kette)	2,3 kDa
Insulin (B-Kette)	3,4 kDa

1.4 Antikörper

Rabbit anti-POR A-Antikörper	Arbeitsgruppe Sundqvist, Göteborg
Rabbit anti-D2-Antikörper	Pineda, Berlin
Rabbit IgG, HRP-Linked F(ab') ₂ Fragment	GE Healthcare, Buckinghamshire

1.5 Referenzpigmente

Aufgereinigtes Protochlorophyll bzw. Protochlorophyllid wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Scheer bzw. Matthias Plösch zur Verfügung gestellt.

1.6 Geräte

Anzuchtschrank	Rumed Kühl-Brutschrank	Rubarth Apparate, Laatzen
Auflichtscanner	Epson Perfection 1640SU	Epson Deutschland, Meerbusch
Blot-Apparatur	Nova Blot Kit (Multiphor II)	GE Healthcare, Buckinghamshire
Elektrophoreseapparatur	Protean II	Biorad, Hercules
	Ettan Dalt II	GE Healthcare, Buckinghamshire
	Typhoon Trio	GE Healthcare, Buckinghamshire
Fluoreszenzscanner	Typhoon Trio	GE Healthcare, Buckinghamshire
Geltrockner	Gel slab dryer GD2000	Hofer, San Francisco
Gradientenmischer	Gradient maker SG 50	Hofer, San Francisco
Horizontalschüttler	K2	Bachofer, Reutlingen
Kühlzentrifugen	Sorvall RC5B	Sorvall Dupont, Wilmington
	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
	Hettich Universal 30RF	Andreas Hettich, Tuttlingen
Lichtbank	Eigenbau	Werkstatt, Botanisches Institut
Lichtmikroskop	Leitz Diavert	Leitz Wetzlar, Wetzlar
Lichtschränk	Heraeus	Heraeus, Hanau
Massenspektrometer	Q-TOF 1.5	Waters, Eschborn

	Q-TOF Premier	Waters, Eschborn
Photometer	UV2401 PC	Shimadzu, Duisburg
Software	ImageQuant 5.2	GE Healthcare, Buckinghamshire
	MassLynx 4.0/ 4.1	Waters, Eschborn
	Origin 7.0	OriginLab, Northampton
Spannungsgerät	EPS 600/EPS 3500	Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermoschüttler	HTM 130 LP	HLC Bio Tech, Bovenden
Ultra-Thurax	Polytron PT 10-35	Kinematica, Littau-Lucerne
Vakuumkonzentrator	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg

2 Methoden

2.1 Anzucht der Gerstenkeimlinge

2.1.1 Etiolierte Keimlinge

Die Gerstensamen wurden in 21 x 35 x 5 cm großen Anzuchtsschalen auf einer ca. 3 cm dicken Vermiculitschicht ausgesät (ca. 2-3 Samen/cm²), mit destilliertem Wasser getränkt und abschließend mit einer dünnen Vermiculitschicht überdeckt.

Die Samen wurden 4,5 Tage bei 25°C im lichtdichten Anzuchtsschrank inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die gelb gefärbten Keimlinge 5-6 cm lang und hatten die Koleoptile durchgewachsen.

2.1.2 Ergrünende Keimlinge

Die Aussaats- und Anzuchtsbedingungen entsprachen den Bedingungen für die Anzucht etiolierter Keimlinge. Nach 4,5 Tagen wurden die etiolierten Keimlinge mit Weißlicht (50 µE/m²s) bei 25°C unterschiedlich lang (10 s, 1 h, 2 h, 4 h) im Lichtschrank bestrahlt.

2.1.3 Grüne Keimlinge

Die Aussaat erfolgte wie unter 2.1.1 beschrieben. Anschließend wurden die Samen unter Dauerlicht (50 µE/m²) für 4,5 Tage auf der Lichtbank angezogen.

2.2 Anzucht der Erbsenpflanzen

Erbsenpflanzen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Soll zur Verfügung gestellt.

2.3 Plastidenisolation

Alle für die Plastidenisolation benötigten Materialien und Medien wurden auf 4°C vorgekühlt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden, soweit möglich, auf Eis durchgeführt. Um eine Photoumwandlung des Protochlorophyllids zu verhindern, fand die gesamte Probenvorbereitung unter grünem Sicherheitslicht (515-560 nm, $7 \times 10^{-4} \text{ W/m}^2$) statt.

2.3.1 Isolation intakter Plastiden

Die Keimlinge (Gerste bzw. Erbse) einer Schale wurden mit einer Schere etwa 1 cm oberhalb des Vermiculits abgeschnitten, in eisgekühltes Isolationsmedium überführt und mit der Schere grob zerkleinert. Nach dem Zellaufschluss mit einem drehzahlregulierbaren Ultra-Thurax wurde die Suspension über vier Lagen Baumwollgaze und eine Lage Nylongaze (Porengröße 22 μm) filtriert. Der Rückstand wurde in Isolationsmedium erneut mittels Ultra-Thurax aufgeschlossen und wie oben beschrieben filtriert.

Die Filtrate wurden vereinigt, zentrifugiert (3800 x g, 3 min, 4°C) und der Überstand abgossen. Das Pellet wurde in etwa 5 ml Isolationsmedium resuspendiert und über die Nylongaze auf einen 40%/80% PercollTM-Stufengradienten geschichtet. Nach der Zentrifugation (4100 x g, 8 min, 4°C) im Ausschwingrotor wurden die intakten Plastiden von der 40%/80%-Stufe abgenommen und in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt. Die intakten Plastiden wurden mit dem 4-5 fachen Volumen an Waschmedium verdünnt und erneut zentrifugiert (4100 x g, 3 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in ca. 200 μl Waschmedium aufgenommen. Das resuspendierte Pellet wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und bis zur weiteren Verwendung in Eiswasser gelagert.

Lösungen

Isolationsmedium: 0,4 M Sorbit
50 mM Hepes/KOH (pH 8,0)
2 mM EDTA (pH 7,5)

Waschmedium: 0,4 M Sorbit
50 mM Hepes/KOH (pH 8,0)

40% Percoll: 40% (v/v) Percoll™
0,4 M Sorbit
50 mM Hepes/KOH (pH 8,0)
2 mM EDTA (pH 7,5)

80% Percoll: 80% (v/v) Percoll™
0,4 M Sorbit
50 mM Hepes/KOH (pH 8,0)
2 mM EDTA (pH 7,5)

2.3.2 Bestimmung der Gerstenplastidenkonzentration

Zur Bestimmung der Plastidenzahl wurde ein Aliquot im Verhältnis 1:500 in Waschmedium verdünnt und in einem Hämatocytozometer (Modell Thomazählkammer) im Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. 16 Felder der Zählkammer entsprachen 0,1 µl, so dass die Plastidenkonzentration nach folgender Formel berechnet werden konnte:

$$\text{Plastidenzahl}/\mu\text{l} = \text{Plastidenzahl in 4 K\"astchen} \times 4 \times 10 \times 500$$

2.3.3 Bestimmung der Erbsenplastidenkonzentration

Die Bestimmung der Proteinmenge der Thylakoidmembran erfolgte durch absorptionsspektroskopische Messung des Chlorophyllgehalts. Hierzu wurden 2 µl der Chloroplastensuspension in 998 µl 80% Aceton gelöst und bei 652 nm gegen 80% Aceton gemessen. Die Berechnung des Gesamtchlorophyllgehalts erfolgte nach der Formel von Arnon (Arnon, 1949):

$$\mu\text{g Chlorophyllgehalt}/\mu\text{l} = \text{OD}_{652} \times 500 \cdot 34,5$$

2.4 Isolation von Membranproteinen

2.4.1 Isolation der inneren Plastidenmembranen

Je 1×10^8 intakte Plastiden wurden mit 200 μ l TMK-Puffer versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Lyse der Plastiden wurden die löslichen Bestandteile durch Zentrifugation (7500 x g, 3 min, 4°C) von der Membranfraktion getrennt. Der Überstand, der die stromalen Proteine enthielt, wurde verworfen und die pelletierten Membranen noch zwei Mal mit jeweils 200 μ l TMK-Puffer gewaschen.

Lösungen:

TMK-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,5)
 10 mM MgCl₂
 20 mM KCl

2.4.2 Isolation nativer Membrankomplexe

Zur Isolation von nativen Membrankomplexen wurden nur Plastiden, welche aus Gerstenkeimlingen gewonnen wurden, verwendet.

- *Solubilisierung für Blue native/Colourless native Polyacrylamidgelelektrophorese*

Das gewaschene Membranpellet wurde in 70 μ l ACA-Puffer gelöst und mit 10 μ l DM versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation der Probe auf Eis wurden die nicht solubilisierten Membranbestandteile durch Zentrifugation (16000 x g, 10 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand, welcher die solubilisierten Membranproteinkomplexe enthielt, wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 5 μ l Coomassie-Beladungslösung gemischt. Die so vorbereitete Probe wurde anschließend vollständig auf ein Blue native Polyacrylamidgel aufgetragen.

Im Fall der Colourless nativen Polyacrylamidgelelektrophorese wurde zum mit DM solubilisierten Überstand keine Beladungslösung zugegeben.

Lösungen:

ACA-Puffer: 750 mM ϵ -Aminocaprinsäure
 50 mM Bis-Tris (pH 7,0)
 0,5 mM EDTA-Na₂

DM: 10% (w/v) n-Dodecyl- β -D-maltosid

Coomassie-Beladungslösung: 750 mM ϵ -Aminocaprinsäure

5% (w/v) Coomassie-G

- *Solubilisierung für Colourless native LDS Polyacrylamidgelelektrophorese*

Je nach Belichtungsdauer wurden unterschiedliche Plastidenzahlen in die Experimente eingesetzt. Im Fall der Etioplasten und der 10 s belichteten Keimlinge wurden pro Ansatz 2×10^8 Plastiden, bei allen anderen Belichtungsstufen 1×10^8 Plastiden verwendet.

Die gewaschenen Membranen von 1×10^8 Plastiden wurden in 70 μ l TMK-Puffer resuspendiert und mit einem Detergenzgemisch aus 3 μ l DM, 6 μ l Digitonin und 0,1 μ l LDS-Beladungslösung gemischt. Zu Ansätzen, welche 2×10^8 Plastiden in 70 μ l TMK enthielten, wurde ein Gemisch aus 4,5 μ l DM, 9 μ l Digitonin und 0,15 μ l LDS-Beladungslösung gegeben. Zur Solubilisierung der Membranproteinkomplexe wurden alle Proben für 10 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die solubilierten Membranproteinkomplexe durch Zentrifugation (16000 x g, 10 min, 4°C) von nicht solubilierten Bestandteilen getrennt und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der gesamte Überstand wurde in der anschließenden Elektrophorese über Colourless native LDS-Elektrophorese in einer Spur getrennt.

Lösungen:

TMK: 10 mM Tris/HCl (pH 8,5)

10 mM MgCl₂

20 mM KCl

Digitonin: 10% (w/v) Digitonin

DM : 10% (w/v) n-Dodecyl- β -D-maltosid

LDS-Beladungslösung: 750 mM ϵ -Aminocaprinsäure

5% (w/v) Lithium-Dodecylsulfat

2.4.3 Isolation von Einzelproteinen

Intakte Plastiden von $1,25 \times 10^7$ Gerstenchloroplasten bzw. $10 \mu\text{g}$ Chlorophyll im Fall der Erbsenchloroplasten wurden nach Cy-Färbung (siehe 2.7.2) in $20 \mu\text{l}$ 1 x Solubilisierungspuffer (SB) aufgenommen und für 2 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation ($16000 \times g$, 1 min, 15°C) abgetrennt und der gesamte Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Lösungen:

1 x SB-Puffer : 0,67% (w/v) SDS
 1,1% (w/v) Saccharose
 0,01% (w/v) Bromphenolblau
 22 mM NaCO_3
 22 mM Dithiothreitol

2.5 Native Elektrophorese

Alle für die native Elektrophorese benötigten Puffer wurden auf 4°C gekühlt, der Gellauf selbst erfolgte ebenfalls bei $4-6^\circ\text{C}$ in einer vertikalen Elektrophoreseapparatur.

Zur Trennung der Membranproteine wurde in allen Fällen ein 6-12% Gradientengel verwendet, dessen Zusammensetzung auf der Vorschrift von Schagger und von Jagow entwickelten Originalmethode des Blue native Polyacrylamidgels basiert (Schagger et al., 1991). Das Gradientengel wurde mittels Gradientenmischer „von oben“ d.h. nur mit Hilfe der Schwerkraft gegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gradientengel mit einem 4% Sammelgel überschichtet und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Dieses auch als „erste Dimension“ bezeichnete Gel besaß eine Gesamtgröße von $20 \times 20 \times 0,075 \text{ cm}$.

Lösungen:

Sammelgel: 4% PAA (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/0,8)
 500 mM ϵ -Aminocaprinsäure
 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0)

Gradientengel: 6 bzw. 12% PAA (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/0,8)
 500 mM ϵ -Aminocaprinsäure
 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0)

20% (w/v) Glycerin (nur bei 12% PAA)

0,019% (w/v) APS

0,048% (w/v) TEMED

2.5.1 Blue native Polyacrylamidelektrophorese (BN-PAGE)

Die Puffer der BN-PAGE basierten auf der von Schagger und von Jagow veröffentlichten Methode (Schagger et al., 1991). Die Elektrophorese wurde mit 1200 V, 12 mA, 24 W pro Gel durchgeführt. Nachdem die Lauffront des mit Coomassie G-gefärbten Kathodenpuffers etwa die Hälfte des Gradientengels erreicht hatte, wurde dieser Puffer durch einen ungefärbten Kathodenpuffer ohne Coomassie G ersetzt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die blaue Lauffront das untere Ende des Gradientengels erreicht hatte.

Lösungen

Kathodenpuffer: 50 mM Tricin
 15 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0)
 0,02% (w/v) Coomassie G (optional)

Anodenpuffer: 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0)

2.5.2 Colourless native Polyacrylamidelektrophorese (CN-PAGE)

Die CN-PAGE entsprach grundsätzlich der BN-PAGE, allerdings wurde bei dieser Variante der nativen PAGE weder der Probe noch dem Kathodenpuffer Coomassie G zugesetzt. Daher erfolgte während der Elektrophorese auch kein Pufferwechsel.

2.5.3 Colourless native LDS Polyacrylamidelektrophorese (CNL-PAGE)

Die Puffer der CNL-PAGE wurden auf der Grundlage der BN-PAGE-Puffer entwickelt. Im Gegensatz zum Anodenpuffer, der unverändert beibehalten wurde, wurde nur der Kathodenpuffer modifiziert. Dabei wurde das Coomassie G durch eine geringe Menge Lithium-Dodecylsulfat (LDS) ersetzt, um eine exogene Färbung der Proteinkomplexe während der Elektrophorese zu verhindern. Somit wurde ein Pufferwechsel während der Elektrophorese vermieden. Die Laufbedingungen für die Elektrophorese wurden mit 1200 V, 12 mA, 24 W und 4-6°C beibehalten.

Lösungen

Kathodenpuffer: 80 mM Tricin
 15 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0)
 0,002% (w/v) LDS

Anodenpuffer: 50 mM Bis-Tris/HCl (pH 7,0)

2.6 Denaturierende Elektrophorese

Für die denaturierende Elektrophorese wurde ein Tris-Glycin-Puffersystem verwendet, welches auf der Vorschrift von Lämmli basiert (Laemmli, 1970). Dabei wurde dem Trenngel in allen Fällen 4 M Harnstoff zugesetzt, um die Auftrennung der Membranproteine zu verbessern. Das Trenngel hatte eine Konzentration von 12,5% Acrylamid und wurde nach der Polymerisation mit einem 5% Sammelgel überschichtet. Der Gellauf erfolgte in allen Fällen bei 15°C über Nacht.

Lösungen:

Trenngel: 12,5% PAA (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/0,8)
 4 M Harnstoff
 375 mM Tris/HCl (pH 6,8)
 0,016% (w/v) APS
 0,05% (v/v) TEMED

Sammelgel: 5% PAA (Acrylamid/Bisacrylamid = 30/0,8)
 125 mM Tris/HCl (pH 8,8)
 0,05% (w/v) APS
 0,015% (v/v) TEMED

Laufpuffer: 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 0,1% (w/v) SDS
 (Der pH stellt sich automatisch auf 8,4 ein)

2.6.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

Die unter 2.4.3 vorbereiteten Proben wurden im Protean II-System aufgetrennt. Das dabei verwendete Gel hatte eine Größe von 20 x 20 x 0,075 cm. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 mA 200V, 20W über Nacht.

2.6.2 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) im Anschluss an native PAGE

Mit Hilfe der SDS- PAGE konnten die über die native PAGE getrennten Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten zerlegt werden (2. Dimension).

Dazu wurden die Spuren der 1. Dimension mit einem scharfen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und für 20 min in SDS-Solubilisierungspuffer unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Gelstreifen möglichst luftblasenfrei auf das SDS-Gel (25,5 cm x 20,5 cm x 0,1 cm) aufgelegt.

Außerdem wurde ein mit Proteinstandard getränktes Filterpapier neben den Gelstreifen auf das Sammelgel gegeben.

Der Gellauf erfolgte im Ettan Dalt II-System. Nach 20 min bei 30 mA/ Gel erfolgte die elektrophoretische Trennung der Proteine über Nacht bei 16 mA/ Gel bei 15°C.

Lösungen:

SDS-Solubilisierungspuffer: 2% (w/v) SDS
 66 mM Na₂CO₃
 2% (v/v) β-Mercapto-Ethanol

2.7 Detektion von Proteinen

Zur Detektion der Proteinkomplexe bzw. ihrer Untereinheiten standen prinzipiell zwei unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Zum einen konnten die Proteine vor der Elektrophorese markiert werden (Detektion der Autofluoreszenz/CyDye-Markierung), zum anderen war eine Visualisierung der Proteine nach der Elektrophorese möglich (Coomassie-/Silberfärbung).

2.7.1 Autofluoreszenz

Zur Detektion der Autofluoreszenz der an die Proteinkomplexe bzw. Komplexuntereinheiten gebundenen Pigmente, wurden die Pigmente nach der Elektrophorese mit Hilfe des Laserscannersystems Typhoon Trio sichtbar gemacht. Dazu wurde eine Anregungswellenlänge von 633 nm in Kombination mit einem Emissionsbandpassfilter von 670 nm BP30 benutzt. Die Bearbeitung der erhaltenen Daten erfolgte durch das Programm ImageQuant 5.2.

2.7.2 CyDye-Markierung

Die CyDye-Markierungstechnik liefert die Grundlage der DIGE-Technologie. Dabei werden die einzelnen Proteine vor der Elektrophorese kovalent mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, welche die chemischen Eigenschaften der einzelnen Proteine nicht signifikant beeinflussen.

- *Markierung ganzer Plastiden*

Zur Überprüfung der Membrangängigkeit der CyDyes wurden jeweils 2×10^7 Erbsenchloroplasten pro Ansatz eingesetzt. Die intakten Plastiden wurden mit TMK/Sorbit auf ein Gesamtvolumen von 50 μ l gebracht und mit 10 pmol Cy3 versetzt. Nach unterschiedlich langer Inkubation (5, 10, 30 s, 1, 5, 10, 30 min) der Proben auf Eis wurde die Markierungsreaktion durch die Zugabe von 5 μ l 20 mM L-Lysin gestoppt. Die intakten Plastiden wurden über ein 40% Percollkissen reisoliert und in 36 μ l TMK lysiert. Die so vorbereitete Probe wurde wie unter 2.4.3 beschrieben für die denaturierende Elektrophorese solubilisiert.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel im Typhoon Trio bei Exc. 532 nm/Em. 580BP30 eingelesen.

- *Markierung isolierter Membranen*

Gewaschene Thylakoidmembranen von 5×10^7 Plastiden wurden in 35 μ l TMK-Puffer resuspendiert und mit 0,2 μ l Cy-Farbstoff für 20 min auf Eis inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch die Zugabe von 20 mM L-Lysin abgebunden. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Membranen pelletiert.

Zum Vergleich verschiedener Zeitstufen wurden Membranen, die aus Plastiden zweier verschiedener Zeitstufen isoliert und mit Cy2 bzw. Cy5 markiert waren, in jeweils 35 μ l

TMK-Puffer aufgenommen und vereinigt. Anschließend wurde diese Probe, deren Gesamtmenge nun 1×10^8 Plastiden entsprach, wie unter 2.4.2 beschrieben, behandelt und anschließend über CNL/SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte je nach verwendeten Cy-Farbstoff bei Exc. 488 nm/Em. 520 BP40 bzw. Exc. 633 nm/Em. 670 nm (Bandpassfilter 30 nm) im Typhoon Trio.

Zur Überlagerung der Cy-Fluoreszenz mit der Eigenfluoreszenz wurden die mit Cy2 markierten Membranen mit 5×10^7 unmarkierten Membranen gemischt, um das Autofluoreszenzsignal zu verstärken. Anschließend wurde die Probe wie unter 2.4.2 beschrieben für die CNL-PAGE vorbereitet und anschließend über CNL/SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von Cy2 erfolgte bei Exc. 488 nm/Em. 520BP40, die der Autofluoreszenz bei Exc. 633 nm/Em. 670 nm BP30.

- *Markierung isolierter Membrankomplexe*

Die Bindung der CyDyes an intakte Membrankomplexe wurde durch verschiedene Solubilisierungsstrategien überprüft. Dazu wurden pro Ansatz gewaschene Thylakoidmembranen von 2×10^7 Erbsenchloroplasten in einem Volumen von 20 μ l eingesetzt (siehe 2.4.1). Zur Solubilisierung intakter Membrankomplexe wurde die Probe mit 1 μ l DM versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Solubilisierung der Einzelproteine erfolgte durch Zugabe von 10 μ l 3 x SB (pH8,5) und anschließendem Erhitzen auf 72°C für 2 min. In einem weiteren Ansatz wurde nach dem Abkühlen zu solubilierten Einzelproteine 1 μ l DM zugegeben. Nach der Solubilisierung wurden alle Proben mit 10 pmol Cy3 gemischt und für 30 min auf Eis (intakte Membrankomplexe) oder bei RT (Einzelproteine) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 5 μ l 20 mM L-Lysin gestoppt. Nach 10 min Inkubation wurden die intakten Membrankomplexe mit 10 μ l 3 x SB (pH 8,5)-Puffer versetzt und für 2 min auf 72°C erhitzt. Anschließend wurden alle Proben zentrifugiert (16000 x g, 1 min, 15°C) und der Überstand, wie unter 2.6.1 beschrieben, elektrophoretisch getrennt.

Nach der Elektrophorese wurden die Cy-markierten Proteine im Typhoon Trio (Exc. 532 nm/Em. 580BP30) visualisiert.

Lösungen:

TMK: 10 mM Tris/HCl (pH 8,5)
 10 mM MgCl₂
 20 mM KCl

TMK/Sorbit:	10 mM Tris/HCl (pH 8,5) 10 mM MgCl ₂ 20 mM KCl 400 mM Sorbit
Percollkissen:	40% (v/v) Percoll™ 0,4 M Sorbit 50 mM Hepes/KOH (pH 8,0) 2 mM EDTA (pH 7,5)
Cy-Farbstoff:	1 mM Cy2/Cy3/Cy5 in DMF

2.7.3 Coomassiefärbung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele für 60 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Der blaue Hintergrund wurde durch Schwenken in 1. Entfärber reduziert (30 min) und bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes im 2. Entfärber belassen.

Anschließend wurden die Gele im Auflichtscanner dokumentiert und auf 3 MM Whatman-Filterpapier im Vakuumtrockner getrocknet.

Lösungen:

Färbelösung:	40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250
1. Entfärber:	40% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
2. Entfärber:	10% (v/v) Essigsäure

2.7.4 Colloidale Coomassiefärbung

Nach der Elektrophorese wurden die Gele unter leichtem Schütteln für mindestens eine Stunde in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung durch Coomassie-Färbelösung ersetzt und die Gele auf dem Horizontalschüttler über Nacht gefärbt. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte am folgenden Tag durch mehrmaliges Waschen in destilliertem Wasser. Nach der Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel im Auflichtscanner dokumentiert.

Lösungen:

Fixierlösung:	10% Essigsäure 40% Ethanol
Coomassie-Färbelösung:	75% Färbelösung (bestehend aus 98% Lösung A und 2% Lösung B) 25% Ethanol
Lösung A:	2% (w/v) ortho-Phosphorsäure (85%) 10% (w/v) Ammoniumsulfat
Lösung B:	5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250

2.7.5 Silberfärbung

Die Silberfärbung basiert auf einem modifizierten Protokoll von Blum et al. (Blum et al., 1987). Alle Schritte wurden unter leichtem Schütteln durchgeführt. Nach der Fixierung der Proteine in Fixierlösung für mindestens eine Stunde wurde das Gel drei Mal für je 20 min in Waschlösung inkubiert. Nach einem einminütigen Sensibilisierungsschritt in Thiosulfatlösung wurde das Gel drei Mal für 20 s mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in Silbernitratlösung inkubiert. Nach 20 minütiger Inkubation wurde das überschüssige Silbernitrat durch zweimalige Zugabe von destilliertem Wasser für jeweils 20 s entfernt. Die Visualisierung der Banden erfolgte in Entwicklerlösung. Kurz vor Erreichen der gewünschten Farbeintensität wurde das Gel zwei Mal für 1 min in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in Stopplösung überführt. Darin wurde das Gel bis zur Dokumentation im Auflichtscanner bzw. bis zum Trocknen zwischen zwei Cellophanfolien aufbewahrt.

Lösungen:

Fixierlösung:	10% Essigsäure 40% Ethanol
Waschlösung:	30% Ethanol
Thiosulfatlösung:	0,02% (w/v) Na-Thiosulfat
Silbernitratlösung:	0,2% (w/v) Silbernitrat
Entwicklerlösung:	3% (w/v) Na-Carbonat 0,0004% (w/v) Na-Thiosulfat 0,05% Formaldehyd
Stopplösung:	0,5% (w/v) Glycin

2.8 Identifikation von Proteinen

Die Identifikation der Proteine erfolgte je nach zur Verfügung stehender Proteinmenge entweder durch die Verwendung verschiedener Antikörper oder durch massenspektrometrische Analyse.

2.8.1 Immunodetektion

Zur Identifikation von Proteinen durch spezifische Antikörper wurden Polyacrylamidgele sowohl nach nativer wie auch denaturierender Elektrophorese verwendet. In beiden Fällen wurden die Proteine nach der Elektrophorese im Semi-dry Verfahren nach Towbin et al. auf stabilisierte Nitrocellulosemembranen übertragen (Towbin et al., 1979). Hierzu wurde das Gel luftblasenfrei auf die Membran aufgelegt, welche zuvor auf drei Lagen Filterpapier platziert wurde. Anschließend wurde das Gel mit drei weiteren Lagen Filterpapier bedeckt. Alle sechs Filterpapierlagen und die Nitrocellulosemembran wurden vor ihrer Verwendung in Towbinpuffer getränkt. Der Proteintransfer wurde für 1 h bei 400 mA durchgeführt.

Der Erfolg des Proteintransfers wurde abschließend durch Ponceaufärbung überprüft. Hierzu wurde die Nitrocellulosemembran für 1 min in Ponceaulösung geschwenkt und anschließend der Hintergrund durch ddH₂O soweit entfernt, bis einzelne Proteinbanden sichtbar wurden. Die vollständige Entfärbung der Membran erfolgte anschließend in TBS-Puffer.

Zum spezifischen Proteinnachweis wurde das enhanced chemo luminescence (ECL)-System verwendet. Zur Abbindung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h in MTBS geschwenkt. Anschließend wurde die Membran entweder mit POR- (1:2000 (v/v) in MTBS) oder D2-Antikörper (1:2000 (v/v) in MTBS) für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS für jeweils 10 min. wurde die Membran für eine weitere Stunde in sekundärem Antikörper (1:10000 (v/v) in MTBS) geschwenkt. Die Entfernung nichtgebundenen Antikörpers erfolgte durch erneutes Waschen mit TBS (drei Mal für jeweils 10 min.). Die Visualisierung der immunologisch detektierten Proteine erfolgte im Photolabor durch kurzzeitige Inkubation der Membran in einer 1:2 Mischung aus ECL1 und ECL2 und anschließendem Auflegen eines Röntgenfilms. Nach 1 bis 10 min wurde der Film von der Membran abgenommen, entwickelt und nach der Fixierung mit Hilfe eines Durchlichtscanners digitalisiert.

Lösungen:

Towbinpuffer:	96 mM Glycin 10 mM Tris 10% Methanol
Ponceau:	0,2% (v/v) Ponceau 1% Essigsäure
TBS:	10 mM Tris/HCl pH 7,5 150 mM NaCl
MTBS:	5% Magermilchpulver in TBS
ECL1:	100 mM Tris/HCl pH 8,3 2,5 mM Luminol 0,4 mM p-Cumarsäure
ECL2:	100 mM Tris/HCl pH 8,3 0,0183% H ₂ O ₂

2.8.2 De novo Sequenzierung

Proteine, welche durch colloidale Coomassiefärbung sichtbar gemacht werden konnten, wurden nach tryptischen Verdau durch *de novo* Sequenzierung identifiziert. Hierzu wurde die Coomassie gefärbte Gelbande mittels Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und für zwei Mal 10 min in ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Banden durch Zentrifugation (9300 x g, 2 min) zerkleinert und in 18 µl Verdauopuffer aufgenommen. Dazu wurden 2µl Trypsin pipettiert und die Proben bei 60°C für 45 min im Thermoschüttler inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 5 µl Stopplösung beendet und mittels ZipTipTM-Entsalzung aufkonzentriert. Hierzu wurde die ZipTipTM-Säule in 100% Methanol aktiviert. Nach der Aktivierung wurde die Säule in Äquilibriumlösung äquilibriert und anschließend die Peptidlösung auf die Säule verbracht. Nach fünfmaligem Waschen der Säule mit Äquilibriumlösung wurden die Peptide in 4 µl Elutionslösung von der Säule abgelöst und mittels Gelloadertip in die Nanospraykapillare aus Borosilikatglas verbracht.

Die Messungen erfolgten offline und ausschließlich im positiven Ionisierungsmodus. Die Vernebelung der Proben erfolgte bei einer Kapillarspannung von 800-1000 V. Für jedes Übersichtsspektrum (MS-Spektrum) wurden 2 s im Bereich von 400-1600 m/z aufgezeichnet. Nach der Kombination von 25-60 MS-Einzelspektren wurden zwei- und dreifach geladene Peptide aus dem kombinierten Spektrum ausgewählt. Nach der Selektion derartiger Peptide

wurden diese in der Kollisionszelle fragmentiert. Die dabei erzeugten Fragmentationenspektren wurden anschließend durch die Software MassLynx, über die auch die Steuerung des Massenspektrometers erfolgte, bearbeitet. Die *de novo* Sequenzierung wurde mit Hilfe des Programmes MaxEnt3 durchgeführt und die ermittelten Peptidsequenzen mittels Protein-BLAST durch den Suchalgorithmus“fastf3” (www.ebi.ac.uk/fasta33) mit der NCBIr-Datenbank am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) abgeglichen.

Lösungen:

Verdaupuffer:	50 mM Tris/HCl pH 8,5
Äquilibrierungslösung:	5% Ameisensäure
Elutionslösung:	65% Methanol 5% Ameisensäure

2.9 Identifikation von Pigmenten

Die Identifikation der Pigmente erfolgte sowohl auf Ebene der nativen Proteinkomplexe als auch im aufgereinigten Zustand. Dabei wurden die noch im Proteinkomplex gebundenen Chromophore durch Absorptionsspektroskopie untersucht, die Analyse der aufgereinigten Pigmente erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie.

2.9.1 Absorptionsspektroskopie

Nach CLN-PAGE wurden die cofaktorbindenden Banden durch Autofluoreszenz sichtbar gemacht (siehe 2.7.1). Alle autofluoreszenten Banden wurden anschließend mit einem Skalpell ausgeschnitten. Eine bis fünf Banden wurden übereinander gestapelt und mit Tesafilm auf einem Probenhalter fixiert. Die auf dem Probenhalter fixierten Banden wurden anschließend in einem Spektralphotometer mit Ulbrichtkugel photometrisch vermessen. Hierzu wurde jeweils ein Absorptionsspektrum im Bereich von 400-700 nm erstellt, welches abschließend mit Hilfe der Software Origin 7.0 bearbeitet wurde.

2.9.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für eine eindeutige Identifikation der im Cyt b₆f-Komplex gebundenen Pigmente wurden diese nach CNL-PAGE aus dem dimeren Cyt b₆f-Komplex isoliert. Dazu wurde die entsprechende Gelbande nach Autofluoreszenzdetektion (siehe 2.7.1) mit einem Skalpell ausgeschnitten und durch Zentrifugation (9300 x g, 2 min) durch eine 10 µl-Spitze

zerkleinert. Die Gelstückchen wurden anschließend mit 100 µl DMF versetzt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Durch Zentrifugation (16000 x g, 10 min) wurden die extrahierten Pigmente von den Gelresten getrennt. Die in DMF gelösten Pigmente wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Vakuumkonzentrator zur Trockene eingengt. Nach dem Rücklösen der Pigmente in 10 µl MP-Lösung wurde die Probe vollständig auf eine HPTLC RP-8 F₂₅₄ aufgetragen. Die Referenzpigmente wurden ebenfalls in MP-Lösung gelöst und neben den extrahierten Pigmenten aufgetragen. Die Trennung der Pigmente erfolgte in MP-Lösung bis das Lösungsmittel die obere Kante der Platte erreicht hatte.

Die R_F-Werte wurden aus dem Verhältnis der Laufstrecke des Pigments zur Laufstrecke des Lösungsmittels ermittelt.

Lösungen:

MP-Lösung: 58,8% Methanol
 39,2% Aceton
 2% ddH₂O

2.9.3 Massenspektrometrie

Für die Identifikation der Pigmente mittels Massenspektrometrie wurden die Chromophore, wie für die Dünnschichtchromatographie beschrieben (siehe 2.9.2), isoliert. Nach dem Einengen der Proben im Vakuumkonzentrator wurden die Proben und die Referenzpigmente in Messlösung gelöst und in eine Nanospraykapillare überführt. Die Proben wurden mittels offline ESI-MS/MS analysiert. Dazu wurden die theoretisch berechneten Molekularmassen der Pigmente über den Quadrupol selektiert und in der Kollisionszelle fragmentiert. Die erhaltenen Fragmentationenspektren von Eluat und Referenzpigment wurden anschließend mit Hilfe der Software MassLynx verglichen.

Lösungen:

Messlösung: 25% Ameisensäure
 62.5% Acetonitril
 7.5% Isopropanol

C Ergebnisse

1 Vergleich von Membranproteinkomplexen des Etio- und Chloroplasten

1.1 Trennung der Membranproteinkomplexe über BN-PAGE

Blue native (BN) PAGE ermöglicht die Trennung von Membranproteinkomplexen nach der Molekularmasse. Durch die Solubilisierung der Membranproteinkomplexe mit milden, nicht ionischen Detergenzien und der Beladung der solubilisierten Komplexe mit dem negativ geladenen Farbstoff Coomassie G kann eine Auftrennung der Membranproteinkomplexe in ihrer nativen Form mittels PAGE erreicht werden. Mit Hilfe dieser Methode sollte die Komplexzusammensetzung des Etioplasten mit der des Chloroplasten verglichen werden, um einen Überblick über die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der beiden Entwicklungszustände der Plastiden zu bekommen. In weiteren Ansätzen sollten anschließend die Vorgänge auf Proteinkomplexniveau untersucht werden, die bei der Umwandlung vom Etioplasten zum Chloroplasten ablaufen. Die Identifikation der Proteinkomplexe erfolgte aufgrund von massenspektrometrischen Analysen früherer Arbeiten (Granvogl et al., 2006).

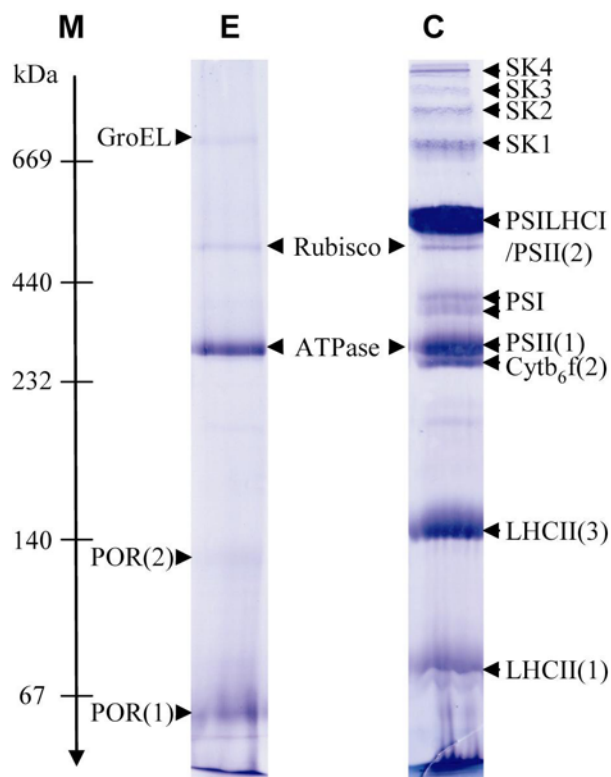


Abb.2 Membranproteinkomplexe in Etio- bzw. Chloroplasten nach BN-PAGE

Nach der Isolation von Membranen aus 1×10^8 Etioplasten (E) bzw. Chloroplasten (C) wurden die Membranen zwei Mal in TMK-Puffer gewaschen. Nach der Solubilisierung der Membranproteinkomplexe in 1,25 % (w/v)

DM wurden die nicht solubilisierten Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand mit den solubilisierten Membranproteinkomplexen wurde mit BL versetzt und auf ein 6-12% BN- Gradientengel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde das Gel mit Coomassie gefärbt. Zur Bestimmung der Molekularmassen der einzelnen Komplexe wurde HMW- Marker auf das Gel aufgetragen und mittels Coomassiefärbung sichtbar gemacht (M).

Die Coomassie gefärbten Proteinkomplexe wurden wie folgt beschriftet: GroEL bezeichnet einen Chaperon-Komplex, POR den Protochlorophyllid-Oxidoreduktase-Komplex in seiner monomeren (1) bzw. dimeren (2) Form, Rubisco den Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase-Komplex, ATPase den ATP-Synthase-Komplex, SK1-4 Superkomplexe des Photosystems I und II, die jeweils aus dem Reaktionszentrums-Kern-Komplex und LHC-Proteinen bestehen, PSI verschiedene RC-Core-Komplexe des Photosystem I, PSII(2) bzw. PSII(1) den dimeren bzw. monomeren RC-Core- Komplex des Photosystem II, LHCI den LHC- Komplex des Photosystem I, Cyt_b₆f (2) den dimeren Cyt_b₆f- Komplex, LHCII(3) bzw. LHCII(1) den trimeren bzw. monomeren LHC-Komplex des Photosystem II.

Bei der Trennung der Membranproteinkomplexe wurden zwei Komplexe detektiert, die in beiden Plastidentypen enthalten waren. So konnte im Bereich von 480-490 kDa sowohl im Etioplasten wie auch im Chloroplasten der Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase-Komplex (RubisCo) nachgewiesen werden (Abb.2, C/E, Rubisco). Bei dem zweiten Komplex handelte es sich um den ATP-Synthase-Komplex, welcher eine Molekularmasse von 290-310 kDa aufwies (Abb.2, C/E, ATPase).

Nach der Coomassiefärbung konnten in beiden Entwicklungsstufen zudem Komplexe identifiziert werden, die entweder für den Etioplasten oder den Chloroplasten charakteristisch schienen (Abb.2). Im Fall des Etioplasten konnten drei Banden unterschieden werden, denen kein Analogon im Chloroplasten zuzuordnen war (Abb.2, E). Die Identifikation der Komplexe erfolgte aufgrund vorangegangener massenspektrometrischer und immunologischer Analysen (Granvogl et al., 2006; Bisle, 2000). Zwei dieser Komplexe stellten verschiedene Assemblierungsstufen eines Enzyms der Chlorophyllbiosynthese, der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR), dar. Die monomere bzw. dimere Assemblierungsstufe des POR-Komplexes wiesen ein Molekulargewicht von ca. 60-65 bzw. 125-130 kDa auf (Abb.2, E, POR(1)/POR(2)). Beim dritten Komplex im Molekularmassenbereich von ca. 770 kDa handelte es sich um einen Komplex des Proteinfaltungsapparats, der der Klasse der GroEL-Proteine zugeordnet wird (Abb.2, GroEL). Im Bereich über 670 kDa war aufgrund fehlender Markerbanden nur noch eine sehr grobe Molekularmassenabschätzung der Komplexe möglich.

Im Vergleich zum Etioplasten wies der Chloroplast zehn zusätzliche Komplexe auf, die im Etioplasten nicht nachgewiesen werden konnten (Abb.2, C). Dabei handelte es sich bei den vier hochmolekularen Komplexen im Bereich von 1000, 900-920, 840-880 und 730-780 kDa um die so genannten Superkomplexe des Photosystem (PS) I und II, welche sich aus den Reaktionszentren (RC) der beiden Photosysteme und verschiedenen Lichtsammelproteinen zusammensetzten (Abb.2, C, SK1-4). Zwei weitere Banden mit einer Molekularmasse von

540-585 kDa und 380-425 kDa konnten verschiedenen Assemblierungsstufen des PS I zugeordnet werden (Abb.2, C, PSI), wobei die höhermolekulare Assemblierungsstufe mit Lichtsammelproteinen (LHC) des PSI assoziiert zu sein schien (Abb.2, C, PSILHCI). Die dimere und monomere Assemblierungsstufe des RC-Kern-Komplexes des PS II (RCCII) wurden bei 540-585 bzw. 290-310 kDa detektiert (Abb.2, C, PSII(1)/PSII(2)). Als weitere Chlorophyll-bindende Komplexe wurden im Bereich von 145-155 kDa die trimere Assemblierungsstufe des LHC des PS II und im Bereich von 75-85 kDa die monomere Assemblierungsstufe dieses Komplexes detektiert (Abb.2, C, LHCII(1)/LHCII(3)). Zudem konnte im Chloroplasten der Cyt b_6f -Komplex (Cyt b_6f) in seiner dimeren Form nachgewiesen werden (Abb.2, C, Cyt b_6f (2)).

Aufgrund des Vergleiches von Etio- und Chloroplastenkomplexen konnten Komplexe festgelegt werden, die nur in einer Entwicklungsstufe nachweisbar waren. So waren die Komplexe der POR als Enzym der Chlorophyllbiosynthese für den Etioplasten charakteristisch, wohingegen alle Chlorophyll-bindenden Komplexe den Chloroplasten auszeichneten. Eine detaillierte Zusammensetzung dieser Komplexe sollte im Folgenden durch kombinierte BN/SDS-PAGE dargestellt werden.

1.2 Zusammensetzung der Thylakoidmembrankomplexe

Die Kombination von BN-PAGE mit denaturierender SDS-PAGE ermöglichte die Untersuchung der Untereinheiten der Proteinkomplexe. Durch BN/SDS-PAGE sollte zuerst die Zusammensetzung der Komplexe der Thylakoidmembran beschrieben werden, um diese anschließend mit den Proteinen des Etioplasten vergleichen zu können. Dabei wurden in beiden Fällen nur Untereinheiten von Proteinkomplexen beschriftet, die bereits in Abb.2 beschrieben wurden. Bei den aus Abb.2 bekannten Komplexen des Chloroplasten handelte es sich um verschiedene Assemblierungsstufen der vier dominanten Komponenten der Thylakoidmembran, d.h. der beiden Photosystemen, der ATP-Synthase und des Cyt b_6f -Komplexes. Die Identifikation der Komplexuntereinheiten erfolgte anhand massenspektrometrischer Daten (Granvogl et al., 2006).

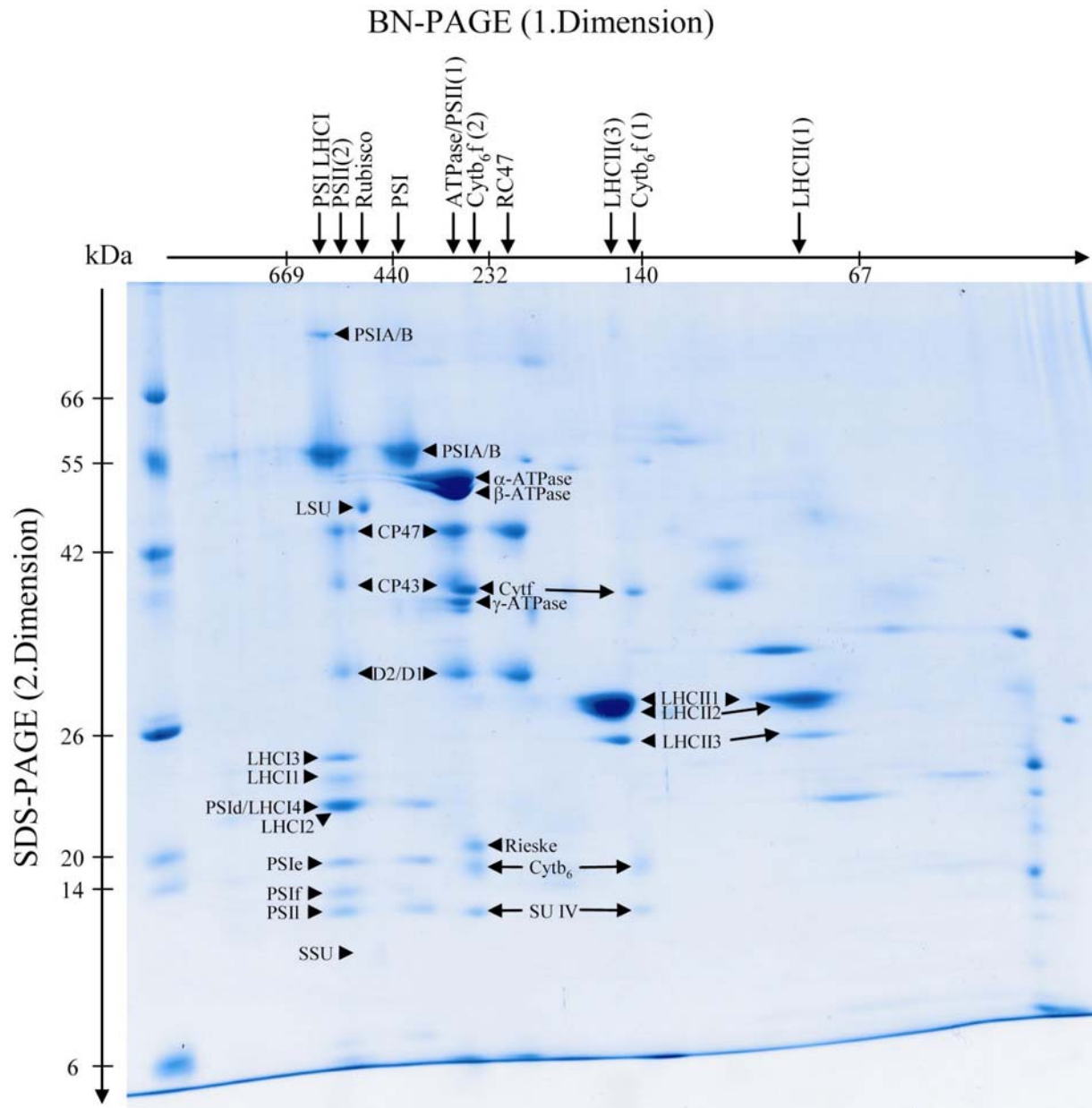


Abb.3 Zusammensetzung der Membranproteinkomplexe des Chloroplasten nach BN/SDS-PAGE

1×10^8 Chloroplasten wurden wie in Abb.2 beschrieben vorbereitet und mittels BN-PAGE (1.Dimension) aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde eine Spur des BN-Gels ausgeschnitten, in Solubilisierungspuffer inkubiert und anschließend auf ein 12,5% SDS – Gel aufgelegt. Nach der elektrophoretischen Trennung der Komplexuntereinheiten durch SDS-PAGE (2.Dimension) wurde das Gel kolloidal Coomassie gefärbt. Die Molekularmassenbestimmung erfolgte mit Hilfe des HMW-Markers (1.Dimension) bzw. des Mark¹² Standards (2.Dimension).

Die Beschriftung der Proteinkomplexe erfolgte analog zu Abb.2. Zusätzlich zu den in Abb.2 beschrifteten Komplexen wurde ein Komplex (RC47) bestehend aus dem RCCII ohne das innere Antennenprotein CP43 und der monomere Cyt _bf-Komplex markiert.

Die Untereinheiten wurden wie folgt beschriftet: PSI A/B bezeichnet die Reaktionszentrumsproteine P700 A und P700 B des PS I- Komplexes, PSI d, PSI e, PSI f und PSI l die kleinen Untereinheiten PSI-d, PSI-e, PSI-f und PSI-l des PS I- Komplexes, LHCI1-4 die Genprodukte von Lhca1-4 der äußeren Antennen von PS I, CP47, CP43 die inneren Antennenproteine CP47 und CP43 des PS II- Komplexes und D1 bzw. D2 die Reaktionszentrumsprotein D1 bzw. D2 des PS II- Komplexes, LHCII1-3 die Genprodukte Lhcb1-3 der äußeren Antennenproteine des PS II, α-, β- und γ- ATPase die α-, β- und γ-Untereinheit des ATP-Synthase-Komplexes, LSU bzw. SSU die große bzw. kleine Untereinheit des Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase-Komplexes und Cyt f, Rieske, Cyt _b und SU IV die Genprodukte von pet A, pet B, pet C und pet D des Cyt _bf- Komplexes.

Nach SDS-PAGE konnten alle Komplexe, die bereits in Abb.2 beschrieben worden waren, anhand verschiedener Untereinheiten charakterisiert werden. So konnte die monomere und dimere Assemblierungsstufe des RCCII anhand von vier gut färbbaren Proteinuntereinheiten identifiziert werden. Dabei handelte es sich um die Reaktionszentrumsproteine D2 und D1 sowie die inneren Antennenproteine CP47 und CP43 (Abb.3, D1/D2/CP47/CP43). Neben diesen beiden Komplexen konnte nach SDS-PAGE noch eine weitere Assemblierungsstufe des PS II im Bereich von 195-210 kDa detektiert werden. Dieser als RC47 bezeichnete Komplex bestand aus den Reaktionszentrumsproteinen D1 und D2 und dem inneren Antennenprotein CP47 (Abb.3, RC47, D1/D2/CP47). Über die Beteiligung der PSII-Proteine an der Bildung der Superkomplexe war nach der Coomassiefärbung der zweiten Dimension keine Aussage zu treffen.

Die Komplexe des PSI bestanden im Bereich von 380-425 kDa aus dem Reaktionszentrum aus P700A und P700B und den Untereinheiten PSI d, PSI e, und PSI l (Abb.3, PSIA/PSIB/PSId/PSIe/PSIl). Im höhermolekularen Komplex des PSI konnten neben P700A, P700B, PSI d, PSI e, PSI f und PSI l auch die Lichtsammelkomplexproteine LHCI 1-4 nachgewiesen werden (Abb.3, PSIA/PSIB/PSId/PSIe/PSIf/PSIl/LHCI1-4).

Der Lichtsammelkomplex des PSII konnte anhand von drei Proteinen nachgewiesen werden. Die Proteine wurden sowohl in trimerer wie auch in monomerer Form identifiziert (Abb.3, LHCI1-3).

Neben den Chlorophyll-bindenden Proteinkomplexen der Thylakoidmembran konnte die ATP-Synthase anhand der α -, β - und γ -Untereinheit mit einer Komplexgröße von ca. 290-310 kDa beschrieben werden (Abb.3, α -ATPase/ β -ATPase/ γ -ATPase).

Der Cyt b_6f -Komplex wurde durch die Proteine Cyt f, Cyt b_6 , das Rieske-Protein und die Untereinheit IV charakterisiert, wobei alle vier Proteine nur im dimeren Cyt b_6f -Komplex nachweisbar waren (Abb.3, Cytf/Cytb₆/Rieske/SUIV). Im monomeren Komplex konnte das Rieske-Protein in der Coomassiefärbung nicht detektiert werden.

Zusätzlich zu den membranständigen Komplexen wurde nach BN/SDS-PAGE ein weiterer, membranassoziierter Komplex sichtbar. Nach der Coomassiefärbung war die RubisCo anhand der großen und kleinen Untereinheit nachweisbar (Abb.3, LSU/SSU).

Nach der Analyse der Proteine der Thylakoidmembran sollten im Folgenden die Proteinuntereinheiten der Etioplastenmembrankomplexe untersucht werden, um die Proteinzusammensetzung des Chloroplasten mit der des Etioplasten zu vergleichen.

1.3 Zusammensetzung der Membrankomplexe des Etioplasten

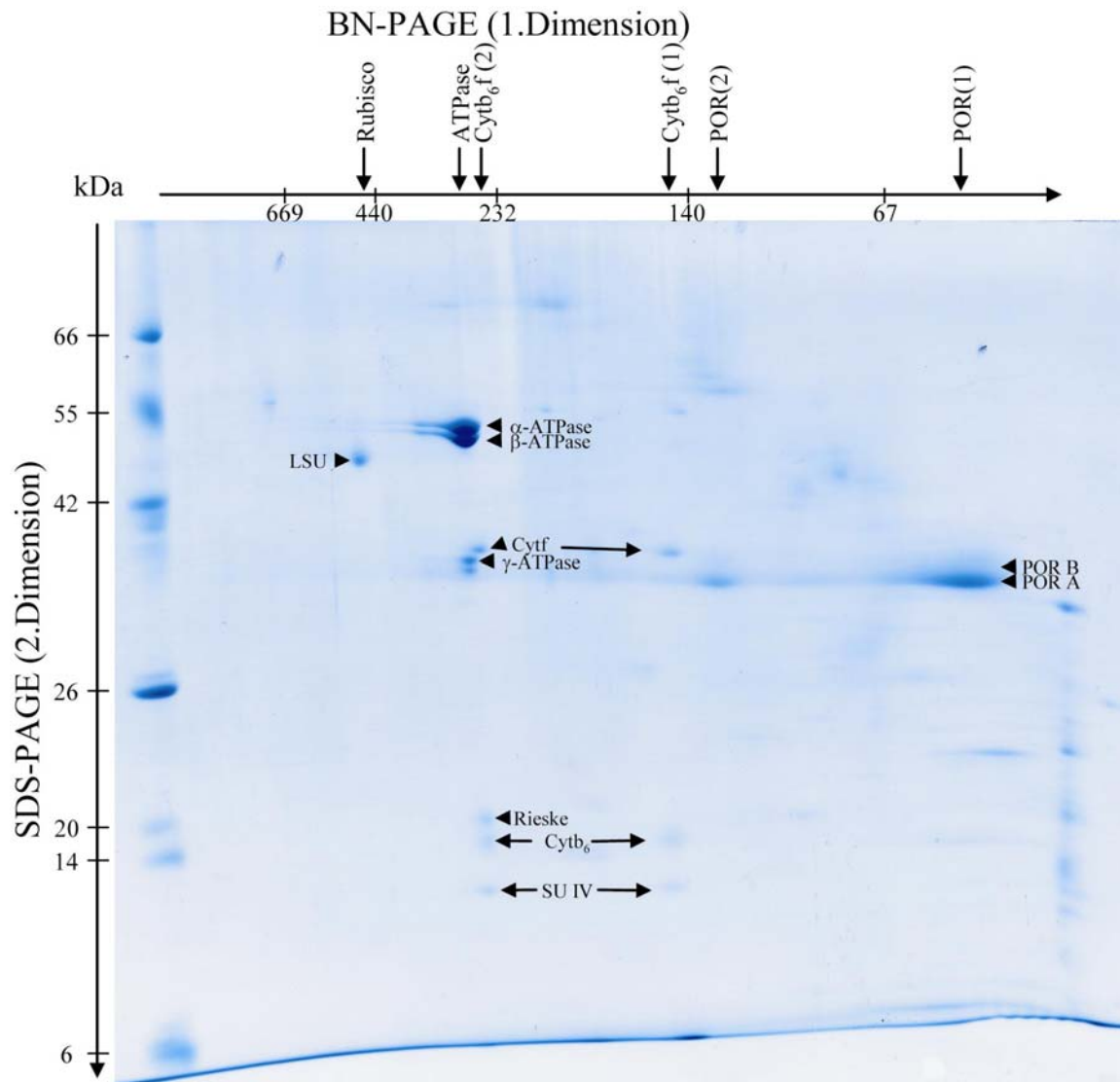


Abb.4 Membranproteinkomplexzusammensetzung des Etioplasten nach BN/SDS-PAGE

1×10^8 Etioplasten wurden wie in Abb.3 beschrieben behandelt und über BN/SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der SDS-Elektrophorese wurde das Gel kolloidal Coomassie gefärbt.

Die Beschriftung der Membranproteinkomplexe erfolgte analog zu Abb.2.

Die Untereinheiten wurden entsprechend der Abb.3 beschriftet. Neben den in Abb.3 beschrifteten Proteinen wurden die beiden Untereinheiten des Protochlorophyllid-Oxidoreduktase-Komplexes Untereinheit A (POR A) und Untereinheit B (POR B) markiert.

Im Vergleich zum Chloroplast konnten im Etioplasten deutlich weniger Proteinspots detektiert werden (Abb.4). Die intensivste Färbung zeigten zwei Proteine im Bereich von ca. 50 kDa, die dem ATP-Synthase-Komplex zuzuordnen waren (Abb.4, α -ATPase/ β -ATPase). Vom ATP-Synthase-Komplex konnte noch ein weiteres Protein identifiziert werden (Abb.4, γ -ATPase).

Neben der ATP-Synthase konnte wie auch im Chloroplasten die große Untereinheit der RubisCo nachgewiesen werden (Abb.4, LSU). Aufgrund der Molekularmasse des Komplexes konnte davon ausgegangen werden, dass die kleine Untereinheit ebenfalls im Komplex enthalten war. Diese wurde in der Coomassiefärbung des Etioplasten allerdings nicht sichtbar. Ein weiterer Komplex, der in beiden Entwicklungszuständen auftrat, schien der Cyt b_6/f -Komplex in seiner monomeren und dimeren Form zu sein. In beiden Assemblierungsstufen konnten die bereits für den Chloroplasten beschriebenen Untereinheiten beschrieben werden, d.h. für den dimeren Komplex die Proteine Cyt f, Cyt b_6 , das Rieske-Protein und die Untereinheit IV und für den monomeren Komplex Cyt f, Cyt b_6 und die Untereinheit IV (Abb.4, Cytf/Cytb₆/Rieske/SUIV).

Im Gegensatz zum Chloroplasten wurde im Etioplasten ein Protein detektiert, das sich bis ca. 440 kDa in der ersten Dimension erstreckte, wobei zwei Komplexe bei 125-130 und 60-65 kDa deutlich wurden. Bei diesem Protein handelte es sich um die Protochlorophyllid-Oxidoreduktase A, welche zumindest im Bereich unter 67 kDa einen Komplex mit der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase B zu bilden schien (Abb.4, PORA/PORB).

Nach dem Vergleich der Proteinzusammensetzung des Etioplasten und des Chloroplasten schienen sowohl die ATP-Synthase wie auch die RubisCo und der Cyt b_6/f -Komplex in derselben Zusammensetzung in beiden Entwicklungszuständen enthalten zu sein. Um zu überprüfen, ob diese Komplexe identische Molekularmassen und Proteinuntereinheiten besaßen, wurde zunächst geprüft, ob das Verfahren der differentiellen Gelelektrophorese (DIGE), welches für die Analyse löslicher Einzelproteine entwickelt wurde, auch auf gesamte Membranproteinkomplexe anwendbar ist. Dies würde einen direkten Vergleich der Proteinkomplexe verschiedener Entwicklungsstufen der Plastiden ermöglichen.

2 Membranproteinkomplexe und DIGE

Das Verfahren der differentiellen Gelelektrophorese wurde zuerst bei löslichen Proteinen, welche über IEF/SDS-PAGE getrennt wurden, erfolgreich angewandt (Lilley et al., 2004). In einem ersten Versuch sollte überprüft werden, in welchem Maß die zur Markierung der Proteine verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (CyDyes) in der Lage waren, die Membranproteine in nativer Form zu markieren. Die Markierung der Einzelproteine sollte dabei möglichst im Komplex d.h. in der Membran durchgeführt werden.

2.1 Membrangängigkeit von CyDyes

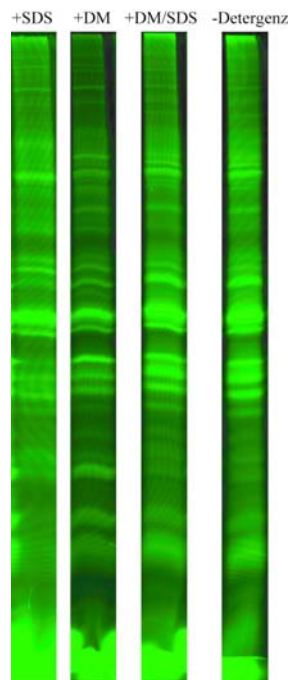


Abb.5 Einfluss von Detergenzien auf die Markierungsintensität von CyDyes

Thylakoidmembranen von 2×10^7 Erbsenchloroplasten wurden nach der Isolation mit Cy3 markiert (- Detergenz). Zusätzlich wurden Thylakoidmembranen entweder mit SB-Puffer (+SDS) oder mit DM (+DM) solubilisiert und anschließend mit Cy3 markiert. In einem weiteren Ansatz wurden die Thylakoidmembranen mit einem Gemisch aus DM und SB-Puffer solubilisiert und mit Cy3 versetzt (+DM/SDS). Nach 20 min wurden die Reaktionen mit L-Lysin gestoppt, die Membranen solubilisiert und die nicht solubilisierten Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Die Überstände wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die fluoreszenzmarkierten Proteine durch Anregung bei 532 nm im Typhoon-Trio sichtbar gemacht.

In einem ersten Ansatz wurden die Proteine der Thylakoidmembran mit SDS solubilisiert und nach der Entfernung der nicht solubilisierten Membranbestandteile mit Cy3 markiert (Abb.5, +SDS). In diesem Fall sollte durch das Vorliegen der Proteine als denaturierte Einzelproteine eine möglichst vollständige Markierung des Thylakoidmembranproteoms erreicht worden sein, welche als Referenz für die anderen Ansätze diene.

In einem weiteren Ansatz wurden die Proteinkomplexe durch die Solubilisierung mit Dodecylmaltosid aus der Membran isoliert und anschließend mit Cy3 markiert. Somit sollte sichergestellt werden, dass die Membran keine Barriere für den Farbstoff darstellte und der Fluoreszenzfarbstoff die Komplexproteine erreichen konnte (Abb.5, +DM). Der Vergleich mit den in denaturiertem Zustand markierten Proteinen zeigte keine signifikanten Unterschiede, allerdings schienen die Färbeintensitäten der einzelnen Banden im Vergleich zur Referenz verschoben zu sein. Während in der Referenzprobe alle Proteine annähernd die gleiche Färbeintensität aufwiesen, wurden nach der Solubilisierung mit Dodecylmaltosid einzelne

Proteine stärker markiert. Generell waren aber alle Proteine, die in der denaturierten Probe sichtbar wurden, nach der Solubilisierung mit Dodecylmaltosid nachweisbar (Abb.5, +DM/+SDS).

Die Markierung der Proteinkomplexe in der Thylakoidmembran schien ebenfalls dem Bandenmuster der Referenzspur zu entsprechen (Abb.5, -Detergenz). In diesem Fall schien die Verteilung der Markierungsintensität der Verteilung der SDS-denaturierten Proteine zu entsprechen, d.h. die Markierung der Proteinuntereinheiten in der intakten Membran erwies sich als möglich.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde geschlossen, dass die Methode der kovalenten Fluoreszenzmarkierung von Proteinen in intakten Membranen zumindest auf der Stufe der qualitativen Analyse anwendbar ist.

Um die Membrangängigkeit der CyDyes zu bestätigen und die optimale Markierungsdauer der Proteinuntereinheiten zu ermitteln, wurden intakte Plastiden mit Fluoreszenzfarbstoff versetzt und unterschiedlich lange inkubiert.

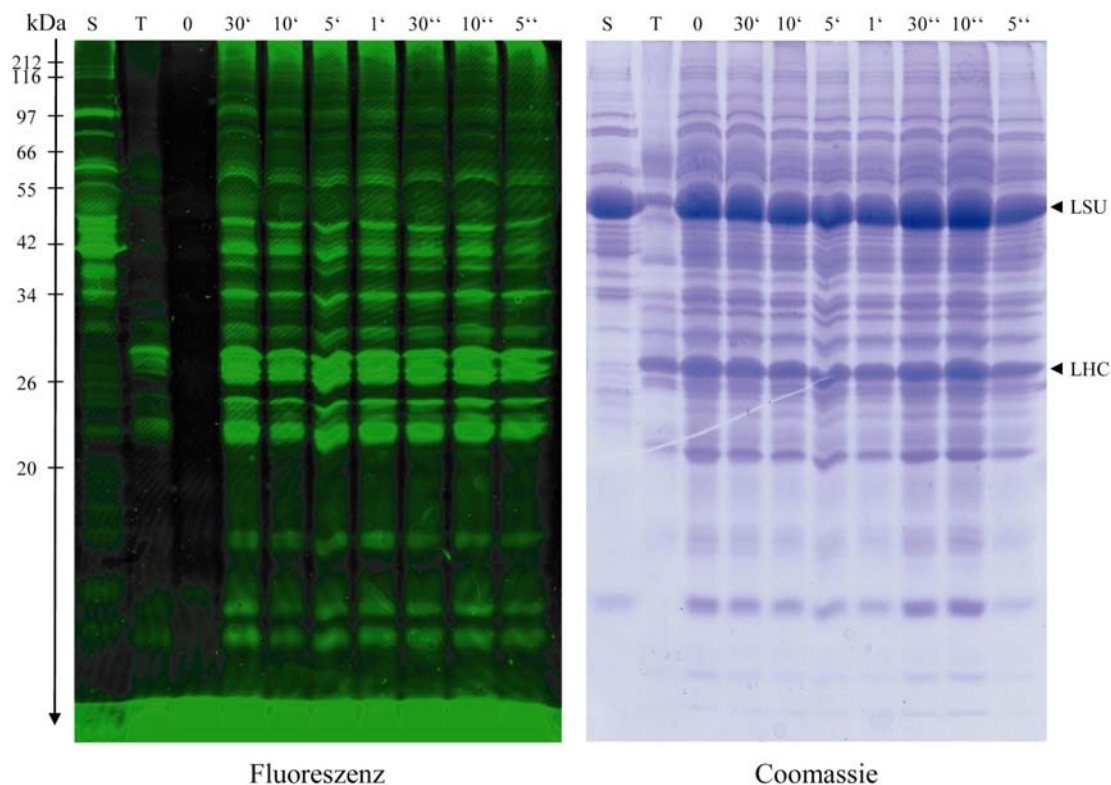


Abb.6 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen in intakten Chloroplasten bei unterschiedlich langer Inkubationszeit mit CyDyes

Jeweils 2×10^7 Chloroplasten aus Erbse wurden in TMK-Puffer mit Sorbit aufgenommen und mit 10 pmol Cy3 für 5, 10 oder 30 s (5'', 10'', 30'') bzw. 1, 5, 10 oder 30 min (1', 5', 10', 30') inkubiert. Anschließend wurde die Markierungsreaktion durch die Zugabe von L-Lysin gestoppt und die intakten Plastiden über 40% Percoll reisoliert. Als Nullkontrolle wurden Proteine von unmarkierten Plastiden eingesetzt (0). Die intakten Plastiden wurden mit SB-Puffer versetzt, erhitzt und die nicht solubilisierten Bestandteile durch Zentrifugation entfernt.

Als Positivkontrolle wurden intakte Plastiden lysiert, das Stroma (S) durch Zentrifugation von den Thylakoiden (T) getrennt und beide Fraktionen mit jeweils 10 pmol Cy3 markiert. Die Markierungsreaktion wurde durch L-Lysin gestoppt und die Proben durch Zugabe von SB-Puffer solubilisiert. Nach der Zentrifugation wurden alle Überstände auf ein 12,5% SDS-PAGE aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Nach dem Gellauf wurden die fluoreszenzmarkierten Proteine mittels Typhoon-Trio (Exc. 532 nm/ Em. 580 BP30) sichtbar gemacht (Fluoreszenz). Anschließend wurde das Gel mit Coomassie gefärbt (Coomassie).

Nach SDS-PAGE des Gesamtplastidenproteoms wurden die fluoreszierenden Einzelproteine im Laserscanner sichtbar gemacht (Abb.6, Fluoreszenz). Die anschließende Coomassiefärbung zeigte, dass für alle Zeitstufen die gleiche Proteinmenge eingesetzt worden war (Abb.6, Coomassie). Die Zuordnung der Proteine zur Fraktion der löslichen bzw. der Membranproteine wurde durch die elektrophoretische Trennung einer Stromafraktion (S) des Chloroplasten bzw. isolierter Thylakoidmembranen (T) ermöglicht. Beide Fraktionen waren sowohl nach der Fluoreszenzmarkierung als auch nach der Coomassiefärbung anhand des unterschiedlichen Bandenmusters gut zu erkennen. Dadurch war es möglich, die Wanderungsgeschwindigkeit des Farbstoffes durch die einzelnen Membranen zu verfolgen (Abb.6, S/T). In der löslichen Fraktion stellte die LSU das dominierende Protein (Abb.6, LSU). Allerdings konnte die LSU nach der Fluoreszenzmarkierung nur als schwach fluoreszierende Bande d.h. kaum markiert nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Coomassiefärbung eine deutlich gefärbte Bande.

In der Membranfraktion diente ein LHC-Protein als Marker (Abb.6, LHC). Dieses Protein war sowohl in der Fluoreszenzmarkierung wie auch in der Coomassiefärbung gut detektierbar.

Die Zeitreihe zeigte für alle Inkubationszeiten das gleiche Bild (Abb.6, Fluoreszenz, 30'-5''). Der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 konnte bereits nach 5 s Inkubationszeit an Proteine der inneren Membran gekoppelt nachgewiesen werden (Abb.6, Fluoreszenz, 5''). Dabei unterschied sich weder die Intensität der Markierung noch die Art der markierten Proteine vom Bandenmuster der längsten durchgeführten Inkubationszeit von 30 min (Abb.6, Fluoreszenz, 30'/5''). Die Inkubationszeit von 30 min entsprach der Angabe des Herstellers für eine vollständige Markierung von Proteinen. Die Überwindung aller Membranen schien somit für das Farbstoffmolekül kein Problem darzustellen, d.h. die Inkubationszeit für eine vollständige Markierung der Membranproteine war nicht als kritisch anzusehen und konnte somit beliebig gewählt werden. Dafür sprach auch die Tatsache, dass die Intensität der Markierung mit längerer Inkubationsdauer nicht zunahm, d.h. es sich sozusagen um eine Art „Endpunktmarkierung“ handelte, die bereits nach 5 s abgeschlossen zu sein schien.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in den folgenden Experimenten die Proben je nach Versuchsansatz für 1 bis 20 min mit CyDyes inkubiert.

2.2 Vergleich unterschiedlicher Färbeverfahren

Die Methode der Fluoreszenzmarkierung von Proteinen durch CyDyes beruht auf der kovalenten Bindung des Farbstoffes an die Seitenkette des Lysins. Der folgende Versuch sollte die Cy-Markierung von Proteinen mit der Coomassie- und der Silberfärbung vergleichen, die beide auf einer nicht-kovalenten Bindung des jeweiligen Farbstoffes an die Proteine beruhen. Im Gegensatz zur CyDye-Markierung, die bereits in der intakten Thylakoidmembran stattfindet, werden sowohl die Coomassie- wie auch die Silberfärbung nach der Elektrophorese durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Färbebedingungen sollte getestet werden, ob die verschiedenen Färbetechniken vergleichbare Resultate erbringen (Abb.7).

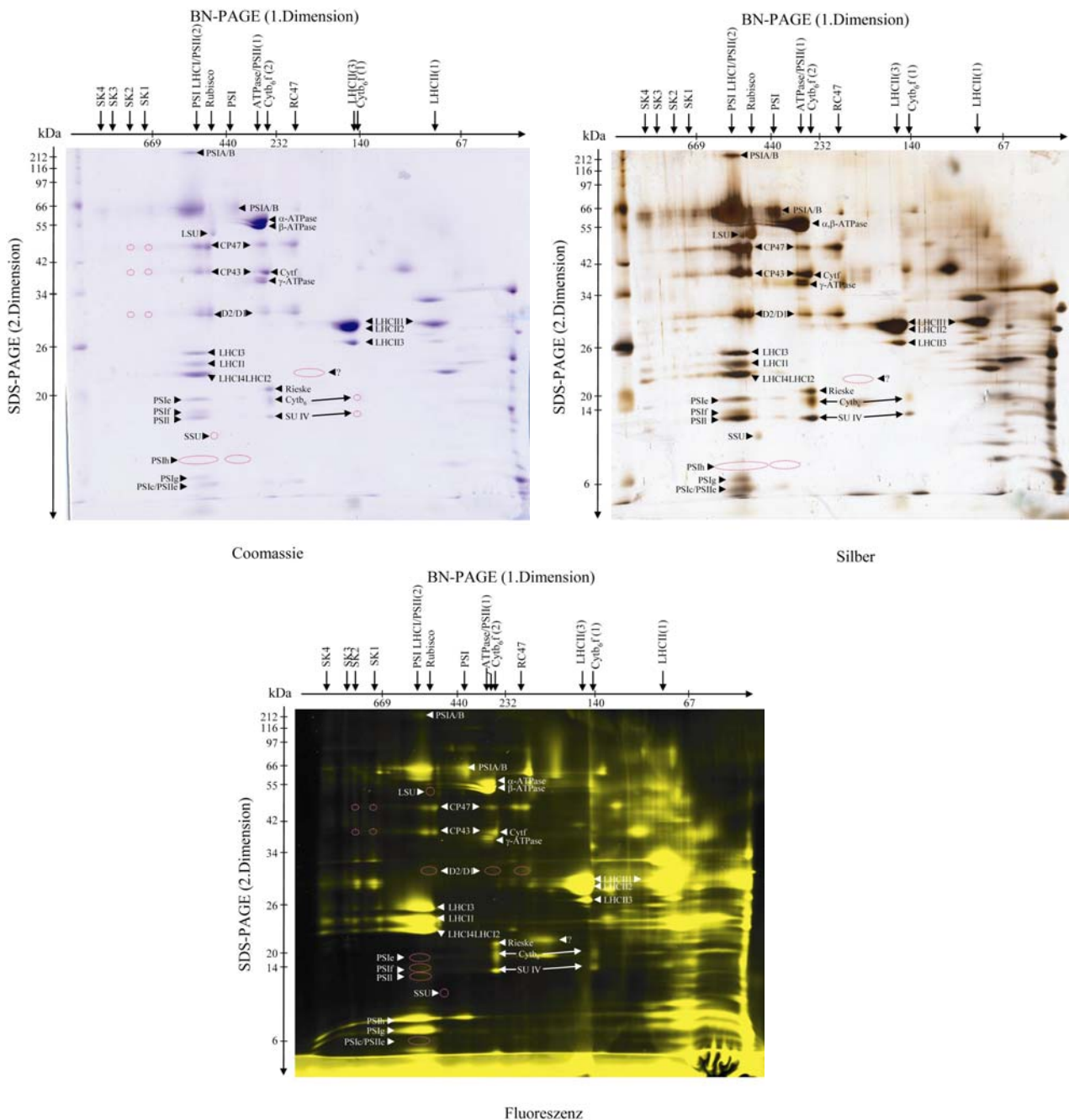


Abb.7 Vergleich von Coomassie, Silber und CyDye Färbung nach BN/SDS-PAGE

Thylakoidmembrankomplexe von 1×10^8 Chloroplasten wurden mit Cy3 markiert und wie in Abb.2 beschrieben solubilisiert. Nach BN/SDS-PAGE wurden die fluoreszenzmarkierten Proteine durch Anregung bei 532 nm sichtbar gemacht (Fluoreszenz). Anschließend wurde das Gel Coomassie gefärbt (Coomassie). Nach der Entfärbung der Gelmatrix wurden die Proteine mit Silber nachgefärbt (Silber).

Die Beschriftung der Proteinkomplexe erfolgte analog zu Abb.2, die Beschriftung der Einzelproteine analog zu Abb.3. Zusätzlich wurden weitere Einzelproteine wie folgt beschriftet: PSIIh, PSIIg und PSIIc bezeichnen die Untereinheit PSII-h, PSII-g und PSII-c des PS II-Komplexes, PSIIe die Untereinheit PSII-e des PS II-Komplexes. Proteine, die nicht identifiziert werden konnten, wurden mit einem Fragezeichen (?) gekennzeichnet. Untereinheiten, die durch eine Färbemethode nicht nachgewiesen werden konnten und daher in dem entsprechenden Gel nicht sichtbar waren, wurden in diesem durch einen roten Kreis dargestellt.

Der Vergleich der drei Färbemethoden ergab auf den ersten Blick ein ähnliches Bandenmuster für alle drei Gele (Abb.7). In allen Gelen konnten Komplexe des PS I, PS II, LHCI, LHCII, der ATP-Synthase und des Cyt b_6f -Komplexes nachgewiesen werden. Bei den Komplexen der ATP-Synthase, des LHC I, LHC II und des Cyt b_6f waren bei allen drei Färbemethoden die gleichen Untereinheiten sichtbar (Abb.7, ATPase/LHCI/LHCII(3)/LHCII(1)/Cyt b_6f (2)/Cyt b_6f (1)). Im Fall des ATP-Synthasekomplexes und der LHC II-Komplexe konnten jeweils drei verschiedene Untereinheiten nachgewiesen werden (Abb.7, α -ATPase/ β -ATPase/ γ -ATPase/LHCII1/LHCII2/LHCII3). Den Komplexen des LHC I und des Cyt b_6f wurden in allen drei Färbemethoden jeweils vier Untereinheiten zugeordnet (Abb.7, LHCI1/LHCI2/LHCI3/LHCI4/Cytf/Cytb₆/Rieske/SU IV).

Im Gegensatz dazu konnten die Superkomplexe nur in der Silber- und CyDye-Färbung sichtbar gemacht werden (Abb.7, Silber/ Fluoreszenz, SK 1-4). Allerdings wurden bei der Markierung der Superkomplexe mit CyDyes nicht so viele Proteinuntereinheiten sichtbar wie bei der Silberfärbung. Es konnten weder CP47 noch CP43 im Fluoreszenzbild im Bereich der Superkomplexe detektiert werden (Abb.7, Fluoreszenz, SK 1-4). Generell war eine Markierung der beiden Proteine durch CyDyes aber möglich, da beide Proteine in allen anderen Assemblierungsstufen des PS II nachgewiesen werden konnten (Abb.7, Fluoreszenz, PSII(2)/PSII(1)/RC47, CP47/CP43). Im Vergleich zu diesen beiden Proteinen konnten die Reaktionszentrumsproteine D1 und D2 in der Cy-Markierung generell nicht nachgewiesen werden (Abb.7, Fluoreszenz, D1/2).

Die gleiche Beobachtung konnte für die große und die kleine Untereinheit der RubisCo gemacht werden. Beide Proteine waren in der Silberfärbung sichtbar und konnten in der Fluoreszenzfärbung nicht detektiert werden (Abb.7, Silber/Fluoreszenz, LSU/SSU). In der Coomassiefärbung konnte der Komplex der RubisCo nur anhand der großen Untereinheit identifiziert werden, da die kleine Untereinheit nicht gefärbt vorlag (Abb.7, Coomassie, LSU/SSU).

Im Bereich des hochmolekularen PS I-Komplexes konnten kleine Untereinheiten des PS I-Komplexes nur in der Coomassie- und Silberfärbung nachgewiesen werden (Abb.7, Coomassie/Silber, PSI3/PSI4/PSI9). Es konnten weder PSYe noch PSYf oder PSII durch Cy-Markierung sichtbar gemacht werden (Abb.7, Fluoreszenz, PSYe/PSYf/PSII).

Auf der anderen Seite konnte durch die Cy-Markierung ein Protein sichtbar gemacht werden, das weder in der Coomassie- noch in der Silberfärbung detektiert werden konnte (Abb.7, Fluoreszenz, ?). Die massenspektrometrische Analyse dieses Proteins führte bisher zu keinem Ergebnis.

Generell konnten die gleichen Membranproteinkomplexe durch alle drei Färbemethoden identifiziert werden. Dabei wurden allerdings nicht die gleichen Komplexuntereinheiten in allen drei Färbungen detektiert. Trotz der unterschiedlichen Färbbarkeit der Untereinheiten war eine eindeutige Identifizierung von einzelnen Proteinkomplexen aufgrund der gefärbten Untereinheiten und der Molekularmasse des Komplexes kein Problem, so dass Gele, welche CyDye, Silber oder Coomassie gefärbt wurden, miteinander verglichen werden konnten.

2.3 Vergleich von Etio- und Chloroplasten mittels DIGE

Die kovalente Bindung der CyDyes an Proteine ermöglicht die Trennung von Proteinen verschiedener Entwicklungszustände in einer Gelspur und deren getrennte Auswertung durch die unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften der einzelnen Cy-Farbstoffe (DIGE-Verfahren). In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese Methode auch für die Untersuchung von Membrankomplexen anwendbar ist. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind problemlos mit den aus Coomassie- und Silberfärbung gewonnenen Erkenntnissen zu kombinieren.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte die Komplexzusammensetzung der Chloro- und Etioplastenmembran durch die Methode des DIGE direkt miteinander verglichen werden.

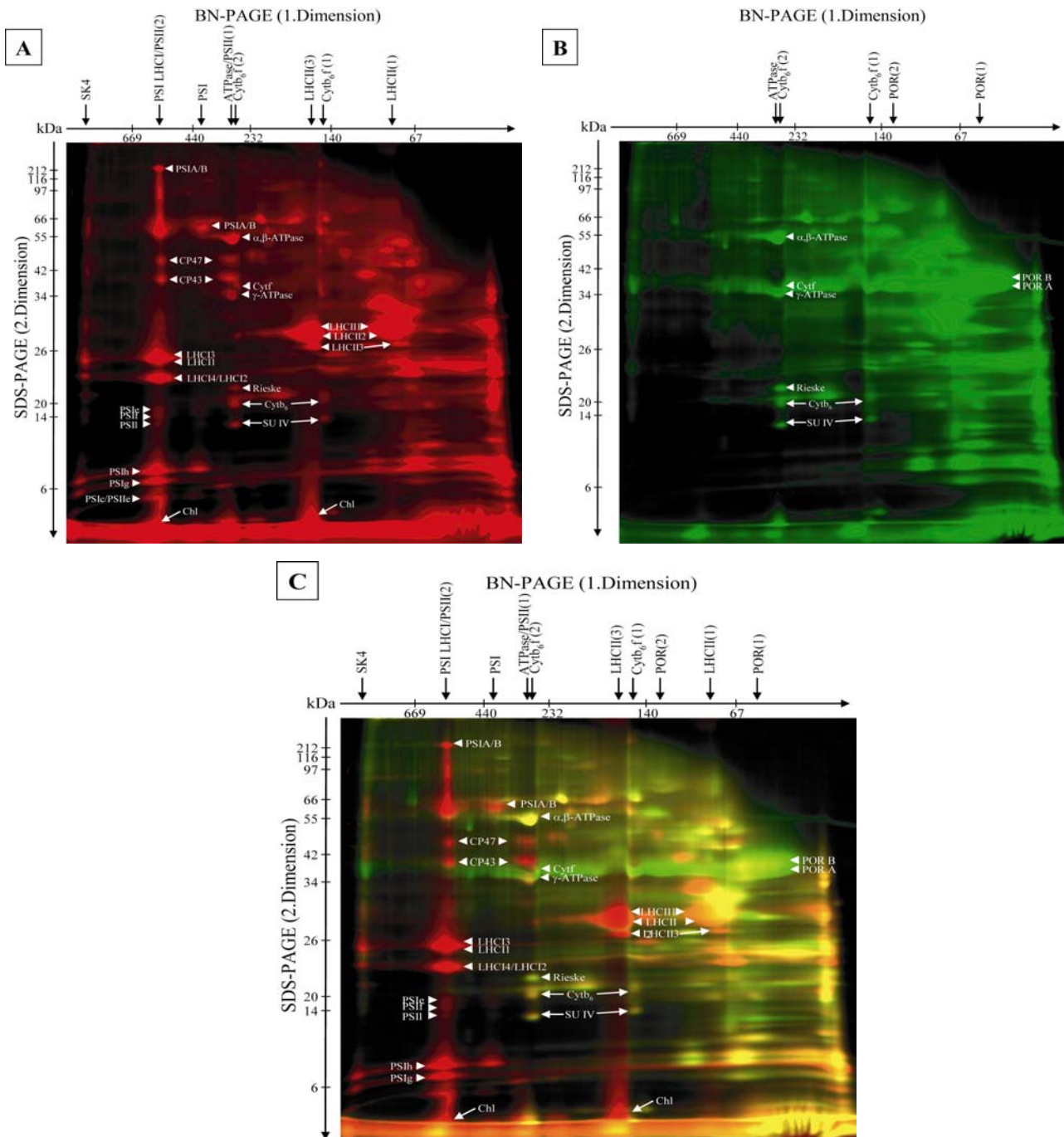


Abb.8 Differenzielle Gelelektrophorese (DIGE) von Eti-/ Chloroplastenmembrankomplexen

Membranen aus 5×10^7 Etioplasten bzw. Chloroplasten wurden mit Cy2 bzw. Cy5 markiert. Nach dem Stoppen der Markierungsreaktion mit L-Lysin wurden die beiden Proben gemischt und die gemischte Probe wie in Abb.2 beschrieben und über BN-PAGE aufgetrennt. Nach der SDS-Solubilisierung des nativen Gels wurden die Untereinheiten der Proteinkomplexe durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurden die fluoreszenzmarkierten Untereinheiten der Etioplastenmembrankomplexe durch Anregung bei 488 nm sichtbar gemacht (A). Die Untereinheiten der Thylakoidmembrankomplexe, die mit Cy5 markiert waren, wurden durch Fluoreszenzanregung bei 633 nm sichtbar gemacht (B). Mit Hilfe der Software „ImageQuant“ wurde ein Überlagerungsbild beider Plastidentypen erzeugt (C). Dabei stellen grün gefärbte Spots Proteine des Etioplasten, rot gefärbte Spots Proteine des Chloroplasten und gelb gefärbte Spots Proteine, die sich im Eti- und im Chloroplasten entsprechen, dar.

Die Beschriftung der Proteinkomplexe erfolgte analog zu Abb.2, die Beschriftung der Einzelproteine analog zu Abb.3 bzw. Abb.4 und Abb.7. Chl bezeichnet die Eigenfluoreszenz der Chlorophyllmoleküle nach Laseranregung.

Die Verteilung der Komplexe in der Thylakoidmembran entsprach dem aus der Coomassiefärbung bekannten Bild (vgl. Abb.3). Die Komplexe des PS II konnten als dimere und monomere Assemblierungsstufe des RC-Core-Komplexes des PS II nachgewiesen werden (Abb.8A, PSII(1)/PSII(2)). Diese beiden Komplexe wurden anhand der beiden inneren Antennen CP43 und CP47 identifiziert. Die LHC II-Proteine konnten im monomeren und trimeren Komplex anhand der drei aus der Coomassiefärbung bekannten Proteine detektiert werden (Abb.8A, LHCII(3)/LHCII(1)). Das PS I wurde in drei Assemblierungsstufen detektiert, wobei der Komplex bei 540-585 kDa mit LHC I-Proteinen assoziiert zu sein schien (Abb.8A, SK4/PSILHCI).

Neben diesen, nur in Gegenwart von Chlorophyll akkumulierten Proteinkomplexen, konnten anhand mehrerer Untereinheiten, die in der Coomassiefärbung beschrieben wurden, der ATP-Synthase-Komplex und der dimere und monomere Cyt b₆f-Komplex detektiert werden (Abb.8A, Cytb₆f(2)/Cytb₆f(1)/ATPase).

Zudem wurden im Bereich der Lauffront nach SDS-PAGE starke Fluoreszenzsignale sichtbar, die beim Vergleich mit dem ungefärbten Gel Chlorophyll zugeordnet werden konnten (Abb.8A, Chl). Das Chlorophyll wurde bei der Denaturierung der Proteinkomplexe freigesetzt und sammelte sich während der SDS-PAGE im Bereich der Lauffront.

Im Fluoreszenzbild des Etioplasten konnten der ATP-Synthase-Komplex und der monomere Cytb₆f-Komplex ebenfalls detektiert werden (Abb.8B, Cytb₆f(2)/Cytb₆f(1)/ATPase). Die dominierenden Proteine im Etioplasten bildeten allerdings die beiden Formen der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase, POR A und POR B, welche vor allem im Bereich von 60-65 kDa ein deutliches Fluoreszenzsignal gaben (Abb.8B, PORA/PORB). POR A konnte dabei in mehr oder weniger klar abgegrenzten Komplexen über den gesamten Trennbereich der ersten Dimension nachgewiesen werden.

Die Überlagerung des Chloroplastenbildes mit dem Fluoreszenzbild des Etioplasten bestätigte die Übereinstimmung der Komplexzusammensetzung im Bezug auf den ATP-Synthase und die beiden Cyt b₆f-Komplexe (Abb.8C, ATPase/Cytb₆f(2)/Cytb₆f(1)). Gelb gefärbte Spots markierten im Überlagerungsbild Proteine, welche in beiden Entwicklungszuständen im gleichen Komplex enthalten waren. Dies wurde vor allem bei der α - und β -Untereinheit des ATP-Synthase-Komplexes sichtbar (Abb.8C, α/β -ATPase).

Der dimere und monomere Cyt b₆f-Komplex erschienen im Überlagerungsbild ebenfalls gelblich (Abb.8C, Cytb₆f(2)/Cytb₆f(1)). Die anderen Spots, die gelb gefärbt vorlagen, wurden bisher noch nicht identifiziert.

Bezüglich des Komplexes der RubisCo konnten im Überlagerungsbild keine Aussagen getroffen werden, da weder die große noch die kleine Untereinheit dieses Komplexes durch CyDyes markiert wurden.

Die Chlorophyll-bindenden Komplexe des PS I, PS II und der LHC-Komplexe konnten nur rot gefärbt, d.h. als Proteine des Chloroplasten nachgewiesen werden. Die Komplexe der POR konnten dagegen als grün gefärbte Komplexe nur dem Etioplasten zugeordnet werden. Diese Beobachtungen deckten sich mit dem bereits nach der Coomassiefärbung getroffenen Aussagen, die die Chlorophyll-bindenden Proteinkomplexe als typische Komplexe des Chloroplasten und die Komplexe der POR als charakteristische Komplexe des Etioplasten bezeichneten.

3 Farblose native PAGE (CNL-PAGE)

Bei der Markierung der Thylakoidmembranproteine mit Cy5 wurde deutlich, dass bei Kombination der Anregungswellenlänge von 633 nm und dem Emissionsfilter von 670 BP 30 neben dem Fluoreszenzfarbstoff auch Chlorophyll sichtbar wurde. Dies konnte auch durch die Anregung von aufgereinigtem, isoliertem Chlorophyll gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Dadurch ergab sich die Möglichkeit, die Chlorophyll-haltigen Proteinkomplexe ohne Verwendung eines exogen zugegebenen Farbstoffes sichtbar zu machen. Allerdings wird Fluoreszenz durch den blauen Farbstoff Coomassie abgeschwächt, so dass ein Coomassie-freies Gelsystem nötig war.

Wittig et al. beschreiben ein System der farblos nativen PAGE (CN-PAGE), welches prinzipiell der BN-PAGE entspricht, allerdings ohne den Zusatz von Coomassie im Kathodenpuffer und zur Probe (Wittig et al., 2005). Dieses System wurde im Folgenden zur Trennung der Thylakoidmembrankomplexe benutzt (Abb.9).

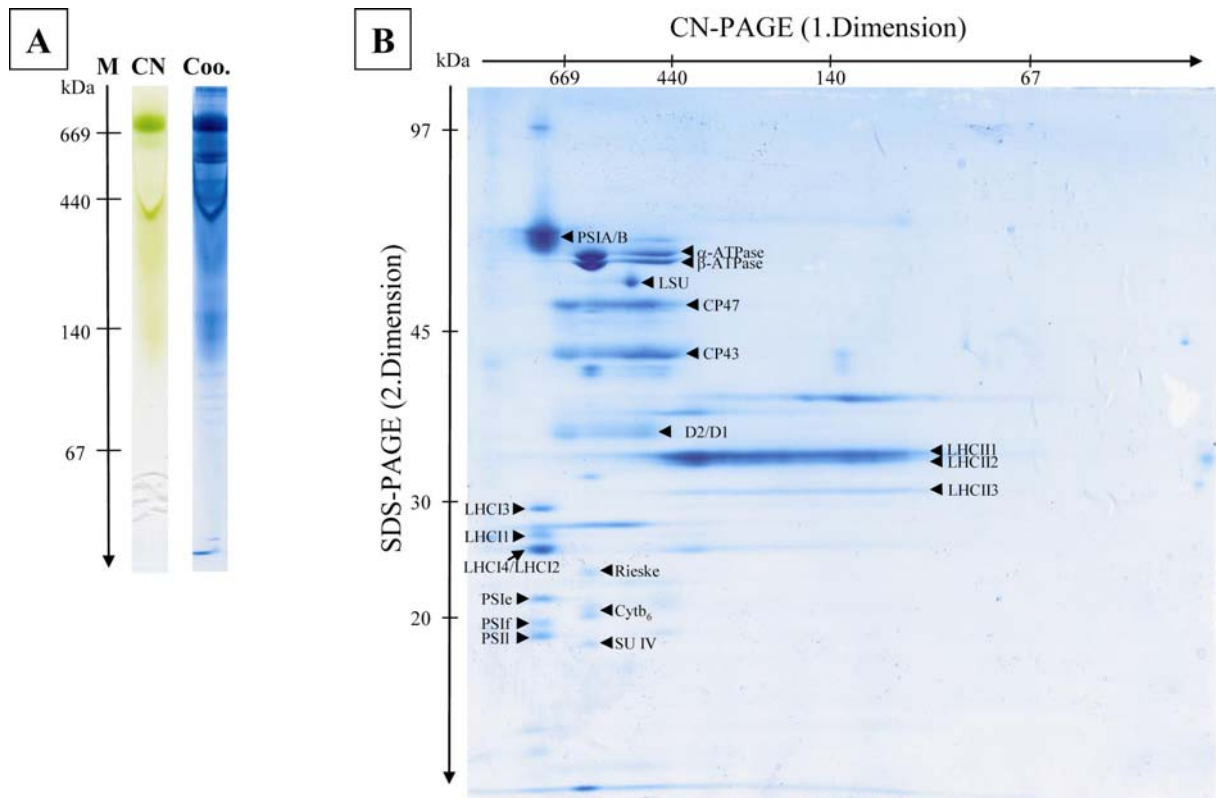


Abb.9 Trennung von Proteinmembrankomplexen nach der Eigenladung der Komplexe

Aus 1×10^8 Chloroplasten wurden Thylakoidmembranen isoliert und die Membrankomplexe mit DM solubilisiert. Die solubilisierten Thylakoidmembrankomplexe wurden direkt auf ein 6-12% BN-Gradientengel aufgetragen und über PAGE (1.Dimension) aufgetrennt (A). Der dabei verwendete BN-Kathodenpuffer enthielt kein Coomassie. Nach dem Gellauf wurde das Gel im Auflichtscanner aufgenommen (CN) und mit Coomassie gefärbt (Coo). Zur Molekularmassenbestimmung der Komplexe wurde HMW-Marker verwendet.

Ein weiterer Streifen der ersten Dimension wurde in Solubilisierungspuffer inkubiert und anschließend auf ein 12,5% SDS – Gel aufgelegt. Nach der Trennung der Komplexuntereinheiten durch SDS-PAGE (2.Dimension) wurde das Gel kolloidal Coomassie gefärbt (B). Die Bestimmung der Molekularmasse der Einzelproteine erfolgte mittels LMW-Marker. Die Beschriftung der Einzelproteine erfolgte analog zu Abb.3.

Bereits nach der Trennung der Komplexe wurde deutlich, dass die Auftrennung der Komplexe mit Hilfe der CN-PAGE nicht direkt mit den Ergebnissen der BN-PAGE vergleichbar waren (vgl. Abb.2). Die Chlorophyll-bindenden Proteinkomplexe konnten in der CN-PAGE nur in einem Molekularmassenbereich ab ca.100 kDa nachgewiesen werden (Abb.9A, CN). Durch die Coomassiefärbung der ersten Dimension konnten keine weiteren Komplexe im niedermolekularen Bereich sichtbar gemacht werden (Abb.9A, Coo.). Dieses Ergebnis bestätigte sich auch nach der anschließenden SDS-PAGE. Im nativen PAG konnten im Molekularmassenbereich unter 70 kDa weder Komplexe noch Einzelproteine angefärbt werden.

Die einzelnen Proteinkomplexe zeigten nach der CN-PAGE unterschiedliches Trennverhalten. So konnte die Untereinheiten der ATP-Synthase, des PS I mit den LHC I-Proteinen, der RubisCo und des Cyt b_6/f jeweils in einem distinkten Komplex nachgewiesen werden (Abb.9B, α -/ β -ATPase/PSIA/B/LHCI1/2/3/4/PSI3/4/9/ LSU/Rieske/ Cyt b_6 /SUIV). Dagegen

waren die Untereinheiten des PS II im Molekularmassenbereich von 440 bis 700 kDa verteilt und konnten dabei keinen klar voneinander getrennten Komplexen zugeordnet werden (Abb.9B, CP47/CP43/D2/D1). Das gleiche konnte für die Lichtsammel-Proteine des PS II beobachtet werden (Abb.9B, LHCII1/2/3). Diese waren im Bereich von ca. 100 bis 500 kDa nachweisbar, wobei sie ebenfalls keine klar von einander getrennten Komplexe bildeten. Aufgrund der von der BN-PAGE deutlich abweichenden Komplexauftrennung der CN-PAGE wurde ein anderes PAGE-System gesucht, dessen Auftrennung dem der BN-PAGE besser entsprach, um den Vergleich mit den durch BN-PAGE erhaltenen Ergebnissen zu ermöglichen und die Auftrennung der PS II und LHC II-Komplexe zu verbessern.

3.1 Vergleich von BN- und CNL-PAGE

Bei der BN-PAGE wird die Eigenladung der Proteinkomplexe durch die Anbindung des negativ geladenen Farbstoffes Coomassie G ersetzt und somit primär eine Auftrennung der Komplexe nach ihrer Molekularmasse ermöglicht. Um dieses Trennprinzip auch in einem Coomassie-freiem PAGE-System beizubehalten, wurde ein geeigneter Ladungsträger gesucht, der negative Ladung auf die Proteinkomplexe bringt, diese möglichst im nativen Zustand belässt, farblos ist und mit dem die Elektrophorese bei 4°C durchführbar ist. Zudem sollte der Ladungsträger einfach zu beschaffen sein und auf das vorhandene Gelsystem der BN-PAGE aufbauen.

Nach einigen Experimenten mit verschiedenen Detergenzien stellte sich das Verfahren der CNL-PAGE, welches eine Solubilisierung mit einem Gemisch aus Digitonin, DM und Lithium-Dodecylsulfat (LDS) und den Zusatz von LDS im Kathodenpuffer kombinierte, als gleichwertiger Ersatz heraus (Abb.10).

3.1.1 Zusammensetzung der Proteinkomplexe nach BN- oder CNL-PAGE

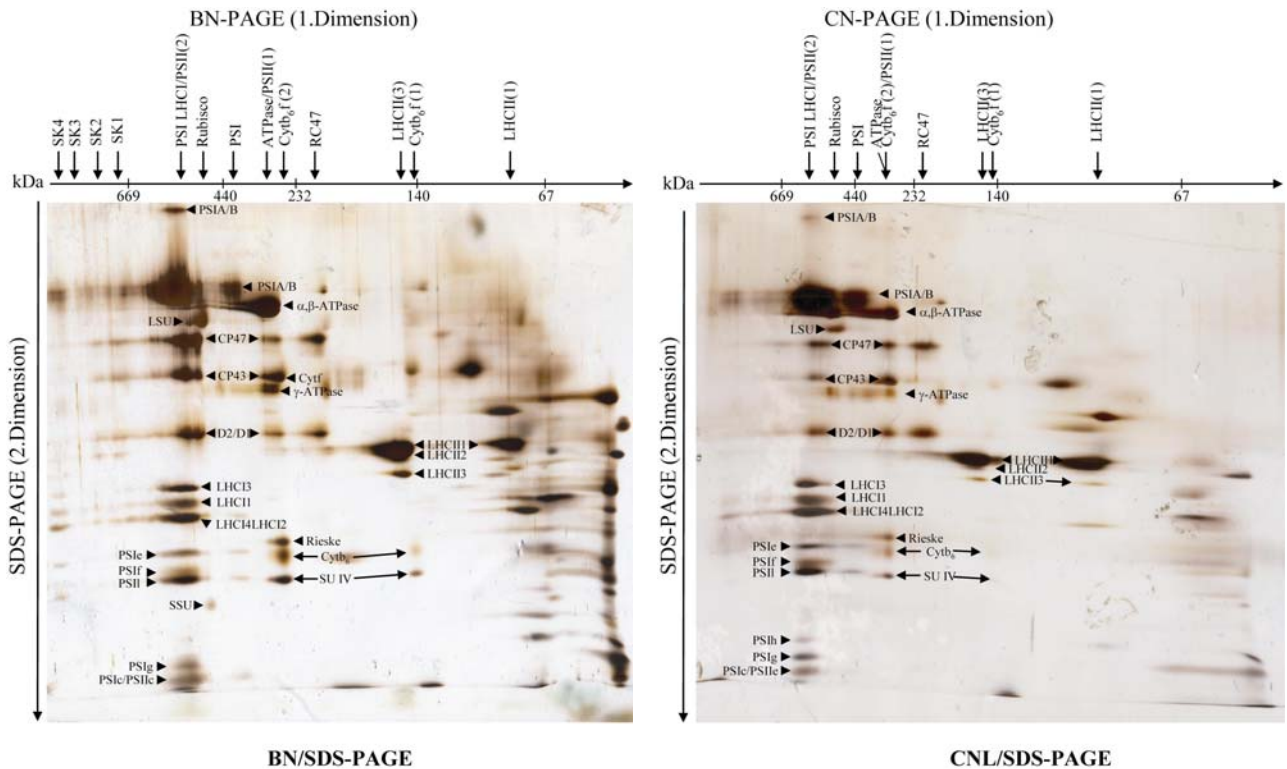


Abb.10 Vergleich von BN/SDS- und CNL/SDS- PAGE

Thylakoidmembrankomplexe von 1×10^8 Chloroplasten wurden entweder über BN- oder CNL-PAGE aufgetrennt. Die Solubilisierung für CNL-PAGE erfolgte in einem Detergenziengemisch aus Digitonin, DM und LDS. Nach der Entfernung der nicht solubilisierten Bestandteile durch Zentrifugation wurden die Proteine über CNL-PAGE aufgetrennt (CNL/SDS-PAGE). Die Vorbereitung der Komplexe für die BN-PAGE erfolgte wie in Abb.2 beschrieben (BN/SDS-PAGE). Nach der nativen PAGE wurde je eine Spur aus beiden Gelen ausgeschnitten, in Solubilisierungspuffer inkubiert und anschließend auf ein SDS-PAGE aufgelegt. Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteinuntereinheiten wurden beide Gele Silber gefärbt. Die Beschriftung der Proteinkomplexe entsprach Abb.2, die der Proteinuntereinheiten Abb.3 bzw. Abb.7. Zur Molekularmassenbestimmung der Komplexe wurde in beiden Fällen HMW- Marker verwendet

Die Auftrennung der Komplexe durch CNL-PAGE entsprach im Wesentlichen der Trennung durch BN-PAGE (Abb.10, BN/SDS-PAGE/ CNL/SDS-PAGE). Es konnten alle aus der BN-PAGE bekannten Komplexe auch nach der Trennung über CNL-PAGE nachgewiesen werden.

Dabei wurden die Komplexe der ATP-Synthase, der RubisCo und des LHC I in nur einer Assemblierungsstufe nachgewiesen (Abb.10, ATPase/RubisCo/LHCI). Der Cyt-Komplex und die Komplexe des PS I wurden wie in der BN-PAGE in zwei Assemblierungsstufen detektiert (Abb.10, Cyt_{b6}f(1)/Cyt_{b6}f(2)/PSI). Das gleiche galt für die Komplexe des Lichtsammelapparats des PS II (Abb.10, LHCII(3)/(1)). Die meisten Assemblierungsstufen waren für das PS II nachweisbar. Dieses lag sowohl als monomerer und dimerer RCCII - als auch als RC47-Komplex vor (Abb.10, PSII(1)/(2)/RC47).

Die Untersuchung der Untereinheiten der Komplexe zeigte für die Komplexe der CNL-PAGE ebenfalls die gleiche Zusammensetzung der einzelnen Komplexe wie nach BN/SDS-PAGE. Daher wurde das System der CNL-PAGE als ein der BN-PAGE entsprechendes System angesehen und seine weiteren Vor- und Nachteile im Vergleich zum BN-PAGE-System untersucht.

3.1.2 Fluoreszenzeigenschaften der Proteinkomplexe nach nativer PAGE

Der Unterschied von nativer zu denaturierender PAGE liegt in der Möglichkeit, dass nach nativer PAGE Chlorophyll an die Proteine gebunden bleibt. Im Gegensatz dazu wird unter denaturierenden Bedingungen das Chlorophyll vom Protein getrennt. Durch das DIGE-Experiment (siehe Kapitel 2.3) wurde deutlich, dass die Fluoreszenzemission des Chlorophylls mit Hilfe des Typhoonscanners detektierbar ist. Ob sich die Emissionseigenschaften der Chlorophylle in den Komplexen im CNL-PAGE-System im Vergleich zum BN-PAGE-System unterschieden, wurde durch das folgende Experiment überprüft (Abb.11).

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit der Fluoreszenzdetektion in beiden Systemen wurden sowohl Chloroplasten wie auch eine Stunde belichtete etiolierte Keimlinge eingesetzt. Nach einer Stunde Belichtung steht im Vergleich zu Chloroplasten erst ein Bruchteil der Chlorophyllmenge zur Verfügung, so dass auch eine Aussage über die Leistungsfähigkeit der Fluoreszenzdetektion möglich sein sollte.

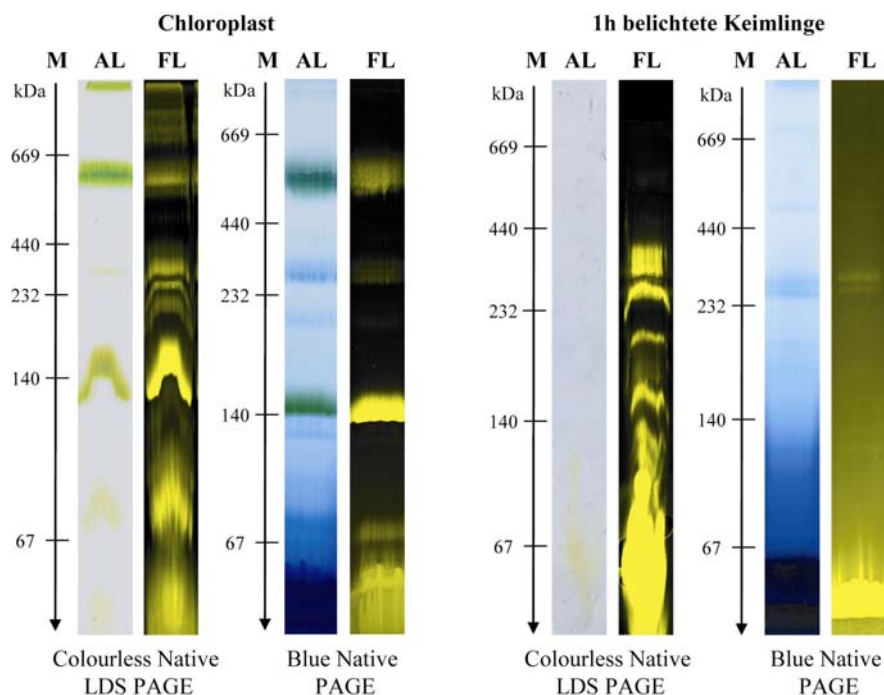


Abb.11 Fluoreszenzdetektion von Membranproteinkomplexen nach BN- bzw. CNL-PAGE

1×10^8 Plastiden wurden aus Chloroplasten (Chloroplast) bzw. 1h belichteten etiolierten Keimlingen (1h belichtete Keimlinge) isoliert. Für die Trennung der Proteinkomplexe über BN-PAGE wurden die Membranen wie in Abb.2 beschrieben vorbereitet und über BN-PAGE getrennt (Blue native PAGE). Die Solubilisierung für CNL-PAGE erfolgte in einem Detergenziengemisch aus Digitonin, DM und LDS. Nach der Entfernung der nicht solubilisierten Bestandteile durch Zentrifugation wurden die Proteine über CNL-PAGE aufgetrennt (Colourless Native LDS PAGE). Nach dem Gellauf wurden die Proteinkomplexe zum einen im Auflichtscanner eingelesen (AL) und zum anderen im Laserscanner bei 633 nm angeregt (FL). Die Molekularmassenbestimmung erfolgte anhand des HMW-Markers.

Nach der Elektrophorese wurden alle Gele sowohl im Auflichtscanner (AL) wie auch im Laserscanner (FL) eingelesen (Abb.11, AL/FL). Dies ermöglichte einen Vergleich der bereits mit dem Auge sichtbaren Chlorophyll-bindenden Komplexe mit den im Fluoreszenzbild detektierbaren Komplexen.

Beim Vergleich der Auflichtbilder der Chloroplasten konnten nach BN-PAGE sieben Komplexe detektiert werden (Abb.11, Chloroplast, Blue Native PAGE, AL). Dabei wurde vor allem bei den Komplexen im Bereich von 540-585 kDa und 145-155 kDa durch eine grüne Färbung Chlorophyll sichtbar. Diese beiden Komplexe zeigten auch im Fluoreszenzbild die stärksten Signale. Außer diesen beiden Banden wurden noch drei weitere Komplexe in deutlich geringerer Intensität im Fluoreszenzbild sichtbar (Abb.11, Chloroplast, Blue Native PAGE, FL). Zwei Komplexe, die im Auflicht als blau gefärbte Banden sichtbar waren, konnten im Fluoreszenzbild nicht sichtbar gemacht werden.

Nach CNL-PAGE ergab sich im Auflichtscan des Chloroplasten ein anderes Bild (Abb.11, Chloroplast, Colourless Native LDS PAGE, AL). Es konnten vier grün gefärbte Komplexe detektiert werden, die sich alle im Fluoreszenzbild wieder finden ließen (Abb.11, Chloroplast, Colourless Native LDS PAGE, FL). Allerdings konnten im Fluoreszenzbild vier zusätzliche Banden detektiert werden, von denen den Banden im Bereich von 370-400 kDa, 290-310 kDa und 190-210 kDa keine entsprechende Bande im BN-Gel zugeordnet werden konnte.

Die höhere Empfindlichkeit der CNL-PAGE im Bezug auf die Fluoreszenzemission wurde bei der Zeitstufe der eine Stunde belichteten Keimlinge noch deutlicher. Nach der BN-PAGE konnten sowohl im Auflichtscan wie auch im Fluoreszenzbild drei Banden detektiert werden, die eine schwache Fluoreszenz zeigten ((Abb.11, 1 h belichtete Keimlinge, Blue Native PAGE, AL/FL). Im Gegensatz dazu waren nach der CNL-PAGE im Auflichtscan keine Banden sichtbar (Abb.11, 1 h belichtete Keimlinge, Colourless Native PAGE, AL). Nur im Bereich unter ca. 130 kDa war eine gelb gefärbte Lauffront zu erkennen. Dagegen zeigte das Fluoreszenzbild nach CNL-PAGE neben der fluoreszierenden Lauffront sieben weitere, deutlich sichtbare Banden, denen keine Bande der BN-PAGE eindeutig zugeordnet werden konnte (Abb.11, 1 h belichtete Keimlinge, Colourless Native PAGE, FL).

3.1.3 Fluoreszenzeigenschaften von Proteinuntereinheiten nach CNL/ SDS-PAGE

Die Methode der CNL-PAGE in Kombination mit dem Chlorophyllnachweis durch den Laserscanner schien eine empfindliche Methode zum Nachweis von Proteinkomplexen darzustellen. Dies führte zu der Überlegung die Nachweisbarkeit von Proteinen aufgrund von Chlorophyllbindung nach SDS-PAGE zu testen. Das nicht kovalent an das Protein gebundene Chlorophyll sollte zwar bei der Solubilisierung mit SDS abgelöst werden, allerdings konnten mit Hilfe des Scanners bereits geringe Mengen an Chlorophyll nachgewiesen werden, die bereits im DIGE-Experiment sichtbar wurden (siehe Kap. 2.3).

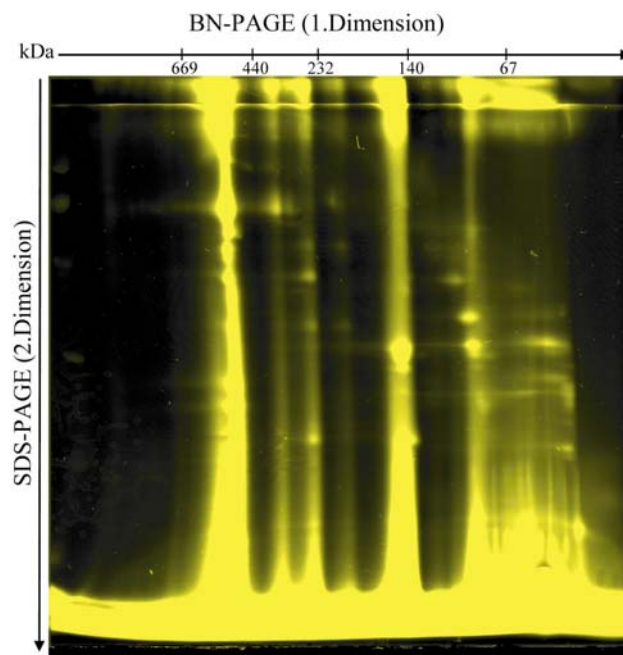


Abb.12 Eigenfluoreszenz von Proteinen nach CNL/SDS-PAGE

1×10^8 Chloroplasten wurden, wie in Abb.10 für CNL-PAGE beschrieben, behandelt und über CNL/SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine im Laserscanner bei 633 nm angeregt und die Eigenfluoreszenz der Proteine mit Hilfe der Software „ImageQuant“ sichtbar gemacht.

Nach CNL/SDS-PAGE wurde das Gel im Fluoreszenzscanner ausgelesen (Abb.12). Das erhaltene Fluoreszenzbild zeigte dabei eine starke Fluoreszenz im Bereich der Lauffront, die wahrscheinlich von aus den Komplexen freigesetztem Chlorophyll stammte. Zudem wurden mehrere unterschiedlich stark fluoreszierende Bereiche detektiert, die sich vertikal über das ganze SDS-Gel zogen. Unter bzw. neben diesen Streifen waren allerdings auch distinkte Banden sichtbar, die von einzelnen Proteinen zu stammen schienen.

Dieses Experiment zeigte, dass neben dem Nachweis von ganzen Komplexen auch der Nachweis von Einzelproteinen mit Hilfe der endogenen Chlorophyllfluoreszenz möglich war. Dadurch war in einem gewissen Rahmen auch die Identifikation der Einzelproteine, welche die fluoreszierenden Pigmente in den Komplex brachten, möglich.

3.1.4 In Gel Absorptionsspektroskopie von Proteinkomplexen nach nativer PAGE

In den bisher beschriebenen Experimenten wurde davon ausgegangen, dass die Fluoreszenz der detektierten Komplexe von Chlorophyllmolekülen stammte. Die Absorptionsspektroskopie stellt eine Methode zur Identifikation von photosynthetisch aktiven Pigmenten dar. Die Untersuchung der Pigmente erfolgt dabei normalerweise in Lösung. Dadurch können sowohl aufgereinigte Pigmente wie auch Pigmente, welche an Proteinkomplexe gekoppelt sind, identifiziert werden (Eijkelhoff et al., 1997; Rogl et al., 2002; Ihalainen et al., 2002). Allerdings besteht auch die Möglichkeit, Pigmente nicht in Lösung, sondern nach der Elektrophorese direkt im Gel zu vermessen (Gregory et al., 1982; Markwell et al., 1979; Metz et al., 1984). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde versucht, die Pigmente, die in den Komplexen die Fluoreszenz verursachten, näher zu charakterisieren (Abb.13).

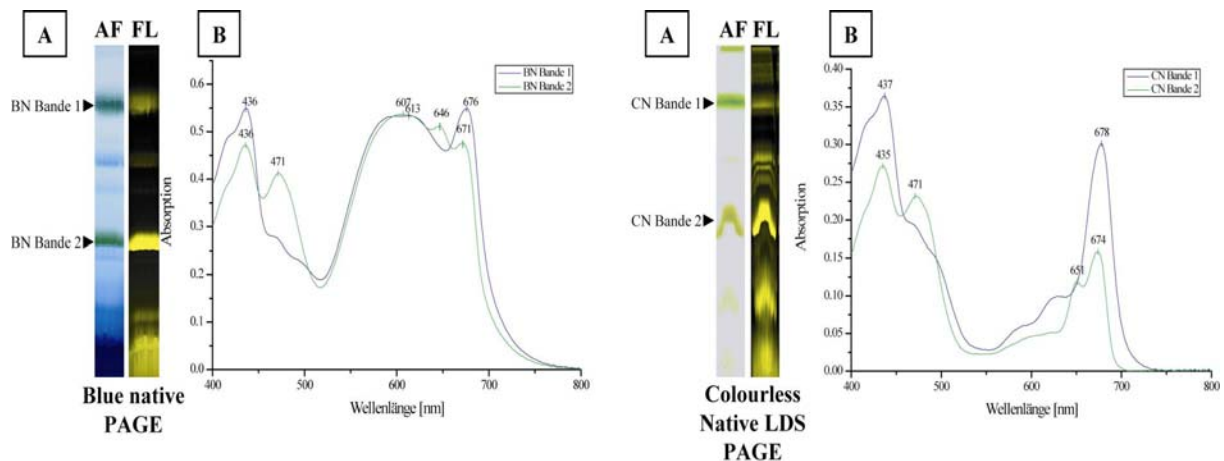


Abb.13 Absorptionsspektren von Thylakoidmembrankomplexen nach BN- bzw. CNL-PAGE

Thylakoidmembrankomplexe von 1×10^8 Chloroplasten wurden über BN-PAGE (Blue native PAGE) bzw. über CNL-PAGE (Colourless native LDS PAGE) aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele sowohl im Auflichtscan abgebildet (AL) als auch im Fluoreszenzscanner bei 633 nm angeregt (FL) (A). Zwei korrespondierende Banden (Bande 1/Bande 2) wurden aus beiden Gelen mit dem Skalpell ausgeschnitten. Es wurde von beiden Banden ein Absorptionsspektrum (Bande 1 blau, Bande 2 grün) aufgenommen (B).

Es wurde versucht, die Pigmente der grün gefärbten Chloroplastenkomplexe nach BN-PAGE bzw. CNL-PAGE zu identifizieren. Dazu wurden die beiden im Auflichtscan am stärksten grün gefärbten Komplexe nach der Elektrophorese ausgeschnitten und im Photometer vermessen.

Die Absorptionsspektren nach BN-PAGE zeigten beide ein deutliches Maximum im Bereich von ca. 525 bis 650 nm (Abb.13, Blue Native PAGE, B). Dieses Signal wurde dem an den Komplex angelagertem Coomassie zugeordnet. Als weitere Maxima konnten für Bande 1 im Bereich von 436 nm und 676 nm weitere Maxima detektiert werden, welche im Bereich der Absorptionsmaxima von Chlorophyll a lagen (Abb.13, Blue Native PAGE, A, Bande1 BN, B,

blaue Linie). Die zweite Bande zeigte neben dem Coomassie-Maximum weitere Maxima bei 436, 471, 646 und 671 nm und könnte damit einem LHC II-Komplex entsprechen (Abb.13, Blue Native PAGE, A Bande2 BN, B, grüne Linie).

Im Vergleich zur BN-PAGE war die Identifikation der Pigmente nach CNL-PAGE einfacher, da die Spektren nur durch die Pigmente gebildet zu sein schienen (Abb.13, Colourless Native LDS PAGE, B). Die Bande 1 zeigte zwei Maxima mit einer Wellenlänge von 437 und 677 nm (Abb.13, Colourless Native LDS PAGE, A Bande1 CNL, B, blaue Linie). Der Vergleich mit veröffentlichten Spektren ließ auf das Vorliegen eines PS I oder PS II-Komplexes schließen, der im Wesentlichen Chlorophyll a gebunden hatte (Tsiotis et al., 1999; Bassi et al., 1987). Bande 2 besaß vier deutlich sichtbare Maxima im Bereich von 435, 471, 651 und 674 nm (Abb.13, Colourless Native PAGE, A Bande2 CNL/B, grüne Linie). Dies deutete wie bereits für den Komplex 2 der BN-PAGE beschrieben, auf einen LHC II-Komplex hin, in dem sowohl Chlorophyll a- wie auch Chlorophyll b-Anteile nachweisbar waren.

Beim Vergleich der beiden Absorptionsspektren fiel auf, dass die Spektren der beiden Komplexe einen unterschiedlichen Kurvenverlauf besaßen, d.h. dass jedem Komplex ein charakteristisches Absorptionsspektrum zuzuordnen war. Daher konnten die Absorptionsspektren als ein Kriterium zur näheren Charakterisierung eines Komplexes herangezogen werden.

3.1.5 Immunodetektion von Proteinkomplexen nach nativer PAGE

Nach BN-PAGE ist eine immunologische Identifikation von Proteinuntereinheiten durch Antikörper prinzipiell möglich. Allerdings wird in der Literatur ein störender Einfluss von Coomassie auf die Antikörperdetektion von Proteinen erwähnt (persönl. Mitteilung Prof. Braun). Aus diesem Grund wird nach der Hälfte der BN-PAGE der blaue Kathodenpuffer durch einen farblosen Kathodenpuffer ersetzt. Da mit der CNL-PAGE ein farbloses System zur Trennung von Proteinkomplexen zur Verfügung stand, wurde das System der CNL-PAGE mit dem BN-System in Bezug auf die erfolgreiche Detektion von Proteinen durch Antikörper untersucht (Abb.14).

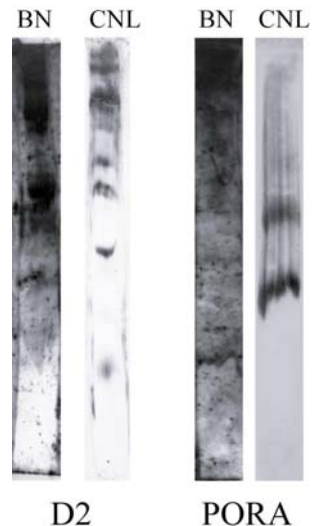


Abb.14 Immunodetektion von Proteinkomplexen nach BN- bzw. CNL-PAGE

Thylakoidmembrankomplexe von 1×10^8 Etioplasten (PORA) bzw. 4h belichteten etiolierten Keimlingen (D2) wurden über BN-PAGE (BN) bzw. über CNL-PAGE (CNL) aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Nitrocellulosemembran wurde mit D2-Antikörper (D2) bzw. POR-Antikörper (PORA) inkubiert. Nach der Inkubation der Membran mit sekundärem Antikörper wurden die Proteine über das ECL-System detektiert.

Es wurden verschiedene Antikörper gegen Proteine, welche für den Entwicklungszustand des Chloroplasten bzw. Etioplasten charakteristisch waren, getestet. Nach einigen Vortests stellten sich von den zur Verfügung stehenden Antikörpern nur die Antikörper gegen die Untereinheit A der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR A) und gegen das Reaktionszentrumsprotein D2 des PS II (D2) als geeignet heraus. Diese beiden wurden nun an den über BN- bzw. CNL-PAGE aufgetrennten Komplexen getestet (Abb.14).

Für beide Antikörper ergab sich ein ähnliches Bild. In den Spuren der BN-PAGE konnten in beiden Fällen keine klar voneinander getrennten Banden detektiert werden. Sowohl im Fall des POR-Antikörpers wie auch im Fall des D2-Antikörpers konnte zwar eine Schwärzung des Films nachgewiesen werden, diese lag jedoch diffus verteilt vor allem im hochmolekularen Bereich der BN-PAGE vor (Abb.14, BN, D2/POR).

Bei der Trennung der Proteinkomplexe über CNL-PAGE konnten mit beiden Antikörpern distinkte Banden nachgewiesen werden (Abb.14, CNL, D2/POR).

Dieses Ergebnis zeigte deutlich, dass die CNL-PAGE im Fall der zur Verfügung stehenden Antikörper die besseren Resultate lieferte und somit für die Detektion von Komplexuntereinheiten direkt nach nativer PAGE verwendet werden sollte.

Im Fall einer Antikörperdetektion nach der 2. Dimension (SDS-PAGE) zeigten sich keine Unterschiede zwischen BN- und CNL-PAGE, so dass beide Verfahren zur Trennung der Proteinkomplexe und anschließender Immunodetektion verwendet werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass durch die Kombination der unterschiedlichen Methoden ein direkter Vergleich bzw. eine Charakterisierung der Proteinkomplexe in verschiedenen Entwicklungsstufen der Plastide bezüglich ihrer Untereinheitenzusammensetzung und der gebundenen Pigmente möglich war.

Daher sollten im Folgenden die zeitliche Reihenfolge der Assemblierungsschritte, die während der Umwandlung vom Etioplasten zum Chloroplasten ablaufen, untersucht werden. Dabei sollte vor allem die Entwicklung von Komplexen berücksichtigt werden, die Chlorophyll oder ein Chlorophyllderivat gebunden hatten. Die Komplexe des Chloroplasten wurden dabei als mature d.h. voll funktionsfähige Endstufe der Komplexassemblierung angesehen. Dies bedeutete, dass ein Komplex während der Ergrünung als vollständig assembliert angesehen wurde, wenn er die im Chloroplasten beobachteten Assemblierungsstufen erreicht hatte.

4 Biogenese von Membranproteinkomplexen während der Ergrünung

4.1 Charakterisierung der Proteinkomplexe des Chloroplasten

In einem ersten Experiment wurden die Komplexe des Chloroplasten charakterisiert. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sollten anschließend als Referenz für die während der Ergrünung detektierten Komplexe dienen.

4.1.1 Fluoreszenzdetektion

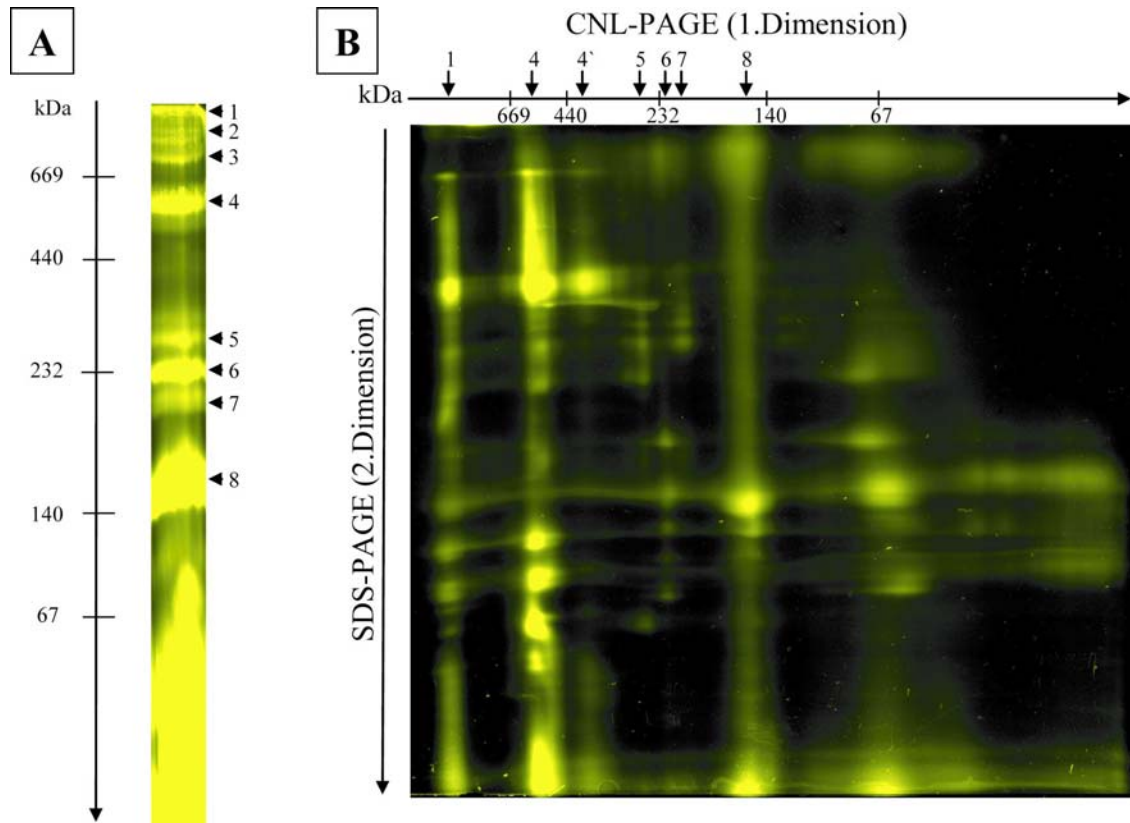


Abb.15 Fluoreszenzdetektion von Komplexen (A) und Einzelproteinen (B) des Chloroplasten

Aus 1×10^8 Chloroplasten wurden Membranproteinkomplexe isoliert und über CNL-PAGE aufgetrennt. Nach der nativen Elektrophorese wurde das Gel im Laserscanner bei 633 nm angeregt und die fluoreszierenden Komplexe detektiert (A). Anschließend wurde eine Spur des Gels in Solubilisierungspuffer inkubiert und die Komplexuntereinheiten über SDS-PAGE getrennt. Nach dem Gellauf wurde die Fluoreszenz der Einzelproteine durch Laseranregung bei 633 nm sichtbar gemacht (B).

Die detektierten Komplexe wurden mit Zahlen von 1 bis 8 beschriftet. Die Molekularmassenbestimmung der Komplexe erfolgte anhand des HMW-Markers.

Die Detektion der Proteine nach Fluoreszenzanregung der gebundenen Pigmente erwies sich als eine sensitive Nachweismethode sowohl auf der Ebene der nativen Proteinkomplexe wie auch der einzelnen Proteinuntereinheiten.

So konnten im Chloroplasten nach CNL-PAGE acht verschiedene Komplexe detektiert werden, die unterschiedlich starke Fluoreszenzemissionen aufwiesen (Abb.15A).

Die drei hochmolekularen Komplexe im Bereich über 700 kDa, die ungefähr gleiche Fluoreszenzintensitäten zeigten, waren nur schlecht gegeneinander abzugrenzen (Abb.15A, 1/2/3). Die Komplexe im Bereich von 540-585, 290-310, 190-210 und 140-155 kDa waren deutlicher zu unterscheiden, wobei diese vier Komplexe die stärkste Fluoreszenzemission besaßen (Abb.15A, 4/5/6/8). Der Komplex 7 war im Molekularmassenbereich von 210-250 kDa ebenfalls deutlich sichtbar, allerdings entsprach die Fluoreszenzintensität eher der der Komplexe 1, 2 und 3 (Abb.15A, 7).

Durch den Vergleich der Proteinkomplexe mit den fluoreszierenden Einzelproteinen nach SDS-PAGE konnten sechs der acht Komplexe Proteinuntereinheiten zugeordnet werden (Abb.15B). Zusätzlich zu den nach CNL-PAGE detektierten Komplexen konnte im Molekularmassenbereich von 380-420 kDa ein weiterer Komplex anhand fluoreszierender Untereinheiten detektiert werden, der nach nativer PAGE und Anregung der Pigmentfluoreszenz noch keine deutliche Bande ergab (Abb.15B, 4`).

Somit war neben der generellen Identifikation der Proteinkomplexe aufgrund der Untereinheitenzusammensetzung auch eine Zuordnung der Pigmente zu einzelnen Proteinen möglich. Um die Identifikation der Untereinheiten zu erleichtern, wurden die Thylakoidmembranproteine vor der Elektrophorese mit Cy2 markiert (Abb.16A), um eine Überlagerung von Protein- und Chlorophyllfluoreszenz zu ermöglichen (Abb.16B). Die beiden Komplexe im hochmolekularen Bereich über 700 kDa, welchen keine Einzelproteine nach der SDS-PAGE entsprachen, wurden durch den Vergleich mit den Coomassie-gefärbten Komplexen nach BN-PAGE als Superkomplexe identifiziert (Abb.15A,1/2).

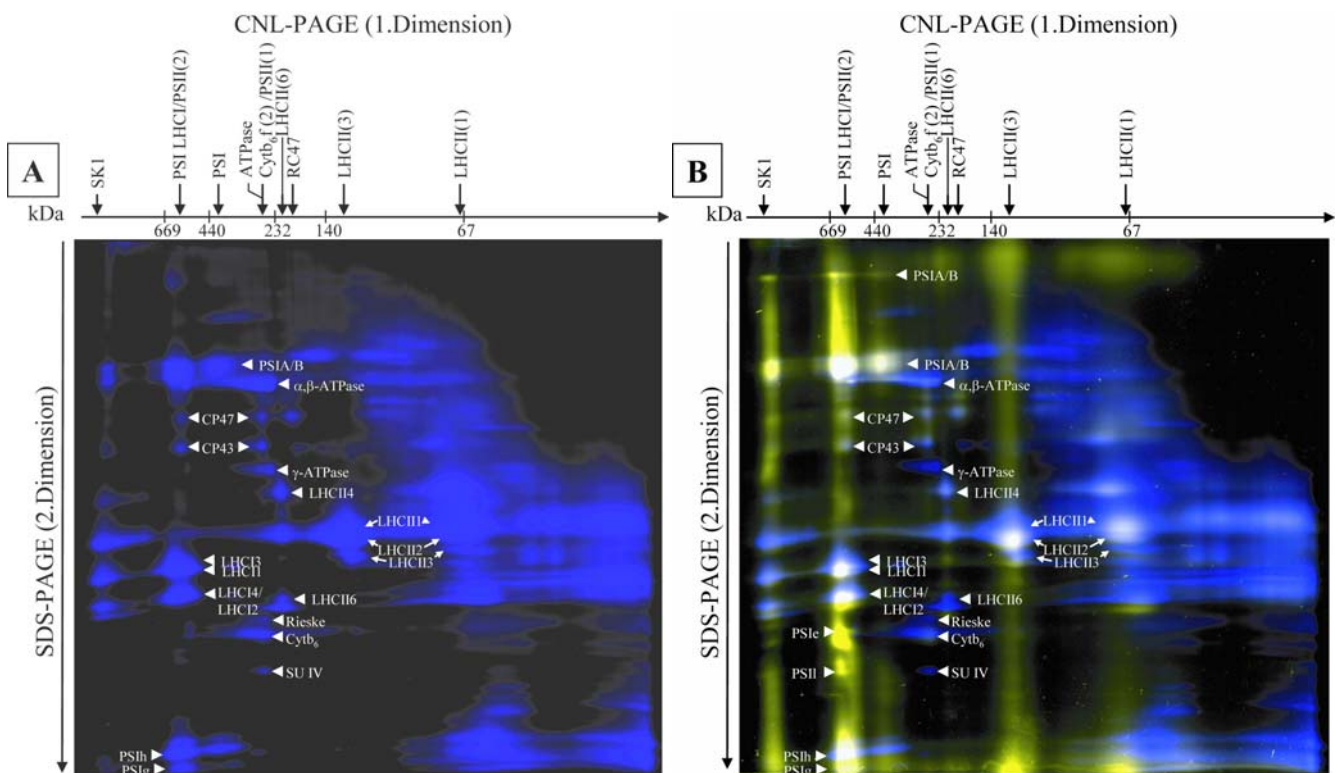


Abb.16 Identifikation von Chlorophyll-bindenden Proteinen durch Cy2

Thylakoidmembrankomplexe von 1×10^8 Chloroplasten wurden mit Cy2 markiert und über CNL-/SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im Laserscanner ausgelesen. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Cy2 erfolgte bei 488 nm (A, blaue Spots), die Detektion der Fluoreszenz des Chlorophylls erfolgte bei 633 nm (gelbe Spots). Mit Hilfe der Software „ImageQuant“ wurden die beiden Fluoreszenzbilder überlagert (B). Weiß gefärbte Banden stellen dabei Proteine dar, die sowohl durch Cy-Markierung wie auch durch Pigmentfluoreszenz sichtbar gemacht werden konnten. Die Beschriftung der Komplexe erfolgte analog Abb.2 und die Beschriftung der Einzelproteine analog Abb.3 bzw. Abb.7. Zusätzlich

zu diesen Proteinen wurden die beiden Genprodukte Lhcb1 und Lhcb6, welche zwei minore Antennenproteine des PS II codieren, mit LHCI4 und LHCI6 beschriftet.

Im Chloroplasten konnten, wie bereits in Kapitel 2.3 beschrieben, nach der Fluoreszenzmarkierung Komplexe der beiden Photosysteme, des Lichtsammelapparats, der ATP-Synthase und des Cyt b_6f detektiert werden (Abb.16A). Durch die Überlagerung mit der Chlorophyllfluoreszenz konnten einer Reihe von Pigmenten einzelnen Proteinen zugeordnet werden (Abb.16B).

So konnte die in Abb.15 als Komplex 4 bezeichnete Bande als Überlagerung des PS I/ LHC I-Komplexes und des dimeren RCC II-Komplex identifiziert werden (Abb.16B, PSILHCI /PSII(2)). Im hochmolekularen Bereich des SDS-PAGs wurde eine schmale Bande im Autofluoreszenzbild sichtbar, der kein Signal im Cy2-Fluoreszenzbild zugeordnet werden konnte. Durch den Vergleich mit der Coomassiefärbung aus Abb.3 wurden die Proteine dieser Bande als nicht voneinander getrennte Reaktionszentrumsproteine des PS I identifiziert (Abb.16B, PSIA/B). Diese beiden Proteine wurden in der Bande dieses Komplexes 4 ein weiteres Mal sichtbar. Im Bereich der darunter liegenden Bande konnten sie sowohl durch endogene als auch durch Cy2-Färbung nachgewiesen werden. Des Weiteren bestand diese Bande aus den LHC-Proteinen des PS I, die alle vier durch Chlorophyll- und Cy2-Fluoreszenz detektierbar waren (Abb.16B, LHCI1/LHCI2/ LHCI3/LHCI4). Einige der minore Proteine des PS I konnten zwar durch Chlorophyllfluoreszenz nachgewiesen werden, waren aber nicht durch die exogene Fluoreszenzmarkierung sichtbar zu machen (Abb.16B, PSIE/PSII). Allerdings muss vor allem im Bereich der unteren Gelkante berücksichtigt werden, dass sich dort auch das von den Proteinen abgelöste Pigment befand, und es somit zu einer unspezifischen Überlagerung von Protein und Pigment kommen konnte (Abb.16B, PSIIh/PSIIg).

Der dimere RCCII wurde in beiden Fluoreszenzbildern durch die beiden inneren Antennenproteine CP47 und CP43 nachgewiesen (Abb.16B, RCCII(2), CP43/CP47). Die Reaktionszentrumsproteine des PS II wurden dagegen weder durch endogene noch durch exogene Fluoreszenzemission sichtbar.

In dem mit 4` gekennzeichnetem Komplex konnten nur eine bzw. zwei kaum voneinander unterscheidbare endogen fluoreszierende Banden den Reaktionszentrumsproteinen P700 A und P700 B des PS I zugeordnet werden (Abb.16B, PSI, P700A/P700B).

Im Bereich von 260-310 kDa (Komplex 5) wurden der monomere Komplex des RCC II und der dimere Cyt b_6f -Komplex detektiert (Abb.16B, PSII(1)/Cyt b_6f (2)). Dabei konnten sowohl

die inneren Antennen des PS II als auch die Untereinheit Cyt b_6 des Cyt b_6f -Komplexes durch endogene Fluoreszenz sichtbar gemacht werden (Abb.16B, CP47/CP43/Cyt b_6).

Direkt daneben befand sich ein weiterer Komplex, der nach nativer PAGE ein starkes Eigenfluoreszenzsignal zeigte (Abb.16B). Nach SDS-PAGE konnten diesem Komplex mindestens sechs verschiedene Untereinheiten aufgrund von Autofluoreszenz zugeordnet werden. Durch den Vergleich mit der Cy2-Färbung konnten drei dieser Proteine als majoren bzw. minoren Antennenproteinen des PS II identifiziert werden (Abb.16B, LHCII2/LHCII4/LHCII6).

Der RC47-Komplex (Komplex 7), der in der Cy-Färbung nur anhand von CP47 sichtbar wurde, konnte auf dem Niveau der endogenen Fluoreszenz durch die Detektion von CP47 und einer weiteren Bande knapp oberhalb der CP47-Bande, d.h. vermutlich durch eine weitere, modifizierte Form von CP47, nachgewiesen werden (Abb.16B, RC47, CP47).

Die Trennung des Komplexes 8 führte zu einer Eigenfluoreszenz im gesamten Bereich der zweiten Dimension. Im Bereich der Lichtsammelproteine war die Eigenfluoreszenz besonders deutlich, so dass zumindest ein Teil der Fluoreszenz im Komplex von diesen Proteinen stammte (Abb.16B, LHCII1/2/3). Durch die Molekularmasse und dem Laufverhalten im Gel wurde dieser Komplex als trimerer LHC-Komplex des PS II identifiziert (Abb.16B, LHCII(3)).

Im Bereich der Lauffront der nativen PAGE konnte in der zweiten Dimension ein weiterer Komplex eindeutig nachgewiesen werden. Dieser wurde als monomerer LHC-Komplex des PS II identifiziert (Abb.16B, LHC(1)). Dabei konnten in allen LHC-Einzelproteinen endogene Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb.16B, LHCII1/2/3).

Die weiteren Banden, die aufgrund von endogener Fluoreszenz sichtbar wurden, konnten keinen bekannten Proteinen zugeordnet werden.

Somit konnten alle Einzelproteine, welche als Chlorophyll-bindend bekannt und durch Cy-Farbstoffe detektierbar waren, auch durch endogene Fluoreszenzsignale sichtbar gemacht werden. Zudem wurde deutlich, dass die Visualisierung von Proteinen aufgrund von gebundenen Pigmenten mindestens die Empfindlichkeit einer exogen durchgeführten Fluoreszenzfärbung erreichte.

4.1.2 Immunodetektion

Neben der Identifikation der Einzelproteine aufgrund ihrer Lage und Verteilung im SDS-Gel wurde der direkte Nachweis von zwei charakteristischen Proteinen des Etio- bzw.

Chloroplasten durch Immunodetektion durchgeführt. Als charakteristisches Protein des Etioplasten wurde die Untereinheit A der Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR A) ausgewählt; der Chloroplast wurde durch das Reaktionszentrumsprotein des PS II, D2, repräsentiert. Da D2 bereits als Ausgangspunkt der PS II-Assemblierung identifiziert wurde (Müller et al., 1999), sollte durch die Immunodetektion des D2-Proteins die Assemblierung des PS II während der Ergrünung direkt verfolgt werden können.

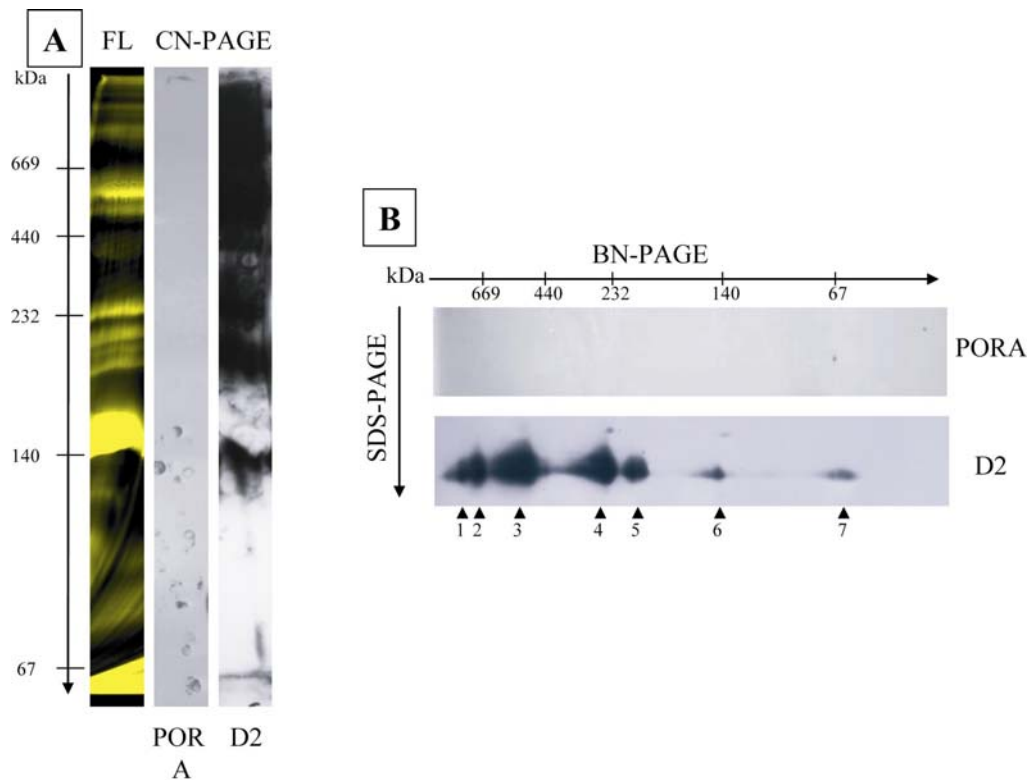


Abb.17 Immunodetektion von Proteinkomplexen des PS II bzw. der POR im Chloroplasten

Thylakoidmembrankomplexe von 1×10^8 Chloroplasten wurden über CNL-PAGE (A) bzw. BN-PAGE (B) aufgetrennt. Nach der Detektion der Eigenfluoreszenz der Komplexe (FL) wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (A). Nach BN-PAGE wurden die Untereinheiten der Komplexe über SDS-PAGE aufgetrennt und ebenfalls auf Nitrocellulosemembran übertragen (B). Die Membranen wurden geblockt und mit D2-Antikörper (D2) bzw. POR A-Antikörper (PORA) inkubiert. Nach der Inkubation der Membranen mit sekundärem Antikörper wurden die Proteine über das ECL-System detektiert. Die detektierten Komplexe wurden mit Zahlen von 1 bis 7 beschriftet. Die Molekularmassenbestimmung der Komplexe erfolgte anhand des HMW-Markers.

Die Detektion der POR A war im Chloroplasten weder direkt in einem Komplex (Abb.17A, PORA) noch nach der Trennung der Komplexuntereinheiten möglich (Abb.17B, PORA). Dies deutete darauf hin, dass das POR A-Protein im Chloroplasten nicht bzw. nur in sehr geringer Menge vorlag.

Dagegen konnte das D2-Protein in mehreren Komplexen nachgewiesen werden. Bei der Immunodetektion des D2 nach CNL-PAGE konnten die einzelnen Komplexe aufgrund der

auftretenden Signalstärke des Antikörpers kaum unterschieden werden (Abb.17A, D2). Somit war auch eine Zuordnung der D2-haltigen Komplexe zu den Eigenfluoreszenzbanden nach CNL-PAGE kaum möglich. Nur im niedermolekularen Bereich von ca. 140 kDa wurde eine klar abgegrenzte Bande sichtbar, wobei dieser Bande keine fluoreszierende Bande im Gel zugeordnet werden konnte. Dies deutete darauf hin, dass dieser D2-Komplex keine oder eine nur sehr geringe Menge an Pigment gebunden hatte. Nach der Trennung der Einzelproteine konnten mindestens sieben voneinander getrennte D2-Komplexe unterschieden werden. Aufgrund der auftretenden Molekularmassen wurden diese Komplexe den beiden bereits beschriebenen Superkomplexen, dem dimeren und monomeren CCII- und dem RC47-Komplex zugeordnet (Abb.17B, D2, 1-5). Die beiden anderen Banden wurden in den zuvor durchgeführten Versuchen nicht detektiert. Die Bande im Bereich von ca. 140 kDa schien der bereits nach CNL-PAGE sichtbaren Bande zu entsprechen und wurde einem weiteren PS II-Assemblierungsintermediat zugeordnet (Abb.17B, D2, 6). Dieses wurde als RCII-Komplex bezeichnet. In früheren Arbeiten wurden in diesem Komplex als weitere Bestandteile D1 und Cyt b₅₅₉ identifiziert (Müller et al., 1999). Bande 7 wurde freiem d.h. nicht in einem Komplex vorliegendem Protein zugeordnet (Abb.17B, D2, 7).

Durch die Antikörperdetektion konnte D2 im Chloroplasten neben den aus den verschiedenen Färbungen bekannten PS II-Komplexen in zwei weiteren Assemblierungsstufen, dem RC II und als freies Protein detektiert werden. Im RC II konnte dabei kein Chlorophyll detektiert werden; für die höhermolekularen Komplexe konnten keine Aussagen gemacht werden, da nach der CNL-PAGE die einzelnen Komplexe nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Auch für die Bande des freien Proteins war keine Aussage möglich, da sich nach der CNL-PAGE in diesem Bereich ebenfalls Mizellen, welche ungebundenes Pigment enthielten, befanden.

4.1.3 Absorptionsspektroskopie

Im Allgemeinen wurde davon ausgegangen, dass die endogene Fluoreszenz der Komplexe wie auch der Einzelproteine durch die Bindung von Chlorophyll verursacht wurde. Zur Bestätigung dieser Annahme wurden im folgenden Experiment alle Komplexe im Photometer vermessen, um die an die Komplexe gebundenen Pigmente näher zu charakterisieren.

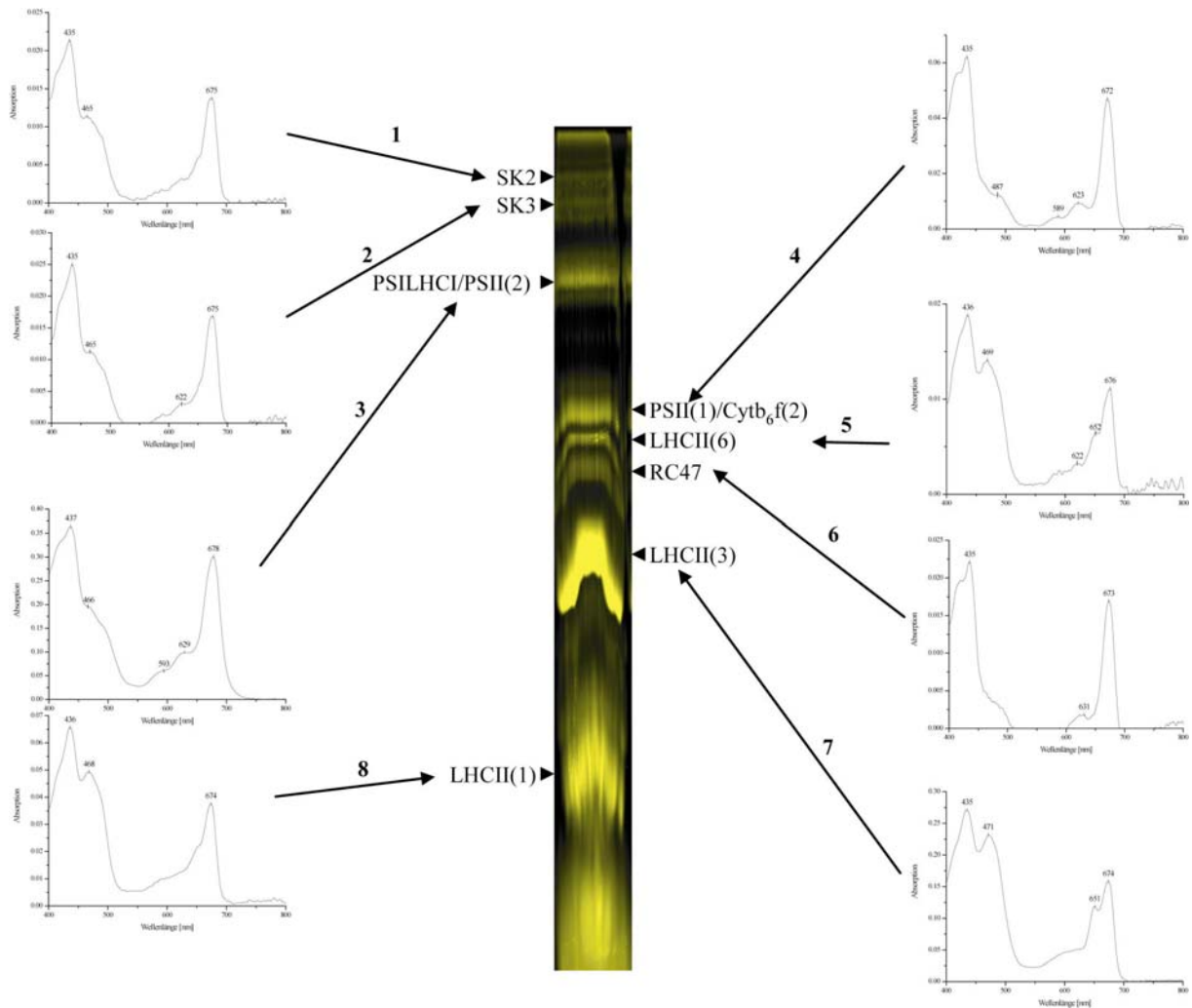


Abb.18 Absorptionsspektren der Thylakoidmembrankomplexe

Thylakoidmembrankomplexe von 1×10^8 Chloroplasten wurden über CNL-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im Fluoreszenzscanner bei 633 nm angeregt (FL) und alle fluoreszierenden Banden mit dem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde von allen Banden ein Absorptionsspektrum im Bereich von 400-800 nm aufgenommen.

Die Beschriftung der Banden erfolgte analog Abb.2 bzw. Abb.16.

Alle Spektren wurden durch die Absorptionsmaxima der Chlorophylle dominiert, wobei jedes Spektrum einen eigenen charakteristischen Verlauf besaß (Abb.18). Dabei wurde deutlich, dass Chlorophyll a in allen Spektren dominierte, die Gegenwart von Chlorophyll b dagegen nur im trimeren und hexameren LHC II-Komplex eindeutig hervortrat (Abb.18, LHCII(3)/LHCII(6)). Eine Ausnahme bildeten die beiden Superkomplexe, die sowohl im Spektrenverlauf als auch in der Intensität der Absorptionsmaxima übereinstimmten (Abb.18, SK2/SK3). Beide Spektren wurden durch Maxima, welche Chlorophyll a zugeordnet wurden, dominiert. Aufgrund des Spektrenverlaufs wurde neben Chlorophyll a auf die Anwesenheit von Chlorophyll b und Carotinoiden in diesen Komplexen geschlossen.

Aufgrund der aufgenommenen Spektren wurde die Bindung von Carotinoiden auch für alle weiteren untersuchten Komplexe angenommen, wobei kein Spektrum von Maxima, die den Carotinoiden zugeordnet wurden, dominiert wurde.

Die Pigmentzusammensetzung aus Chlorophyll a und Chlorophyll b konnte in unterschiedlicher Intensität in vier weiteren Komplexen detektiert werden (Abb.18, PSILHCI/PSII(2)/LHCII(6)/LHCII(3)/LHCII(1)). Dabei zeigte der trimere LHC II-Komplex das höchste Chlorophyll b zu Chlorophyll a-Verhältnis (Abb.18, LHCII(3)).

Die Fluoreszenz der restlichen zwei Banden wurde wahrscheinlich durch gebundenes Chlorophyll a verursacht. Sowohl die Bande des monomeren RCC II-Komplexes bzw. dimeren Cyt b_6f -Komplexes und des RC47-Komplexes zeigten im langwelligen Bereich ein ausgeprägtes Maximum zwischen 672 und 678 nm (Abb.18, PSII(1)/Cyt b_6f (2)/RC47). Aufgrund dieses Maximums wurde auf die Bindung von Chlorophyll a an die Proteinkomplexe geschlossen.

Die Absorptionsspektren ermöglichten somit auf der einen Seite eine Identifikation der in den Komplexen gebundenen Pigmente, auf der anderen Seite konnte der charakteristische Verlauf der Spektren zur Identifikation einzelner Komplexe herangezogen werden. Die Methode der Absorptionsspektroskopie lieferte allerdings nur auf dem Niveau der Komplexe auswertbare Spektren. Auf der Ebene der Einzelproteine lieferte die Absorptionsspektroskopie keine verwertbaren Spektren, so dass keine Aussage über die Art der an die Einzelproteine gebundenen Pigmente möglich war.

4.2 Charakterisierung der Proteinkomplexe des Etioplasten

Zur Charakterisierung der Vorgänge bei der Ergrünung wurde der Etioplast als Startpunkt gewählt. In diesem Entwicklungszustand liegt in Angiospermen noch kein Chlorophyll vor, so dass die Chlorophyll-bindenden Proteine nach der Translation wieder abgebaut werden. Erst nach erfolgreicher Chlorophyllsynthese akkumulieren die Einzelproteine und können zu funktionsfähigen Komplexen assemblieren (Eichacker et al., 1990; Kim et al., 1994; Eichacker et al., 1996). Daher sollten untersucht werden, ob bereits im Etioplasten Pigmente an Proteinkomplexe bzw. einzelne Proteine gebunden sind, und um welche Art von Pigmenten es sich handelt.

4.2.1 Fluoreszenzdetektion

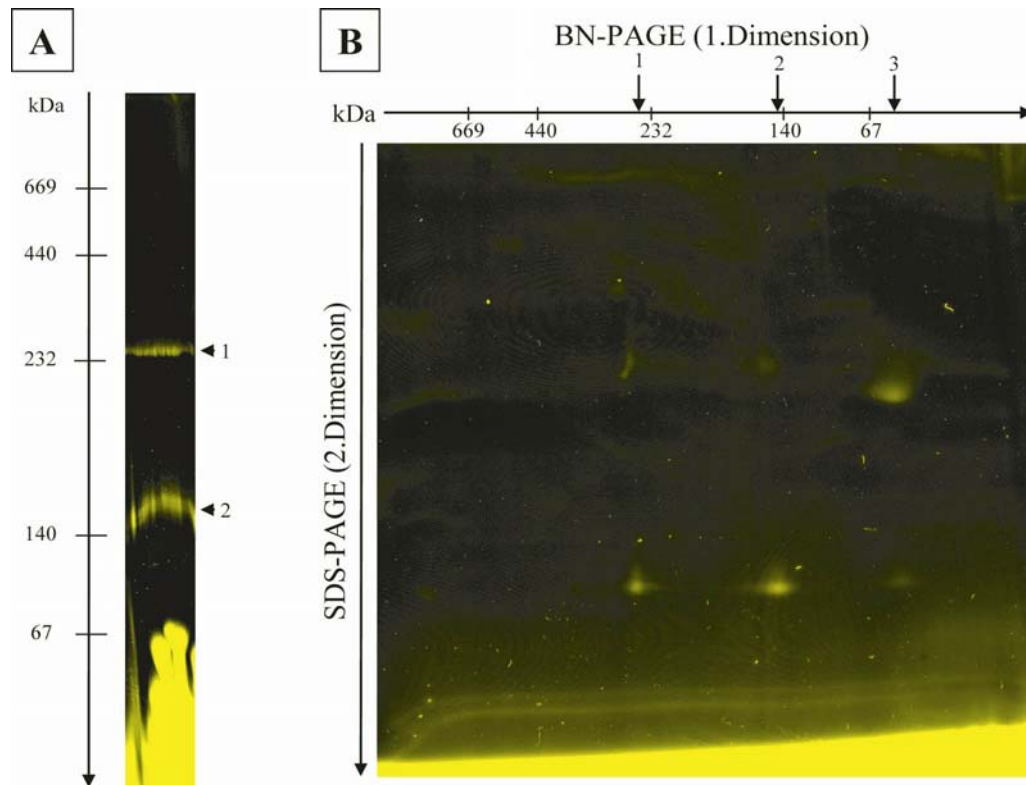


Abb.19 Fluoreszenzdetektion von Proteinkomplexen (A) und Einzelproteinen (B) des Etioplasten

Aus 2×10^8 Etioplasten wurden Membranproteinkomplexe isoliert und über CNL-PAGE aufgetrennt. Nach der nativen Elektrophorese wurde das Gel im Laserscanner bei 633 nm angeregt und die fluoreszierenden Komplexe detektiert (A). Anschließend wurde eine Spur des Gels in Solubilisierungspuffer inkubiert und die Komplexuntereinheiten über SDS-PAGE getrennt. Nach dem Gellauf wurde die Fluoreszenz der Einzelproteine durch Laseranregung bei 633 nm sichtbar gemacht (B).

Die detektierten Komplexe wurden mit den Zahlen 1 und 2 beschriftet. Die Molekularmassenbestimmung der Komplexe erfolgte anhand des HMW-Markers.

Nach CNL-PAGE konnten im Etioplasten zwei Banden aufgrund von Eigenfluoreszenz im Fluoreszenzbild sichtbar gemacht werden (Abb.19 A). Bande 1 lag im Bereich von 260-310 kDa und entsprach in der Intensität der Fluoreszenzemission ungefähr der Bande 2 (Abb.19 A, 1). Bande 2 wies eine Molekularmasse von ca. 140-150 kDa auf (Abb.19 A, 2).

Die Trennung der Komplexe in ihre Untereinheiten mit anschließender Detektion der Eigenfluoreszenz der Einzelproteine wies scheinbar für beide Komplexe die gleichen fluoreszierenden Untereinheiten auf (Abb.19 B). Sowohl in Komplex 1 als auch in Komplex 2 konnten zwei Banden bei einer Anregung von 633 nm sichtbar gemacht werden.

Neben den beiden nach CNL-PAGE detektierbaren Proteinkomplexen konnte im Bereich unter 70 kDa ein weiteres Protein durch Eigenfluoreszenz detektiert werden, welches in der ersten Dimension (CNL-PAGE) im Bereich der Lipid-/ Detergenz-/ Pigmentmizellen lag, und dessen Fluoreszenz somit in der ersten Dimension nicht eindeutig einem Proteinkomplex

zugeordnet werden konnte (Abb.19 B, 3). Unterhalb dieses Proteins war nach SDS-PAGE ein weiteres Protein mit schwacher Fluoreszenzemission zu detektieren.

Die Überlagerung der fluoreszierenden Banden mit Cy2-markierten Proteinen ermöglichte eine genauere Charakterisierung dieser drei Komplexe (Abb.20).

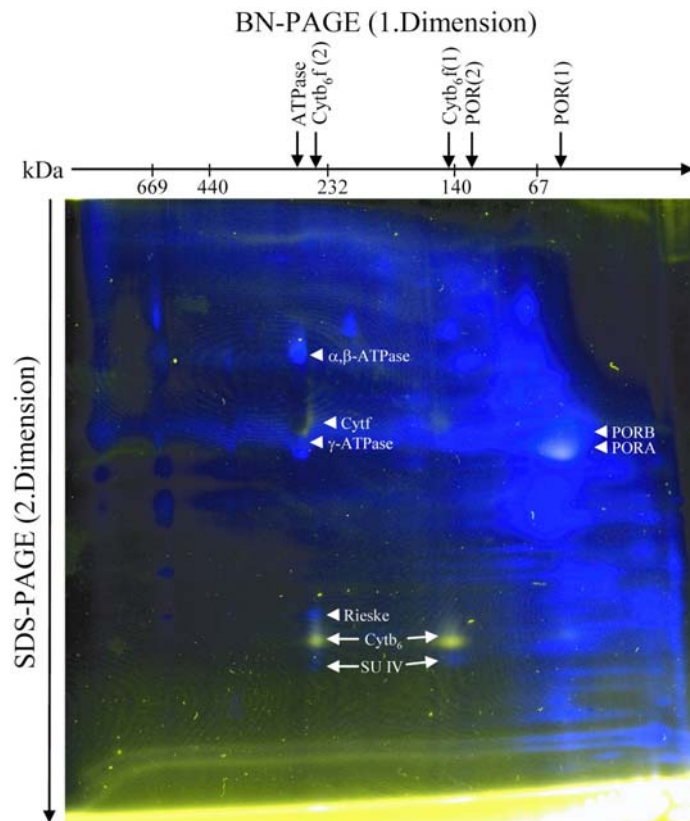


Abb.20 Identifikation von Pigment-bindenden Proteinen durch Cy2

Membrankomplexe von 2×10^8 Etioplasten wurden mit Cy2 markiert und über BN/SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im Laserscanner ausgelesen. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Cy2 erfolgte bei 488 nm (blaue Spots), die Detektion der Fluoreszenz des Chlorophylls erfolgte bei 633 nm (gelbe Spots). Mit Hilfe der Software „ImageQuant“ wurden die beiden Fluoreszenzbilder überlagert. Weiß gefärbte Banden stellen dabei Proteine dar, die sowohl durch Cy-Markierung wie auch durch Pigmentfluoreszenz sichtbar gemacht werden konnten. Die Beschriftung der Komplexe erfolgte analog Abb.2 und die Beschriftung der Einzelproteine analog Abb.3 bzw. Abb.4.

Die beiden fluoreszierenden Komplexe nach CNL-PAGE konnten anhand der Pigmentbindenden Proteine als dimerer und monomerer Cyt b₆f-Komplex identifiziert werden (Abb.20, Cytb₆f(2)/(1)). Dabei wurde das höhermolekulare Protein, welches ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal besaß, der Untereinheit Cyt f zugeordnet (Abb.20, Cyt f). Das zweite Protein, das im Fluoreszenzbild deutlich sichtbar war, schien vom Protein Cyt b₆ zu stammen (Abb.20, Cytb₆). Die Identifikation der beiden Proteine wurde anschließend durch massenspektrometrische Analysen bestätigt.

Der dritte Komplex konnte anhand der fluoreszierenden Untereinheit POR A als monomere Assemblierungsstufe des POR-Komplexes identifiziert werden (Abb.20, POR(1), PORA). Dem anderen Fluoreszenzsignal im Molekularmassenbereich unter 70 kDa konnte kein Protein in der Cy2-Färbung zugeordnet werden. Aufgrund der geringen Proteinmenge war auch keine massenspektrometrische Identifikation dieses Proteins möglich.

Im Etioplasten konnten somit die monomere und dimere Assemblierungsstufe des Cyt b_6f -Komplexes und der monomere POR-Komplex als Träger von Pigmenten identifiziert werden, die bei einer Anregung bei 633 nm fluoreszieren.

Zur genaueren Charakterisierung der gebundenen Pigmente wurden vom monomeren und dimeren Cyt b_6f -Komplex Absorptionsspektren aufgenommen. Eine weitere Charakterisierung des monomeren POR-Komplexes wurde nicht vorgenommen, da sich dieser Komplex nach CNL-PAGE im Bereich der Detergenz-Lipid-Mizellen befand, in dem sich auch alle Pigmente befanden, die nach der Elektrophorese nicht mehr an Proteinkomplexe gebunden waren. Somit konnte nicht unterschieden werden, welche Signale von den Detergenz-Lipid-Mizellen bzw. vom monomeren POR-Komplex herrührten.

4.2.2 Absorptionsspektroskopie

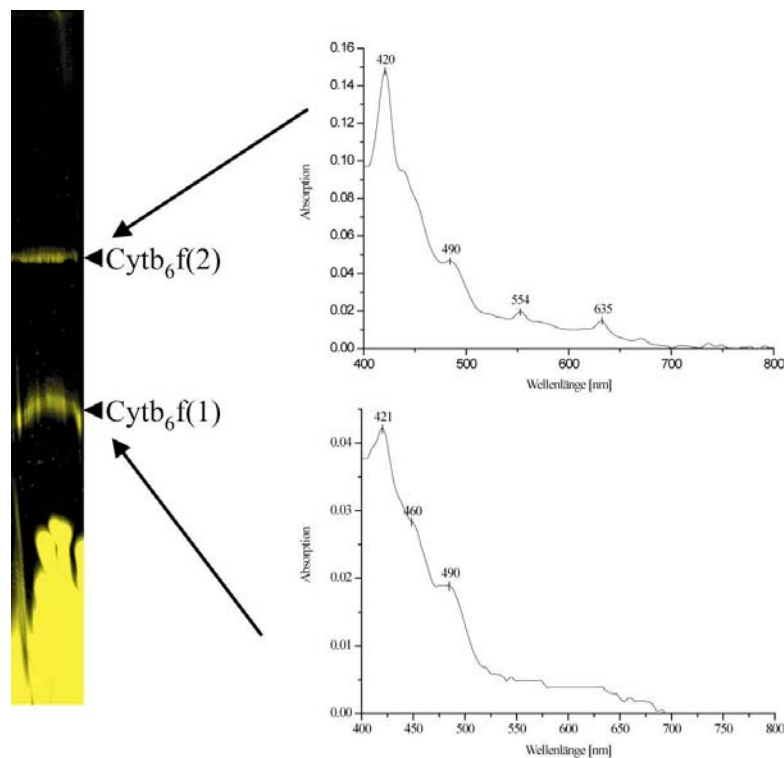


Abb.21 Absorptionsspektren des dimeren und monomeren Cyt b_6f -Komplexes

2×10^8 Etioplasten wurden über CNL-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im Fluoreszenzscanner bei 633 nm angeregt (FL) und die fluoreszierenden Banden von fünf Spuren mit dem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde von beiden Komplexen fünf Banden übereinander gestapelt und ein Absorptionsspektrum im Bereich von 400-800 nm aufgenommen.

Der dimere Cyt b_6f -Komplex wurde mit Cyt $b_6f(2)$ und der monomere Cyt b_6f -Komplex mit Cyt $b_6f(1)$ beschriftet.

Das Absorptionsspektrum des dimeren Cyt b_6f -Komplexes wurde durch ein Maximum bei 420 nm dominiert (Abb.21, Cyt $b_6f(2)$, 420). Durch den Vergleich mit Daten aus der Literatur wurde dieses Maximum Häm c, welches an Cyt f gebunden war, zugeordnet (Zhang et al., 2001). Das Maximum bei 554 nm schien ebenfalls von Cyt f zu stammen (Abb.21, Cyt $b_6f(2)$, 554). Das letzte Maximum deutete auf die Anwesenheit von Protochlorophyllid oder dessen veresterter Form, dem Protochlorophyll hin (Abb.21, Cyt $b_6f(2)$, 635). Eine eindeutige Identifikation des gebundenen Chlorophyllderivats war aufgrund der identischen Absorptionseigenschaften der beiden Tetrapyrrolderivate mittels photometrischer Methoden nicht möglich.

Neben Häm c und Protochlorophyllid/Protochlorophyll konnte aufgrund des Spektrenverlaufs, d.h. einer Schulter im Bereich von 460/490 nm die Bindung von Carotinoiden im dimeren Cyt b_6f -Komplex nicht ausgeschlossen werden (Abb.21, Cyt $b_6f(2)$).

Die Analyse des monomeren Cyt b_6f -Komplexes lieferte ein anderes Ergebnis. Auf Ebene der Tetrapyrrolderivate konnte nur Häm c des Cyt f identifiziert werden (Abb.21, Cyt $b_6f(1)$, 421).

Die Bindung von Protochlorophyllid/Protochlorophyll konnte im monomeren Cyt b_6f -Komplex nicht bestätigt werden. Dagegen wurde die Anwesenheit von Carotinoiden durch die Absorptionsmaxima im Bereich von 460/490 nm im Monomer deutlicher (Abb.21, Cyt $b_6f(1)$, 460/490).

Somit konnten für die dimere Assemblierungsstufe mindestens drei unterschiedliche, für die monomere Assemblierungsstufe zwei verschiedene Co-Faktoren als Bestandteile der Cyt b_6f -Komplexe im Etioplasten identifiziert werden. Häm c und Carotinoide konnten in beiden Komplexen nachgewiesen werden, wohingegen das Protochlorophyllid/Protochlorophyll nur in der dimeren Assemblierungsstufe sichtbar wurde. Zur eindeutigen Identifikation des Chlorophyllderivats wurden die nicht kovalent gebundenen Co-Faktoren aus dem dimeren Komplex isoliert und sowohl über Dünnschichtchromatographie als auch durch MS/MS-Spektren analysiert.

4.2.3 Dünnschichtchromatographie (DC)

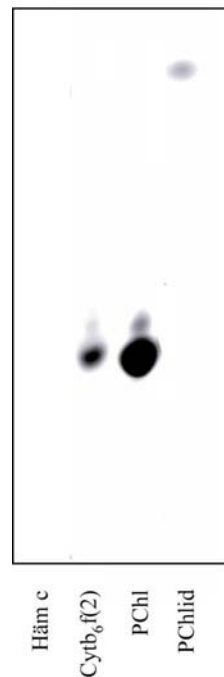


Abb.22 Identifikation des Tetrapyrolderivats im dimeren Cyt b₆f-Komplexes durch DC

Nach CNL-PAGE wurden die Co-Faktoren des dimeren Cyt b₆f-Komplexes mittels DMF aus dem Gel extrahiert. Nach dem Trocknen wurden die Co-Faktoren in ein Gemisch aus Methanol/Aceton/Aqua dest. aufgenommen und über DC getrennt (Cytb₆f(2)). Als Referenzsubstanzen wurden gereinigtes Protochlorophyllid (PChlid), Häm c (Häm c) und Protochlorophyll (PChl) verwendet. Nachdem die Lauffront die obere Kante der DC-Platte erreicht hatte, wurden die Pigmente durch Anregung bei 633 nm im Laserscanner sichtbar gemacht.

Nach der Dünnschichtchromatographie konnte in der Probe des dimeren Cyt b₆f-Komplexes eine Bande mit einem R_f-Wert von ungefähr 0.5 detektiert werden (Abb.22, Cytb₆f(2)). Durch den Vergleich mit den Referenzspuren wurde dieses Fluoreszenzsignal des dimeren Cyt b₆f-Komplexes als Protochlorophyll identifiziert, da das Fluoreszenzsignal des gereinigten Protochlorophyll ebenfalls einen R_f-Wert von ungefähr 0.5 besaß (Abb.22, PChl).

Dagegen zeigte das gereinigte Protochlorophyllid ein deutlich abweichendes Laufverhalten (R_f-Wert ca. 0.85) und konnte somit als Co-Faktor im dimeren Cyt b₆f-Komplex ausgeschlossen werden (Abb.22, PChlid).

Die Referenzprobe des Häm c zeigte keine Fluoreszenz (Abb.22, Häm c). Daher wurde unter Berücksichtigung des Absorptionsspektrums auf die Bindung von Protochlorophyll im Cyt b₆f-Komplex des Etioplasten geschlossen. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden die isolierten Co-Faktoren durch MS/MS-Fragmentationenspektren analysiert.

4.2.4 Massenspektrometrie

Zur Erstellung des Fragmentationenspektrums musste das dem Pigment entsprechende Mutterion selektiert werden. Dessen m/z -Wert berechnet sich aus dem Molekulargewicht und der Ionenladung. Zusätzlich kam es durch die Säurebehandlung der Pigmente zu einem Verlust des Mg^{2+} und zur Aufnahme eines Protons pro positiver Ladung während der Ionisierung. Daraus ergab sich für das Mutterion des Protochlorophyllids, welches in der Probe als Protophäophorbid vorlag ein m/z -Wert von 591 und für das Mutterion des Protochlorophylls, welches während der Messung als Protophäophytin vorlag ein m/z -Wert von 896 für das einfach geladene Ion. Um die Zuordnung der einzelnen Co-Faktoren zu den Proben möglichst einfach zu gestalten, wurden die Bezeichnungen Protochlorophyllid bzw. Protochlorophyll im weiteren Text beibehalten.

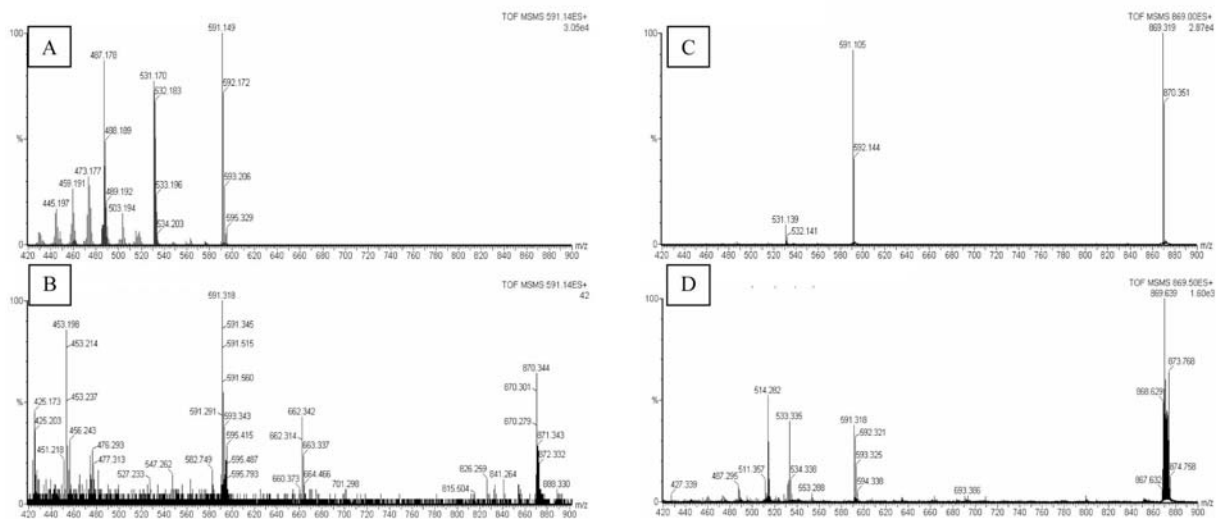


Abb.23 Vergleich der MS/MS-Spektren von Protochlorophyllid, Protochlorophyll und den Co-Faktoren des dimeren Cyt b_6f -Komplexes

Protochlorophyllid (A), Protochlorophyll (C) und die extrahierten Co-Faktoren des dimeren Cyt b_6f -Komplexes (B/D) wurden in einem Lösungsmittelgemisch aus Ameisensäure, Acetonitril, Isopropanol und Wasser aufgenommen. Zur Erstellung des Fragmentationenspektrums des Protochlorophyllid wurde ein Mutterion von 591 m/z und für das Protochlorophyll ein Mutterion von 896 m/z ausgewählt.

Das Fragmentationenspektrum des gereinigten Protochlorophyllids zeigte neben dem Mutterion mit einem m/z -Wert von 591.15 (1+) zwei deutliche Fragmentationen bei 487.18 (1+) und 531.17 (1+) (Abb.23, A). Zusätzlich zu diesen beiden Fragmenten konnten sechs weitere kleinere Fragmentationen detektiert werden.

Im dimeren Cyt b_6f -Komplex konnte dieses Spektrum bei der Fragmentation eines Ions mit einem m/z -Wert von 591 nicht erzeugt werden (Abb.23, B). Im MS/MS-Modus konnte ein Mutterion mit einem m/z -Wert von 591.32 (1+) detektiert werden. Im Bereich der Fragmentationen wurde ein Signal mit einem Wert von 453.30 (1+) sichtbar, welches im

Fragmentationenspektrum des Protochlorophyllids nicht nachzuweisen war (Abb.23, A/B). Da das Fragmentationenspektrum des dimeren Cyt b_6f -Komplexes bei einem m/z -Wert des Mutterion von 591 keine Übereinstimmung mit dem Fragmentationenspektrum des gereinigten Protochlorophyllids zeigte, wurde dieses Pigment als Co-Faktor im dimeren Cyt b_6f -Komplex ausgeschlossen.

Das Fragmentationenspektrum des gereinigten Protochlorophylls unterschied sich deutlich vom Spektrum des gereinigten Protochlorophyllid. Nach der Selektion eines Mutterions mit einem m/z -Werts von 896 konnte im MS/MS-Spektrum neben dem Mutterion mit einem m/z -Wert von 869.30 (1+) ein Fragmention mit einem m/z -Wert von 591.11 (1+) detektiert werden (Abb.23, C). Dieser Wert entsprach dem Wert des Mutterions des Protochlorophyllids. Der Abstand zwischen dem Mutterion des Protochlorophylls und diesem Fragmention betrug m/z 278.19 (1+). Diese Massendifferenz entspricht dem Molekulargewicht von Phytol, so dass das Fragmention bei 591.11 (1+) als dephytyliertes Protochlorophyll interpretiert wurde.

In der Probe des dimeren Cyt b_6f -Komplexes konnte im MS/MS-Spektrum neben dem Mutterion bei m/z 869.64 (1+) ebenfalls ein Fragmention mit einem m/z -Wert von ungefähr 591 (591.32) (1+) detektiert werden (Abb.23, D). Da dies nahezu dem Fragmention in der Probe des gereinigten Protochlorophylls entsprach, wurde damit Protochlorophyll im dimeren Cyt b_6f -Komplex bestätigt. Die weiteren Fragmentionen in der Probe mit m/z -Werten von 533.33 und 514.28 konnten nicht interpretiert werden.

Die Identifikation des Protochlorophylls als Bestandteil des dimeren Cyt b_6f -Komplexes konnte somit auch durch die MS/MS-Spektren belegt werden.

4.2.5 Immunodetektion

Es waren weder nach der Fluoreszenzmarkierung der Proteine noch im Scan auf Eigenfluoreszenz Bestandteile der beiden Photosysteme detektierbar (vgl. Abb.20). Durch den Einsatz des Antikörpers gegen D2 sollte untersucht werden, ob im Etioplasten bereits Komplexe des PS II nachgewiesen werden konnten. Zusätzlich wurde versucht, durch den Einsatz des POR A-Antikörpers, die Komplexe dieses, im Etioplasten dominierendem Enzym, näher zu charakterisieren.

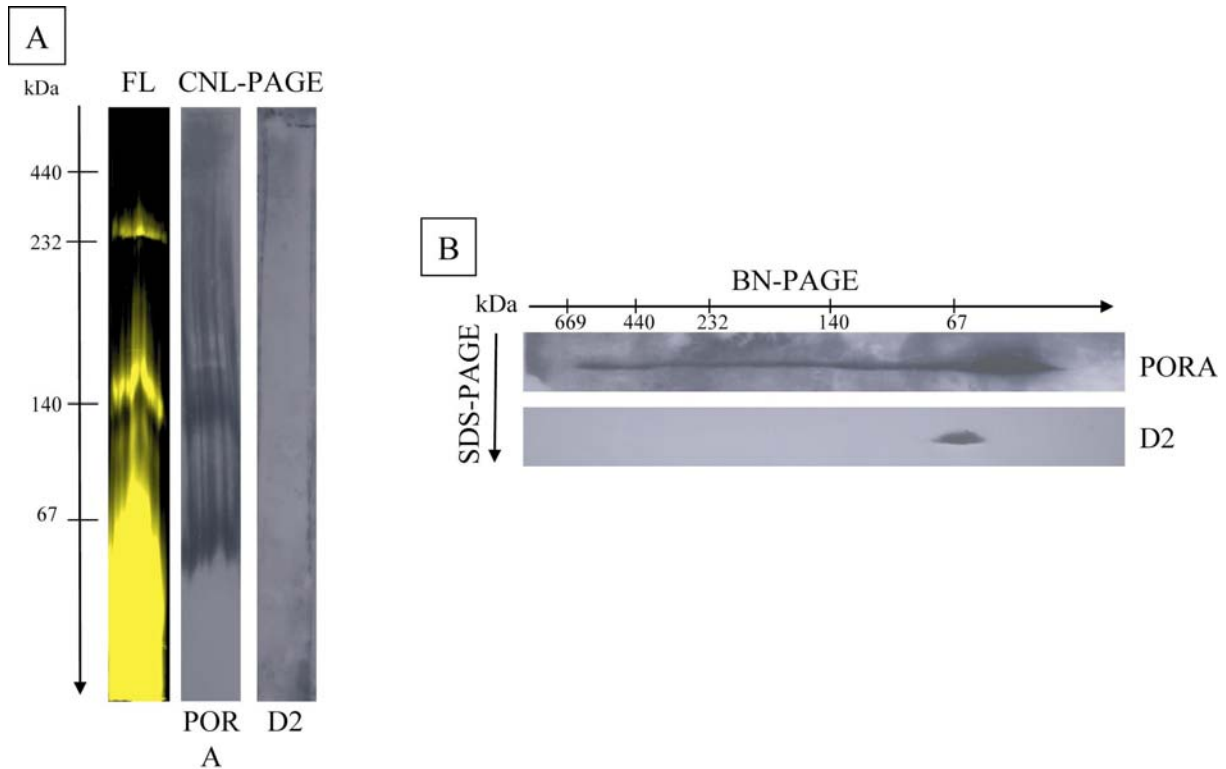


Abb.24 Immunodetektion von D2- bzw. POR A- haltigen Komplexen im Etioplasten

Membrankomplexe von 1×10^8 Etioplasten wurden über CNL-PAGE bzw. BN-PAGE aufgetrennt. In beiden Fällen betrug der Gradient des PAG 8-15%. Nach der Detektion der Eigenfluoreszenz der Komplexe (FL) nach CNL-PAGE wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach BN-PAGE wurden die Untereinheiten der Komplexe über SDS-PAGE aufgetrennt und ebenfalls auf Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membranen wurden mit D2-Antikörper (D2) bzw. POR A-Antikörper (PORA) inkubiert. Nach der Inkubation der Membranen mit sekundärem Antikörper wurden die Proteine über das ECL-System detektiert. Die Molekularmassenbestimmung der Komplexe erfolgte anhand des HMW-Markers.

Nach CNL-PAGE konnten mit dem D2-Antikörper im Etioplasten keine Komplexe detektiert werden (Abb.24 CNL-PAGE/D2). Die Zerlegung der Komplexe in ihre Untereinheiten erbrachte für das D2-Protein ein Signal im Bereich unter 70 kDa (Abb.24, BN-PAGE/D2). Damit konnte das D2-Protein im Etioplasten nur im Bereich der Einzelproteine und nicht als Bestandteil eines Komplexes nachgewiesen werden. Zudem erwies sich die Immunodetektion des D2-Proteins auf Ebene der Einzelproteine als sensitiver als auf Ebene der Komplexe, da nach CNL-PAGE das D2-Protein nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Protochlorophyllid-Oxidoreduktase konnte dagegen bereits nach CNL-PAGE in zwei Komplexen im Bereich von 120-140 und bei ca. 70 kDa detektiert werden (Abb.24, CNL-PAGE/PORA). Zusätzlich zu diesen beiden Komplexen war oberhalb des Komplexes bei ca. 70 kDa über den gesamten Bereich der ersten Dimension ein diffuses Signal des Antikörpers zu detektieren. Der Vergleich mit der Immunodetektion nach BN/SDS-PAGE zeigte die Existenz von POR A-Komplexen im gesamten Bereich der ersten Dimension, wobei vor allem im hochmolekularen Bereich keine distinkten Komplexe zu trennen waren (Abb.24, BN-PAGE/PORA). Das stärkste Signal wurde im Bereich unter 70 kDa sichtbar. Dieses

Signal deckte sich mit dem Signal bei 60-70 kDa nach CNL-PAGE. Der Komplex bei 120-140 kDa konnte nach BN/SDS-PAGE nur erahnt werden; er war nicht deutlich von den restlichen POR A-Signalen in der zweiten Dimension zu unterscheiden (Abb.24, BN-PAGE/PORA).

Im Etioplasten konnte somit vor allem ein Protein der Chlorophyll-Biosynthese nachgewiesen werden, allerdings war mit D2 bereits eine Komponente der Chlorophyll-bindenden Proteine zu detektieren. Hinsichtlich der Detektion von an Proteine gebundenen Pigmenten im Etioplasten ließ sich feststellen, dass nach CNL-PAGE zwei verschiedene Proteinkomplexe detektierbar waren. Bei diesen Komplexen handelte es sich um den Cyt b_6f -Komplex in seiner monomeren und dimeren Form. In der dimeren Form konnte neben Häm c und Carotinoiden die Existenz von Protochlorophyll nachgewiesen werden. Im monomeren Komplex konnte dagegen kein Protochlorophyll detektiert werden.

Zusätzlich zu diesen beiden Komplexen konnte auf dem Niveau der Einzelproteine eine Co-Faktor-Bindung im Bereich des monomeren POR A-Komplexes gezeigt werden. Dieser im Bereich der Lauffront der CNL-PAGE lokalisierte Komplex könnte Protochlorophyllid enthalten, dies konnte allerdings nicht zweifelsfrei identifiziert werden.

4.3 Charakterisierung von Proteinkomplexen nach einstündiger Belichtung von etiolierten Keimlingen

Durch Belichtung etiolierter Keimlinge wird die Biosynthese von Chlorophyll abgeschlossen. Die Gegenwart von Chlorophyll ermöglicht wiederum die Akkumulation der Chlorophyll-bindenden Proteine und somit erst die Assemblierung der Photosysteme. In den folgenden Experimenten wurden etiolierte Keimlinge für eine Stunde belichtet, um die Akkumulation und Assemblierung der Chlorophyll-bindenden Proteine zu initiieren. Aus diesen Keimlingen wurden anschließend Plastiden isoliert und die Membrankomplexe dieser Plastiden charakterisiert. Dazu wurden diese Komplexe und ihre Co-Faktoren mit den Komplexen des Etio- bzw. Chloroplasten verglichen.

4.3.1 DIGE von Membrankomplexen des Etioplasten und Plastiden aus etioliierten Keimlingen nach einstündiger Belichtung (1h L)

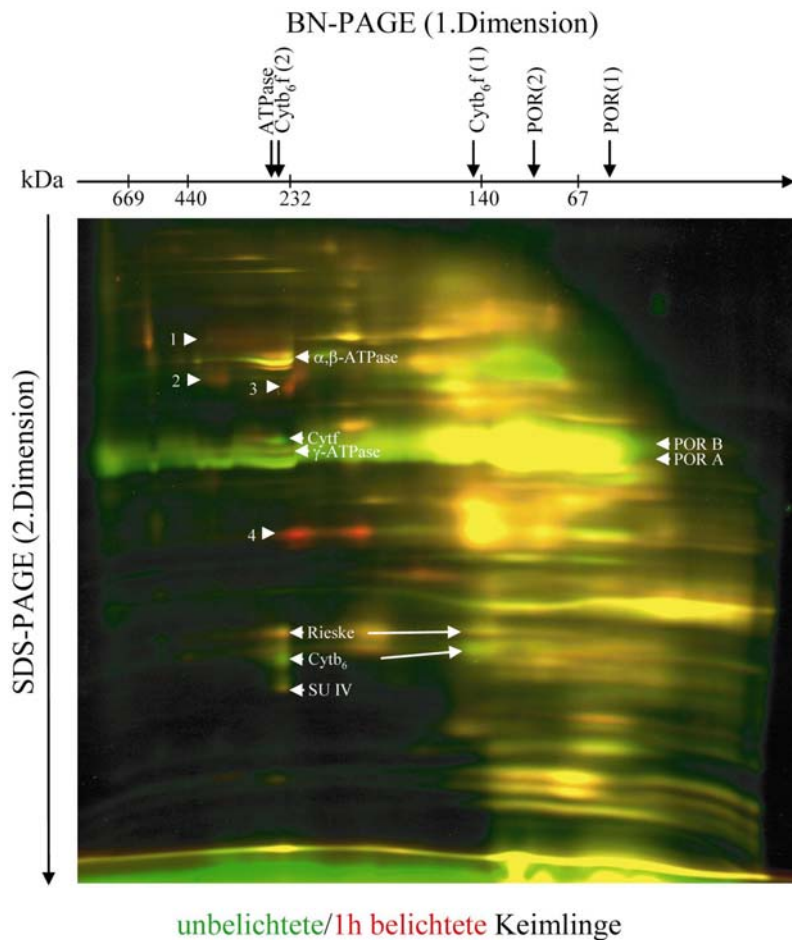


Abb.25 DIGE von Membranproteinkomplexen des Etioplasten und Plastiden nach 1h L

Membranen aus 5×10^7 Etioplasten bzw. Plastiden nach 1h L wurden mit Cy2 bzw. Cy5 markiert. Nach dem Stoppen der Markierungsreaktion mit L-Lysin wurden die beiden Proben gemischt und die gemischte Probe wie in Abb.10 beschrieben für CNL-PAGE vorbereitet. Nach der SDS-Solubilisierung des nativen Gels wurden die Untereinheiten der Proteinkomplexe durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurden die fluoreszenzmarkierten Untereinheiten der Etioplastenmembrankomplexe durch Anregung bei 488 nm sichtbar gemacht. Die Untereinheiten der Membrankomplexe nach 1h L, die mit Cy5 markiert waren, wurden durch Fluoreszenzanregung bei 633 nm sichtbar gemacht. Mit Hilfe der Software „ImageQuant“ wurde ein Überlagerungsbild beider Plastidentypen erzeugt. Dabei stellen grün gefärbte Spots Proteine des Etioplasten, rot gefärbte Spots Proteine nach 1h L und gelb gefärbte Spots Proteine, die sich in beiden Plastidentypen entsprechen, dar.

Die Beschriftung der Proteinkomplexe erfolgte analog zu Abb.2, die Beschriftung der Einzelproteine analog zu Abb.3 bzw. Abb.4. Die Zahlen von 1 bis 4 bezeichnen Proteine, welche erstmals nach einstündiger Belichtung zu detektieren waren.

Nach einstündiger Belichtung konnten alle für den Etioplasten beschriebenen Komplexe detektiert werden (Abb.25). Dabei wiesen die Komplexe der ATP-Synthase, der POR und des Cyt b₆f in seiner monomeren und dimeren Form die gleiche Molekularmasse wie im Etioplasten auf (Abb.25, ATPase/Cytb₆f(2)/(1)/POR(2)/(1)). Allerdings konnte im Bereich der hochmolekularen POR-Komplexe ein Rückgang der Proteinmenge detektiert werden, d.h.

nach einstündiger Belichtung schien die Menge an hochmolekularen POR-Komplexen zurückzugehen.

Zusätzlich zu den für den Etioplasten beschriebenen Proteinen konnten auf dem Niveau der Einzelproteine vier Banden detektiert werden, die erst nach einer Stunde Belichtung akkumulierten (Abb.25, 1-4). Die Proteine, welche mit den Zahlen 1, 2 und 4 markiert wurden, schienen in mindestens zwei unterschiedlichen Assemblierungsstufen vorzuliegen. Protein 1 konnte in Komplexen im Molekularmassenbereich von 300 bis 440 kDa nachgewiesen werden (Abb.25, 1). Das zweite Protein wurde im Bereich von 420-440 kDa sichtbar (Abb.25, 2). Das stärkste Fluoreszenzsignal der zusätzlich zum Etioplasten akkumulierten Proteine zeigte Protein 4, welches Bestandteil von zwei Komplexen im Bereich von 180-200 und 210-250 kDa war (Abb.25, 4). Dagegen konnte das Protein 3 nur in einem Komplex im Bereich um 300 kDa detektiert werden (Abb.25, 3).

Der anschließende Versuch sollte zeigen, ob diese neu akkumulierten Proteine Bestandteile von Pigment-bindenden Komplexen waren, d.h. ob diese Proteine direkt mit der erfolgten Chlorophyll-Biosynthese in Beziehung standen.

4.3.2 Fluoreszenzdetektion der Pigment-bindenden Proteine in Komplexen bzw. Komplexuntereinheiten

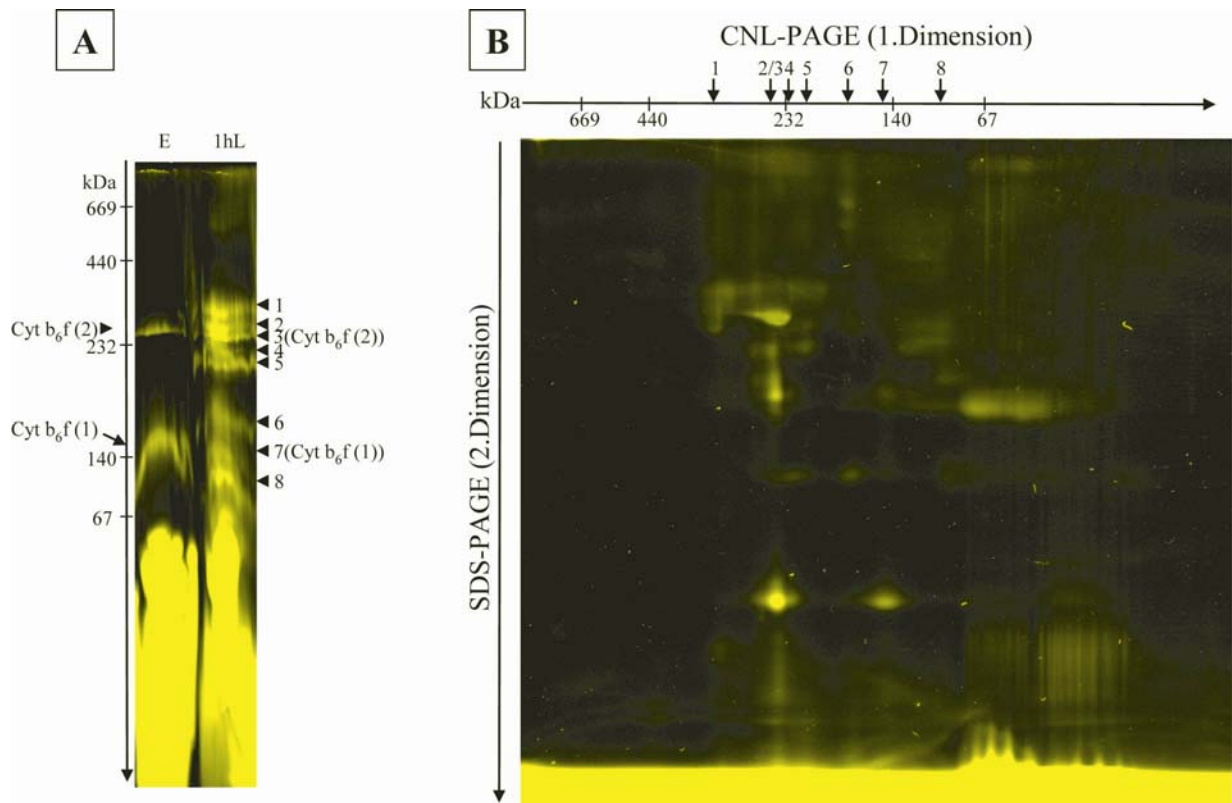


Abb.26 Fluoreszenzdetektion von Proteinkomplexen (A) und Einzelproteinen (B) nach 1h L

Aus 2×10^8 Etioplasten bzw. 1×10^8 Plastiden nach 1h L wurden Membranproteinkomplexe isoliert und über CNL-PAGE aufgetrennt. Nach der nativen Elektrophorese wurde das Gel im Laserscanner bei 633 nm angeregt und die fluoreszierenden Komplexe detektiert (A). Anschließend wurde eine Spur der 1hL-Komplexe in Solubilisierungspuffer inkubiert und die Komplexuntereinheiten über SDS-PAGE getrennt. Nach dem Gellauf wurde die Fluoreszenz der Einzelproteine durch Laseranregung bei 633 nm sichtbar gemacht (B).

Die Komplexe des Etioplasten wurden mit Cyt_b₆f(2) bzw. Cyt_b₆f(1) beschriftet. Alle Komplexe, welche in der Spur nach 1h L sichtbar wurden, wurden mit den Zahlen 1 bis 8 beschriftet. Die Molekularmassenbestimmung der Komplexe erfolgte anhand des HMW-Markers.

Nach einstündiger Belichtung konnten acht verschiedene Komplexe unterschieden werden (Abb.26 A, 1-8). Dabei zeigten alle acht Komplexe in etwa die gleiche Intensität des Fluoreszenzsignals und lagen im Molekularmassenbereich zwischen 80 und 350 kDa.

Nach der Zerlegung der Komplexe in ihre Untereinheiten konnten eine Vielzahl von Proteinen aufgrund von Eigenfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Dabei schienen mindestens sechs Proteine, welche nach SDS-PAGE anhand von Co-Faktor-Bindung detektiert werden konnten, in mehr als einer Assemblierungsstufe vorzuliegen.

Im Bereich des Komplexes 1 konnten nach SDS-PAGE drei fluoreszierende Banden unterschieden werden (Abb.26 A/B, 1). Dabei wiesen die Untereinheiten eine leichte Verschiebung in vertikaler Richtung auf, so dass diese Bande zwei getrennte Komplexe mit sehr ähnlicher Molekularmasse zu enthalten schien.

Die Bande des Komplexes 2 konnte kaum von der des Komplexes 3 unterschieden werden. Daher lagen auch die Untereinheiten der beiden Komplexe nahezu untereinander, so dass eine Zuordnung der einzelnen Untereinheiten zu einem der beiden Komplexe nicht möglich war. Die beiden Komplexe wurden insgesamt aus mindestens sechs fluoreszierenden Untereinheiten gebildet (Abb.26 A/B, 2/3). Der Komplex 3 konnte durch den Vergleich mit den Komplexen des Etioplasten als dimerer Cyt b₆f-Komplex identifiziert werden. (Abb.26 A, 3/Cyt_b₆f(2)).

Der Vergleich mit den Komplexen und Untereinheiten des Etioplasten führte für einen weiteren Komplex aus 1h L Plastiden zur Identifikation. So konnte Komplex 7 als monomere Form des Cyt b₆f-Komplexes beschrieben werden (Abb.26 A/B, 7/Cyt_b₆f(1)). In unmittelbarer Nachbarschaft des dimeren Cyt b₆f-Komplexes konnte ein weiterer Komplex anhand einer fluoreszierenden Untereinheit sichtbar gemacht werden (Abb.26 A/B, 4). Im Bereich von 190-210 kDa wurde Komplex 5 mit einem Protein sichtbar (Abb.26 A/B, 5). Komplex 6 im Bereich von 180-200 kDa schien die gleiche fluoreszierende Untereinheit wie Komplex 4 zu enthalten (Abb.26 A/B, 6). Im niedermolekularen Bereich konnte schließlich Komplex 8 mit einer Molekularmasse von 90-110 kDa identifiziert werden, der ein fluoreszierende Protein enthielt (Abb.26 A/B, 8).

Zur Identifikation der fluoreszierenden Untereinheiten wurden diese mit dem Fluoreszenzbild von Cy2-markierten Proteinen überlagert, um anhand des aus dem Etio- bzw. Chloroplasten bekannten Bandenmusters die einzelnen Untereinheiten zu bestimmen.

4.3.3 Identifikation der Pigment-bindenden Komplexuntereinheiten

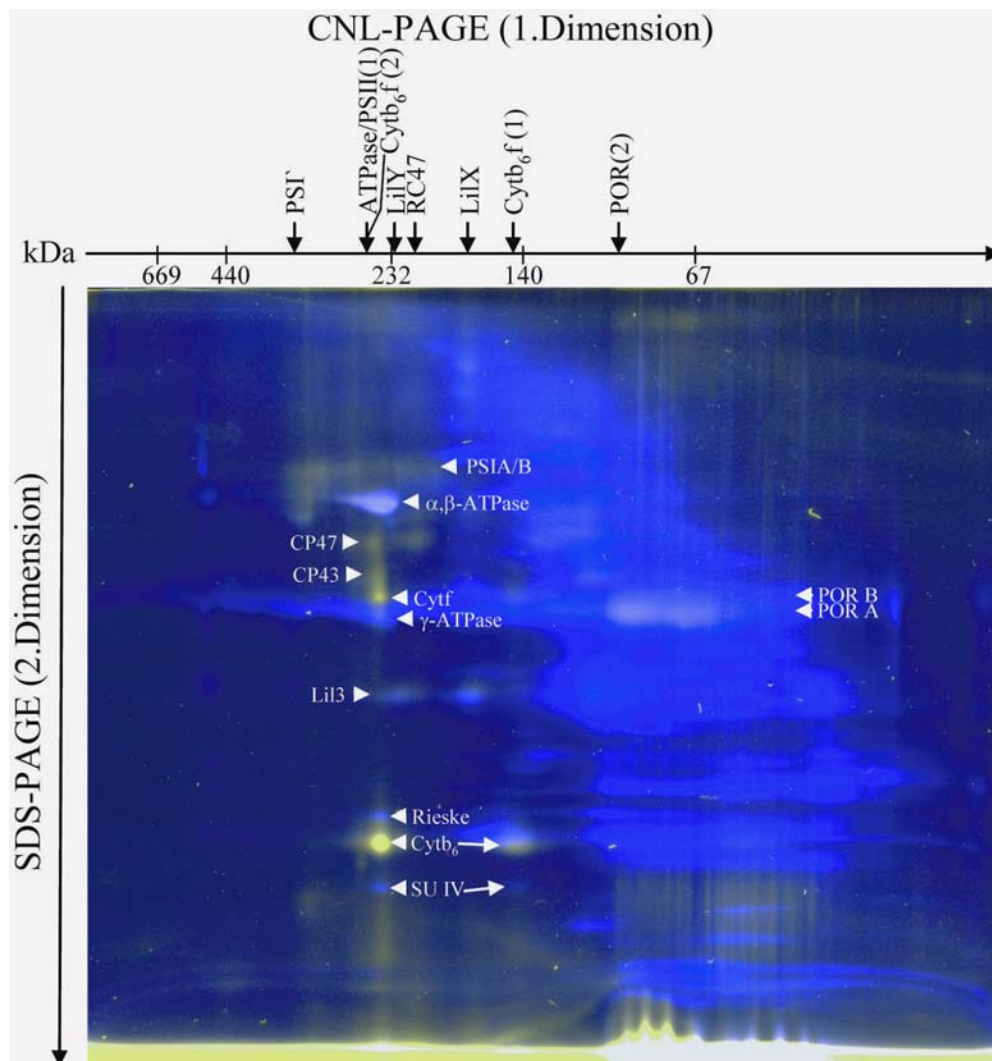


Abb.27 Identifikation von Pigment-bindenden Proteinen durch Cy2

Membrankomplexe von 1×10^8 Plastiden aus 1h L wurden mit Cy2 markiert und über CNL-/SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im Laserscanner ausgelesen. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Cy2 erfolgte bei 488 nm (blaue Spots), die Detektion der Fluoreszenz des Chlorophylls erfolgte bei 633 nm (gelbe Spots). Mit Hilfe der Software „ImageQuant“ wurden die beiden Fluoreszenzbilder überlagert. Weiß gefärbte Banden stellen dabei Proteine dar, die sowohl durch Cy-Markierung wie auch durch Pigmentfluoreszenz sichtbar gemacht werden konnten. Die Beschriftung der Komplexe erfolgte analog Abb.2 und die Beschriftung der Einzelproteine analog Abb.3/Abb.4.

Die Überlagerung der Cy2-Markierung mit der Eigenfluoreszenz der Proteine machte deutlich, dass durch endogene Fluoreszenz Proteine detektierbar waren, die durch die exogene Fluoreszenzmarkierung nicht erfasst wurden. Da diese Proteine nicht färbbar waren und

vermutlich in sehr geringer Menge in der Membran vorlagen, war der Versuch einer massenspektrometrischen Identifikation dieser Banden bisher nicht erfolgreich.

Eine Ausnahme stellte das Protein dar, welches nach CNL/SDS-PAGE in Komplex 4 und 6 sichtbar wurde. Dieses Protein wurde bereits im DIGE-Überlagerungsbild mit „4“ markiert, da es im Etioplasten nicht zu detektieren war. Dieses Protein wurde als Lil 3-Protein identifiziert (Abb.27, Lil3). Die zugehörigen Komplexe wurden als Lil X und Lil Y bezeichnet (Abb.27, Lil3).

In der Bande im Bereich der α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase, welche ein deutliches Fluoreszenzsignal zeigte, konnte durch massenspektrometrische Analyse kein weiteres Protein identifiziert werden, welchem die Co-Faktor-Bindung zugeordnet werden konnte (Abb.27, α , β -ATPase). Die Peptide der α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase dominierten in den MS-Spektren, so dass durch die MS/MS-Analysen nur Peptide dieser beiden Proteine identifiziert wurden. Eine Bindung von fluoreszierenden Pigmenten an die α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase ist in der Literatur nicht beschrieben, so dass weiterhin von einem weiteren, bisher nicht identifizierten Protein in dieser Bande ausgegangen werden muss.

Die Untereinheiten Cyt f und Cyt b_6 des Cyt b_6f -Komplexes, deren fluoreszierende Eigenschaften bereits aus dem Etioplasten bekannt war, konnten durch Cy2-Markierung ebenfalls sichtbar gemacht werden (Abb.27, Cytf/Cytb₆).

Das fluoreszierende Protein des Komplexes 8 wurde nach der Überlagerung mit den Cy2-markierten Proteinen als die POR A identifiziert. Aufgrund der Molekularmasse des Komplexes wurde dieser als dimere Form der POR bezeichnet (Abb.27, POR(2)/PORA).

Durch den Vergleich mit dem Bandenmuster nach CNL/SDS-PAGE des Chloroplasten konnten vier weitere Spots beschriftet werden. So wurde die fluoreszierende Bande des Proteins im Komplex 1 als Kombination der Reaktionszentrumsproteine P700 A und P700 B des PS I identifiziert und der Komplex 1 der CNL-PAGE daher als PS I Γ Komplex bezeichnet. Dieser Komplex zeigte eine etwas höhere Molekularmasse als der im Chloroplasten als PS I bezeichnete Komplex (vgl. Abb.16). Diese Proteine entsprachen den im DIGE-Überlagerungsbild mit 1 beschrifteten Protein (Abb.25, 1). Die anderen beiden autofluoreszenten Proteine aus Abb.26 wurden dem PS II zugeordnet. Dabei wurde CP 47 als Bestandteil der monomeren RCCII-Komplexes (Abb.26, 2) und des RC47-Komplexes (Abb.26, 5) identifiziert (Abb.27, PSII(1)/RC47/CP47). Ebenfalls dem monomeren RCCII-Komplex wurde das fluoreszierende Protein unterhalb des CP47-Proteins zugeordnet

(Abb.27, PSII(1)/CP43). Die Identifikation dieser beiden PS II-Komplexe konnte durch den immunologischen Nachweis des Reaktionszentrumsproteins D2 bestätigt werden (Abb.28).

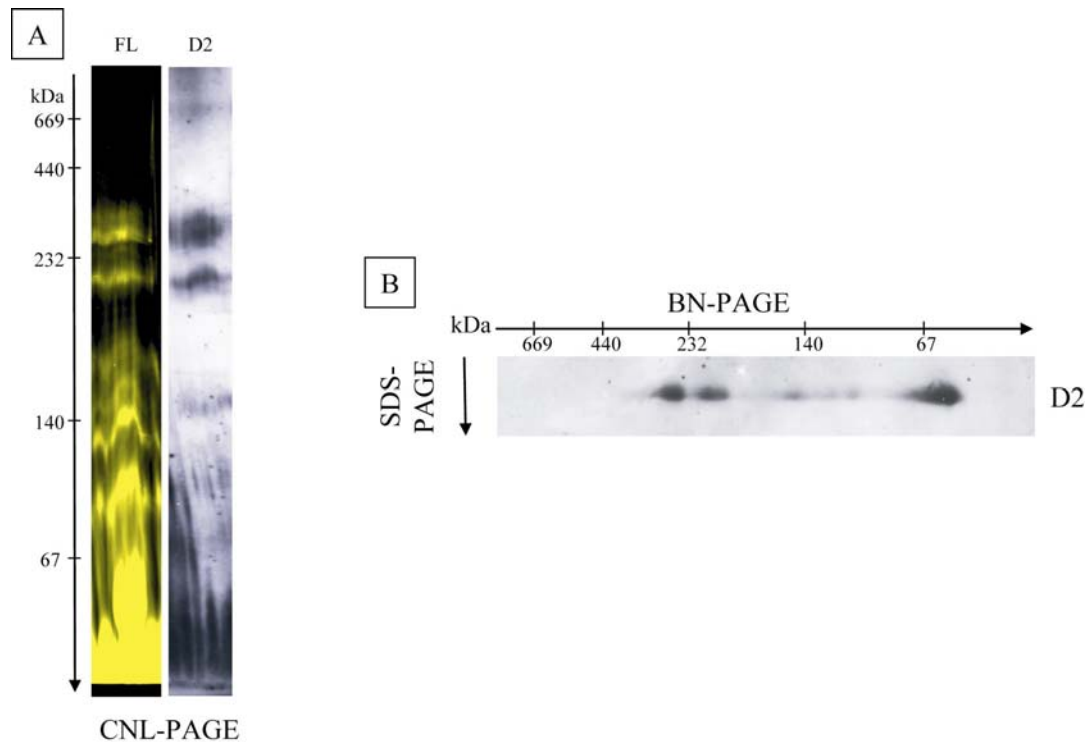


Abb.28 Immunodetektion von D2 Komplexen in 1h L Plastiden

Membrankomplexe von 1×10^8 1h L Plastiden wurden über CNL-PAGE bzw. BN-PAGE aufgetrennt. In beiden Fällen betrug der Gradient des PAG 6-12%. Nach CNL-PAGE und der Detektion der Eigenfluoreszenz der Komplexe (FL) wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach BN-PAGE wurden die Untereinheiten der Komplexe über SDS-PAGE aufgetrennt und ebenfalls auf Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membranen wurden geblockt und mit D2-Antikörper (D2) inkubiert. Nach der Inkubation der Membranen mit sekundärem Antikörper wurden die Proteine über das ECL-System detektiert. Die Molekularmassenbestimmung der Komplexe erfolgte anhand des HMW-Markers.

Neben dem monomeren RCCII- und dem CP47-Komplex konnte D2 auch als Bestandteil von mindestens zwei weiteren Assemblierungsstufen detektiert werden. So wurde D2 auch im Bereich von 140-150 und unter 70 kDa sichtbar (Abb.28, BN-PAGE). Diese beiden Banden wurden als Reaktionszentrumskomplex (RC II) bestehend aus D2 und D1 und als freies Protein interpretiert. Beide Assemblierungsstufen waren durch Eigenfluoreszenz nicht sichtbar. Allerdings hatte sich bereits im Chloroplasten der Nachweis von D2 aufgrund von Eigenfluoreszenz als unmöglich erwiesen (vgl. Abb.16). Dieser Befund ließ sich auch durch den Vergleich der Immunodetektion auf der Ebene der Komplexe mit dem Fluoreszenzbild, welches die Autofluoreszenz der Komplexe wiedergab, bestätigen (Abb.28, CNL-PAGE, FL/D2). Es konnten nur dem monomeren RCCII- und dem RC47-Komplex fluoreszierende Banden zugeordnet werden, auf der Höhe des RC II konnte im Fluoreszenzbild keine der Immunodetektion entsprechende Bande ermittelt werden.

Für die restlichen Banden, die aufgrund von Eigenfluoreszenz detektierbar waren, war keine Identifikation möglich. Den beiden Banden des DIGE-Überlagerungsbildes, die nach einstündiger Belichtung als zusätzliche Banden detektiert werden konnten, konnte zwar ebenfalls ein Fluoreszenzsignal zugeordnet werden, eine erfolgreiche Identifikation dieser Proteine war aber bislang nicht möglich (Abb.25, 2/3).

Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass im DIGE-Überlagerungsbild alle nach einstündiger Belichtung neu hinzugekommenen Proteine durch Eigenfluoreszenz detektiert werden konnten, d.h. scheinbar erst nach Chlorophyllsynthese akkumulieren konnten, da sie scheinbar alle für eine erfolgreiche Akkumulation Pigmente binden müssen. Von diesen vier Proteinen konnte eines als eine Mischung der beiden Reaktionszentrumsproteine des PS I und ein weiteres als Lil3-Protein identifiziert werden. Die Art der gebundenen Pigmente wurde im Folgenden durch Absorptionsspektroskopie bestimmt.

Durch die Identifikation bzw. die Zuordnung der Proteinuntereinheiten zu den einzelnen Komplexen wurde deutlich, dass die Banden 2 bzw. 3 der CNL-PAGE aus mindestens drei verschiedenen Komplexen gebildet wurde (Abb.27, Cytb₆f(2)/PSII(1)/ATPase). Allen anderen fluoreszierenden Banden der CNL-PAGE konnte anhand der fluoreszierenden Untereinheiten jeweils nur ein Komplex zugeordnet werden.

4.3.4 Absorptionsspektroskopie

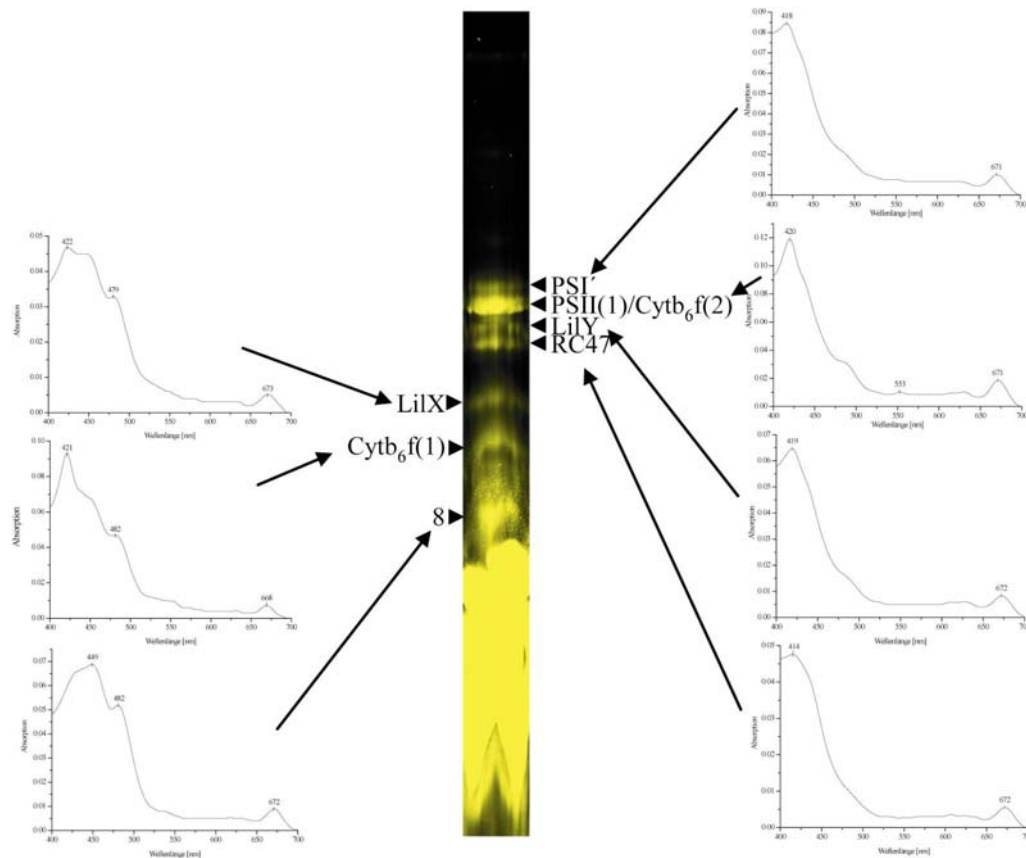


Abb.29 Absorptionsspektren von Komplexen aus etiolierten Keimlingen nach einstündiger Belichtung

Membrankomplexe von 1×10^8 Plastiden aus 1 h L wurden über CNL-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im Fluoreszenzscanner bei 633 nm angeregt (FL) und alle fluoreszierenden Banden mit dem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurden jeweils fünf Banden eines Komplexes übereinander gestapelt und ein Absorptionsspektrum im Bereich von 400-700 nm aufgenommen. Die Beschriftung der Banden erfolgte analog Abb.27.

In allen sieben Banden wurde Chlorophyll a als Bestandteil der Komplexe nachgewiesen, wobei die Menge des gebundenen Chlorophylls in den einzelnen Komplexen unterschiedlich hoch war. Die größte Menge Chlorophyll a konnte in der Mischbande aus dem monomeren RCCII und dem dimeren Cytb_6f -Komplex detektiert werden (Abb.29, PSII(1)/ Cytb_6f (2)). Neben Chlorophyll a und Protochlorophyll wurde aufgrund der Absorptionsspektren in allen Komplexen Carotinoide vermutet.

In mindestens zwei Komplexen konnte wegen des Spektrenverlaufs nicht ausgeschlossen werden, dass neben Chlorophyll a auch geringere Mengen Protochlorophyll in den Komplexen enthalten waren. So schienen sowohl in der Bande des dimeren Cytb_6f -Komplexes wie auch im LilY-Komplex beide Pigmente enthalten zu sein, wobei das Chlorophyll a in beiden Komplexen deutlich überwog (Abb.29, Cytb_6f (2)/LilY). Im Bereich des dimeren Cytb_6f -Komplexes kam es zu einer Überlagerung mit dem monomeren RCC II-

Komplex, so dass keine eindeutige Zuordnung des Chlorophyll a und des Protochlorophyll zum Cytochrom bzw. PS II-Komplex möglich war. Da in der untersten Bande nur Chlorophyll a nachgewiesen werden konnte, musste davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Pigment-bindenden Komponenten dieses Komplexes nicht um POR-Proteine handelte. Im Falle eines POR-Komplexes sollte von der Detektion von Protochlorophyllid anstelle des Chlorophylls ausgegangen werden. Aufgrund der Molekularmasse des als Komplex 8 beschrifteten Komplexes wurde vermutet, dass es sich dabei um einen Komplex handelte, der sich direkt neben dem dimeren POR-Komplex befand (Abb.29, 8). Dessen Untereinheiten konnte nach SDS-PAGE nicht eindeutig bestimmt werden, da weder in der Cy2-Markierung noch im Scan auf Autofluoreszenz eine entsprechende Bande zu detektieren war. Die Pigmente des POR-Komplexes wurden wahrscheinlich nicht spektroskopisch erfasst, da sich der Komplex nach CNL-PAGE im Bereich der Detergenz/ Lipid-Mizellen befand und somit nicht eindeutig als Komplex identifiziert wurde.

Nach einstündiger Belichtung konnte Chlorophyll a bereits in beiden Photosystem-Komplexen, dem Cyt b₆f-Komplex und den Lil-Komplexen detektiert werden, d.h. in allen Komplexen, die potentiell Chlorophyll enthalten können, konnte dieses auch nachgewiesen werden. Allerdings waren für beide Photosysteme nur Assemblierungsstufen bis zu 440 kDa zu detektieren, d.h. die für den Chloroplasten beschriebenen hochmolekularen Komplexe waren nicht nachweisbar. Um die Zahl der Komplexe, die das *de novo* synthetisierte Chlorophyll als erste einbauen, enger einzugrenzen, wurde die Belichtungszeit der etiolierten Keimlinge vor der Plastidenisolation auf 10 Sekunden verkürzt.

4.4 Verteilung von de novo synthetisiertem Chlorophyll auf die Membranproteinkomplexe

4.4.1 Identifikation der gebundenen Pigmente

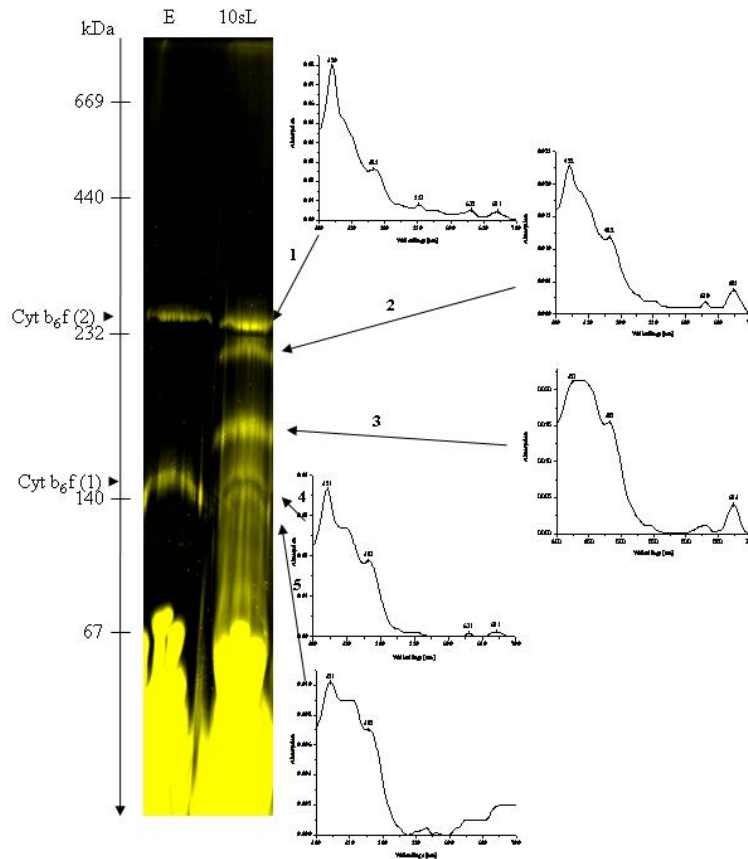


Abb.30 Absorptionsspektren von Komplexen aus 10 Sekunden belichteten (10 s L) Keimlingen

Membrankomplexe von 2×10^8 10 s L Plastiden wurden über CNL-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im Fluoreszenzscanner bei 633 nm angeregt und alle fluoreszierenden Banden mit dem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde von allen Banden ein Absorptionsspektrum im Bereich von 400-700 nm aufgenommen.

Nach CNL-PAGE konnten fünf fluoreszierende Banden detektiert werden. Zwei dieser Banden konnten durch den Vergleich mit den autofluoreszenten Komplexen des Etioplasten als monomere und dimere Assemblierungsstufe des Cyt b_6f -Komplexes identifiziert werden (Abb.30, Cyt $b_6f(2)$ /Cyt $b_6f(1)$ /1/4). Im Absorptionsspektrum des dimeren Cyt b_6f -Komplexes wurden neben Cyt f und Carotinoiden sowohl Protochlorophyll als auch Chlorophyll a sichtbar (Abb.30, 1). Die Maxima bei 632 nm und 671 nm besaßen dabei ungefähr die gleiche Höhe. Im Gegensatz zum monomeren Cyt b_6f -Komplex des Etioplasten schien der monomere Cyt b_6f -Komplex aus 10 s L Plastiden neben Carotinoiden auch Chlorophyll a bzw. Protochlorophyll zu enthalten. Darauf deuteten zumindest die Absorptionsmaxima dieser Bande hin.

Die knapp unterhalb des monomeren Cyt b_6f -Komplexes liegende Bande schien vor allem Carotinoide zu enthalten (Abb.30, 5). Eine Zuordnung weiterer Pigmente war nicht möglich, da vor allem im langwelligen Bereich keine eindeutigen Maxima zu detektieren waren.

Dagegen konnten sowohl in Bande 2 als auch in Bande 3 neben Carotinoiden Chlorophyll a und Protochlorophyllid/ Protochlorophyll detektiert werden, wobei in beiden Banden der Chlorophyll a-Anteil deutlich überwog (Abb.30, 2/3).

Auf Grundlage der Absorptionsspektren wurde der Schluss gezogen, dass die Banden 2 und 3 die Komplexe darstellen, die zu Beginn der Ergrünung als erste das *de novo* synthetisierte Chlorophyll a in größerer Menge binden. Zur Identifikation der beiden Komplexe wurde ein Streifen der CNL-PAGE über SDS-PAGE aufgetrennt.

4.4.2 Identifikation der Chlorophyll a-bindenden Proteinkomplexe

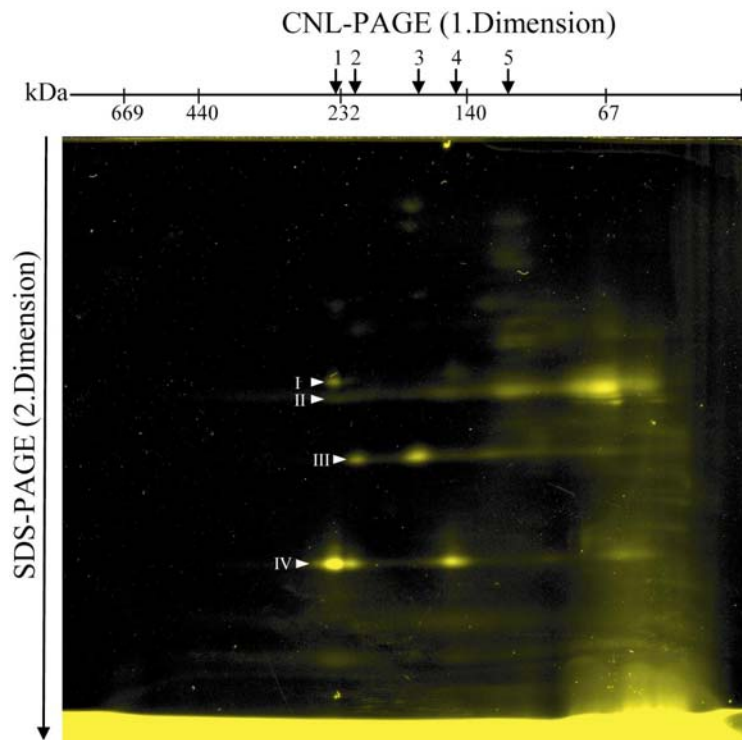


Abb.31 Detektion von Pigment-bindenden Untereinheiten durch Autofluoreszenz

Aus 2×10^8 Plastiden nach 10 s L wurden Membranproteinkomplexe isoliert und über CNL/SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der SDS-Elektrophorese wurde das Gel im Laserscanner bei 633 nm angeregt und die fluoreszierenden Untereinheiten detektiert.

Die Komplexe des Etioplasten wurden mit Cyt b_6f (2) bzw. Cyt b_6f (1) beschriftet. Alle detektierten Komplexe, welche nach 10 s L sichtbar wurden, wurden mit den Zahlen von 1 bis 5 beschriftet. Die Molekularmassenbestimmung der Komplexe erfolgte anhand des HMW-Markers. Die vier Proteine, welche nach SDS-PAGE das intensivste Fluoreszenzsignal zeigten, wurden mit I-IV bezeichnet.

Nach der Trennung der Komplexuntereinheiten konnten mehrere Proteine nach Anregung bei 633 nm sichtbar gemacht werden (Abb.31). Die vier Proteine, welche das intensivste

Fluoreszenzsignal lieferten, wurden mit den Zahlen von I bis IV beschriftet. Bei Protein I handelte es sich um Cyt f, welches dem dimeren Cyt b_6f -Komplex zugeordnet wurde (Abb.31, 1, I).

Durch die Detektion der Autofluoreszenz konnte mit Cyt b_6 eine weitere Untereinheit dieses Komplexes sichtbar gemacht werden (Abb.31, 1, IV). Neben der dimeren Assemblierungsstufe war dieses Protein Bestandteil des monomeren Cyt b_6f -Komplexes (Abb.31, 4, IV). Ob es sich bei der fluoreszierenden Bande direkt neben Cyt b_6 im dimeren Cyt b_6f -Komplex ebenfalls um Cyt b_6 handelte, konnte bisher nicht geklärt werden. Durchgeführte massenspektrometrische Analysen dieser Bande verliefen bisher nicht erfolgreich.

Protein II wurde als POR A identifiziert (Abb.31, II). Aufgrund der Fluoreszenzverteilung im SDS-Gel wurde geschlossen, dass die Bande 5 nach CNL-PAGE durch dieses Protein verursacht wurde (Abb.31, 5, II). Dieser Komplex könnte somit der dimeren Form des POR-Komplexes entsprechen. Da für die Bande 5 durch die Absorptionsspektroskopie weder Chlorophyll noch Protochlorophyllid nachgewiesen werden konnte, konnte auch aufgrund des gebundenen Pigments kein Rückschluss auf die Identität dieses Komplexes gezogen werden.

Die Bande, welche im SDS-Gel oberhalb des Cyt b_6 -Proteins lag, wurde anhand von insgesamt vier Peptiden massenspektrometrisch als Lil 3-Protein identifiziert (Abb.31, III). Dieses Protein wurde in zwei Komplexen im Bereich von 210-250 und 160-180 kDa sichtbar (Abb.31, 2/3, III). Lil 3 stellte dabei die einzige fluoreszierende Untereinheit der beiden Komplexe nach SDS-PAGE dar. Diese beiden Lil-Komplexe wurden auch nach einstündiger Belichtung aufgrund von Autofluoreszenz sichtbar (vgl. Abb.26). Allerdings konnte nach einstündiger Belichtung kein Protochlorophyll mehr nachgewiesen werden; die beiden Komplexe schienen zu diesem Zeitpunkt nur noch Chlorophyll a zu enthalten.

Durch die Identifikation der Proteinuntereinheiten wurde deutlich, dass die größte Menge des *de novo* synthetisierten Chlorophylls zuerst nicht an Komplexe der photosynthetischen Elektronentransportkette gebunden wurde, sondern sich in zwei Komplexen, dessen Bestandteil Lil 3 war, befand. Nach 10 s Belichtung konnte keine der Chlorophyll-bindenden Untereinheiten der beiden Photosysteme aufgrund von Chlorophyll-Bindung sichtbar gemacht werden. Der einzige Komplex der photosynthetischen Elektronentransportkette, in dem bereits nach 10 s Belichtung Chlorophyll a nachgewiesen werden konnte, war der dimere Cyt b_6f -Komplex.

4.5 Charakterisierung der Membrankomplexe nach zweistündiger Belichtung etiolierter Keimlinge

Nach einstündiger Belichtung konnte Chlorophyll a in drei verschiedenen Assemblierungsstufen der Photosysteme, im dimeren Cyt b₆f- und zwei LiI3-Komplexen nachgewiesen werden. Um die weitere Entwicklung der Chlorophyll-bindenden Komplexe zu verfolgen, wurde die Belichtungsdauer der etiolierten Keimlinge auf zwei Stunden (2h L) verdoppelt.

4.5.1 DIGE von Membrankomplexen nach einstündiger und zweistündiger Belichtung etiolierter Keimlinge

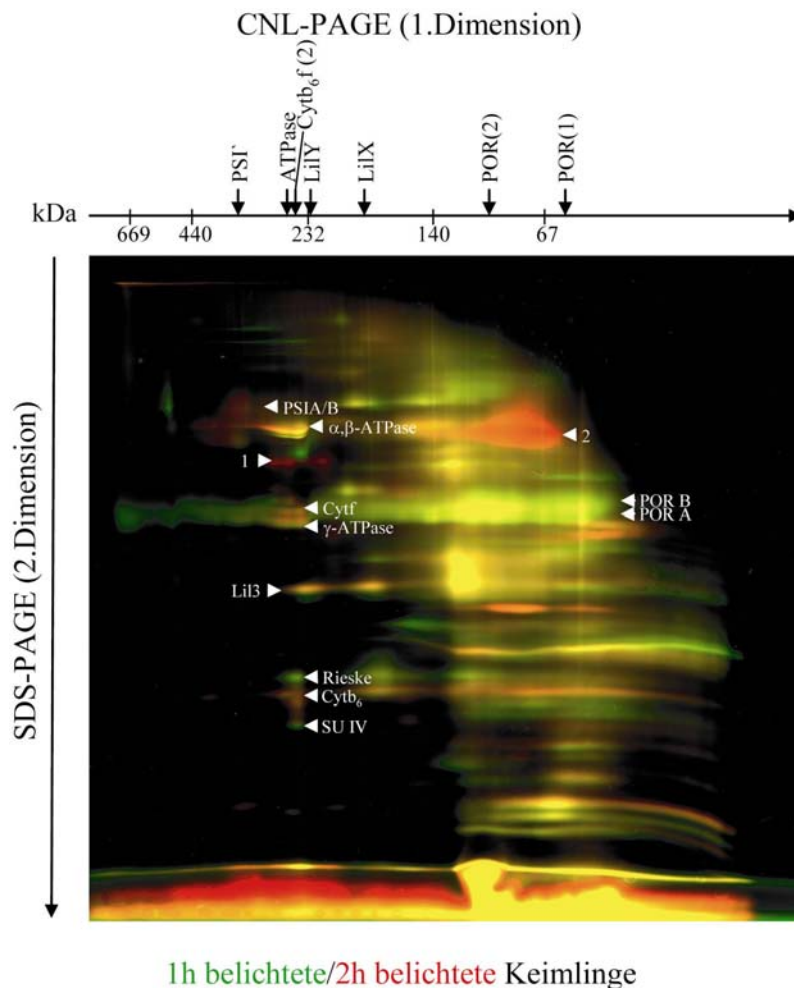


Abb.32 DIGE von Membranproteinkomplexen von Plastiden nach 1h L und 2h L

Membranen aus 5×10^7 Plastiden nach 1h L bzw. 2h L wurden mit Cy2 bzw. Cy5 markiert. Nach dem Stoppen der Markierungsreaktion mit L-Lysin wurden die beiden Proben gemischt und die gemischte Probe wie in Abb.10 beschrieben über CNL-PAGE aufgetrennt. Nach der SDS-Solubilisierung des nativen Gels wurden die Proteinkomplexe durch SDS-PAGE in ihre Untereinheiten zerlegt. Nach dem Gellauf wurden die

fluoreszenzmarkierten Untereinheiten der Membrankomplexe nach 1h L durch Anregung bei 488 nm sichtbar gemacht. Die Untereinheiten der Membrankomplexe nach 2h L, die mit Cy5 markiert waren, wurden durch Fluoreszenzanregung bei 633 nm sichtbar gemacht. Mit Hilfe der Software „ImageQuant“ wurde ein Überlagerungsbild beider Plastidentypen erzeugt. Dabei stellen grün gefärbte Spots Proteine nach 1h L, rot gefärbte Spots Proteine nach 2h L und gelb gefärbte Spots Proteine, die sich in beiden Plastidentypen entsprechen, dar.

Die Beschriftung der Proteinkomplexe erfolgte analog zu Abb.2, die Beschriftung der Einzelproteine analog zu Abb.3 bzw. Abb.4. Die Zahlen von 1 und 2 bezeichnen Proteine, welche erstmals nach zweistündiger Belichtung zu detektieren waren.

Durch die verlängerte Belichtungszeit wurden zwei zusätzliche Einzelproteine detektiert (Abb.32, 1/2). Eines dieser Proteine wurde dabei nur in einer Assemblierungsstufe sichtbar. Aufgrund seiner Molekularmasse war nicht auszuschließen, dass dieses Protein nicht als Bestandteil eines Komplexes, sondern als Einzelprotein vorlag (Abb.32, 2). Dagegen schien das zweite Protein in mindestens zwei Assemblierungsstufen enthalten zu sein (Abb.32, 2). Dabei handelte es sich um Komplexe mit einer Molekularmasse von 190-230 bzw. 280-310 kDa. Die Bindung von Chlorophyll an diese Proteine wurde anschließend überprüft.

Alle weiteren Proteine, welche durch Fluoreszenzmarkierung sichtbar wurden, waren bereits aus dem Fluoreszenzbild nach einstündiger Belichtung bekannt. So waren nach zweistündiger Belichtung als Vertreter der Chlorophyll a-bindenden Komplexe sowohl die beiden Lil 3-Komplexe und der PSI-Intermediatskomplex wie auch der dimere Cyt b₆f-Komplex zu detektieren (Abb.32, LilX/LilY/PSI/Cytb₆f(2)). Als weiterer Pigment-bindender Komplex konnte in beiden Belichtungsstufen die POR in mehreren Assemblierungsstufen nachgewiesen werden, wobei die höhermolekularen Komplexe über 230 kDa nach zweistündiger Belichtung kaum mehr sichtbar waren (Abb.32, POR(1)/POR(2)).

Einige der Proteine, welche nach einstündiger Belichtung deutlich markiert vorlagen, waren nach zweistündiger Belichtung nicht mehr zu detektieren. Da diese Proteine nach SDS-PAGE allerdings keine Autofluoreszenz zeigten d.h. kein Hinweis auf eine Chlorophyll-Bindung vorlag, wurden sie nicht näher untersucht.

4.5.2 Nachweis der Pigment-bindenden Proteine in Komplexen bzw. Komplexuntereinheiten anhand endogener Fluoreszenz

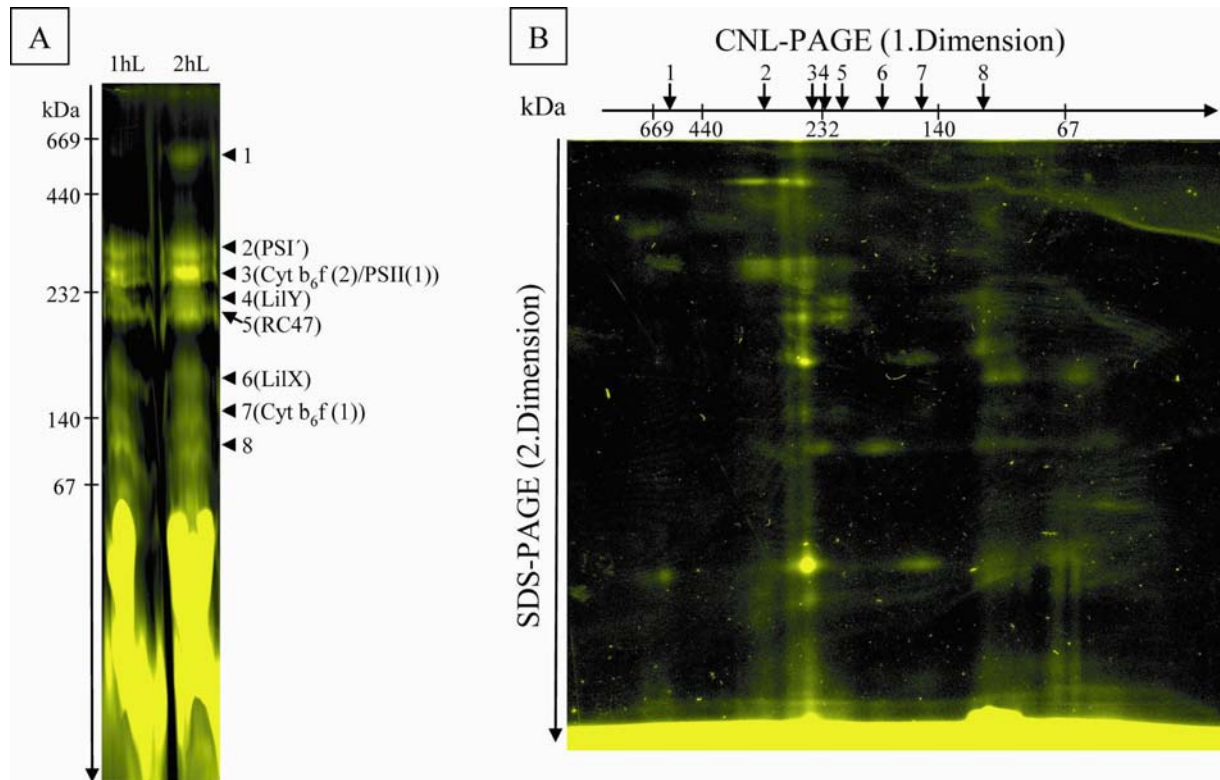


Abb.33 Fluoreszenzdetektion von Proteinkomplexen (A) und Einzelproteinen (B) nach 2h L

Aus 1×10^8 Plastiden nach 1h L bzw. 2h L wurden Membranproteinkomplexe isoliert und über CNL-PAGE aufgetrennt. Nach der nativen Elektrophorese wurde das Gel im Laserscanner bei 633 nm angeregt und die fluoreszierenden Komplexe detektiert (A). Anschließend wurde eine Spur der 2h L Komplexe in Solubilisierungspuffer inkubiert und die Komplexuntereinheiten über SDS-PAGE getrennt. Nach dem Gellauf wurde die Fluoreszenz der Einzelproteine durch Laseranregung bei 633 nm sichtbar gemacht (B).

Die aus 1h L bekannten Komplexe wurden entsprechend Abb.27 beschriftet und in Klammern hinter die entsprechenden Zahlen gesetzt. Alle detektierten Komplexe, welche in der Spur nach 2h L sichtbar wurden, wurden mit den Zahlen von 1 bis 8 beschriftet. Die Molekularmassenbestimmung der Komplexe erfolgte anhand des HMW-Markers.

Nach CNL-PAGE wurde nach zweistündiger Belichtung im Bereich von 540-590 kDa ein Komplex sichtbar, der bei kürzerer Belichtung noch nicht nachzuweisen war (Abb.33 A, 1). Der Vergleich mit den fluoreszierenden Banden nach CNL/SDS-PAGE zeigte in diesem Bereich eine schwach fluoreszierende Bande, welche eine Molekularmasse unter 20 kDa besaß (Abb.33 B, 1).

Alle anderen Komplexe, die nach zweistündiger Belichtung sichtbar wurden, konnte eine entsprechende Bande in der CNL-Spur der 1hL Plastiden zugeordnet werden (Abb.33 A, 2-8).

Die Trennung dieser Komplexe über SDS-PAGE führte für alle acht Komplexe zu fluoreszierenden Untereinheiten.

So wurden Komplex 2, der nach einstündiger Belichtung als PS I-Assemblierungsintermediat charakterisiert wurde, zwei fluoreszierende Einzelproteine zugeordnet, wobei die Bande im hochmolekularen Bereich ein stärkeres Fluoreszenzsignal zeigte (Abb.33, 2).

Die Bande im Bereich von Komplex 3 spaltete sich in neun fluoreszierende Untereinheiten auf (Abb.33, 3). Diese Bande wurde nach einstündiger Belichtung als Mischung von mindestens drei verschiedenen Komplexen (Cyt_b₆f(2)/PSII(2)/ATPase) beschrieben. Daher musste davon ausgegangen werden, dass nach zweistündiger Belichtung im Bereich von Bande 3 mehr als ein Komplex enthalten war. Die beiden Einzelproteine, die dabei die stärksten Fluoreszenzsignale zeigten, wurden aufgrund ihrer Molekularmasse dem Cyt b₆f-Komplex zugeordnet. Zur Identifikation aller weiteren Proteine wurde das Bild der Eigenfluoreszenz mit der Cy2-Markierung überlagert.

In der Mitte des Gels wurde nach SDS-PAGE eine fluoreszierende Untereinheit sichtbar, die von der Bande 4 der CNL-PAGE stammte (Abb.33, 4). Der Vergleich mit dem Fluoreszenzbild der 1h L-Einzelproteine deutete auf das Lil 3-Protein hin. Lil 3 schien auch als einziger fluoreszierender Bestandteil in Komplex 6 enthalten zu sein (Abb.33, 6).

Dem Komplex 5 konnte eine fluoreszierende Untereinheit zugeordnet werden, welche ebenfalls in der Bande des Komplexes 2 enthalten zu sein schien. Aufgrund der Molekularmasse und den Ergebnissen der vorherigen Versuche könnte dieses Protein das innere Antennenprotein CP47 des PS II darstellen (Abb.33, 5).

Die Fluoreszenz von Bande 7 wurde durch zwei Einzelproteine verursacht, die von den Molekularmassen den fluoreszierenden Untereinheiten des dimeren Cyt b₆f-Komplexes entsprachen (Abb.33, 7). Allerdings besaßen beide Fluoreszenzsignale eine schwächere Signalintensität als die beiden Proteine des dimeren Cyt b₆f-Komplexes.

Ungefähr die gleiche Signalstärke wie die Banden des Komplexes 7 zeigte die autofluoreszente Bande des Komplexes 8, die neben diesem Komplex in einem weiteren Assemblierungsintermediat im Bereich der Lauffront der CNL-PAGE enthalten zu sein schien (Abb.33, 8).

Die zusätzlich auftretenden Fluoreszenzerscheinungen im Gelbild konnten aufgrund ihres Trennverhaltens nicht eindeutig als Banden, welche durch die Auftrennung von Proteinen entstanden waren, identifiziert werden und wurden daher nicht näher charakterisiert. Die Identifikation der fluoreszierenden Einzelproteine wurde durch eine Überlagerung dieses Fluoreszenzbildes mit dem Bild der Cy2-Markierung durchgeführt. Dabei wurden auch die bereits getroffenen Identifikationen überprüft.

4.5.3 Identifikation der Pigment-bindenden Komplexuntereinheiten

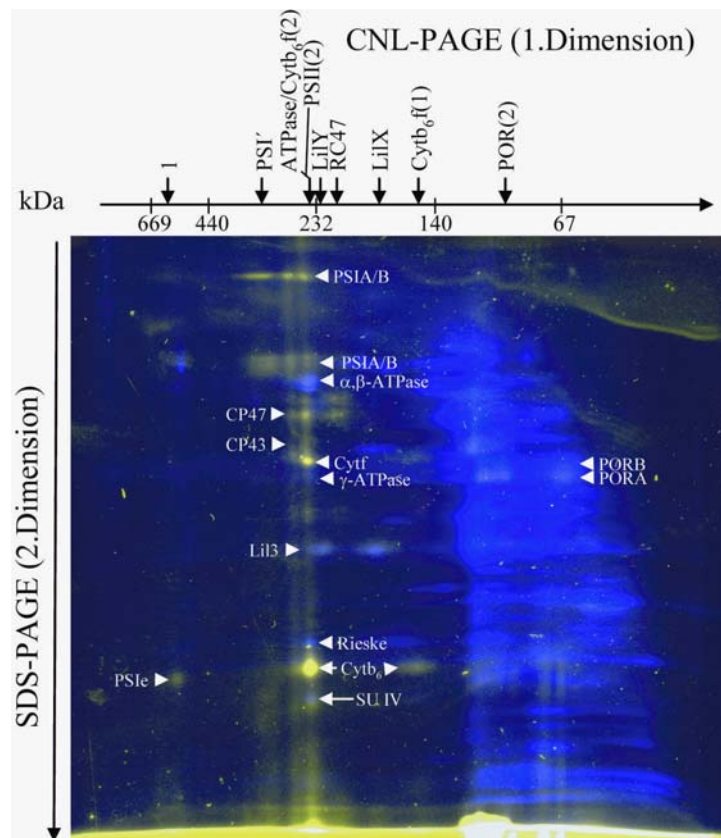


Abb.34 Überlagerung von autofluoreszenten Cy2-markierten Proteinen

Membrankomplexe von 1×10^8 Plastiden aus 2h L wurden mit Cy2 markiert und über CNL-/SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im Laserscanner ausgelesen. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Cy2 erfolgte bei 488 nm (blaue Spots), die Detektion der Fluoreszenz des Chlorophylls erfolgte bei 633 nm (gelbe Spots). Mit Hilfe der Software „ImageQuant“ wurden die beiden Fluoreszenzbilder überlagert. Weiß gefärbte Banden stellen dabei Proteine dar, die sowohl durch Cy-Markierung wie auch durch Pigmentfluoreszenz sichtbar gemacht werden konnten. Die Beschriftung der Komplexe erfolgte analog Abb.2 und die Beschriftung der Einzelproteine analog Abb.3/Abb.4

Durch die Überlagerung des Autofluoreszenzbildes konnte sowohl die Identifikation der Komplexe 4 und 6 als Lil X- und Lil Y-Komplex als auch die Zuordnung der Banden 3 bzw. 7 zum dimeren bzw. monomeren Cyt b_6f -Komplex bestätigt werden (Abb.34, LilX/LilY/Cyt $b_6f(2)$ /Cyt $b_6f(1)$). In diesen Komplexen konnten die fluoreszierenden Untereinheiten auch durch die Cy2-Markierung sichtbar gemacht werden. Dem dimeren Cyt b_6f -Komplex konnten nach der Cy2-Markierung zwei weitere Untereinheiten zugeordnet werden, die keine Pigmente gebunden zu haben schienen (Abb.34, SUIV/Rieske). Dabei wurde deutlich, dass die fluoreszierende Bande, die sich unterhalb der Untereinheit b_6 befand, keine weitere bekannte Untereinheit des Cyt b_6f -Komplexes darstellte. Dieser autofluoreszenten Bande konnte keine bekannte Komplexuntereinheit zugeordnet werden, vor allem, da sie in der Cy2-Markierung nicht zu detektieren war.

Wie die Untereinheiten Lil 3, Cyt f und Cyt b₆ konnte die POR A bei beiden Anregungswellenlängen sichtbar gemacht werden. Dabei waren in der Cy-Markierung zwei deutlich getrennte Assemblierungsstufen zu unterscheiden, wobei der höhermolekulare Komplex, den dimeren POR-Komplex repräsentieren könnte (Abb.34, POR(1)/POR(2), POR A). Dieser Komplex entsprach Komplex 8 nach CNL-PAGE. Neben der POR A wurde in beiden POR-Komplexen die POR B durch die Fluoreszenzmarkierung sichtbar (Abb.34, PORB). Dabei wurde deutlich, dass diese Untereinheit nach SDS-PAGE in keiner Assemblierungsstufe Pigment gebunden hatte.

Ein weiteres Protein, welches in beiden Bildern nachweisbar war, lag im Bereich der α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase (Abb.34, α,β -ATPase). Dieses Protein trat bereits in einem Komplex auf, welcher aus 1 h L Plastiden isoliert wurde. Bei verlängerter Belichtung schien die Fluoreszenzintensität allerdings abzunehmen. Die Identifikation dieses Proteins war, wie bereits zuvor beschrieben, noch nicht möglich.

Alle weiteren autofluoreszenten Proteinuntereinheiten waren in der Cy2-Markierung nicht sichtbar. Durch den Vergleich mit dem CNL/SDS-Gel des Chloroplasten und der Verwendung des D2-Antikörpers wurde versucht, die restlichen Komplexe näher zu charakterisieren.

Durch den Vergleich mit dem SDS-Gel des Chloroplasten wurde das Protein oberhalb der α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase den Untereinheiten P700 A bzw. P700 B des PS I zugeordnet (Abb.34, PSIA/B). Dabei konnten drei voneinander getrennte Assemblierungsstufen unterschieden werden. Der Komplex mit der höchsten Molekularmasse war nach einstündiger Belichtung bereits als PSI'-Komplex bezeichnet worden (Abb.34, PSI'). Daran direkt anschließend konnte ein weiteres Assemblierungsintermediat detektiert werden, welches dem im Chloroplasten als PSI-Komplex beschriebenen Komplex zu entsprechen schien. Die dritte Assemblierungsstufe schloss sich im niedermolekularen Bereich direkt an den PSI-Komplex an. Die beiden zuletzt genannten Assemblierungsstufen waren nach CNL-PAGE wohl beide in der Bande 3 enthalten, da der Unterschied in der Molekularmasse nur sehr gering war und die beiden Komplexe somit in der nativen PAGE nicht vollständig voneinander getrennt wurden. Allen drei Assemblierungsstufen war gemeinsam, dass die beiden Untereinheiten P700 A und P700 B nicht nur als Einzelproteine vorlagen, sondern auch im SDS-Gel als Subkomplex im hochmolekularen Bereich nachgewiesen werden konnten.

Dem PS I könnte eventuell ein weiterer Komplex zugeordnet werden, der allerdings nur aufgrund eines Proteins und dem Vergleich mit dem Fluoreszenzbild des Chloroplasten

identifiziert wurde. Dabei handelte es sich nach CNL-PAGE um den Komplex 1. Bei dessen Untereinheit im niedermolekularen Bereich könnte es sich möglicherweise um die Untereinheit e des PS I handeln (Abb.34, 1/PSI e). Da weder geeignete Antikörper zur Verfügung standen, noch eine massenspektrometrische Identifikation erfolgreich verlief, konnte diese Zuordnung nicht verifiziert werden.

Im Gegensatz dazu konnte die Identifikation der Assemblierungsstufen des PS II durch den immunologischen Nachweis des Reaktionszentrumsproteins D2 überprüft werden (Abb.35). Zuerst wurde allerdings versucht, die Komplexe des PS II anhand von Pigmentfluoreszenz oder Cy-Markierung zu identifizieren. Durch den Vergleich mit der vorhergehenden Zeitstufe wurden die Banden 3 und 5 der CNL-PAGE dem PS II zugeordnet. Bande 3 mit einem Molekulargewicht von 280-350 kDa entsprach dabei dem monomeren RCCII-Komplex, von welchem die beiden inneren Antennenproteine CP43 und CP47 aufgrund von Pigmentbindung sichtbar wurden (Abb.34, CP43/CP47). Bande 5 wurde durch die Vorstufe dieses Komplexes, den RC47-Komplex gebildet. Dieser Komplex wurde anhand des Proteins CP47 identifiziert (Abb.34, CP47). Durch den Vergleich mit der ebenfalls durchgeführten Immunodetektion wurden die Aussagen über die Komplexe des PS II überprüft.

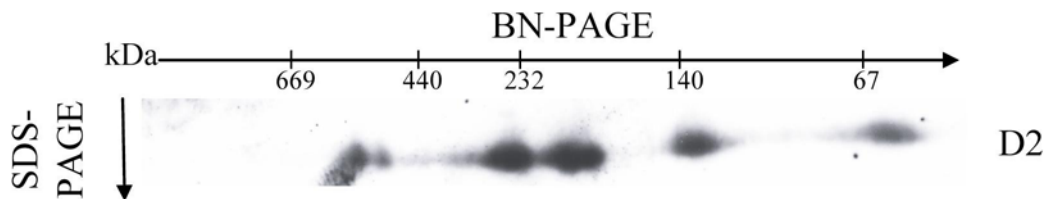


Abb.35 Immunodetektion von D2-haltigen Komplexen in 2h L Plastiden

Membrankomplexe von 1×10^8 2h L Plastiden wurden über BN/SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membranen wurden geblockt und mit D2-Antikörper (D2) inkubiert. Nach der Inkubation der Membranen mit sekundärem Antikörper wurden die Proteine über das ECL-System detektiert.

Die Molekularmassenbestimmung der Komplexe erfolgte anhand des HMW-Markers.

Obwohl sowohl D2 wie auch D1 als Chlorophyll-bindende Proteine bekannt sind, waren beide nicht durch Autofluoreszenz zu detektieren. Allerdings konnte D2 durch Immunodetektion als Bestandteil verschiedener Assemblierungsstufen nachgewiesen werden (Abb.35). Dadurch konnte bestätigt werden, dass es sich bei den Banden 3 und 5 der CNL-PAGE tatsächlich um Komplexe des PS II handelte. Zusätzlich zu diesen beiden Komplexen wurden noch drei weitere Assemblierungsstufen detektiert, wobei D2 sowohl im RCII im Bereich von 130-150 kDa als auch unter 70 kDa detektiert werden konnten. Diese beiden Assemblierungsstufen konnten bereits nach einstündiger Belichtung nachgewiesen werden. Dagegen konnte der Komplex im Bereich von 540-590 kDa nach einstündiger Belichtung noch nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Molekularmasse wurde davon ausgegangen,

dass es sich bei diesem Komplex um die dimere Form des RCC II handelte. Interessanterweise konnte in der zweiten Dimension im Scan auf Eigenfluoreszenz weder CP43 noch CP47 in diesem Molekularmassenbereich sichtbar gemacht werden (vgl. Abb.33 B, 1).

Durch den Vergleich der Ergebnisse aus dem Überlagerungsbild der Autofluoreszenz/Cy2-Markierung (Abb.34) mit dem DIGE-Experiment (Abb.32) konnte eines der beiden zusätzlich detektierten Proteine identifiziert werden. So hatte Protein 2 nach SDS-PAGE Pigment gebunden und wurde im Autofluoreszenz/Cy2-Bild a als inneres Antennenprotein CP 47 des PS II charakterisiert (Abb.32, 1, Abb.34, CP47). Das andere Protein, welches im DIGE-Experiment nach zwei Stunden Belichtung erstmals sichtbar wurde, zeigte nach SDS-PAGE keine Eigenfluoreszenz und wurde somit nicht weiter untersucht (Abb.32, 2).

Nach Verlängerung der Belichtung auf zwei Stunden ließen sich somit zwei zusätzliche Komplexe identifizieren, die nach einstündiger Belichtung noch nicht zu detektieren waren. Dabei handelte es sich zum einen um eine weitere Assemblierungsstufe des PS I, zum anderen um den dimeren RCC II. Alle Komplexe, die für frühere Stadien der Ergrünung beschrieben wurden, traten auch nach zweistündiger Belichtung auf. Allerdings nahmen die POR-Komplexe im hochmolekularen Bereich in Bezug auf die Quantität ab.

Ob sich die Zusammensetzung des gebundenen Pigments in den 2h L Plastiden von der Art des Pigments in den Komplexen nach einstündiger Belichtung unterschied, wurde durch Absorptionsspektroskopie der einzelnen Komplexe untersucht.

4.5.4 Charakterisierung der an die Proteinkomplexe gebundenen Pigmente

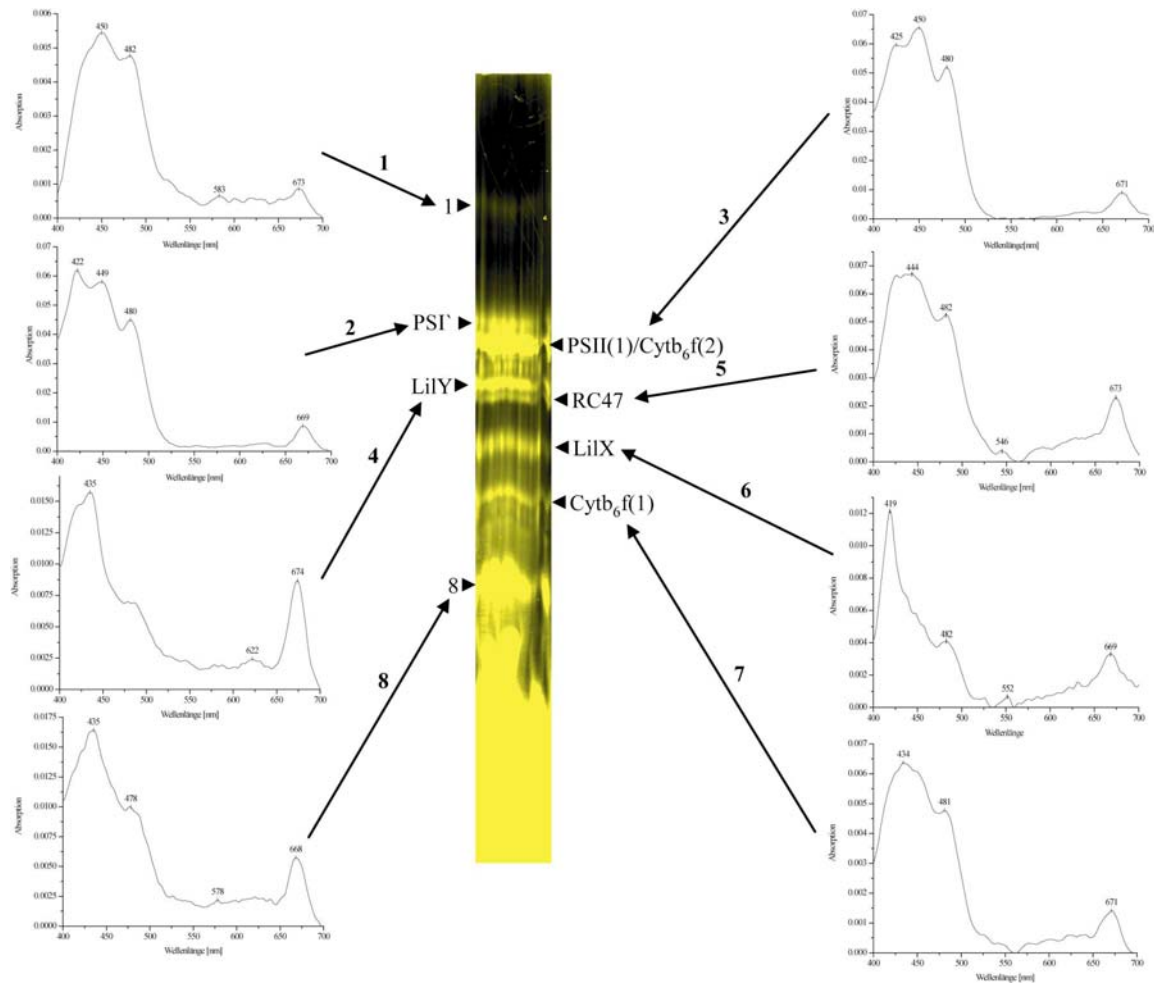


Abb.36 Absorptionsspektren von Komplexen aus 2h L Keimlingen

Membrankomplexe von 1×10^8 2h L Plastiden wurden über CNL-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im Fluoreszenzscanner bei 633 nm angeregt und alle fluoreszierenden Banden mit dem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurden jeweils fünf gleiche Banden kombiniert und von allen Banden ein Absorptionsspektrum im Bereich von 400-700 nm aufgenommen.

In allen untersuchten Komplexen konnten sowohl Chlorophyll a als auch Carotinoide nachgewiesen werden (Abb.36). Dabei wurde die höchste Chlorophyll a-Absorption in den Komplexen 3 und 4 gemessen, d.h. im Intermediatskomplex des PS I und dem monomeren RCC II (Abb.36, 3/4, PSI/PSII(1)). Durch die Auswertung des Spektrums von Komplex 8 wurde deutlich, dass das Fluoreszenzsignal dieser nach CNL-PAGE deutlich abgrenzbaren Bande wohl nicht von Protochlorophyllid stammt, sondern entweder von noch nicht vom dimeren POR-Komplex abgegebenen Chlorophyllid oder einem weiteren Protein, welches nicht eindeutig zu identifizieren war (Abb.36, 8).

Protochlorophyll, welches nach einstündiger Belichtung noch in einigen Komplexen enthalten war, konnte nach zweistündiger Belichtung in keiner Bande mehr eindeutig detektiert werden. Ebenso war das Absorptionsmaximum bei 553 nm, welches für Cyt f des Cyt b_6f -Komplexes

charakteristisch war, in keinem Spektrum mehr nachzuweisen. Da die molekulare Masse des dimeren Cyt b_6f -Komplexes im Bereich des monomeren RCCII-Komplex liegt, könnte durch die mengenmäßige Zunahme der Photosystem-Komplexe und damit der Chlorophyllmenge die Absorption des Cyt f überdeckt worden sein.

Dagegen war nicht auszuschließen, dass in einigen Komplexen neben Chlorophyll a auch geringe Mengen Chlorophyll b vorhanden waren. So besaßen die Komplexe 6, 7 und 8 im Bereich des langwelligen Chlorophyll a -Maximums eine Schulter bei ca. 650 nm, die auf die Gegenwart von Chlorophyll b hindeuten könnte.

Damit konnten nach zweistündiger Belichtung sowohl der PS I- als auch RCC II-Komplex in Kombination mit Chlorophyll a in ihrer maturen Form nachgewiesen werden. Aufgrund der vorliegenden Absorptionsspektren konnte der Beginn der Chlorophyll b -Synthese und damit der Bildung von LHC-Proteinkomplexen nicht völlig ausgeschlossen werden, so dass ab diesem Zeitpunkt prinzipiell alle an der Photosynthese beteiligten Chlorophyll-bindenden Einzelproteine zur Verfügung stehen könnten.

Während auf der einen Seite eine Zunahme der Chlorophyll-bindenden Proteine im Allgemeinen bzw. eine Molekularmassenzunahme der von ihnen gebildeten Komplexe im Besonderen zu beobachten war, konnte auf der anderen Seite eine Abnahme der hochmolekularen POR-Komplexe beobachtet werden, wobei in keinem dieser Komplexe Protochlorophyllid sichtbar gemacht werden konnte. Da nach einer Belichtungszeit von zwei Stunden weder Chlorophyll b zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, noch die LHC-Proteinkomplexe und die damit assoziierten Superkomplexe direkt detektiert werden konnten, wurde die Belichtungszeit der etiolierten Keimlinge auf vier Stunden verdoppelt.

4.6 Charakterisierung der Membrankomplexe nach vierstündiger Belichtung etiolierter Keimlinge

4.6.1 DIGE von Membrankomplexen nach zweistündiger und vierstündiger Belichtung etiolierter Keimlinge

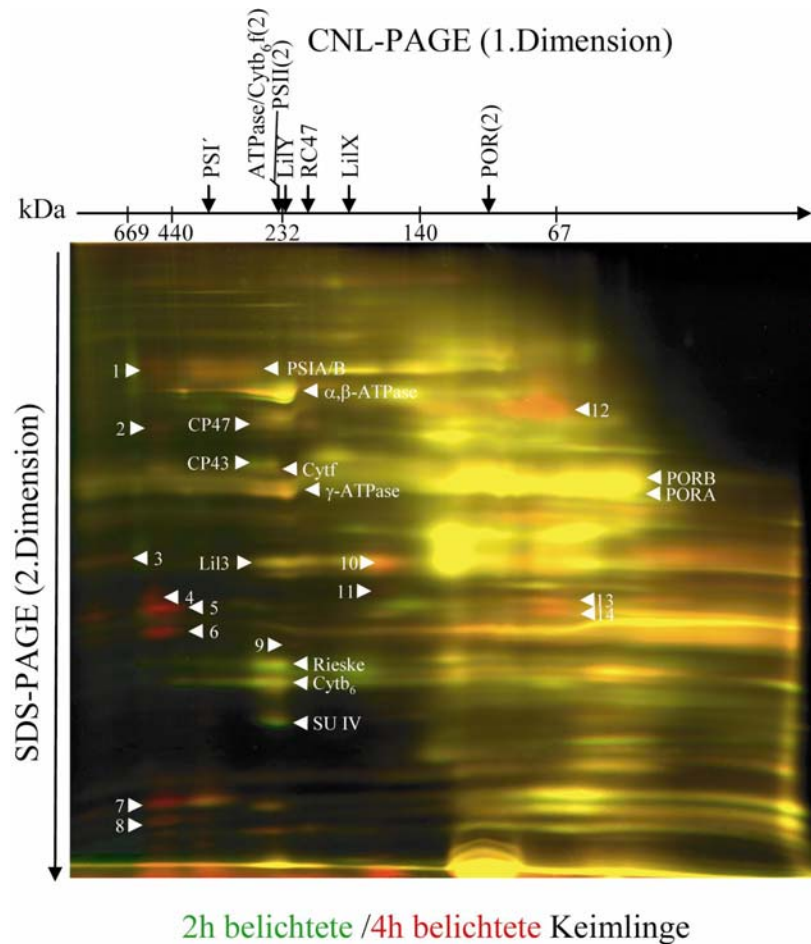


Abb.37 DIGE von Membranproteinkomplexen von Plastiden nach 2h L und 4h L

Membranen aus 5×10^7 Plastiden nach 2h L bzw. 4h L wurden mit Cy2 bzw. Cy5 markiert. Nach dem Stoppen der Markierungsreaktion mit L-Lysin wurden die beiden Proben gemischt und die gemischte Probe wie in Abb.10 beschrieben über CNL-PAGE aufgetrennt. Nach der SDS-Solubilisierung des nativen Gels wurden die Untereinheiten der Proteinkomplexe durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurden die fluoreszenzmarkierten Untereinheiten der Membrankomplexe nach 2h L durch Anregung bei 488 nm als grüne Spots sichtbar gemacht. Die Untereinheiten der Membrankomplexe nach 4h L, die mit Cy5 markiert waren, wurden durch Fluoreszenzanregung bei 633 nm als rote Spots sichtbar gemacht. Mit Hilfe der Software „ImageQuant“ wurde ein Überlagerungsbild beider Plastidentypen erzeugt. Dabei stellen gelb gefärbte Spots Proteine, die sich in beiden Plastidentypen entsprechen, dar.

Die Beschriftung der Proteinkomplexe erfolgte analog zu Abb.2, die Beschriftung der Einzelproteine analog zu Abb.3/Abb.4. Die Zahlen von 1 bis 14 bezeichnen Proteine, welche erstmal nach vierstündiger Belichtung zu detektieren waren.

Alle Pigment-bindenden Proteinkomplexe, die für die vorhergehende Zeitstufe beschrieben wurden, konnten auch nach vierstündiger Belichtung detektiert werden. So waren sowohl der

POR-, der Cyt b_6f - wie auch die Lil- und der PS I-Komplex in beiden Zeitstufen sichtbar (Abb.37, POR(2)/ Cyt b_6f (2)/ LilX/ LilY/PSI). Die entsprechenden Untereinheiten waren im Überlagerungsbild als gelbe bzw. gelbliche Banden zu erkennen.

Zusätzlich konnten nach vierstündiger Belichtung mindestens 14 Banden detektiert werden, die im Fluoreszenzbild nach zweistündiger Belichtung noch nicht sichtbar waren (Abb.37, 1-14). Dabei lagen die Banden 1 und 3-8 im Molekularmassenbereich von 540-590 kDa direkt untereinander, so dass daraus gefolgert wurde, dass diese sieben Proteine zum gleichen Komplex gehören könnten (Abb.37,1/3-8). Neben diesem Komplex wurden die Banden 3, 5, und 7 zusätzlich im hochmolekularen Bereich sichtbar. Ein weiterer Komplex, der aus mehr als einem zusätzlich detektierten Protein bestand, befand sich im Molekularmassenbereich von 150-160 kDa. Dieser Komplex wurde durch die Banden 10 und 11 gebildet (Abb.37, 10/11). Ebenso schienen die beiden mit 13 und 14 bezeichneten Banden in einem gemeinsamen Komplex enthalten zu sein (Abb.37,13/14). Die restlichen Proteine waren auf unterschiedliche Komplexe verteilt, die teilweise von bereits vorhandenen Komplexen bzw. deren Untereinheiten überdeckt wurden.

Auf der anderen Seite schienen einzelne Proteinuntereinheiten und damit auch einzelne Komplexe nach vierstündiger Belichtung zu verschwinden. Diese grün gefärbten Banden wurden allerdings nicht weiter untersucht, da sie in den bisherigen Versuchen nicht als Pigment-bindende Proteine identifiziert wurden.

Um eine mögliche Pigment-Bindung der nach vierstündiger Belichtung zusätzlich detektierten Komplexe bzw. deren Untereinheiten zu überprüfen, wurden die Proteinkomplexe über CNL-PAGE bzw. CNL/SDS-PAGE aufgetrennt und auf Autofluoreszenz hin untersucht.

4.6.2 Nachweis der Pigment-bindenden Proteine in Komplexen bzw. Komplexuntereinheiten anhand endogener Fluoreszenz

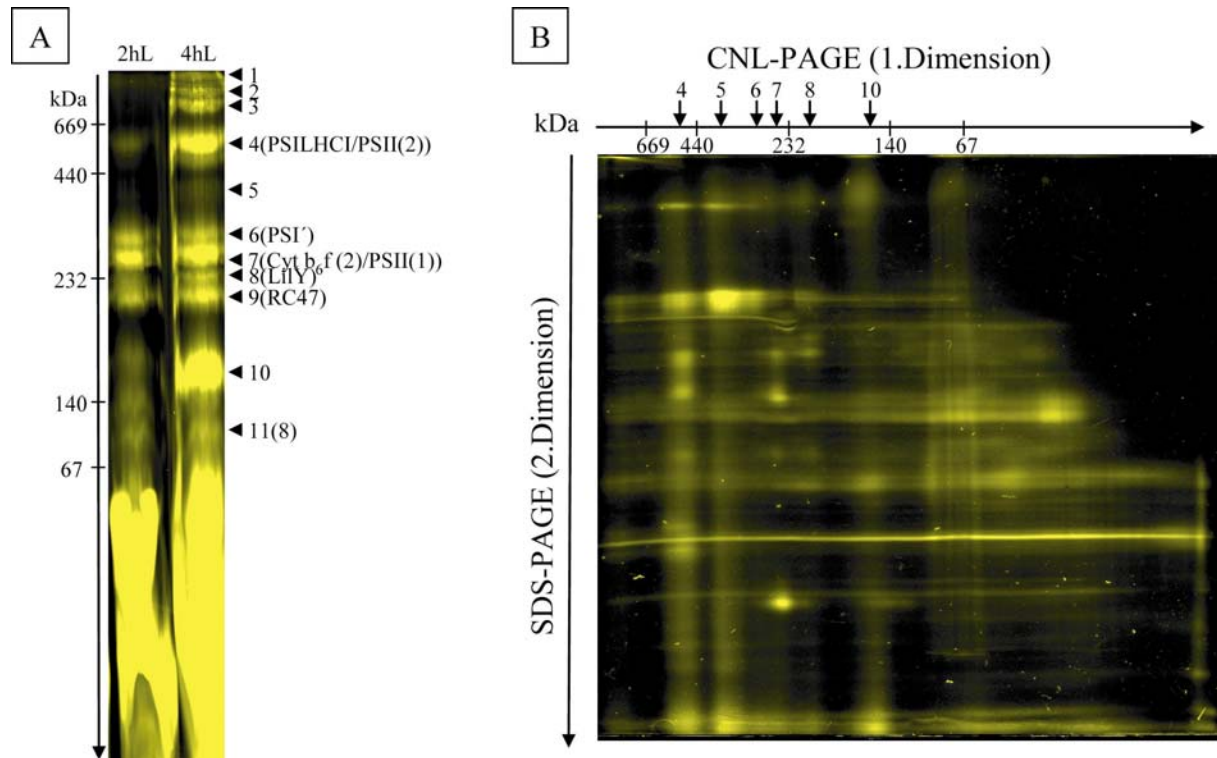


Abb.38 Fluoreszenzdetektion von Proteinkomplexen (A) und Einzelproteinen (B) nach 4h L

Aus jeweils 1×10^8 Plastiden nach 2h L bzw. 4h L wurden Membranproteinkomplexe isoliert und über CNL-PAGE aufgetrennt. Nach der nativen Elektrophorese wurde das Gel im Laserscanner bei 633 nm angeregt und die fluoreszierenden Komplexe detektiert (A). Anschließend wurde eine Spur der 4h L Komplexe in Solubilisierungspuffer inkubiert und die Komplexuntereinheiten über SDS-PAGE getrennt. Nach dem Gellauf wurde die Fluoreszenz der Einzelproteine durch Laseranregung bei 633 nm sichtbar gemacht (B).

Die aus 2h L bekannten Komplexe wurden entsprechend Abb.34 beschriftet und in Klammern hinter die entsprechenden Zahlen gesetzt. Alle detektierten Komplexe, welche in der Spur nach 4h L sichtbar wurden, wurden mit den Zahlen von 1 bis 11 beschriftet. Die Molekularmassenbestimmung der Komplexe erfolgte anhand des HMW-Markers.

Nach der Trennung der Komplexe konnten aufgrund von Autofluoreszenz 11 Banden unterschieden werden (Abb.38 A). Der Vergleich mit der vorherigen Zeitstufe brachte für fünf Banden eine Übereinstimmung mit den nach 2h L detektierten Komplexen (Abb.38 A, 4/6/7/8/9). Dabei wurde vor allem im Bereich der Bande 4 eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals sichtbar. Dies deutete auf eine besonders starke Zunahme der Pigment-bindenden Proteinkomplexe in diesem Bereich hin. Generell konnte nach vier Stunden Belichtung eine vermehrte Fluoreszenz von Pigment-bindenden Komplexen im hochmolekularen Bereich nachgewiesen werden. So konnten erstmals drei Komplexe im Bereich über 700 kDa detektiert werden (Abb.38 A, 1-3). Neben diesen drei Komplexen traten zwei weitere Komplexe im Bereich von 380-430 und 155-170 erstmals auf, wobei der Komplex im Bereich von 155-170 kDa das stärkste Fluoreszenzsignal aufwies (Abb.38 A, 5/10). Komplex 11 schien dem Komplex 8 nach zweistündiger Belichtung zu entsprechen,

allerdings konnten die Untereinheiten dieses Komplexes bisher nicht identifiziert werden (Abb.38 A, 11).

Nach CNL/SDS-PAGE konnten ebenfalls eine Reihe von autofluoreszenten Einzelproteinen sichtbar gemacht werden (Abb.38 B). Nach Anregung bei 633 nm konnten auf dem SDS-Gel mindestens 38 voneinander getrennte Banden unterschieden werden.

Interessanterweise konnten den Komplexe 1 bis 3 nahezu keine klar voneinander getrennte fluoreszente Untereinheiten zugeordnet werden, obwohl diese Komplexe nach CNL-PAGE jeweils ein deutliches Fluoreszenzsignal zeigten (Abb.38 A/B, 1-3). Vielmehr zogen sich einige schwache Einzelproteinbanden aus dem niedermolekularen bis in diesen hochmolekularen Bereich hinauf.

Dagegen konnten im Bereich von Komplex 4 mindestens 10 Einzelproteine durch Eigenfluoreszenz sichtbar gemacht werden (Abb.38 B, 4). Nach zweistündiger Belichtung konnte der Komplex in diesem Bereich nur durch ein einziges Protein identifiziert werden (vgl. Abb.33 B, 1). Ein Großteil der in diesem Komplex nachgewiesenen Proteine konnte auch in weiteren Assemblierungsstufen gefunden werden.

So wurden mindestens sieben dieser Untereinheiten auch im Molekularmassenbereich von Komplex 5 sichtbar, wobei die Fluoreszenzintensität der Untereinheiten im niedermolekularen Bereich teilweise schwächer ausfiel als im Komplex 4 (Abb.38 B, 5).

Im Gegensatz dazu konnten dem Komplex 6 nur zwei der bereits im hochmolekularen Bereich detektierten Untereinheiten zugeordnet werden (Abb.38 B, 6). Diese waren auch in den Komplexen 4 und 5 nachzuweisen, wobei sie in diesen Komplexen stärkere Fluoreszenzemissionen zeigten.

Der Komplex 7 wurde durch die drei bereits aus Komplex 4 bekannten Proteinen und zwei bisher noch nicht beschriebenen autofluoreszenten Proteinen zusammengesetzt (Abb.38 B, 7). Eines der Proteine, welches den Komplex 8 charakterisierte, war bereits Bestandteil der Komplexe 4 und 7 (Abb.38 B, 4/7/8). Eine weitere mögliche Untereinheit des Komplexes 8 konnte mindestens ein weiteres Mal als Bestandteil von Komplex 10 sichtbar gemacht werden (Abb.38 B, 8/10). In Komplex 10 schien aber ein weiteres fluoreszierendes Protein, welches sich direkt unter diesem Protein befand, enthalten zu sein (Abb.38 B, 10).

Ebenso wie bei den Komplexen 1 bis 3 konnten dem Komplex 9 nicht eindeutig fluoreszierenden Untereinheiten zugeordnet werden. Daher wurde dieser Komplex im Fluoreszenzbild nach SDS-PAGE nicht eingezeichnet.

Komplex 11, der nach CNL-PAGE der Komplex mit der kleinsten Molekularmasse oberhalb der Lipid-/ Pigment-/ Detergenz-Mizellen war, konnte nach SDS-PAGE keine Untereinheit eindeutig zugeordnet werden und wurde deshalb auch nicht eingezeichnet.

Nach SDS-PAGE wurden auch verschiedene Banden im gesamten Bereich der CNL-PAGE sichtbar, die starke Autofluoreszenz zeigten, aber keine eindeutigen Komplexe formten.

Neben diesen als Fluoreszenzmissionen von Pigment-bindenden Proteinen charakterisierten Banden wurden im Gelbild noch weitere Fluoreszenzerscheinungen sichtbar, die sich über die gesamte Breite des SDS-Gels hinzogen. Bei diesen Fluoreszenzsignalen wurde aufgrund der Ausprägung des Signals ausgegangen, dass es sich nicht um Pigment-bindende Proteine handelte.

Zur Abklärung dieser Signale und zur näheren Charakterisierung der detektierten Proteine wurden die Autofluoreszenzsignale mit Cy2-markierten Proteinen überlagert.

4.6.3 Identifikation der Pigment-bindenden Komplexuntereinheiten

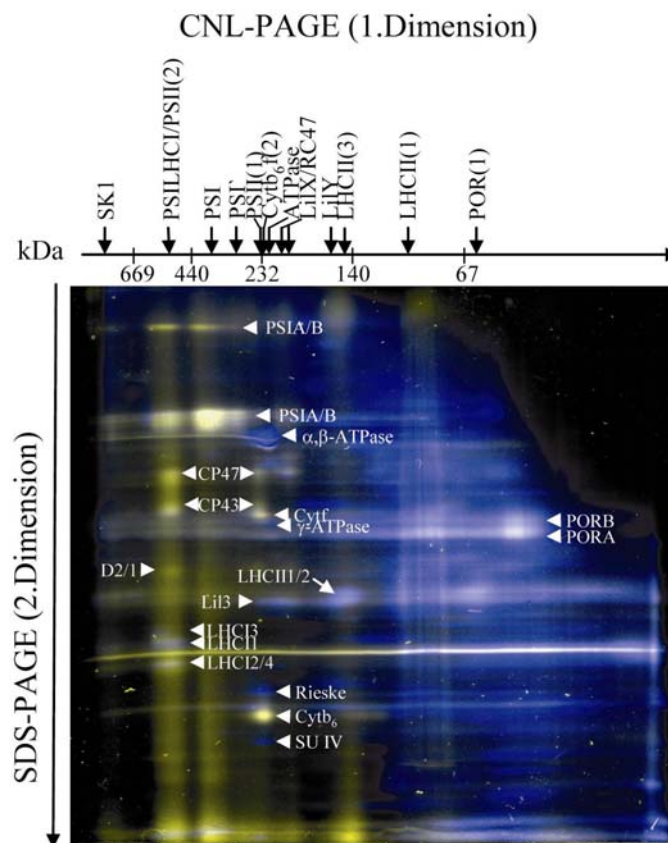


Abb.39 Überlagerung von autofluoreszenten Einzelproteinen mit Cy2-markierten Proteinen

Membrankomplexe von 1×10^8 Plastiden aus 4h L Keimlingen wurden mit Cy2 markiert und über CNL-/SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im Laserscanner ausgelesen. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Cy2 erfolgte bei 488 nm (blaue Spots), die Detektion der Fluoreszenz des Chlorophylls erfolgte bei 633 nm (gelbe Spots). Mit Hilfe der Software „ImageQuant“ wurden die beiden Fluoreszenzbilder

überlagert. Weiß gefärbte Banden stellen dabei Proteine dar, die sowohl durch Cy-Markierung wie auch durch Pigmentfluoreszenz sichtbar gemacht werden konnten. Die Beschriftung der Komplexe erfolgte analog Abb.2 und die Beschriftung der Einzelproteine analog Abb.3/Abb.4

Durch die Überlagerung der Autofluoreszenz mit den fluoreszenzmarkierten Proteinen wurde deutlich, dass nicht allen Banden, welche endogene Fluoreszenz aufwiesen, entsprechende Banden nach Cy₂-Markierung zugewiesen werden konnten (Abb.39). Allerdings konnten durch den Vergleich mit dem Cy₂-markierten Bild des Etio- bzw. Chloroplasten alle in Abb.38 B beschrifteten Komplexe identifiziert werden.

So konnten alle nach zweistündiger Belichtung beschriebenen Komplexe auch nach vierstündiger Belichtung detektiert werden.

Allerdings hatte sich die Intensität der Eigenfluoreszenz ebenso wie die Intensität der Cy₂-Markierung für einige Proteine im Vergleich zur zweistündigen Belichtung verändert.

So konnte im Bereich der α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase nach vierstündiger Belichtung nur noch ein schwaches Autofluoreszenzsignal nachgewiesen werden (Abb.39, α -/ β -ATPase). Nach zweistündiger Belichtung war dieses noch deutlich sichtbar.

Ebenso verhielt es sich beim Lil 3-Protein, dessen Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den anderen autofluoreszenten Proteinen ebenfalls zurückging bzw. nicht wie bei den anderen nach SDS-PAGE detektierten Proteinen weiter zunahm (Abb.39, Lil3).

Dagegen schienen sich die Fluoreszenzintensitäten von Cyt b₆ und Cyt f im dimeren Cyt b₆f-Komplexes nicht verändert zu haben, wohingegen beide Untereinheiten in der monomeren Assemblierungsstufe nach vierstündiger Belichtung sowohl durch Eigenfluoreszenz als auch durch Cy₂-Markierung nicht sichtbar wurden (Abb.39, Cytb₆/Cytf).

Zum selben Ergebnis führte die Betrachtung des Überlagerungsbildes für die POR A-Untereinheit im niedermolekularen Bereich. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Belichtungsstufen konnte im Überlagerungsbild die Pigmentbindung im Bereich der POR A-Komplexe diesmal bis in den hochmolekularen Bereich verfolgt werden (Abb.39, PORA). Zudem schien im gesamten Bereich der nativen PAGE die Untereinheit POR B ebenfalls ein schwaches Autofluoreszenzsignal zu besitzen (Abb.39, PORB). Dieses konnte in den bisher untersuchten Belichtungsstufen noch nicht nachgewiesen werden. Bisher hatte die Überlagerung der Autofluoreszenz mit der Cy₂-Markierung kein eindeutiges Ergebnis für POR B gebracht, da nicht sicher zu erkennen war, ob sich bei der in diesem Bereich beobachteten Fluoreszenzsignalen um das Signal der POR A oder es sich um ein eigenständiges Signal der POR B handelte.

Im Gegensatz dazu war für die Untereinheiten der beiden Photosysteme eine Zunahme sowohl in der endogenen wie auch der exogen durch Cy2-Markierung verursachten Fluoreszenzintensität zu beobachten.

Dabei konnte dem PS I mindestens drei Assemblierungsstufen zugeordnet werden (Abb.39, PSILHCI/PSI/PSI Γ). Neben dem bereits nach zweistündiger Belichtung eindeutig beschriebenen Komplex PS I Γ konnten jetzt zwei weitere Komplexe im hochmolekularen Bereich nachgewiesen werden (Abb.39, PSILHCI/PSI). Dem als PS I LHC I bezeichneten Komplex konnten neben P700 A und P700 B noch die LHC I-Untereinheiten LHC I 1, LHC I 2, LHC I 3 und LHC I 4 zugeordnet werden (Abb.39, PSILHCI, P700A/B/LHCI1/LHCI2/LHCI3/LHCI4). Der bereits nach 2h L detektierte PS I-Intermediatskomplex wurde nur durch die beiden Reaktionszentrumsproteine detektiert (Abb.39, PSI/PSI Γ , P700A/B). Zusätzlich zu diesen drei Komplexen wurde der Komplex, welcher nach CNL-PAGE die größte Molekularmasse besaß, dem PS I zugeordnet, da in diesem Bereich ein schwaches Fluoreszenzsignal auf Höhe des P700 A/B-Subkomplex nachgewiesen werden konnte (Abb.39, SK1, P700A/B).

Durch die Identifizierung der drei LHC I-Untereinheiten konnten nach vierstündiger Belichtung erstmals die äußeren Lichtsammelkomplexe des PS I nachgewiesen werden.

Ähnliches war auch für die äußeren Antennen des PS II zu beobachten. Im Überlagerungsbild aus Cy2-Markierung und Autofluoreszenz konnte nach vier Stunden Belichtung erstmals eine Bande detektiert werden, aus der auf die Anwesenheit eines LHC II-Komplexes geschlossen werden konnte (Abb.39, LHCII1/2). Diese wurde allerdings teilweise durch den als Lil Y bezeichneten Komplex überlagert, da die trimere Form des LHC II-Komplexes und der Lil Y-Komplex annähernd die gleiche Molekularmasse besaßen.

Das PS II selbst wurde durch die Kombination aus endogener und exogener Fluoreszenz in drei verschiedenen Assemblierungsstufen sichtbar. Im Vergleich zur zweistündigen Belichtung konnte neben den monomeren RCC II- und dem RC47-Komplex die dimere Form der RCC II-Komplexes anhand der beiden inneren Antennen CP43 und CP47 nachgewiesen werden. Zudem konnten im Gegensatz zu allen bisher untersuchten Zeitstufen die beiden Reaktionszentrumsproteine D1 und D2 nach CNL/SDS-PAGE durch Autofluoreszenz detektiert werden. Der Nachweis von D2 war auch durch Immunodetektion sowohl nach nativer wie auch nach kombinierter BN/SDS-PAGE möglich (Abb.40).

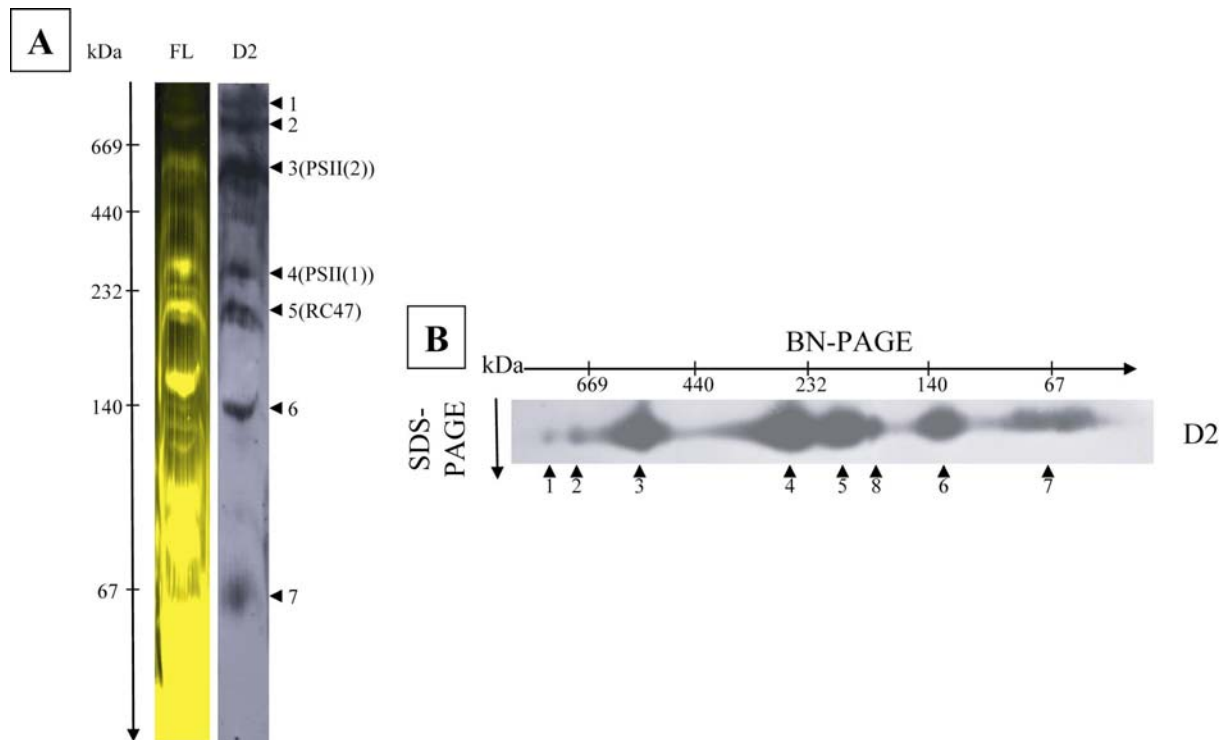


Abb.40 Immunodetektion von D2 Komplexen nach 4h L

Membrankomplexe von 1×10^8 4h L Plastiden wurden über CNL-PAGE bzw. BN-PAGE aufgetrennt. In beiden Fällen betrug der Gradient des PAG 6-12%. Nach der Detektion der Eigenfluoreszenz der Komplexe (FL) nach CNL-PAGE wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach BN-PAGE wurden die Untereinheiten der Komplexe über SDS-PAGE aufgetrennt und ebenfalls auf Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membranen wurden geblockt und mit D2-Antikörper (D2) inkubiert. Nach der Inkubation der Membranen mit sekundärem Antikörper wurden die Proteine über das ECL-System detektiert. Die Molekularmassenbestimmung der Komplexe erfolgte anhand des HMW-Markers.

Nach nativer PAGE wurde D2 in sieben verschiedenen Komplexen sichtbar, wovon fünf Komplexen eine entsprechende autofluoreszente Bande nach CNL-PAGE zugeordnet werden konnte (Abb.40A, FL/D2). Dadurch wurde deutlich, dass das PS II neben dem dimeren und monomeren RCC II und dem RC47-Komplex noch in vier weiteren Assemblierungsstufen vorlag (Abb.40A, 3/4/5). Durch die Immunodetektion konnten die beiden nach CNL-PAGE im hochmolekularen Bereich detektierten Komplexe als PS II-Komplexe identifiziert werden (Abb.40A, 1/2). Durch den Vergleich mit den Komplexen des Chloroplasten stellte sich heraus, dass in diesen beiden Komplexen neben dem RCC II ebenfalls LHC II-Proteine enthalten sein sollten.

Die restlichen beiden Komplexe schienen sich genau unterhalb bzw. zwischen zwei fluoreszenten Banden zu befinden. Dabei wurde der Komplex im Bereich von 130-150 kDa als Reaktionszentrumskomplex aus D1 und D2 identifiziert, dem bereits nach einstündiger Belichtung keine autofluoreszente Komplexbande zugeordnet werden konnte (Abb.40A, 6). Die Assemblierungsform im Bereich unter 70 kDa konnte keinem bekannten Komplex zugeordnet werden (Abb.40A, 7).

Durch kombinierte BN/SDS-PAGE konnten die getrennten D2-Komplexe noch besser gegeneinander abgegrenzt werden (Abb.40B). Dabei stellte sich heraus, dass das PS II nach vierstündiger Belichtung sogar in acht unterschiedlichen Assemblierungsstufen vorlag. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Komplexen konnte eine geringe Menge D2 in einem weiteren Komplex direkt neben dem RC47-Komplex detektiert werden (Abb.40B, 8). Ein Vergleich mit der Immunodetektion nach CNL-PAGE zeigte in diesem Bereich ebenfalls eine dünne Fluoreszenzbande, so dass davon ausgegangen wurde, dass dieser Komplex ebenfalls Pigment gebunden hatte. Die weitere Zusammensetzung dieses Komplexes war nicht bekannt, da dieser Komplex weder in der Fluoreszenz- noch in der Silberfärbung auftrat und somit für die massenspektrometrische Analyse nicht genug Material zur Verfügung stand.

Insgesamt konnten durch diese Experimente neun der 14 Banden (vgl. Abb.37), die nach vierstündiger Belichtung erstmals detektiert wurden, identifiziert werden. Dabei konnten die Banden 1, 4, 5, 6, 7 und 8 des DIGE-Überlagerungsbild den PS I-Proteinen P700 A, P700 B, LHC I 1, LHC I 2/4, LHC I 3, PSI h und PS I g zugewiesen werden. Bis auf PS I h und PS I g, für die keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte, schienen alle Banden Pigmente gebunden zu haben, da sie auch durch Autofluoreszenz nachgewiesen wurden. Die restlichen drei Banden des DIGE-Überlagerungsbildes, die identifiziert werden konnten, zeigten ebenfalls Eigenfluoreszenz und wurden als CP47 (Bande 2) und LHC II 1/2 (Bande 10) bzw. LHC II 3 (Bande 11) charakterisiert. Die anderen fünf Banden konnten nicht identifiziert werden. Diese zeigten allerdings nach SDS-PAGE auch keine Eigenfluoreszenz, so dass ihre Charakterisierung vorerst nicht weiter verfolgt wurde.

Die Verdopplung der Belichtungsdauer auf vier Stunden führte zur Assemblierung von Komplexen bis zu ca. 1000 kDa. Neben den bereits aus kürzeren Belichtungszeiten bekannten Komplexen konnten zu diesem Zeitpunkt erstmals Komplexe, die die äußeren Antennenproteine enthielten, nachgewiesen werden. Dabei wurden sowohl für das PS I wie auch für das PS II Kombinationen aus dem RCC II-Komplex und den dazugehörigen äußeren Antennen sichtbar. Damit schienen nach vierstündiger Belichtung alle aus dem Chloroplasten bekannten Komplexe zur Verfügung zu stehen. Ob diese Komplexe auch die gleiche Pigmentausrüstung besaßen, wurde durch Absorptionsspektroskopie der Komplexe überprüft (Abb.41).

4.6.4 Identifikation der Pigmente durch Absorptionsspektroskopie

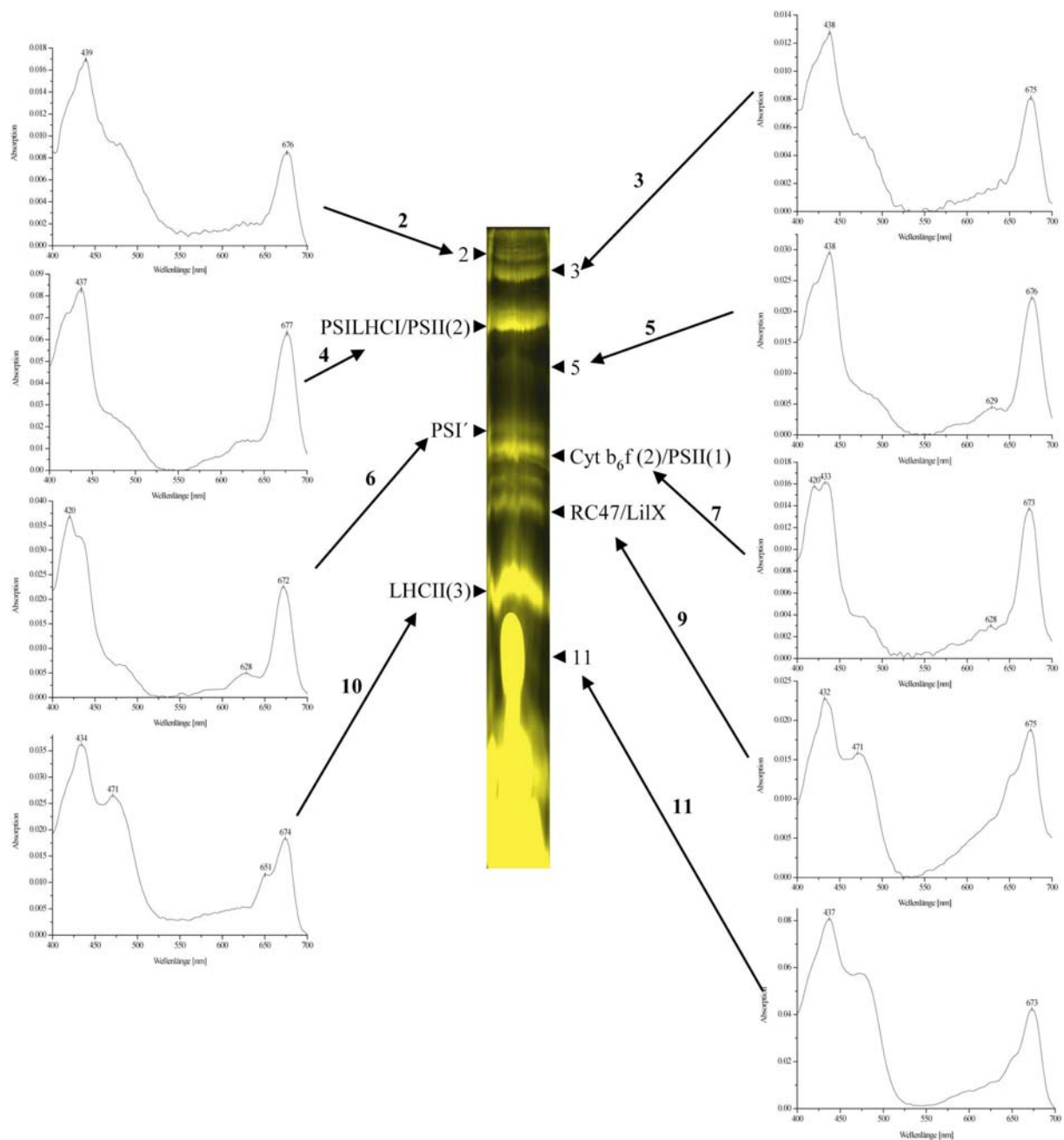


Abb.41 Absorptionsspektren von Komplexen aus 4h L Keimlingen

Membrankomplexe von 1×10^8 4h L Plastiden wurden über CNL-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im Fluoreszenzscanner bei 633 nm angeregt und alle fluoreszierenden Banden mit dem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde von allen Banden ein Absorptionsspektrum im Bereich von 400-700 nm aufgenommen.

Alle untersuchten Komplexe enthielten sowohl Chlorophyll a wie auch Carotinoide (Abb.41). Zusätzlich zu diesen beiden Pigmenten konnte in drei Komplexen Chlorophyll b eindeutig nachgewiesen werden. Bei diesen Komplexen handelte es sich um verschiedene Assemblierungsstufen der LHC-Proteine des PS II (Abb.41, 8/10/11). Dies deutete darauf hin,

dass im Bereich von 210-250 kDa neben des durch Fluoreszenz detektierten Lil-Komplexes ein weiterer Komplex vorlag. Durch den Vergleich mit den Spektren des Chloroplasten wurde dieser Komplex als hexamerer LHC II-Komplex identifiziert (vgl. Abb.18). Zudem deutete im Bereich der Superkomplexe eine schwach ausgeprägte Schulter im Absorptionsspektrum bei 651 nm ebenfalls auf die Gegenwart von Chlorophyll b hin (Abb.41, 2/3). Die Bindung von Chlorophyll b in diesen Komplexen ist auch zu erwarten, da in verschiedenen Experimenten gezeigt wurde, dass diese Komplexe neben dem RCC-Komplex ebenfalls LHC-Proteine enthalten. Ein entsprechendes Absorptionsspektrum erhielt man bei der Untersuchung der spektralen Eigenschaften der Chloroplastenkomplexe.

Nach vierstündiger Belichtung waren die höchsten Absorptionswerte des Chlorophylls a im Bereich der Bande 4, d.h. des dimeren RCC II-Komplexes bzw. des PS I-LHC I-Komplexes nachgewiesen werden (Abb.41, 4). Dies entsprach den im Chloroplasten gemachten Beobachtungen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde geschlossen, dass vier Stunden nach dem Beginn der Ergrünung alle aus dem Chloroplasten bekannten Komplexe mit der entsprechenden Pigmentausstattung zur Verfügung standen. Dies deutete darauf hin, dass die grundlegenden Assemblierungsprozesse, welche zum Aufbau einer funktionsfähigen linearen Elektronentransportkette der Photosynthese benötigt werden, bereits nach vierstündiger Belichtung abgeschlossen sind. Allerdings waren zu diesem Zeitpunkt auch noch Proteinkomplexe detektierbar, die im muren Chloroplasten nicht mehr sichtbar waren. So konnten nach vierstündiger Belichtung noch Reste der POR- und Lil 3-Komplexe nachgewiesen werden.

In einem abschließenden Versuch wurden die Komplexe der 4 h L Plastiden direkt mit den Komplexen des Chloroplasten verglichen, um die Übereinstimmung der verschiedenen Komplexe zu überprüfen.

4.7 Vergleich der Membrankomplexe nach vierstündiger Belichtung mit den Komplexen des Chloroplasten

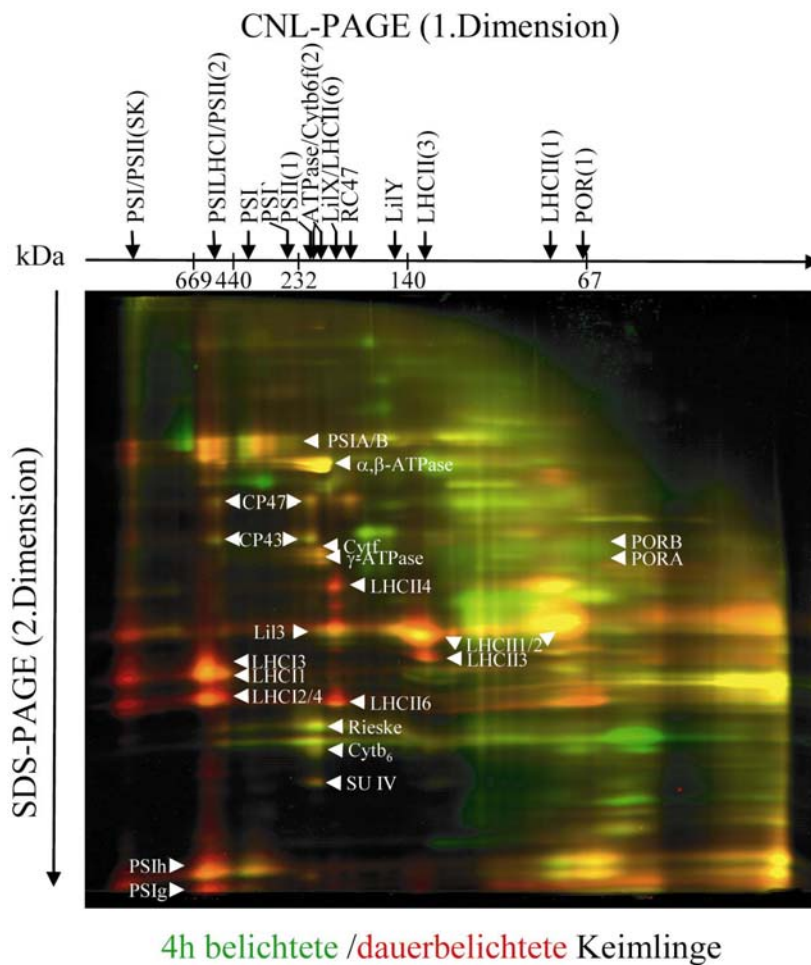


Abb.42 DIGE von Membranproteinkomplexen aus Plastiden nach 4h L und Chloroplasten

Membranen aus 5×10^7 4h L Plastiden bzw. Chloroplasten wurden mit Cy2 bzw. Cy5 markiert. Nach dem Stoppen der Markierungsreaktion mit L-Lysin wurden die beiden Proben gemischt und die gemischte Probe wie in Abb.10 beschrieben über CNL-PAGE getrennt. Nach der SDS-Solubilisierung des nativen Gels wurden die Untereinheiten der Proteinkomplexe durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurden die fluoreszenzmarkierten Untereinheiten der Membrankomplexe nach 4h L durch Anregung bei 488 nm sichtbar gemacht. Die Untereinheiten der Thylakoidmembrankomplexe, die mit Cy5 markiert waren, wurden durch Fluoreszenzanregung bei 633 nm sichtbar gemacht. Mit Hilfe der Software „ImageQuant“ wurde ein Überlagerungsbild beider Plastidentypen erzeugt. Dabei stellen grün gefärbte Spots Proteine nach 4h L, rot gefärbte Spots Proteine des Chloroplasten und gelb gefärbte Spots Proteine, die sich in beiden Plastidentypen entsprechen, dar.

Die Beschriftung der Proteinkomplexe erfolgte analog zu Abb.2, die Beschriftung der Einzelproteine analog zu Abb.3/Abb.4.

Im Überlagerungsbild konnten für alle Assemblierungsstufen der beiden Photosysteme die nach vier Stunden Belichtung entsprechenden Komplexe im Chloroplasten sichtbar gemacht werden (Abb.42). Dabei wurden die Superkomplexe, die nach vierstündiger Belichtung nur durch Immunodetektion nachgewiesen werden konnten, im Chloroplasten zum Teil auch durch Cy-Markierung sichtbar (Abb.42, PSI/II(SK)). Wie bereits nach vierstündiger

Belichtung beschrieben, wurden die PS II-Komplexe durch die beiden inneren Antennenproteine CP47 und CP43, die Assemblierungsstufen des PS I durch die beiden Reaktionszentrumsproteine P700 A und P700 B und die Untereinheiten Psa G und Psa H identifiziert (Abb.42, CP47/43, P700A/B, PSIIg/PSIIh). Die zugehörigen Lichtsammelkomplexe wurden jeweils durch die großen Untereinheiten sichtbar (Abb.42, LHCI1/LHCI2/4/LHCI3/, LHCII1/2/LHCII3/LHCII4/ LHCII6).

Sowohl der dimere Cyt b_6f -Komplex wie auch der Komplex der ATP-Synthase konnten ebenfalls im gleichen Molekularmassenbereich mit den gleichen Untereinheiten in beiden Zeitstufen nachgewiesen werden (Abb.42, Cytf, Cyt b_6 , Rieske, SUIV, α -/ β -ATPase/ γ -ATPase). Diese beiden Komplexe waren die einzigen Hauptkomplexe der Lichtreaktion der Photosynthese, welche über den gesamten Zeitraum der Ergrünung ihre Molekularmasse nicht änderten.

Die interessanteste Beobachtung konnte dabei im Bereich der LHC II-Komplexe gemacht werden. So wurde deutlich, dass sich der als Lil X bezeichnete Komplex mit dem hexameren LHC II-Komplex überlagerte, Lil 3 selbst konnte im Chloroplasten nicht mehr nachgewiesen werden (Abb.42, LHCII(6)/LilX, Lil3). Es blieb allerdings unklar, ob der Lil X-Komplex durch den hexameren LHC II-Komplex ersetzt wurde oder ob diese beiden Komplexe rein zufällig die gleiche Molekularmasse besaßen. Der zweite Lil-Komplex wurde dagegen nicht im Bereich eines weiteren LHC II-Komplexes gefunden, sondern leicht in den hochmolekularen Bereich verschoben (Abb.42, LHCII(3), LilY).

Die POR-Untereinheiten A und B konnten ebenso wie das Lil 3-Protein im Chloroplasten nicht mehr sichtbar gemacht werden (Abb.42, PORA/B). Da die beiden POR-Proteine bereits im Etioplasten, d.h. vor Beginn der Chlorophyllsynthese vorlagen, wurde nur das Lil 3-Protein und seine beiden Komplexe als Markerproteine der Ergrünung angesehen.

4.8 Überblick über die zeitliche Abfolge der Assemblierung der Pigmentbindenden Membrankomplexe während der Ergrünung

Die folgende Abbildung soll einen schematischen Überblick über die, durch die verschiedenen Versuche erhaltenen Ergebnisse geben. Dabei wurden nur Komplexe berücksichtigt, die durch Eigenfluoreszenz nach nativer PAGE sichtbar gemacht werden konnten.

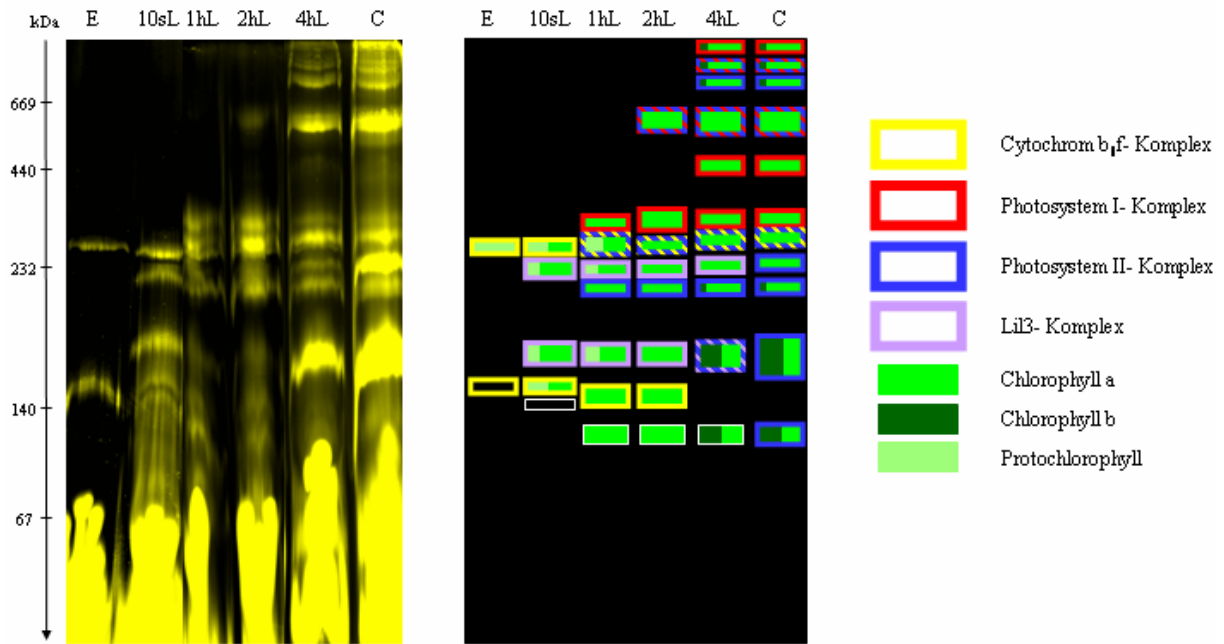


Abb.43 Schematische Darstellung aller nach CNL-PAGE autofluoreszenten Komplexe während der Ergrünung

Gelspuren aller Zeitstufen (Etioplast (E), 10 sec L, 1h L, 2h L, 4h L, Chloroplast (C)), welche durch CNL-PAGE erhalten wurden, wurden nebeneinander gelegt (A). Diesen Komplexen entsprechend wurden einzelne Kästchen gezeichnet (B), deren Randfarbe die Zuordnung der Komplexe zu den drei großen Pigment-bindenden Komplexen des Chloroplasten darstellt. Dabei stellt rote Farbe die Zugehörigkeit des Komplexes zu PS I-, blaue zum PS II-, gelbe zu Cyt b_6/f - und lila zu Lil-Komplexen dar. Bei Überlagerung verschiedener Komplexe wurde der Kästchenrand in beiden Farben schraffiert. Autofluoreszente Komplexe, die nicht eindeutig identifiziert werden konnten, wurden weiß umrandet.

Die Füllung der Kästchen erfolgte entsprechend den gebundenen Tetrapyrrolderivaten. So wurde Protochlorophyll in mintgrün, Chlorophyll a in hellgrün und Chlorophyll b in dunkelgrün dargestellt. Falls mehr als ein Pigment in einem Komplex detektiert wurde, wurden alle Pigmente nebeneinander dargestellt wurde, wobei die beobachteten Mengenverhältnisse nur ungefähr wiedergegeben wurden.

Die Ergrünung etiolierter Keimlinge wurde durch die Untersuchung von sechs verschiedenen Zeitpunkten charakterisiert. Der Endpunkt der Ergrünung wurde dabei durch die Komplexe des Chloroplasten markiert, welche aus 12 h L/12 h D gezogenen Keimlingen isoliert wurden (C).

Als Startpunkt dienen dabei im Dunkeln angezogene Keimlinge. Die daraus isolierten Etioplasten besaßen zwei autofluoreszente Komplexe, welche als monomere und dimere Assemblierungsstufe des Cyt b_6/f -Komplexes identifiziert werden konnten (Abb.43, E, gelb). Dabei konnte in der dimeren Form Protochlorophyll nachgewiesen werden (Abb.43, E, mint). Bereits nach 10 Sekunden Belichtung der etiolierten Keimlinge war in allen identifizierten Komplexen neben Protochlorophyll Chlorophyll a gebunden (Abb.43, 10sL, mint/hellgrün). Neben den beiden Cyt b_6/f -Komplexen konnten drei weitere Banden detektiert werden. In zwei dieser Banden konnte Lil 3 als Pigment-bindender Bestandteil identifiziert werden (Abb.43, 10sL, lila). Der dritten Bande konnten keine Untereinheiten eindeutig zugeordnet werden (Abb.43, 10sL, weiß).

Nach einstündiger Belichtung waren die ersten Assemblierungsstufen der beiden Photosysteme sichtbar (Abb.43, 1hL, rot, blau). In diesen Komplexen lag Chlorophyll a vor (Abb.43, 1hL, hellgrün). Im Gegensatz dazu konnte sowohl im Bereich der Cyt b_6f -Komplexe wie auch der Lil-Komplexe neben Chlorophyll a noch Protochlorophyll nachgewiesen werden (Abb.43, 1hL, mint, hellgrün). PS I konnte durch Eigenfluoreszenz in einem Intermediatskomplex im Bereich von 330-350 kDa nachgewiesen werden (Abb.43, 1hL, rot). Durch die Verwendung des D2-Antikörpers waren dem PS II zwei Pigment-bindende Assemblierungsformen zuzuordnen (Abb.43, 1hL, blau). Ein weiterer Komplex, der anhand von Chlorophyll a-Fluoreszenz sichtbar wurde, konnte nicht identifiziert werden (Abb.43, 1hL, weiß).

Die Verdopplung der Belichtungszeit auf zwei Stunden führte auf der einen Seite zum Verlust des Protochlorophylls. Es konnte ab diesem Zeitpunkt in keinem Komplex mehr nachgewiesen werden. Auf der anderen Seite konnte die Bildung von Chlorophyll b nicht völlig ausgeschlossen werden. Allerdings waren die Hinweise auf die Bindung von Chlorophyll b an einzelne Proteine zu diesem Zeitpunkt nur sehr vage. Daher wurde Chlorophyll b im Schema in dieser Zeitstufe nicht eingezeichnet. Dagegen konnte Chlorophyll a in allen detektierten Komplexen eindeutig nachgewiesen werden (Abb.43, 2hL, hellgrün). Im Hinblick auf die Assemblierung konnte sowohl für das PS I wie auch das PS II ein zusätzlicher Komplex im Bereich von 540-590 kDa detektiert werden (Abb.43, 2hL, rot, blau). Alle Komplexe, die bereits nach einer Stunde Belichtung sichtbar wurden, konnten auch nach zweistündiger Belichtung nachgewiesen werden (Abb.43, 2hL, rot, blau, gelb, lila). Eine Belichtung der etiolierten Keimlinge für vier Stunden brachte eine Komplexzusammensetzung der Membran, die der des Chloroplasten entsprach (Abb.43, 4hL vgl. C). Neben dem eindeutigen Nachweis verschiedener Assemblierungsstufen der beiden äußeren Antennensysteme konnten für beide Photosysteme verschiedene Superkomplexe sichtbar gemacht werden (Abb.43, 4hL, rot, blau). Nach vierstündiger Belichtung konnte auch Chlorophyll b in verschiedenen Komplexen eindeutig nachgewiesen werden (Abb.43, 4hL, dunkelgrün). Im Unterschied zum Chloroplasten waren nach vierstündiger Belichtung noch die Komplexe des Lil 3-Proteins, welches als typischer Vertreter für die Ergrünungsvorgänge angesehen wurde, nachzuweisen (Abb.43, 4hL, lila).

Somit entsprach die Komplexausstattung nach vierstündiger Belichtung hinsichtlich der Photosysteme samt ihrer äußeren Antennensystemen und des Cyt b_6f -Komplexes den Verhältnisse im Chloroplasten, so dass die grundsätzlichen Assemblierungsvorgänge in Bezug auf diese Komplexe nach vier Stunden als abgeschlossen betrachtet werden konnten.

D Diskussion

Die Umwandlung von Etioplasten zu photosynthetisch aktiven Chloroplasten kann auf Ebene der Chlorophyll-bindenden Proteinkomplexe durch elektrophoretische und spektroskopische Techniken gut verfolgt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Akkumulation der einzelnen Proteinkomplexe durch native Elektrophoresesysteme in Kombination mit unterschiedlichen Detektionsmethoden durchgeführt.

1 DIGE und Membranproteinkomplexe

Die Methode der zweidimensionalen differentiellen Gelelektrophorese (DIGE) ermöglicht einen direkten Vergleich der Proteinakkumulation in verschiedenen Proben. Dadurch wird ein Problem umgangen, das beim Vergleich verschiedener Entwicklungszustände durch BN/SDS-PAGE immer wieder auftritt: die elektrophoretische Trennung von Proteinen in unterschiedlichen Gelen liefert keine hundertprozentig reproduzierbaren Ergebnisse, so dass bei geringer Änderung der Molekularmasse z.B. durch Verlust niedermolekularer Komplexbestandteile die Unterscheidung zwischen elektrophoretisch und biologisch verursachten Unterschieden erschwert sein kann. Diese Problematik entfällt bei der gemeinsamen Trennung von zwei unterschiedlichen Proben in einem Gel, wobei die beiden Proben vor dem Mischen und der daran anschließenden Elektrophorese jeweils mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff kovalent markiert werden. Nach der Elektrophorese können diese Fluoreszenzfarbstoffe selektiv angeregt werden und liefern damit zwei virtuell getrennte Gele, die durch geeignete Software übereinander gelegt und somit direkt miteinander verglichen werden können (Lilley et al., 2004).

1.1 Die Methode der DIGE ist auch mit nativen Gelsystemen koppelbar

Die durchgeführten Experimente machen deutlich, dass die kovalente Bindung von Cy-Farbstoffen an Proteine nicht nur für klassische 2D-PAGE-Experimente, d.h. IEF/SDS-PAGE-Anwendungen, sondern auch für 2D-native/SDS-PAGE geeignet ist. Dies bedeutet, dass sich die Anwendung der DIGE-Technologie nicht nur auf lösliche Proteine beschränkt, sondern durchaus Verwendung bei der Analyse von Membranproteinen finden kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Versuche zeigen, dass die Farbstoffe durchaus in der Lage sind,

in intakte Komplexe in der Membran einzudringen und an einzelne Komplexuntereinheiten zu binden (Abb.6).

Obwohl die Verwendung von Coomassie, welches die Emissionssignale von Fluoreszenzfarbstoffen heruntersetzt, im Allgemeinen der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen entgegensteht, ist DIGE auch mit BN/SDS-PAGE koppelbar. Dies ist möglich, da während der zweiten Dimension das Coomassie größtenteils von den Proteinen abgelöst wird und nur noch im Bereich der Lauffront nachweisbar ist. Daher ist der störende Einfluss von Coomassie auf die Fluoreszenzdetektion, der nach der ersten Dimension noch deutlich sichtbar ist (Wittig et al., 2007), bei der Detektion auf Ebene der Einzelproteine kein Problem mehr. Somit können in der ersten Dimension neben IEF auch alle Varianten von nativen Gelsystemen eingesetzt werden.

Der Vergleich von Cy-markierten Proben mit Silber oder Coomassie gefärbten Gelen macht deutlich, dass sich die durch die unterschiedlichen Färbemethoden erhaltenen Bandenmuster nicht völlig entsprechen. Daher sollte neben der Cy-Färbung auch immer noch zusätzlich eine postelektrophoretische Färbung, d.h. Silber- oder Fluoreszenzfärbung durchgeführt werden, um ein möglichst vollständiges Bild der Einzelproteinverteilung zu erhalten.

1.2 Prä- und postelektrophoretische Färbetechniken liefern ein sich ergänzendes Bandenmuster

Generell ist die Silberfärbung bis zu 200 mal sensitiver als die entsprechende Coomassiefärbung (Mackintosh et al., 2003; Heukeshoven J. et al., 1985; Lilley et al., 2004). Dies konnte auch durch die Färbung von Thylakoidmembranproteinen bestätigt werden. Bei Auftrag von 1×10^8 Chloroplasten konnten nach Silberfärbung mehr Proteine sichtbar gemacht werden als in der Coomassiefärbung (Abb.7).

Dagegen entspricht die Sensitivität der CyDye-Markierung der Sensitivität der Silberfärbung bzw. kann diese sogar übertreffen (Lilley et al., 2004). Diese Tatsache wirft die Frage auf, warum verschiedene Proteine, die nach Silberfärbung eindeutig sichtbar sind, nach CyDye-Markierung nicht zu detektieren sind (Abb.7).

Eine einfache Erklärung bietet sich für alle Proteine, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenz kein Lysin enthalten und somit keine potentielle Markierungsstelle besitzen. Dies trifft vor allem auf kleine transmembrane Proteine z.B. PsbE, PsbJ, PsbN zu, die allerdings generell nur schlecht von der verwendeten Tris-Glycin-PAGE aufgelöst werden und somit kaum zu sehen sind.

Andere Proteine, z.B. die beiden Reaktionszentrumsproteine des PS II D1 und D2 werden trotz vorhandener Lysinseitenketten nicht durch CyDyes markiert, sind aber in der Silberfärbung deutlich sichtbar (Abb.7). Eine mögliche Erklärung könnte die Tatsache liefern, dass die Markierungsreaktion in Gegenwart intakter Komplexe abläuft, d.h. dass die Lysine entweder durch ihre Lage im Komplex nicht für die Markierungsreaktion zugänglich oder durch die Bindung in Salzbrücken bzw. aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen nicht zur Verfügung stehen. Ähnliche Ursachen werden auch bei erfolglosen Cross-Link-Versuchen mit D1 vermutet, dessen Cross-Link an weitere Proteine in intakten Thylakoidmembranen nicht möglich war (Adir et al., 1988).

Die Überprüfung dieser Hypothese erweist sich als schwierig, da der Vergleich von Markierungsexperimenten mit SDS-vorsolubilisierten Proteinen und nativen Komplexproteinen in der daran anschließenden SDS-PAGE keine sichtbaren Unterschiede lieferte (Abb.5). Dies liegt wahrscheinlich vor allem daran, dass die Auflösung der eindimensionalen SDS-PAGE im Gegensatz zur zweidimensionalen Elektrophorese begrenzt ist. Abhilfe wäre in diesem Fall z.B. durch die Durchführung der Markierungsreaktion während des Denaturierungsschritts zwischen der nativen ersten und der denaturierenden zweiten Dimension zu schaffen, da in diesem Fall durch die Denaturierung der Komplexe die Lysingruppen frei vorliegen sollten. Auf eine Durchführung wurde bisher verzichtet, da für dieses Experiment größere Mengen Cy-Farbstoffes zugesetzt werden müssten und dies mit nicht unerheblichen Kosten verbunden wäre.

Auf alle Fälle kann aus der fehlenden Bindung von CyDyes an Proteine trotz vorhandener Lysine nicht generell auf die Lage eines Proteins im Inneren des Komplexes geschlossen werden. Diese Annahme würde sich für die Reaktionszentrumsproteine D1 und D2 anbieten, allerdings können auch Proteine, die sich nach Auswertung der Kristallstrukturdaten eher am Rand des Komplexes befinden, nicht mit CyDyes markiert werden. Dies ist z.B. für PsaL zu beobachten, welches sich bei höheren Pflanzen am Rand des PS I-Komplexes befindet und trotz sechs Lysinresten dennoch nicht mit Cy-Farbstoffen angefärbt werden kann, obwohl es bereits in der Coomassiefärbung zu detektieren ist. Da für PsaL in höheren Pflanzen eine Wechselwirkung mit PsaH oder anderen Untereinheiten angenommen wird, kann eine mögliche Protein-Protein-Interaktion über Lysine die fehlende CyDye-Markierung erklären (Jensen et al., 2004).

Durch die Markierungsversuche mit intakten Plastiden (Abb.6) konnte zudem gezeigt werden, dass die Membranen an sich keine Barriere für die Cy-Farbstoffe darstellen, d.h. dass diese durchaus in der Lage sind, in Membranen einzudringen bzw. diese zu passieren, so dass

generell davon ausgegangen werden kann, dass die Farbstoffe in der Lage sind, in die Komplexe einzudringen.

Auf der anderen Seite können durch die CyDye-Markierung Proteine visualisiert werden, die weder durch Coomassie- noch durch Silberfärbung detektiert werden konnten (Abb.7). Dies könnte zum einen an der im Vergleich zur Silberfärbung etwas höheren Sensitivität der CyDye-Markierung liegen (Lilley et al., 2004), zusätzlich können schwach exprimierte Proteine durch Fluoreszenzfärbung besser detektiert werden, da die Hintergrundfärbung, die bei längeren Entwicklungszeiten in der Silberfärbung auftritt, bei der Fluoreszenzfärbung entfällt (Lopez et al., 2000). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die Verwendung verschiedener Färbemethoden das Gesamtbild der in der Membran enthaltenen Proteine weiter vervollständigt werden kann, wobei durch jede der benutzten Färbemethoden bereits die Identifikation der einzelnen Komplexe anhand einzelner charakteristischer Proteine möglich ist. Zur Identifikation der verschiedenen Komplexe ist in der Regel der Nachweis einiger Komplexuntereinheiten in Kombination mit der Gesamtmolekularmasse des Komplexes ausreichend.

2 Spektrale Eigenschaften der Proteinkomplexe und Einzelproteine

2.1 Die Detektion der Chlorophyll-bindenden Proteine aufgrund von Chlorophyllfluoreszenz ist nach SDS-PAGE noch teilweise möglich

Im Vergleich zur BN-PAGE erweitert die Methode der CNL-PAGE die Identifikationsmöglichkeiten von Proteinkomplexen um die Fluoreszenzdetektion von Proteinkomplexen aufgrund endogen gebundener Pigmente. Diese Pigmente können anschließend direkt im Gel durch Absorptionsspektroskopie näher charakterisiert werden, wobei außer der Pigmentidentifikation teilweise auch eine Identifikation des vorliegenden Komplexes aufgrund seines charakteristischen Absorptionsspektrums möglich ist (Abb.13).

Die Untersuchung von Pigment-bindenden Proteinkomplexen durch „In-Gel“-Spektroskopie wurde bereits in früheren Arbeiten durchgeführt (Barbato et al., 1995; Dunkley et al., 1979; Gregory et al., 1982). In diesen Experimenten wurden die Membranen mit geringen SDS-Mengen versetzt und die dabei solubilisierten Pigment-Proteinkomplexe anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt. Die erhaltenen Komplexe wurden anschließend im Gel spektroskopisch vermessen.

Dabei muss berücksichtigt werden, dass SDS als anionisches Detergenz denaturierend auf Proteinkomplexe wirkt, da durch die Anlagerung des SDS an das Proteingrundgerüst das Protein entfaltet wird, d.h. seine Quartär- und Tertiärstruktur verliert und somit das Chlorophyll aus dem Protein freigesetzt werden kann. Chlorophyll ist in höheren Pflanzen nicht kovalent an die Proteine gebunden ist, so dass die Konformationsänderung der Proteine zu einem Verlust des Pigments führen kann.

Dies muss vor allem bei der Detektion der Einzelproteine aufgrund der Fluoreszenzemission berücksichtigt werden (Abb.12). Daher kann nicht von einem vollständigen Nachweis, d.h. einer Detektion sämtlicher Chlorophyll-bindender Proteine über die Fluoreszenzemission nach SDS-PAGE ausgegangen werden. Dies wird durch die grüne Färbung auf der Höhe der Chlorophyll-bindenden Komplexe in der Lauffront nach SDS-PAGE unterstrichen. Die Detektion von Einzelproteinen aufgrund von endogener Fluoreszenz kann zwar einen wichtigen Beitrag zur Identifikation von Chlorophyll-bindenden Proteinen, aber keinen vollständigen Nachweis über alle Chlorophyll-bindenden Proteine in einem Komplex liefern. Es können in den Komplexen weitere, Chlorophyll-bindende Proteine vorliegen, aus denen nach SDS-Behandlung die Pigmente herausgelöst wurden und die somit durch Fluoreszenzdetektion nicht sichtbar gemacht werden konnten.

2.2 Die Mischung von anionischen und nicht-ionischen Detergenzien ermöglicht die Auftrennung von nativen Proteinkomplexen

2.2.1 BN-PAGE eignet sich nicht für spektrale Untersuchungen von Pigment-bindenden Komplexen

Da die Verwendung von SDS zur Auftrennung von ganzen Proteinkomplexen nur zur Isolation von Komplexen des PS I und der beiden LHC-Systeme führte (Thorner et al., 1967; Dunkley et al., 1979; Henderson et al., 2003), wurde bereits in früheren Jahren nach alternativen Trenntechniken gesucht, die eine Auftrennung von nativen Proteinkomplexen ermöglichen. In den letzten Jahren kristallisierte sich für diesen Zweck vor allem die Methode der Blue Native-PAGE als geeignetes Trennverfahren heraus. Dabei werden die Proteinkomplexe durch nicht-ionische Detergenzien solubilisiert und mit Hilfe des negativ geladenen Farbstoffes Coomassie G eine Auftrennung, welche unabhängig von der Eigenladung der Komplexe erfolgt, ermöglicht (Schagger et al., 1991). Diese Methode erwies sich vor allem bei der Untersuchung der Assemblierung von Chloroplasten- und Mitochondrienkomplexen als geeigneter Ansatz (Krause, 2006).

Allerdings besitzt die BN-PAGE durch die Verwendung von Coomassie G den Nachteil, dass eine spektrale Charakterisierung der getrennten Komplexe nicht mehr möglich ist (Abb.13). Daher muss bei der Analyse der spektralen Eigenschaften auf alternative Methoden zurückgegriffen werden.

Zum einen bietet sich die Methode der Saccharosedichtegradientenzentrifugation an, bei der die einzelnen Komplexe voneinander getrennt und anschließend spektroskopisch vermessen werden können (Bassi et al., 1987; Müller, 2000; Standfuss et al., 2004). Die Reinheit der vorliegenden Komplexe wird anschließend durch die Trennung der Saccharosebande über SDS-PAGE bestätigt. Für die Dichtegradientenzentrifugation muss neben der erheblichen Proteinmenge, die eingesetzt werden muss, auch der nicht unerhebliche Zeitaufwand berücksichtigt werden.

2.2.2 Die CN-PAGE liefert für die Thylakoidmembrankomplexe keine gute Auflösung

Der Zeitaufwand und die benötigten Probenmengen sind bei der Elektrophorese wesentlich günstiger. Wittig et al. schlagen als „farblose“ Alternative der BN-PAGE die CN-PAGE vor (Wittig et al., 2005), welche der BN-PAGE ohne Zusatz von Coomassie G entspricht. Daher beruht die Trennung der Proteinkomplexe nur noch auf der Kombination aus Eigenladung der Proteinkomplexe und ihrer Molekularmasse, was zumindest für die Komplexe der Thylakoidmembran nur zu unbefriedigenden Ergebnissen führt (Abb.9). Durch die CN-PAGE können einzelne Komplexe nur noch schlecht gegeneinander abgegrenzt werden, so dass einzelne Untereinheiten nicht mehr eindeutig einem Komplex zugeordnet werden können. Dies ist wahrscheinlich auf die fehlende exogene Ladung durch Coomassie G zurückzuführen, ebenso wie die Tatsache, dass sich die elektrophoretisch getrennten Komplexe vor allem im hochmolekularen Bereich befinden.

Somit ist im Gegensatz zur BN-PAGE, die zumindest in einem gewissen Rahmen eine Aussage über die Molekularmasse der getrennten Komplexe erlaubt, in diesem Fall überhaupt keine Aussage über die Molekularmasse der Komplexe mehr möglich. Aus diesen Gründen wurde beschlossen, eine andere Alternative zur BN-PAGE zu suchen. In älterer Literatur finden sich mehrere Artikel zur Analyse der Pigment-bindenden Proteinkomplexe durch Deriphat-PAGE (Markwell et al., 1979; Gregory et al., 1982; Peter et al., 1991; Sarvari et al., 1994). Diese Methode, die von den Trenneigenschaften durchaus mit der BN-PAGE vergleichbar ist, liefert auch gute spektrale Ergebnisse. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass das als Ladungsträger verwendete Deriphat, welches auch die Solubilisierung der

Komplexe bewirkt, nicht frei im Handel zu erwerben ist. Aus diesem Grund wurde versucht, das Deriphat durch frei käufliche Substanzen zu ersetzen.

Das zu entwickelnde System sollte der BN-PAGE möglichst ähnlich sein, um einen Vergleich mit bereits erhaltenen Ergebnissen zu ermöglichen.

2.2.3 Durch die Mischung mit nicht-ionischen Detergenzien wird die denaturierende Wirkung von LDS deutlich abgeschwächt

Da die BN-PAGE bei 4°C durchgeführt wird, kam SDS als Ladungsträger nicht in Frage. Dem SDS entspricht in Aufbau und Struktur das LDS, welches sich nur durch das Gegenion vom diesem unterscheidet. Durch den Ersatz des Natriums im SDS durch Lithium im LDS wird erreicht, dass LDS auch bei niedrigen Temperaturen in Lösung bleibt. Durch seine negative Ladung und seine Fähigkeit, sich an Proteine anzulagern, stellt LDS einen geeigneten Ladungsträger für die Elektrophorese bei 4°C dar. Der Nachteil von LDS besteht in den bereits für SDS beschriebenen denaturierenden Eigenschaften sowohl auf Proteinkomplexe als auch auf Einzelproteine.

Daher wurde das LDS dem Kathodenpuffer nur in sehr geringer Menge zugesetzt, um alle Komplexe mit negativer Ladung zu versehen. Zur Solubilisierung wurde eine Mischung aus DM und Digitonin verwendet, die beide nichtionisch sind und somit im Vergleich zu ionischen Detergenzien als „milder“, d.h. weniger stark denaturierend angesehen werden (Wasylewski et al., 1979). Das bedeutet, dass durch diese Detergenzien in der richtigen Konzentration ganze Komplexe aus der Membran herausgelöst werden können, die ihre native Konformation behalten. In verschiedenen Experimenten zeigte sich, dass die Mischung von DM und Digitonin die besten Ergebnisse erzielte, wohingegen der alleinige Einsatz eines der beiden Detergenzien zu unerwünschten Effekten während der Elektrophorese, d.h. zur partiellen Denaturierung einiger Komplexe bzw. zur Solubilisierung großer Lipidvesikel führte (Daten nicht gezeigt). Aus der Literatur ist bekannt, dass die Effekte auf die Solubilisierung von Membranen, die bei der Verwendung von verschiedenen Detergenzien in der Gegenwart von Lipidgemischen auftreten, nicht vorausgesagt werden können (Garavito et al., 2001). Es können zwar einige Annahmen über die vermutlichen Auswirkungen getroffen werden, allerdings müssen diese nicht eintreffen, so dass eine optimale Mischung meist nur durch Ausprobieren herausgefunden werden kann. Daher wird in den meisten Experimenten die Verwendung nur eines Detergenz bevorzugt. Im vorliegenden Fall konnte aber erst durch die Mischung verschiedener Detergenzien ein befriedigendes Ergebnis erzielt werden,

welches nach der elektrophoretischen Auftrennung der Trennung durch BN-PAGE weitgehend entsprach (Abb.10).

3 Der Cyt b₆f-Komplex liegt bereits im Etioplasten als Dimer vor

Durch die Verwendung von nativen PAGE-Systemen konnte gezeigt werden, dass der Cyt b₆f-Komplex im Chloroplasten ebenso wie im Etioplasten sowohl als Monomer als auch als Dimer vorliegt (Abb.8). Der Cyt b₆f-Komplex stellt im Chloroplasten einen Oxidoreduktase-Komplex dar, der neben dem linearen und zyklischen Elektronentransport auch an der Protonentranslokation über die Thylakoidmembran beteiligt ist. Dabei wird die dimere Assemblierungsstufe als der funktionelle Komplex angesehen, der an den Vorgängen in der Thylakoidmembran beteiligt ist (Huang et al., 1994; Breyton et al., 1997), so dass diesem bei der Durchführung der Experimente die größere Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Im Bereich des dimeren Komplexes konnten in beiden Entwicklungsstufen die vier, bezüglich ihrer Molekularmasse „großen“ Untereinheiten des Cyt b₆f-Komplexes Cyt f, Cyt b₆, Rieske und der Untereinheit IV (Hurt et al., 1982) durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht und massenspektrometrisch identifiziert werden (Abb.3/Abb.4). Durch die Anwendung der DIGE-Methode konnte die Annahme bestätigt werden, dass der dimere Cyt b₆f-Komplex des Etioplasten in Bezug auf die Molekularmasse dem dimeren Cyt b₆f-Komplex des Chloroplasten entspricht (Abb.8). Dies wurde vor allem daraus geschlossen, da sich die Untereinheiten, welche in der zweiten Dimension der BN/SDS- bzw. CNL/SDS-PAGE färbbar waren, entsprachen. Auf dieser Grundlage wird zudem davon ausgegangen, dass auch bezüglich der restlichen „kleinen“ Untereinheiten eine identische Zusammensetzung besteht. Der dimere Cyt b₆f-Komplex der Thylakoidmembran enthält neben den mindestens acht verschiedenen Proteinuntereinheiten auch mehrere Co-Faktoren. Dabei handelt es sich in höheren Pflanzen um ein 2 Fe-2 S-Cluster, vier Häme, ein Chlorophyll a und ein β-Carotin (Kurisu et al., 2003; Stroebel et al., 2003).

In Bezug auf den Etioplasten ist besonders die Bindung von Chlorophyll von Interesse, da dieses in Angiospermen in Etioplasten nicht synthetisiert wird und somit nicht zur Verfügung steht. Dadurch ergibt sich die Frage, wie der Cyt b₆f-Komplex das Fehlen des Chlorophylls kompensiert und welchen Zweck ein funktioneller Komplex im Etioplasten besitzen könnte.

3.1 Im Etioplasten wird anstelle des Chlorophylls Protochlorophyll in den dimeren Cyt b_6f -Komplex eingebaut

3.1.1 Protochlorophyll scheint eine essentielle Rolle im etioplastidären Cyt b_6f -Komplex zu besitzen

Neben der Auswertung der Kristallstrukturen kann Chlorophyll als Bestandteil des Cyt b_6f -Komplexes im Chloroplasten auch durch Absorptionsspektroskopie eindeutig nachgewiesen werden. Dabei zeigt sich im Absorptionsspektrum des isolierten Komplexes ein deutliches Maximum bei 670 nm, das durch Chlorophyll a hervorgerufen wird (Pierre et al., 1997; Wenk et al., 2005; Zhang et al., 2001).

Das Absorptionsspektrum des Etioplasten zeigt einen deutlichen Unterschied zu diesem Spektrum (Abb.21). Während der dimere Cyt b_6f -Komplex des Chloroplasten ein klar erkennbares Maximum bei 670 nm aufweist, fehlt dieses Maximum im Absorptionsspektrum des Etioplasten. Dagegen besitzt das Spektrum des Etioplasten ein Maximum bei 632 nm, welches dem Absorptionsspektrum des Chloroplasten fehlt (vgl. (Pierre et al., 1997; Wenk et al., 2005; Zhang et al., 2001)). Das Maximum bei 632 nm ist für die Gegenwart von Protochlorophyllid/Protochlorophyll charakteristisch. Die Unterscheidung zwischen Protochlorophyllid und Protochlorophyll wurde durch DC und massenspektrometrische Analysen getroffen (Abb.22/Abb.23), so dass von einem Ersatz des Chlorophylls durch Protochlorophyll ausgegangen wird. Bisher war über Protochlorophyll bekannt, dass es in geringen Mengen im Etioplasten vorliegt, mit den Prothylakoidmembranen des Etioplasten angereichert werden kann und kein Substrat für die POR darstellt (Shioi et al., 1983; Schoch et al., 1995; Klement et al., 1999). Der Befund, dass Protochlorophyll mit den Prothylakoiden isoliert wird, bedeutet, dass sich dort auch der Cyt b_6f -Komplex befinden sollte. Diese Annahme ist in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten, welche membranständige Proteine in der Prothylakoidfraktion lokalisierten (Lütz et al., 1981).

Durch den Einbau des Protochlorophylls in den Cyt b_6f -Komplex wird deutlich, dass im Etioplasten eine Möglichkeit zur Verfügung steht, die Abwesenheit von Chlorophyll im Dunkeln zu kompensieren und einen dem dimeren Cyt b_6f -Komplex des Chloroplastenentsprechenden Komplex bereits im Etioplasten zur Verfügung zu stellen. Diese hier beschriebene Möglichkeit der Natur, im Cyt b_6f -Komplex bestimmte Verbindungen in Abwesenheit durch verwandte Substanzen zu ersetzen, ist nicht nur auf das Chlorophyll a beschränkt. In Mutanten, die Echinon nicht mehr synthetisieren können, wird an dessen

Stelle β -Carotin, Zeaxanthin und Mono-Hydroxy- β -Carotin in den Cyt b_6f -Komplex eingebaut (Wenk et al., 2005).

Die Tatsache, dass die Plastiden in Abwesenheit von Chlorophyll a einen „Platzhalter“ für Chlorophyll a im Cyt b_6f -Komplex in Form von Protochlorophyll benutzen, weist auf eine essentielle Rolle des Chlorophylls a für die Assemblierung des Cyt b_6f -Komplexes hin. Damit kann nahezu ausgeschlossen werden, dass das mit dem Cyt b_6f -Komplex kristallisierte Chlorophyll a eine Kontamination darstellt.

Wie der Ersatz von Protochlorophyll durch Chlorophyll während der Ergrünung von statten geht bzw. ob es überhaupt zu einem Ersatz des Pigments kommt oder der gesamte Cyt b_6f -Komplex des Etioplasten gegen einen *de novo* assemblierten Komplex ausgetauscht wird, ist bisher nicht untersucht worden. Bisher ist nur bekannt, dass bereits nach einer Stunde kein Protochlorophyll mehr im Bereich des dimeren Cyt b_6f -Komplexes nachgewiesen werden kann (Abb.29).

3.1.2 Protochlorophyll scheint ein Bestandteil sowohl des dimeren wie auch des monomeren Cyt b_6f -Komplexes zu sein

Allen Organisationsstufen gemeinsam ist eine starke Bindung des Chlorophylls a an die Untereinheit b_6 . Bei der Trennung der Komplexuntereinheiten konnte Chlorophyll a sowohl in *Synechocystis* wie auch in *Chlamydomonas* und Spinat an Cyt b_6 gebunden nachgewiesen werden (Boronowsky et al., 2001). Diese Bindung wird wahrscheinlich durch hydrophobe Interaktion zwischen dem Phytolrest des Chlorophylls und Cyt b_6 erreicht (Wenk et al., 2005). Die Detektion der Autofluoreszenz im Etioplasten zeigte nach CNL/SDS-PAGE im Bereich des Cyt b_6f -Komplexes zwei fluoreszierende Banden. Durch Tests mit aufgereinigten Pigmenten (Daten nicht gezeigt) wurde deutlich, dass sowohl Chlorophyll wie auch Protochlorophyllid bzw. Protochlorophyll durch Anregung bei 633 nm ein starkes Autofluoreszenzsignal zeigten. Carotinoide oder die zur Verfügung stehenden Häme ergaben dagegen nach Anregung bei 633 nm kein Signal. Daraus wurde geschlossen, dass Banden, die aufgrund von Eigenfluoreszenz detektiert wurden, ein Chlorophyllderivat gebunden haben. Eine der im Etioplasten durch Autofluoreszenz detektierten Banden entsprach Cyt b_6 , d.h. dass wie im Chloroplasten das Pigment an die Cyt b_6 -Untereinheit gebunden nachgewiesen werden kann (Abb.20). Dies ist auch so zu erwarten, da Protochlorophyll ebenso wie Chlorophyll a einen Phytolrest besitzt, der für die Bindung des Pigments an Cyt b_6 eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

3.1.3 Protochlorophyll wird wie Chlorophyll a mit der Untereinheit b₆ isoliert

Das Autofluoreszenzsignal des Cyt b₆ trat nicht nur im Bereich des dimeren Cyt b₆f-Komplexes auf, sondern auch im Bereich des monomeren Cyt b₆f-Komplexes (Abb.20). Geht man davon aus, dass es sich bei diesem Signal um gebundenes Protochlorophyll handelt, steht dies im Widerspruch zu den Daten aus *Chlamydomonas*, die Chlorophyll nur im Bereich des Dimers nachweisen (Breyton et al., 1997). Die durchgeführten Experimente decken sich eher mit den Ergebnissen aus Cyanobakterien (Poggese et al., 1997). Allerdings konnte auf Ebene der Einzelproteine keine Identifikation der Pigmente durchgeführt werden, so dass nicht hundertprozentig geklärt werden konnte, ob es sich bei dem fluoreszierenden Pigment wirklich um Protochlorophyll handelte. Das Absorptionsspektrum des monomeren Cyt b₆f-Komplexes lieferte keinen Hinweis auf Protochlorophyll; allerdings konnten auch die Häme im Absorptionsspektrum des Monomers nicht sichtbar gemacht werden (Abb.21).

Zusätzlich zu Cyt b₆ konnte auch im Bereich von Cyt f ein Autofluoreszenzsignal detektiert werden (Abb.20). Dieses Protein wurde bisher nur gemeinsam mit dem kovalent gebundenen Häm aufgereinigt. Bezüglich des Chlorophyll a wurde bisher von keiner gemeinsamen Aufreinigung mit Cyt f berichtet, allerdings ist nach einem Vergleich mit den zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen diese Möglichkeit nicht völlig auszuschließen. Aufgrund der Anordnung des Chlorophylls im Cyt b₆f-Komplexes wäre eine Wechselwirkung des Tetrapyrrolrings mit der Helix f und g der SU IV denkbar, die zu einer gemeinsamen Aufreinigung führen könnte. Endgültige Klarheit wird erst die Anreicherung und Identifikation des gebundenen Pigments an das Einzelprotein bringen können.

3.1.4 Protochlorophyll erfüllt eine strukturelle Rolle im Cyt b₆f-Komplex

Über die Funktion des Chlorophylls a im dimeren Cyt b₆f-Komplex ist bisher nichts Näheres bekannt. Im Allgemeinen werden zwei verschiedene Funktionen diskutiert.

Zum einen wird über die Beteiligung des Chlorophylls an den Elektronentransportvorgängen im Cyt b₆f-Komplex nachgedacht. Durch den geringen Abstand zwischen dem Tetrapyrrolring und der Hämgruppe ist generell ein Ladungstransfer zwischen den beiden Pigmenten vorstellbar. Da bei einer Reduktion des Cyt b₆f-Komplexes mit Dithionit neben Häm auch für Chlorophyll a ein Rotshift beobachtet werden kann, wird für Chlorophyll eine Interaktion mit den b-Hämen vermutet (Wenk et al., 2005). Die Reduktion mit Ascorbat, welches nur Cyt f reduziert, führt dagegen nicht zur Änderung der spektroskopischen Eigenschaften. Ob das Chlorophyll und damit auch potentiell das Protochlorophyll wirklich aktiv am

Elektronentransfer bzw. der Signaltransduktion teilnimmt, ist durch diese Beobachtung offen, da der beschriebene Rotshift auch das Ergebnis eines elektrochromen Shifts, verursacht durch ein lokales, starkes elektrisches Feld bei Anregung der benachbarten Co-Faktoren, sein könnte (Wenk et al., 2005).

Die meisten Wissenschaftler favorisieren aber eine strukturelle Rolle des Chlorophylls a, wobei vor allem dem Phytolrest eine entscheidende Bedeutung zugemessen wird (Pierre et al., 1997). Der Vergleich der Kristallstrukturen des mitochondrialen und des plastidären Cytochrom-Komplexes macht deutlich, dass scheinbar eine der Helices des Cyt b des mitochondrialen Komplexes im Chloroplasten durch das Chlorophyll ersetzt wurde (Stroebel et al., 2003). Dadurch würde im plastidären Cyt b_6f -Komplex das Fehlen der Helix H kompensiert werden und die ansonsten sehr ähnlichen Strukturen der beiden Komplexe erklärt.

Das im etioplastidären Cyt b_6f -Komplex gefundene Protochlorophyll würde diese Hypothese, dass der Phytolrest eine wichtige Funktion zu besitzen scheint, unterstützen. Käme dem Phytolrest im Komplex keine besondere Rolle zu, wäre nur schwer zu verstehen, weshalb die Natur Protochlorophyll in den dimeren Komplex einbaut und nicht das im Etioplasten wesentlich häufiger vertretene Protochlorophyllid, dessen Synthese auch weniger aufwendig ist. Als weiterer Hinweis auf eine strukturgebende Funktion des Chlorophylls/Protochlorophylls kann gewertet werden, dass der Cyt b_6f -Komplex auch nach dem Ausbleichen des Chlorophylls normale Aktivität zeigt (Pierre et al., 1997). Zudem kann in *Chlamydomonas*mutanten, die kein Chlorophyll synthetisieren können, keine Assemblierung eines Cyt b_6f -Komplexes nachgewiesen werden (Pierre et al., 1997). Im Gegensatz dazu wird in LDS-Mutanten von *Chlamydomonas*, die nur im Licht Chlorophyll synthetisieren können, im Dunkeln der Cyt b_6f -Komplex assembliert (Pierre et al., 1997). Ob der Cyt b_6f -Komplex in dieser Mutante wie im Etioplasten Protochlorophyll zur Assemblierung des Komplexes heranzieht, wurde bisher nicht untersucht. Allerdings wäre dies eine mögliche Erklärung für die gemachten Beobachtungen.

Aufgrund der Literaturdaten und der Isolation von Protochlorophyll als Bestandteil des dimeren Cyt b_6f -Komplexes im Etioplasten scheint eine strukturgebende Rolle des Chlorophyll a/Protochlorophyll die wahrscheinlichere der beiden diskutierten Funktionen darzustellen.

3.2 Gibt es bereits eine funktionelle Elektronentransportkette im Etioplasten?

Die Tatsache, dass der dimere Cyt b_6f -Komplex bereits im Etioplasten nachgewiesen werden kann, wirft die Frage auf, welcher Grund für die Assemblierung des Holokomplexes in diesem Entwicklungsstadium vorliegt. Wie bereits erwähnt, wird der dimere Cyt b_6f -Komplex als die funktionelle Assemblierungsstufe betrachtet, so dass man davon ausgehen kann, dass der Cyt b_6f -Komplex bereits im Etioplasten eine Funktion besitzt. Durch die Tatsache, dass der Cyt b_6f -Komplex der einzige Chlorophyll-bindende Komplex ist, dem die Natur einen Chlorophyllersatz zur Verfügung stellt und damit seine Assemblierung bereits im Etioplasten sicherstellt, drängt sich die Frage auf, welche besondere Bedeutung gerade diesem Komplex in Bezug auf Elektronentransportprozesse zukommt.

Über Elektronentransportketten im Etioplasten ist bisher so gut wie nichts bekannt. In verschiedenen Arbeiten konnte in Etioplasten aus Gerste ein Ndh-Komplex als weiterer potentieller Elektronentransportkomplex nachgewiesen werden (Guera et al., 2000; Müller, 2000). In Kombination mit einer membrangebundenen Peroxidase, die möglicherweise den terminalen Elektronenakzeptor im Etioplasten darstellt, ist der Aufbau einer Elektronentransportkette denkbar (Casano et al., 2000). Nach dem Modell von Casano et al. würde diese ausgehend von NADH Elektronen über den Ndh-Komplex auf H_2O_2 als Endakzeptor übertragen. H_2O_2 wird dabei zur Reoxidation von Plastochinon benötigt, welches in diesem Modell durch NADH reduziert wird. Neues H_2O_2 wird durch die Reaktion von molekularem Sauerstoff und reduzierten Eisen-Schwefelproteinen generiert. Als Eisen-Schwefelprotein könnte dabei das Rieske-Protein des Cyt b_6f -Komplexes dienen.

Durch die Beteiligung des Cyt b_6f -Komplexes an der Elektronentransportkette wäre neben dem Elektronentransport auch ein Beitrag zum Aufbau eines Protonengradienten möglich. Da der Aufbau des plastidären Ndh-Komplexes dem des mitochondrialen Komplexes größtenteils entspricht, wird auch für den plastidären Ndh-Komplex die Fähigkeit zur Protonentranslokation angenommen (Sazanov et al., 1998; Guera et al., 2000). Der Aufbau eines Protonengradienten im Etioplasten ist spätestens durch den Nachweis des ATP-Synthase-Komplexes im Etioplasten ein Thema (Abb.4). Allerdings ist bisher offen, ob dieser Protonengradient nur für die Erzeugung von Energie in Form von ATP benötigt wird oder direkt für die Integration der Proteine in die Membran nötig ist (Guera et al., 2000).

4 Der Lil 3-Komplex ist einer der ersten Komplexe, in denen der Nachweis von Chlorophyll möglich ist

Die Proteine der beiden Photosysteme können erst nach dem Einsetzen der Chlorophyllbiosynthese akkumuliert werden. In der Abwesenheit von Chlorophyll werden die Chlorophyll-bindenden Proteine nach der Translation degradiert (Eichacker et al., 1996).

4.1 Das Lil 3-Protein ist ein Mitglied der Familie der Chlorophyll a/b-bindenden Proteine

Die durchgeführten Experimente zeigen allerdings, dass die Hauptmenge des Chlorophylls nach der Synthese nicht direkt an die Untereinheiten der Photosysteme gebunden wird, sondern an die Lil 3-Proteine gebunden vorliegt (Abb.31). Die Bindung von Chlorophyll an die Chlorophyll-bindenden Proteine der Photosysteme konnte erst nach einstündiger Belichtung gezeigt werden, wohingegen bereits nach 10 s Belichtung die Bindung von Chlorophyll a an das Lil 3-Protein nachgewiesen werden konnte.

Das Lil 3-Protein gehört zur Familie der Chlorophyll a/b- bindenden (CAB) Proteine, die alle durch mindestens ein typisches LHC-Motiv aus ca. 20 Aminosäuren, gekennzeichnet sind (Jansson, 1999). Dieses Motiv ist für die Fähigkeit dieser Proteine, Chlorophyll a bzw. Chlorophyll b zu binden, verantwortlich. Die Bindung von Chlorophyllen kann auch am Lil 3-Protein nachgewiesen werden. Im Lil 3-Komplex konnte sowohl die Bindung von Chlorophyll a wie auch von Protochlorophyll durch ein Autofluoreszenzsignal des Komplexes im Laserscanner und Absorptionsspektroskopie des Komplexes nachgewiesen werden.

Die Bindung von Chlorophyll a ist bereits für andere Mitglieder der CAB-Familie d.h. neben verschiedenen LHC-Proteinen auch für ELIP (early light inducible protein) gezeigt worden (Adamska et al., 2001; Adamska et al., 1999), wohingegen über die Bindung von Protochlorophyll an CAB-Proteine bisher nichts in der Literatur bekannt ist.

4.1.1 Handelt es sich bei dem im Lil 3-Komplex nachgewiesenen Protochlorophyll um einen Komplexbestandteil oder eine Kontamination?

Wie bereits für den Cyt b_6f -Komplex beschrieben, beschäftigt sich die neuere Literatur kaum mit dem Chlorophyll-Derivat Protochlorophyll, so dass es nicht einfach ist, eine Aussage darüber treffen, ob es sich bei dem im Absorptionsspektrum des Lil 3-Komplexes sichtbaren Protochlorophyll um einen Komplexbestandteil oder eine Kontamination des benachbarten

dimeren Cyt b_6f -Komplex handelt. Für diesen Komplex konnte bereits im Etioplasten die Bindung von Protochlorophyll gezeigt werden (Abb.21). Zwar konnten im Autofluoreszenzbild nach 10 s Belichtung zwei deutlich voneinander getrennte Banden detektiert werden, allerdings ist nicht völlig auszuschließen, dass Spuren der Pigmente des Cyt b_6f -Komplexes auch in der Bande des Lil 3-Komplexes nachzuweisen sind. Bei einer UPLC-MS/MS-Messung der gesamten Lil 3-Komplexbande (Daten nicht gezeigt) konnte neben anderen Proteinen auch Cyt b_6 nachgewiesen werden. Nachdem eine Identifikation der gebundenen Pigmente auf Ebene der Einzelproteine nicht möglich war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Absorptionsmaximum des Protochlorophylls im Lil X-Komplex von Cyt b_6 stammt, und nicht direkt von Lil 3. Cyt b_6 könnte auch im Autofluoreszenzbild der 2. Dimension im Bereich des Lil X-Komplexes sichtbar sein. Eine anschließende Coomassiefärbung erbrachte allerdings keine Banden für Proteine des Cyt b_6f -Komplexes, so dass nicht geklärt werden konnte, ob Cyt b_6 zu diesem Zeitpunkt der Ergrünung mit dem Lil 3-Protein interagiert oder nicht. Zu einem späteren Zeitpunkt der Belichtung konnte Cyt b_6 in diesem Molekularmassenbereich nicht mehr nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Cyt b_6 zumindest keinen permanenten Bestandteil des Lil X-Komplexes darstellt. Nach einstündiger Belichtung konnte auch im Lil X-Komplex kein Protochlorophyll nachgewiesen werden (Abb.29). Auf der anderen Seite wurde im Lil Y-Komplex, dem neben dem Lil 3-Protein keine weiteren Untereinheiten zugeordnet werden konnten, nach 10 s Belichtung ebenfalls Protochlorophyll nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis spricht eher für eine direkte Bindung des Protochlorophylls durch das Lil 3-Protein.

Generell ist es durchaus möglich, dass das Lil 3-Protein neben Chlorophyll a auch Protochlorophyll binden kann. Da die Bindung der Chlorophylle an die Proteine über das zentrale Magnesiumion und im Fall von Chlorophyll b zusätzlich über den Formylrest geschieht (Liu et al., 2004), wäre die Bindung von Protochlorophyll prinzipiell vorstellbar.

4.2 Die Lil 3-Komplexe könnten verschiedene Aufgaben während der Ergrünung besitzen

Die Frage nach der Aufgabe der Lil3-Proteinkomplexe im Zusammenhang mit der Ergrünung ist nicht eindeutig zu beantworten. Für die meisten Lil-Proteine ist ein Zusammenhang zwischen der Proteinexpression und photo-oxidativem Stress sichtbar (Jansson, 1999; Klimmek et al., 2006). Deshalb wird diesen Proteinen generell eine Schutzfunktion gegen

reaktive Sauerstoffspezies zugeschrieben. Allerdings stellt ausgerechnet die Expression des Lil 3-Proteins eine Ausnahme dar. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Lil-Familie, deren mRNA-Level im Hochlicht steigen, hat der Transfer von Pflanzen zu Hochlichtbedingungen auf die Expression des Lil 3-Proteins keinen Einfluss (Jansson, 1999). Dies spricht dafür, dass dieses Protein eine andere Funktion als die übrigen Lil-Proteine besitzt. Für das Lil 3-Protein sind mindestens zwei verschiedene Funktionen denkbar.

4.2.1 Die Lil 3-Komplexe könnten als temporärer Chlorophyllspeicher genutzt werden

Zum einen könnte Lil 3 als temporärer Chlorophyllspeicher genutzt werden, der die *de novo* synthetisierten Chlorophylle nach Bedarf an die *de novo* synthetisierten Chlorophyll-bindenden Proteine abgibt.

Die Funktion als vorübergehender Chlorophyllspeicher wurde bereits für die mit den Lil-Proteinen verwandten SCPs (small CAB like proteins) vorgeschlagen. ScpD, das in *Synechocystis* am Reparaturzyklus des PS II beteiligt zu sein scheint, wird eine mögliche Rolle als Chlorophyllzwischenpeicher beim Austausch der beschädigten Photosystem-Untereinheiten zugeschrieben (Yao et al., 2007).

Für eine Rolle des Lil 3-Proteins als temporärer Chlorophyllspeicher spricht die Tatsache, dass die Menge des an den Lil 3-Komplex gebundenen Pigments mit zunehmender Belichtungsdauer abnimmt, d.h. dass möglicherweise das nach dem Einsetzen der Chlorophyllsynthese gebundene Chlorophyll im Laufe der Photosystemassemblierung nach und nach an die *de novo* synthetisierten Chlorophyll-bindenden Proteine abgegeben wird, um diese vor Degradation zu schützen. Mit der Abnahme des gebundenen Pigments nimmt auch die Menge des akkumulierten Lil 3-Proteins ab; im Chloroplasten ist dieses Protein nicht mehr zu detektieren (Abb.42). Allerdings befinden sich im Chloroplasten genau auf der Höhe der Lil –Komplexe zwei LHC II-Komplexe, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich neben den LHC II-Proteinen auch eine geringe Menge des Lil 3-Proteins in dieser Bande befindet. Massenspektrometrische Analysen dieses Komplexes gaben bisher keinen Hinweis auf die Existenz des Lil 3-Proteins auf der Höhe der LHC II-Komplexe. Ein Antikörper für den Nachweis geringer Mengen an Lil 3 stand bisher nicht zur Verfügung.

Ein weiterer Punkt, der für eine mögliche Chlorophyllspeicherfunktion spricht, ist, dass die Geschwindigkeit der Chlorophyllbiosynthese nicht mit der Translationsgeschwindigkeit der Chlorophyll-bindenden Proteine korreliert. Versuche an isolierten Plastiden zeigen, dass die Synthese des Chlorophylls in keiner Weise mit der Synthese der Chlorophyll-bindenden

Proteine gekoppelt zu sein scheint (Bhaya et al., 1985). Durch Belichtung etiolierter Keimlinge stehen nach kurzer Zeit große Mengen an Chlorophyll zur Verfügung, welche von den während dieser Zeit *de novo* synthetisierten Photosystemproteinen nicht vollständig gebunden werden dürften. Über den Verbleib dieser „überflüssigen“ Chlorophylle ist bisher nichts bekannt. Denkbar wäre, dass diese entweder abgebaut werden oder irgendwo zwischengelagert werden, um bei Bedarf eingebaut werden zu können. Für zweiteres spricht die Tatsache, dass nach kurzzeitiger Belichtung und anschließender Dunkelphase zusätzliche Chlorophyll-bindende Photosystem-Untereinheiten akkumulieren können, obwohl im Dunkeln in Angiospermen keine Chlorophyllsynthese stattfinden kann (Reisinger, 2001). Allerdings ist auch bekannt, dass unter den Chlorophyll-bindenden Proteinen selbst eine Umverteilung der Chlorophylle stattfinden kann (Tanaka et al., 1991), so dass nicht zwingend von einem weiteren Protein zur Chlorophyllspeicherung ausgegangen werden muss. Im Fall einer Chlorophyllumverteilung ohne zusätzliches Chlorophyllspeicherprotein sollte sich die Gesamtmenge der Chlorophyll-bindenden Proteine nicht verändern, da kein zusätzliches Chlorophyll ins „System“ der Photosystem-Komplexe gebracht wird. Dies wurde bisher noch nicht untersucht.

4.2.2 Lil 3 könnte eine Rolle beim Chlorophylltransfer auf Chlorophyll-bindende Proteine spielen

Zum anderen könnte das Lil 3-Protein auch als Chlorophyll-Überträger dienen, d.h. die Chlorophylle nach der Biosynthese auf die Chlorophyll-bindenden Proteine übertragen. Bisher ist noch unklar, wie der Mechanismus der Chlorophyll-Bindung an die Photosystem-Proteine genau funktioniert. *In vitro* Rekonstitutionsexperimente an LHC II-Proteinen zeigen allerdings, dass für die Faltung und Chlorophyllbindung der LHC-Proteine keine weiteren Proteine benötigt werden (Horn et al., 2002).

Die Bindung des Chlorophylls an die Chlorophyll-bindenden Proteine erfolgt cotranslational (van Wijk et al., 1996), allerdings wurde bisher nicht nachgewiesen, ob das Chlorophyll direkt von den Enzymen der Chlorophyllsynthese auf die Photosystemproteine übergeht oder ob die Chlorophylle erst über ein Transferprotein an ihre endgültigen Partner gekoppelt werden. Aus der Literatur ist generell noch kein spezielles Pigmenttransferprotein bekannt. Experimente zur Chlorophyllumverteilung in Gurkenkotyledonen zeigen, dass der Chlorophylltransfer generell zwischen verschiedenen Proteinen möglich ist und Chlorophyll nicht starr an ein Protein gebunden bleiben muss (Tanaka et al., 1991).

4.3 Die genaue Zusammensetzung der Lil-Komplexe ist noch ungeklärt

Da dem Lil 3-Proteinkomplex nach Fluoreszenzdetektion und Coomassiefärbung keine weiteren Untereinheiten zugeordnet werden konnten, ist es schwierig eine abschließende Aussage über seine Zusammensetzung zu treffen.

Zum einen könnte es sich bei den beiden detektierten Assemblierungsstufen um verschiedene Multimere des Lil 3-Proteins handeln, wobei der Lil X-Komplex einem Pentamer und der Lil Y-Komplex einem Enneamer entsprechen könnte. Die Trennung des Lil Y-Komplexes nach CNL-PAGE über Ultra Performance Liquid Chromatography und MS/MS erbrachte zwar einige weitere Proteine in der Bande des Lil 3-Komplexes (Daten nicht gezeigt), allerdings konnte für keines der identifizierten Proteine die Interaktion mit dem Lil 3-Protein eindeutig belegt werden. Ohne Aufreinigung des Komplexes über Co-Immunopräzipitation ist nicht auszuschließen, dass sich nach der Elektrophorese unterschiedliche Proteinkomplexe aufgrund sich entsprechender Molekularmasse im selben Massenbereich d.h. in der gleichen Bande wieder finden.

Bei einem Vergleich mit anderen Proteinen der CAB-Familie wird deutlich, dass alle bisher untersuchten Mitglieder mit Proteinen des PS II interagieren (Yao et al., 2007; Heddad et al., 2006). Sowohl für die ELIP Proteine wie auch die SCPs werden verschiedene PS II-Proteine als Interaktionspartner angenommen. So sind die ELIP-Proteine in *Arabidopsis* wahrscheinlich an die trimeren LHC-Komplexe angelagert, wohingegen SCP eher in Nachbarschaft der PS II-Reaktionszentrumsproteine nachgewiesen wurde (Heddad et al., 2006; Yao et al., 2007).

Nach dem Auftreten der LHC-Proteine konnten die Lil 3-Proteine nach der nativen PAGE zwar auf der Höhe der LHC II-Komplexe detektiert werden, allerdings befanden sich diese Komplexe bereits vor dem Auftreten der LHC II-Proteine in diesem Molekularmassenbereich, so dass die gleiche Molekularmasse des LHC II- und des Lil 3-Komplexes nicht von einer Interaktion der beiden Proteine herrührt, sondern zufällig aufgrund ähnlicher Komplexgrößen zweier unterschiedlicher Proteinkomplexe auftritt.

5 Die POR ist in etiolierten und ergrünendem Gewebe in mehreren Aggregationsformen nachweisbar

5.1 Die membranassoziierte POR wird mit der Membranfraktion isoliert

Im Etioplasten stellt die POR A mengenmäßig das dominierende Protein dar. Obwohl es sich bei diesem Protein um ein membranassoziiertes und nicht um ein membranintegrales Protein handelt, wird es mit dem Prolamellarkörper d.h. mit der Membranfraktion des Etioplasten isoliert (Abb.4). Dies könnte nach heutigem Wissensstand zwei verschiedene Ursachen haben, die beide mit dem durch die elektrophoretische Auftrennung gewonnen Bild in Übereinstimmung zu bringen sind.

5.1.1 Die POR könnte über ein membranständiges Protein am PLB gebunden sein

Die Anheftung der POR an den Prolamellarkörper wird durch ATP und NADPH stimuliert, wobei die Anbindung der POR an die Plastidenmembran vermutlich über eine tryptophanreiche Region erfolgt (Dahlin et al., 1999). Andere Modelle gehen von einer indirekten Bindung der POR an die Membran aus. Dabei stellt die membranständige Chlorophyllsynthase den Membrananker für die POR in der Membran dar (Sundqvist et al., 1997). Die räumliche Nähe zwischen POR und Chlorophyllsynthase ist aus energetischer Sicht durchaus sinnvoll, da die Veresterung des Chlids durch die Chlorophyllsynthase direkt an die Umsetzung des PChlid durch die POR anschließt. Ein derartiger Komplex aus sieben mit Pchlid und NADPH beladenen POR-Monomeren und einem Molekül Chlorophyllsynthase, welches bereits mit GGPP beladen ist, wird von Domanskii et al. postuliert (Domanskii et al., 2003). Andere Wissenschaftler gehen sogar von der Existenz großer Multienzymkomplexe aus, die verschiedene Enzyme der Chlorophyllbiosynthese beinhalten (Sundqvist et al., 1997).

Der Nachweis der POR nach nativer Elektrophorese bis in den hochmolekularen Bereich unterstützt die Vorstellung von hochmolekularen Chlorophyllbiosynthesekomplexen. Unter Berücksichtigung der nativen/SDS-PAGE-Daten würden diese Komplexe von der POR dominiert und enthielten alle weiteren Komponenten nur in geringer Menge, da durch die Anwendung verschiedener Färbetechniken jeweils nur die POR als Enzym der Chlorophyllbiosynthese färbbar war.

5.1.2 Die POR könnte je nach Aggregationsform am oder im PLB lokalisiert sein

Aus Crosslink- und fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wird deutlich, dass die POR *in vivo* nicht als Monomer vorliegt (Wiktorsson et al., 1993; Kis-Petik et al., 1999). Es werden zwei verschiedene Assemblierungsformen unterschieden, die als Dimer und „große Aggregate“ bezeichnet werden, die aufgrund ihrer spektralen Eigenschaften unterscheidbar sind. Diese hochmolekularen Aggregate, welche über 1000 kDa groß sein können, werden nicht als reine POR-Aggregate, sondern als Fragmente des Prolamellarkörpers, in welche der POR-Komplex eingelagert ist, gedeutet (Aziz Ouazzani Chahdi et al., 1998). Es wird angenommen, dass sich die dimeren Komplexe auf der Oberfläche des PLB befinden, wohingegen die hochmolekularen Aggregate integrale Komponenten des PLB darstellen (Boddi et al., 1991; Ryberg et al., 1982; Boddi et al., 1989).

Diese Hypothese könnte erklären, weshalb nach nativer/SDS-PAGE im Bereich über 160 kDa im Bereich der POR keine distinkten Assemblierungsstufen mehr zu unterscheiden sind. Da die verwendeten Detergenzien nicht direkt am Proteingerüst angreifen, sondern in die Lipiddoppelschicht eingelagert werden, werden mit dem Proteinkomplex auch unterschiedliche Mengen der angrenzenden Lipide co-solubilisiert. Die Solubilisierung der hochmolekularen POR-Aggregate mit unterschiedlich großen, nicht klar definierten Anteilen der Lipide des PLB würde durch die Auftrennung der POR nach nativer/SDS-PAGE sichtbar (Abb.4/Abb.8).

Die hochmolekularen Aggregate könnten somit durch die Lokalisation der POR im PLB und der damit verbundenen Solubilisierung von POR-PLB-Komplexen erklärt werden, wohingegen die Isolierung des dimeren POR-Komplexes in der Verankerung der POR am PLB durch einen Multienzymkomplex, begründet liegen kann.

5.2 Es gibt verschiedene photoaktive Assemblierungsstufen der POR

Die Tatsache, dass die POR A, welche im Etioplasten das dominierende Protein darstellt, über den gesamten Molekularmassenbereich der nativen PAGE nachgewiesen werden kann (Abb.4), wirft die Frage auf, ob alle detektierten Aggregationsformen die photoaktive Form der POR darstellen. Bei der Frage nach dem photoaktiven Assemblierungszustand der POR herrscht noch keine absolute Klarheit. So wurde einerseits das Monomer aus dem Enzym, NADPH und Protochlorophyllid als kleinste funktionelle Einheit der POR beschrieben (Birve et al., 1996; Klement et al., 1999; Lebedev et al., 1999), andererseits legen Crosslink- und Überexpressionsversuche das Dimer als zentrale Einheit bei der Photoumwandlung nahe

(Wiktorsson et al., 1993; Martin et al., 1997). Ouazzani et al. konnten neben dimeren Komplexen durch die Solubilisierung des Prolamellarkörpers mit 0.1 mM DM hochmolekulare Aggregate anreichern, welche Photoaktivität zeigten (Aziz Ouazzani Chahdi et al., 1998).

5.2.1 Nach der Elektrophorese ist Pigment nur noch an die monomere Form der POR gebunden

Die photoaktive Form der POR ist durch die Bindung von Protochlorophyllid und NADPH in einem tenären Komplex gekennzeichnet. Generell können zwei photoaktive Formen des POR-Komplexes unterschieden werden, die durch Absorptionsmaxima des Protochlorophyllids bei 640 nm (PChlid₆₄₀) und 650 nm (PChlid₆₅₀) charakterisiert sind, wobei die Absorption von PChlid₆₄₀ mit einem geringeren Aggregationszustand des Pigment-POR-Komplexes als die Absorption bei PChlid₆₅₀ in Verbindung gebracht werden (Boddi et al., 1992; Aziz Ouazzani Chahdi et al., 1998). Nach CNL/SDS-PAGE der Etioplastenmembranen wurde deutlich, dass Pigment nur noch im Bereich des monomeren POR-Komplexes nachgewiesen werden kann (Abb.19). In den höhermolekularen Massenbereichen war dagegen kein Pigment durch Autofluoreszenz zu detektieren.

Dieser Befund lässt aber nicht den Rückschluss zu, dass das Monomer aufgrund des gebundenen Pigments die photoaktive Form des Pigments darstellt. Zwar ist das Enzym nur im tenären Komplex aus Protein, Pigment und NADPH photoaktiv (Boddi et al., 1989), allerdings ist nicht auszuschließen, dass aus den anderen Aggregationsstufen des Komplexes das Pigment durch die Solubilisierungsschritte bei der Komplexisolierung herausgelöst wurde.

Bei dem herausgelösten Pigment kann es sich anstelle von Protochlorophyllid auch um Chlorophyllid handeln, welches nach seiner Bildung nicht sofort aus der POR freigesetzt wird (Schoefs et al., 2003; Wiktorsson et al., 1993). Die Sensitivität dieses temporären Komplexes gegen SDS-Behandlung und der damit verbundene Verlust des Pigments wurde bereits gezeigt (Reinbothe et al., 1995). Der Zeitraum bis zur endgültigen Auflösung des photoaktiven Komplexes wird in intakten Blättern mit bis zu 60 min angegeben (Shibata, 1957; Klockare et al., 1983). Da die native Elektrophorese nicht im Dunkeln stattfand, wäre eine Reduktion des gebundenen Protochlorophyllids in der für die Elektrophorese vorbereiteten Probe denkbar, da Aziz Ouazzani Chahdi et al. zeigten, dass die POR auch in solubilisierten Proben aktiv ist (Aziz Ouazzani Chahdi et al., 1998).

Dies bedeutet, dass alle Aggregate der POR, in welchen kein Pigment nachweisbar ist, die photoaktive Form darstellen könnten und das POR-Monomer, welches als einziges ein Autofluoreszenzsignal zeigte, die photoinaktive Form darstellt. Die Möglichkeit, dass es sich bei monomeren POR-Formen um eine photoinaktive Form handelt, welche ihre finale dimere Assemblierungsstufe noch nicht erreicht hat, wurde bereits bei der Untersuchung von Erbsenepikotyl diskutiert (Boddi et al., 1998; Reinbothe et al., 1996).

Andere Wissenschaftler sehen in der monomeren Form die Aggregationsstufe, die erst eine Übergabe des Chlorophyllids an die Chlorophyllsynthase erlaubt (Butler et al., 1966). Bisher wird angenommen, dass das Enzym Chlorophyllsynthase nur in monomerer Form auftritt und die POR somit monomerisieren muss, um das Substrat an die Chlorophyllsynthase weitergeben zu können. Damit stellt die monomere Aggregationsform den Schlusspunkt der Enzymreaktion dar und würde nach Abgabe des Pigments wieder neu beladen werden können (Nielsen, 1974). Andere Quellen gehen davon aus, dass die POR nur einmal aktiv ist und nach der Abgabe des Chlorophyllids abgebaut wird (Reinbothe et al., 1996).

5.2.2 Die niedermolekularen POR-Protein-Komplexe bleiben während der Ergrünung am längsten detektierbar

Im Etioplasten dominiert die POR A das Plastidenproteom (Abb.4). Mit dem Einsetzen der Belichtung kommt es zur Umwandlung des Protochlorophyllids in Chlorophyllid und einem massiven Abbau von POR A (Santel et al., 1981; Kay et al., 1983; Forreiter et al., 1991). Die Reduzierung der POR A-Menge ist auch in den DIGE-Bildern nach CNL/SDS-PAGE der verschiedenen Belichtungsstufen sichtbar (Abb.25/Abb.32/Abb.37/Abb.42). Dabei wird deutlich, dass die hochmolekularen Aggregate der POR zuerst verschwinden, diese zeigen bereits nach einstündiger Belichtung eine deutliche Reduktion. Dies kann in Zusammenhang mit der Zersetzung des PLB stehen, die simultan mit dem Abbau der POR A beginnt (Virgin et al., 1963; Henningsen et al., 1974). Durch den Abbau des PLB wird die POR A nicht mehr gemeinsam mit dessen Lipiden solubilisiert, sondern nur noch als „reiner“ Proteinkomplex. Dies wäre eine mögliche Erklärung, weshalb die POR nach vier Stunden Belichtung nur noch in der mono- bzw. dimeren Form isoliert wird.

Im Chloroplasten ist die POR A schließlich weder durch Silber- bzw. Fluoreszenzfärbung nachweisbar noch durch immunologische Methoden detektierbar (Abb.7/Abb.17). Dies befindet sich in Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur, welche nach sechs Stunden Belichtung immunologisch nur noch eine Bande im Bereich von 38 kDa nachweisen konnten

(Barthelemy et al., 2000). Diese Molekularmasse wird mit dem Protein POR B assoziiert, das die Chlorophyllbiosynthese im Chloroplasten bewerkstelligen soll (Holtorf et al., 1995). Da der bei den durchgeführten Experimenten verwendete Antikörper nur POR A erkennt, konnte im Chloroplasten keine POR mehr nachgewiesen werden. Da die Menge der POR B nur einen Bruchteil der POR A-Menge des Etioplasten beträgt, ist diese im Chloroplasten durch Färbetechniken nicht nachweisbar.

6 Bindung der Chlorophylle an die Photosystemproteine

In Abwesenheit von Chlorophyll akkumuliert mit Ausnahme des Reaktionszentrumsproteins D2 keines der Chlorophyll-bindenden Proteine (Klein et al., 1988; Müller et al., 1999). D2 akkumuliert im Dunkeln allerdings auch nur in geringem Umfang, so dass der Nachweis nur auf immunologischer oder radioaktiver Ebene erfolgreich verläuft (Klein et al., 1988; Müller et al., 1999). Daher kann im Etioplasten keines der Photosystem-Proteine durch Coomassie- oder Fluoreszenzfärbung visualisiert werden (Abb.4/Abb.8).

Im Dunkeln wirken zwei unterschiedliche Regulationsprinzipien. Die plastidencodierten Proteine der beiden Photosysteme unterliegen einer posttranslationalen Kontrolle d.h. sie werden zwar im Dunkeln translatiert, können aber ohne Chlorophyll nicht stabilisiert werden, sondern werden wieder degradiert (Eichacker et al., 1990; Eichacker et al., 1996). Im Gegensatz dazu wird die Translation der kerncodierten LHC-Proteine erst bei einsetzender Belichtung durch das Phytochromsystem aktiviert und die Proteine in die Plastide importiert, d.h. es greift in diesem Fall ein prätranslationaler Kontrollmechanismus (Thompson et al., 1983; Horwitz et al., 1988; Mosinger et al., 1988).

6.1.1 Die Bindung des Chlorophylls an die Proteine könnte direkt oder indirekt durch Chlorophylltransferproteine bewerkstelligt werden

Ebenso wie die Translationaktivität ist die Bindung der Chlorophylle an die plastiden- bzw. kerncodierten Untereinheiten unterschiedlich organisiert. Bezüglich der plastidencodierten Chlorophyll-bindenden Proteine erfolgt wahrscheinlich eine cotranslationale Bindung des Chlorophylls an das Protein (Kim et al., 1994), wohingegen die LHC-Proteine posttranslational Chlorophyll binden (Kuttkat et al., 1997). Dieser Unterschied ist in der räumlichen Aufteilung von Chlorophyllbiosynthese und Translation von Photosystem und äußeren Antennenproteinen begründet. Durch die räumliche Nähe sind die plastidencodierten Proteine die ersten Proteine, die nach dem Beginn der Chlorophyllbiosynthese Chlorophylle

binden können. Ob die kerncodierten Proteine das Chlorophyll nach ihrem Import in die Plastide von den plastidencodierten Proteinen erhalten können oder nur direkt aus der *de novo* Synthese des Chlorophylls, ist ebenso ungeklärt wie der Verteilungsmechanismus des Chlorophylls an die plastidencodierten Proteine. In Versuchen an Gurkenkotyledonen wurde gezeigt, dass die Umverteilung der Chlorophylle zwischen verschiedenen Chlorophyll-bindenden Proteinen durchaus möglich ist, allerdings konnte bisher nur die Abgabe von Chlorophyll des LHC-Komplexes an Photosystemzentrumsproteine nachgewiesen werden und nicht umgekehrt (Tanaka et al., 1991).

Wie bereits erwähnt (siehe Kap. 4.2.2) ist bisher unklar, ob das Chlorophyll direkt von den Enzymen der Chlorophyllbiosynthese an die Chlorophyll-bindenden Proteine weitergegeben wird, oder ob an der Übergabe der Chlorophylle an die Photosystemproteine noch weitere Proteine beteiligt sind. Ein möglicher Kandidat für diese Aufgabe wäre das Lil 3-Protein, das bereits kurz nach dem Einsetzen der Chlorophyllbiosynthese nachweisbare Mengen an Chlorophyll gebunden hat und über dessen potentielle Aufgaben bereits im Kapitel 4.2.2 diskutiert wurde. Die kerncodierten Lichtsammelproteine scheinen zumindest *in vitro* keine weiteren Hilfsproteine/-faktoren zu benötigen, um die Chlorophylle zu binden und zu höhermolekularen Komplexen zu assemblieren (Horn et al., 2002; Horn et al., 2004). *In vivo* wird bisher angenommen, dass das Chlorophyll direkt nach dem Import durch die äußere Membran ohne die Beteiligung weiterer Proteine an die LHC-Proteine gebunden wird (Hooper et al., 1999). Entsprechende Versuche mit den plastidencodierten Untereinheiten sind bisher nicht bekannt, so dass für diese Proteine der Mechanismus der Chlorophyllbindung völlig offen ist.

6.1.2 Nach einer Stunde Belichtung ist keine hierarchische Chlorophyll a-Verteilung nachweisbar

Die Frage nach der Existenz einer Hierarchie, in welcher die Verteilung des Chlorophylls an die Proteine erfolgt, konnte bisher noch nicht beantwortet werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass bei der Verteilung des Chlorophylls keines der Photosystemkomplexproteine, sondern der Cyt b_6f -Komplex oberste Priorität besitzt (Abb.30). Dieser war der erste Komplex der Elektronentransportkette der Thylakoidmembran, in dem nach der Belichtung Chlorophyll nachgewiesen werden konnte. Dagegen konnten die Proteine der beiden Photosysteme in etwa zeitgleich nach Belichtung aufgrund von Autofluoreszenzsignalen und Absorptionsspektroskopie nachgewiesen werden

(Abb.27/Abb.29). Versuche mit Chlorophyllanaloga deuten auf die Möglichkeit einer präferentiellen Bindung von Chlorophyll an PS I-Proteine hin (Eichacker et al., 1996). Die Proteine des PS II weisen dagegen mit Ausnahme von CP47 im Vergleich zu den PS I-Proteinen eine geringere Affinität für Chlorophyll auf und sollten dieses daher erst nach den PS I-Proteinen binden.

Die Detektion von autofluoreszenten Proteinen konnte keine Klarheit über eine Gewichtung der Chlorophyllverteilung liefern. Nach Kurzzeitbelichtung konnte Chlorophyll noch nicht in Kombination mit Photosystemproteinen gefunden werden (Abb.31). Nach einstündiger Belichtung konnten schließlich alle Photosystem-Proteine aufgrund der Autofluoreszenz detektiert werden (Abb.27). Dabei zeigte sich, dass die Menge an Chlorophyll, welches noch an die Proteine gebunden war, gerade ausreichte, um visualisiert zu werden.

6.1.3 Die Reaktionszentrumsproteine des PS II weisen eine geringe Affinität zu Chlorophyll auf

Bei der Betrachtung des Chloroplasten nach nativer/SDS-PAGE wurde deutlich, dass die einzelnen Proteinuntereinheiten zumindest nach Denaturierung eine unterschiedlich hohe Affinität zu Chlorophyll aufweisen (Abb.16). Im Fall des PS II konnte keines der beiden Reaktionszentrumsproteine durch Autofluoreszenz visualisiert werden, wohingegen alle anderen bekannten Chlorophyll-bindenden Proteine zu detektieren waren. Die Kristallstrukturdaten aus *Synechococcus* weisen aber sowohl für D2 wie auch für D1 die Bindung von drei Chlorophyllmolekülen nach (Zouni et al., 2001). In der geringen Anzahl von Chlorophyllmolekülen pro Einzelprotein könnte auch das fehlende Autofluoreszenzsignal begründet liegen. Im Gegensatz zu den beiden Reaktionszentrumsproteinen des PS II binden alle anderen Proteine zwischen 14 und 40 Chlorophylle (Nelson et al., 2006), die zu einem Autofluoreszenzsignal beitragen können. Auf der anderen Seite binden die niedermolekularen Untereinheiten des PS I im Durchschnitt nicht mehr Chlorophyll als die beiden Reaktionszentrumsproteine des PS II (Fromme et al., 2001; Nelson et al., 2006) und sind nach nativer/SDS-PAGE noch sichtbar (Abb.16). Dies kann bedeuten, dass die Reaktionszentrumsproteine im Verhältnis zu allen anderen Chlorophyll-bindenden Proteinen die niedrigste Affinität für Chlorophyll besitzen und daher die Wechselwirkung des Chlorophylls mit den Reaktionszentrumsproteinen nur schwach ausgeprägt ist. Eine geringe Affinität der PS II-Reaktionszentrumsproteine für Chlorophyll wurde bereits durch radioaktive Markierungsversuche der plastidencodierten Proteine in isolierten Etioplasten

beobachtet (Eichacker et al., 1996). Die Bindung der Chlorophylle an die inneren und äußeren Antennenproteine scheint dagegen relativ stabil zu sein. Zwar wird der Großteil der Pigmente nach SDS-PAGE im Bereich der Lauffront detektiert, aber die am Protein verbleibende Menge ist ausreichend, um im Fluoreszenzscanner detektiert werden zu können.

6.1.4 Der Zeitpunkt der Chlorophyllbindung an D2 ist offen

Da D2 auch in Abwesenheit von Chlorophyll akkumuliert, stellt sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt das Chlorophyll an die Reaktionszentrumsproteine gebunden wird. Im Etioplasten existieren bereits RC-Prä-Komplexe, die aus D2, Cyt b_{559} und pD1 bestehen (Müller et al., 1999). Im Dunkeln kann allerdings nur D2 immunologisch nachgewiesen werden, d.h. pD1 wird in Abwesenheit von Chlorophyll degradiert. Nach dem Einsetzen der Chlorophyllbiosynthese wird pD1 gegen Proteolyse geschützt und ein monomeres RC-Komplex kann nachgewiesen werden (Müller et al., 1999). Bei der Assemblierung des monomeren PS II-Reaktionszentrumskomplexes könnte eine Übergabe von Chlorophyll an das D2-Protein erfolgen. Allerdings konnte im Bereich eines möglichen RC II-Komplexes, welcher nach einstündiger Belichtung immunologisch zu detektieren war, kein eindeutiges Autofluoreszenzsignal detektiert werden (Abb.28). Prinzipiell ist die Fluoreszenzdetektion von Chlorophyll im RC II-Komplex möglich (Gounaris et al., 1990), so dass dies bedeuten könnte, dass die Chlorophyllbindung nicht auf Ebene des RC II-Komplexes stattfindet, sondern erst zu einem späteren Zeitpunkt.

Auf der anderen Seite wäre aber auch eine Bindung von Chlorophyll vor der Bildung des RC-Komplexes d.h. auf der Ebene des Einzelproteins denkbar, wenn D1 erst in der Gegenwart von Chlorophyll stabil in den RC-Komplex integriert wird. Dann würden bis zum Einsetzen der Chlorophyllsynthese immer wieder D2-Proteine ohne D1 vorliegen, die nach Belichtung direkt Chlorophyll binden könnten. Da für die Akkumulation von D2 vor allem die Gegenwart von Cyt b_{559} und weniger Chlorophyll entscheidend ist (Klein et al., 1988; Morais et al., 1998; Müller et al., 1999), wäre es durchaus möglich, dass die Bindung von Chlorophyll an D2 erst mit der Anlagerung der inneren Antennenproteine an das RC stattfindet. Da diese generell in der Lage sind, eine größere Anzahl an Chlorophyllmolekülen als D1 zu binden, wäre eine Ab- bzw. Übergabe von Chlorophyllmolekülen an D2 von CP43 oder CP47 durchaus denkbar.

7 Assemblierung der Photosystem-Komplexe

Von den vier membranständigen Komplexen der Thylakoidmembran, welche an der Photosynthese beteiligt sind, liegen zwei bereits im Etioplasten vollständig assembliert vor. Dabei wird ein Komplex als „vollständig“ definiert, wenn er dem aus dem Chloroplasten bekannten Komplex, welcher die größte Komplexität an Untereinheiten bzw. die höchste Molekularmasse besitzt, entspricht.

Bei den beiden bereits im Etioplasten vollständig assemblierten Komplexen handelt es sich zum einen um den Cyt b_6f -Komplex, der bereits in Kapitel 3 ausführlich behandelt wurde und zum anderen um die ATP-Synthase. Die ATP-Synthase, die kein Chlorophyll bindet, kann im Gegensatz zum Cyt b_6f -Komplex unabhängig von der Chlorophyllbiosynthese assemblieren. In aufgereinigten Prothylakoidmembranen aus Etioplasten werden die Untereinheiten der ATP-Synthase als dominierende Proteine beschrieben (Lindsten et al., 1988). Im Etioplasten wird die ATP-Synthase mit einer regulatorische Funktion beim Aufbau eines Protonengradienten in Verbindung gebracht, der Voraussetzung für die Membranintegration verschiedener Proteine ist (Fischer et al., 1997; Cline et al., 1992; Cohen et al., 1995). Allerdings ist ebenso wie für den Cyt b_6f -Komplex unklar, welche Faktoren die Synthese und Assemblierung dieser beiden Komplexe im Etioplasten auslösen.

Im Gegensatz dazu kann bei beiden Photosystemen während der Ergrünung die schrittweise Assemblierung der Komplexe beobachtet werden. Dies betrifft vor allem die Assemblierung der Chlorophyll-bindenden Proteine, da diese erst mit einsetzender Belichtung akkumulieren können und das gebundene Chlorophyll eine empfindliche Nachweismethode für die verschiedenen Proteine darstellt. Die Assemblierung der einzelnen Photosynthesekomplexe wird in allen Fällen als abgeschlossen angesehen, wenn das aus dem Chloroplasten bekannte Assemblierungsniveau erreicht ist.

7.1 Die Assemblierung von PS II kann durch native/SDS-PAGE in mehr Einzelschritte aufgelöst werden als von PS I

Obwohl die *de novo* Assemblierung beider Photosysteme erst mit dem Beginn der Chlorophyllsynthese einsetzt, eignet sich das verwendete System vor allem für die Untersuchung des PS II. Dies liegt vor allem am Aufbau der beiden Photosystemkomplexe. Die beiden Proteine des Reaktionszentrums des PS I bestehen jeweils aus 11 Transmembranhelices, welche in eine N- und eine C-terminale Domäne unterteilt werden

können. Die N-terminale Domänen von PsaA bzw. PsaB sind homolog zu den inneren Antennenproteinen CP43 und CP47 des PS II (Hippler et al., 2002). Da die Assemblierung des PS I mit der Bildung des Reaktionszentrums startet (Hippler et al., 2002), besitzt bereits das erste Assemblierungsintermediat eine beträchtliche Molekularmasse. Nach der Bildung des Reaktionszentrums aus den beiden Einzelproteinen PsaA und PsaB mit einer Molekularmasse von jeweils über 80 kDa, liegt die Größe dieses Komplexes bereits über 160 kDa. Eine anschließende Anlagerung weiterer PS I-Proteine, die alle unter 20 kDa groß sind, führt nur zu einer geringen Molekularmassenzunahme, welche das Laufverhalten des Komplexes in der nativen PAGE nur geringfügig beeinflusst und daher kaum zu detektieren ist.

Zwar startet die Assemblierung des PS II auch mit der Bildung des Reaktionszentrums, allerdings besitzen dessen beide Untereinheiten Molekularmassen um die 35 kDa. Dies führt zu einem wesentlich kleineren Assemblierungsintermediat, dessen Molekularmassenveränderung durch die sequentielle Anlagerung der inneren Antennenproteine deutlich sichtbar ist. Da in höheren Pflanzen das PS II im Gegensatz zu PS I dimerisiert, ist dort ein weiterer Schritt in der Assemblierung des vollständigen Komplexes zu beobachten.

Die Assemblierung der „kleinen“ Proteine (<10 kDa) in die Komplexe kann für beide Photosysteme durch die Verwendung der nativen PAGE nicht direkt nachverfolgt werden, da diese minimalen Molekularmassenänderungen nicht mehr durch das verwendete Gelsystem aufzulösen sind. Aussagen bezüglich des Zeitpunkts der Assemblierung dieser Untereinheiten in den Komplex sind nur durch Vergleich mit entsprechenden Mutanten oder die direkte Identifizierung der entsprechenden Proteine über Massenspektrometrie oder Immunodetektion möglich.

7.2 Die Assemblierung der Komplexe des linearen Elektronentransports ist nach vier Stunden Belichtung abgeschlossen

7.2.1 Der PS I-Reaktionszentrumskomplex ist nach einstündiger Belichtung assembliert

Photochemische Messungen der Elektronentransportvorgänge während der Ergrünung zeigen eine sequentielle Aktivierung der beiden Photosysteme (Egneus et al., 1972; Plesnicar et al., 1973; Kyle et al., 1982; Ohashi et al., 1989). Dabei zeigen alle Untersuchungen, dass PS I-Aktivität im Vergleich zu PS II zu einem früheren Zeitpunkt während der Ergrünung nachgewiesen werden kann. Bereits eine Stunde nach der Belichtung etiolierter Gerste ist

PS I-Aktivität photochemisch nachweisbar (Ohashi et al., 1989). Zu diesem Zeitpunkt war elektrophoretisch ein Komplex nachweisbar, der die beiden Chlorophyll-haltigen Reaktionszentrumsproteine enthielt (Abb.27). Ein derartiger Komplex wird als minimale Einheit beschrieben, an welcher photochemische Aktivität nachgewiesen werden kann (Bengis et al., 1975).

Nach zweistündiger Belichtung ist photochemisch der Elektronenübertrag auf Ferredoxin nachweisbar. Da für die Anlagerung von Ferredoxin an das Reaktionszentrum die Untereinheiten PsaC und PsaD nötig zu sein scheinen (Scheller et al., 2001; Andersen et al., 1992), müssen diese spätestens zu diesem Zeitpunkt Bestandteil des PS I-Komplexes sein. Diese beiden Proteine konnten elektrophoretisch nicht nachgewiesen werden, allerdings konnte nach zweistündiger Belichtung eine schwach fluoreszierende Bande im Bereich von 20 kDa detektiert werden, welche PsaE zugeordnet wurde. Dieses Protein scheint für die transiente Bildung des PS I-Ferredoxin-FNR-Komplex verantwortlich zu sein (van Thor et al., 1999), so dass ab diesem Zeitpunkt theoretisch NADP-Reduktion nachweisbar sein sollte. Photochemisch wird diese aber erst nach vierstündiger Belichtung beschrieben. Dabei muss beachtet werden, dass das Fluoreszenzsignal, welches als PsaE identifiziert wurde, nur schwach ausgeprägt war, d.h. das nur geringe Mengen des Komplexes zu diesem Zeitpunkt vorlagen, die möglicherweise für eine photochemische Detektion nicht ausreichen. Das Protein konnte zu diesem Zeitpunkt durch exogene Färbemethoden nicht sichtbar gemacht werden (Abb.34). Dies war erst nach vierstündiger Belichtung möglich, d.h. zum Zeitpunkt der photochemischen Detektion. Da die FNR als peripherer Bestandteil des PS I vorliegt, kann sich das Enzym bei der Solubilisierung leicht vom PS I-Komplex lösen und wird daher nicht mit dem Komplex aufgetrennt. Bei der FNR handelt es sich zudem um ein lösliches Protein, so dass bei der Membranpräparation nicht nachgewiesen werden konnte, zu welchem Zeitpunkt die FNR für den Elektronenübertrag zur Verfügung stand.

7.2.2 Die Assemblierung des PS I-LHC-Komplex ist nach zweistündiger Belichtung abgeschlossen

Zwei Stunden nach dem Einsetzen der Belichtung kann die Integration der LHC-Proteine in die innere Plastidenmembran nachgewiesen werden (Dreyfuss et al., 1994; Dreyfuss et al., 1994; Kleffmann et al., 2007). Zu diesem Zeitpunkt sind sowohl die äußeren Antennenproteine des PS I wie auch des PS II sichtbar. Allerdings besteht ein Unterschied im Assemblierungsgrad von LHC I und LHC II. So berichten Dreyfuss und Thornber nach

zweistündiger Belichtung bereits von der Existenz von PS I-LHC I-Komplexen, wohingegen die LHC II-Proteine zu diesem Zeitpunkt erst in monomeren und trimeren LHC II-Komplexen vorliegen (Dreyfuss et al., 1994; Dreyfuss et al., 1994). Dabei ist zu beachten, dass bei diesen Experimenten die Keimlinge nicht in völliger Dunkelheit angezogen wurden, sondern bereits kurz vor dem Beginn der kontinuierlichen Belichtung kurzzeitig belichtet wurden. Somit ist das Ergebnis dieser Experimente bezüglich der *de novo* Assemblierung unter Vorbehalt zu sehen. Experimente mit kurzzeitig belichteten Keimlingen, die anschließend wieder im Dunkeln inkubiert wurden, zeigen, dass dies ausreicht, um die Chlorophyllsynthese und die Akkumulation der Chlorophyll-haltigen Proteine sowie ihre Komplexassemblierung zu initiieren (Daten nicht gezeigt).

Der Vergleich mit den Autofluoreszenzdaten nach CNL-PAGE zeigt zwar im Bereich des PS I-LHC I-Komplexes eine Bande, allerdings ist nach CNL/SDS-PAGE kein LHC-Protein aufgrund von Autofluoreszenz sichtbar (Abb.34). Dies kann aber auch daran liegen, dass die zu diesem Zeitpunkt vorliegende Proteinmenge zu gering war, um ein detektierbares Signal zu geben. Nach vierstündiger Belichtung konnte auf exakt derselben Höhe der PS I-LHC I-Komplex sichtbar gemacht werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Komplex bereits nach zweistündiger Belichtung die gleiche Zusammensetzung besaß (Abb.37). Da im Gegensatz zu LHC II während der Ergrünung keine „reinen“ LHC I-Komplexe detektierbar sind, liegt der Schluss nahe, dass die LHC I-Proteine nicht über einen LHC-Präkomplex, sondern direkt an das PS I assemblieren. Da in höheren Pflanzen der PSI-LHC I-Komplex als das finale Assemblierungsstadium des PS I angesehen wird (Nelson et al., 2006), kann die Assemblierung des PS I nach zwei Stunden als abgeschlossen betrachtet werden.

7.2.3 PS II liegt nach einstündiger Belichtung als monomerer PS II-Komplex vor

PS II-Aktivität kann photochemisch erst eine halbe Stunde nach der ersten Detektion von PS I-Aktivität nachgewiesen werden (Ohashi et al., 1989). Dazu wird die Elektronenübertragung von Wasser auf DCIP gemessen. Für diese Reaktion ist minimal die Existenz eines Komplexes aus monomerem PS II und dem Wasserspaltungsapparat nötig. Der monomere PS II-Komplex kann bereits nach einstündiger Belichtung durch Autofluoreszenz nachgewiesen werden (Abb.27). Da die Bindungskräfte, über die der Wasserspaltungsapparat an das PS II gebunden ist, nur gering ausgeprägt sind, wird er bei der Solubilisierung bzw. während der daran anschließenden Elektrophorese vom PS II-Komplex getrennt und seine

Untereinheiten liegen als Einzelproteine vor. Theoretisch wären somit bereits nach einer Stunde Belichtung die Voraussetzung für PS II-Aktivität erfüllt. Die Tatsache, dass diese photochemisch erst zu einem späteren Zeitpunkt detektierbar war, könnte wiederum an der geringen Menge der vorhandenen Komplexe liegen.

Die Detektion von Assemblierungsintermediaten, die zum monomeren PS II-Komplex führen, konnte auf der Basis der Einzelproteinautofluoreszenz nicht durchgeführt werden, da weder D1 noch D2 aufgrund von Autofluoreszenz oder durch Cy-Markierung detektierbar waren (Abb.27). Mögliche Ursachen hierfür wurden bereits diskutiert (Kap. 6.1.3). Ein PS II-Präkomplex aus diesen beiden Proteinen wird als Ausgangspunkt der PS II-Assemblierung angesehen und kann bereits im Etioplasten radioaktiv und immunologisch detektiert werden (Müller et al., 1999).

Der monomere PS II-Komplex kann durch die Autofluoreszenz von CP43 und CP47 zeitgleich mit dem RC47-Komplex detektiert werden, so dass sich die Frage ergibt, ob der RC47-Komplex ein „reales“ Assemblierungsintermediat oder ein Solubilisierungsartefakt, das aus Komplexen mit schwach assoziierten CP43 resultiert, darstellt. Da nach nativer/SDS-PAGE CP43 nicht nur in Komplexen, sondern auch als Einzelprotein nachweisbar ist (Abb.27), ist die Möglichkeit eines Solubilisierungsartefakts nicht auszuschließen. Zudem ist es bisher noch nicht gelungen, Plastiden zu einem Zeitpunkt zu isolieren, zu welchem diese nur den RC47- und keinen höhermolekularen PS II-Komplex enthalten.

Daher wäre es durchaus möglich, dass keine zeitversetzte, sondern eine zeitgleiche Anlagerung der beiden inneren Antennenproteine an den Reaktionszentrumkomplex stattfindet. Ob die Interaktion von CP43 mit PsbK, die vor der Assemblierung von CP43 in den PS II-Komplex zu beobachten ist (Sugimoto et al., 2003), den Verlauf der Assemblierung zeitlich regulieren kann, ist bisher nicht geklärt. Ebenso ist bisher unklar, ob ein ähnlicher Mechanismus für CP47 existiert.

7.2.4 Ist die Assemblierung des dimeren PS II-Komplexes während der Ergrünung mit der Existenz von Granathylakoiden gekoppelt?

Der nächste nachweisbare Schritt bei der *de novo* Assemblierung ist die Dimerisierung des PS II-Komplexes, welche nach zweistündiger Belichtung zu beobachten ist. Das Dimer ist die Assemblierungsstufe, welche *in vivo* Bestandteil der Granastapel der Thylakoidmembran und der Superkomplexe ist (Santini et al., 1994; Rogner et al., 1996; Hankamer et al., 1997). Dagegen wird der monomere PS II-Komplex, der eine eigenständige Assemblierungsstufe des

PS II darstellt, den Stromalamellen zugeordnet. Inwieweit die Verteilung der Proteinkomplexe auf die unterschiedlichen Bereiche der Thylakoidmembran auf die sich im Aufbau befindlichen Thylakoidmembranen übertragen werden kann, ist offen. Der genaue Zeitpunkt, zu welchem die ersten Granastrukturen nachweisbar sind, wurde bisher nicht bestimmt. Gegenwärtig existieren nur Daten, die deutlich ausgeprägte Granastapel nach 24 stündiger Belichtung beschreiben (Von Wettstein et al., 1995). In diesem Zusammenhang ergibt sich ebenfalls die Frage, ob die Existenz von hochmolekularen Membranproteinkomplexen die Voraussetzung für die Bildung der Granathylakoide darstellt oder umgekehrt. Ein Einfluss von Proteinkomplexen auf die Erhaltung der lamellaren Membranstrukturen wurde bereits beschrieben (Giroud et al., 1988).

7.2.5 Die LHC II-Komplexe assemblieren nach vierstündiger Belichtung an das PS II

Der letzte Schritt ist die Bildung des PS II-Superkomplexes, der nach vier Stunden abgeschlossen ist.

Im Vergleich zu den LHC I-Proteinen ist die Bildung verschiedener LHC II-Komplexe im Laufe der Ergrünung nach nativer/SDS-Elektrophorese zu beobachten (Abb.34/Abb.39). So ist nach zweistündiger Belichtung erstmals eine schwach fluoreszierende Bande im Bereich des monomeren LHC II-Komplexes zu detektieren. Der von Dreyfuss und Thornber beschriebene trimere Komplex, der aus Keimlingen isoliert werden konnte, welche unter periodischer Kurzzeitbelichtung angezogen wurden, trat bei im Dunkeln angezogenen Keimlingen zu diesem Zeitpunkt nicht auf (Dreyfuss et al., 1994). Das LHC II-Trimer konnte in etioliertem Gewebe erst nach vier Stunden Belichtung detektiert werden, ebenso wie die Assoziation des PS II-Komplexes mit den äußeren Antennenproteinen, d.h. dass die Assemblierung der LHC II-Proteine im Vergleich zur Assemblierung der LHC I-Proteine ein sequenzieller Prozess über mehrere Intermediate zu sein scheint. Bei zeitgleicher Integration der LHC-Proteine in die innere Plastidenmembran führt dies für das PS II zu einem im Vergleich zum PS I zeitlich verzögertem Auftreten des Photosystem-LHC-Komplexes und damit zu einer zeitlich versetzten vollständigen Funktionalität des PS II. Die Tatsache, dass das PS I vor dem PS II vollständig assembliert vorliegt, zeigt, dass nicht nur die für RC der beiden Photosysteme eine sequentielle Aktivierung vorliegt, sondern auch für den Gesamtkomplex aus Photosystem und äußeren Antennen und dieser der Reihenfolge der Photosystem-Aktivierung entspricht.

In Übereinstimmung mit den photochemischen Daten, welche linearen Elektronentransport vier Stunden nach Beginn der Belichtung belegen (Ohashi et al., 1989), stimmt die Komplexzusammensetzung der Thylakoidmembrankomplexe prinzipiell mit der Zusammensetzung nach vierstündiger Belichtung etiolierter Keimlinge überein (Abb.43). Im weiteren Verlauf der Ergrünung sind keine qualitativen Änderungen, sondern nur noch quantitative Änderungen der einzelnen Komplexe zu beobachten, d.h. die Menge einiger Komplexe nimmt zu (Photosystem- und LHC-Komplexe) bzw. ab (Lil 3-Komplexe).

7.3 Möglicher zeitlicher Verlauf der Ergrünung

Das folgende Schema zeigt den möglichen zeitlichen Verlauf der *de novo* Assemblierung der Thylakoidmembrankomplexe. Dabei ist für jede Entwicklungsstufe nur die Assemblierungsstufe jedes Komplexes mit der zu diesem Zeitpunkt höchsten Molekularmasse dargestellt. Die Reihenfolge der Assemblierung der kleinen Komplexuntereinheiten, die im verwendeten Gelsystem nicht verfolgt werden konnte, wurde der Literatur entnommen (Müller et al., 1999; Hooper et al., 1999; Hippler et al., 2002; Saenger et al., 2002; Minagawa et al., 2004; Rokka et al., 2005; Nelson et al., 2006).

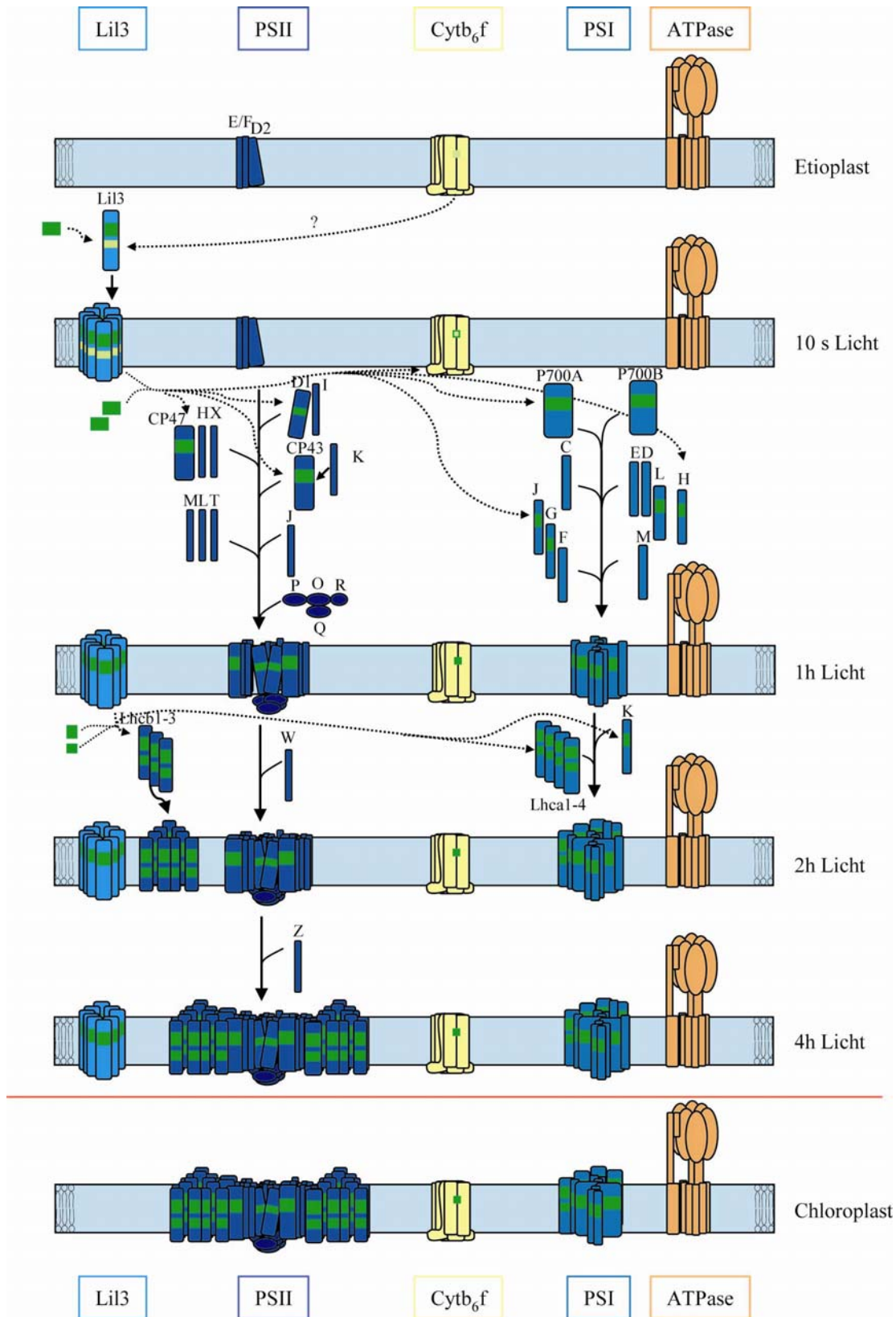


Abb.44 Möglicher Verlauf der Komplexassemblierung während der Ergrünung

Ausgehend von der Situation im Etioplasten wurde der Assemblierungszustand der Membranproteinkomplexe nach 10s, 1h, 2h und 4h Belichtung und im Chloroplasten dargestellt. Proteinuntereinheiten des ATP-Synthasekomplexes sind in orange, Untereinheiten des Cytochrom b_6f -Komplexes in gelb, Untereinheiten des Photosystem II bzw. Photosystem I in blau bzw. blaugrün und der Lil 3-Komplex in hellblau dargestellt. Chlorophyll a-Moleküle sind als hellgrüne Rechtecke, Chlorophyll b-Moleküle als dunkelgrüne Rechtecke und Protochlorophyll als gelbgrünes Rechteck wiedergegeben.

Im Etioplasten liegen sowohl der Cyt b_6f - wie auch der ATP-Synthasekomplex vollständig assembliert vor. Der dimere Cyt b_6f -Komplex enthält anstelle des Chlorophylls Protochlorophyll. Von den anderen Chlorophyll-bindenden Proteinen kann im Etioplasten nur D2 nachgewiesen werden (Abb.44, Etioplast).

Nach 10 sekundiger Belichtung ist im dimeren Cyt b_6f -Komplex neben Protochlorophyll auch Chlorophyll a nachzuweisen. Zudem ist zu diesem Zeitpunkt ein Lil 3-Komplex zu detektieren, dessen Molekularmasse einem enneameren Komplex entsprechen könnte. Das Absorptionsspektrum zeigt sowohl Chlorophyll a wie auch Protochlorophyll als Bestandteile dieses Komplexes, wobei Protochlorophyll aus dem Cyt b_6f -Komplex abgegeben worden sein könnte (Abb.44, 10 s Licht).

Da nach einstündiger Belichtung bereits der komplette PS I-Komplex vorliegt, müssen während der Zeitspanne zwischen 10 Sekunden und einer Stunde Belichtung die meisten Assemblierungsschritte ablaufen. Gleiches gilt für das PS II, das nach einer Stunde in seiner monomeren Form detektiert werden kann, wobei in beiden Photosystemen Chlorophyll a vorliegt (Abb.44, 1 h Licht).

Nach zweistündiger Belichtung ist die Assemblierung des PS I-Gesamtkomplexes durch die Anlagerung der äußeren Antennenproteine abgeschlossen, wobei zu diesem Zeitpunkt neben Chlorophyll a erstmals Chlorophyll b nachgewiesen wird. Im Gegensatz zum PS I liegen die äußeren Antennen des PS II und der PS II-Komplex nach zweistündiger Belichtung als eigenständige, von einander getrennt isolierte Komplexe vor. Der PS II-Komplex selbst liegt als Dimer vor (Abb.44, 2 h Licht).

Die Assemblierung aller Thylakoidmembrankomplexe kann nach vier Stunden Belichtung als abgeschlossen betrachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt der Ergrünung können auch für das PS II Superkomplexe aus PS II und äußeren Antennenproteinen isoliert werden, so dass damit für alle am photosynthetischen Elektronentransport beteiligten Proteinkomplexe die aus dem Chloroplasten bekannte Organisationsstufe erreicht ist. Der einzige Unterschied zum Chloroplasten besteht im Nachweis des Lil 3-Komplexes nach vierstündiger Belichtung, dessen Nachweis im Chloroplasten bisher noch nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte (Abb.44, 4 h Licht, Chloroplast).

E Literaturverzeichnis

Adam, Z., Rudella, A. and van Wijk, K.J. (2006). Recent advances in the study of Clp, FtsH and other proteases located in chloroplasts. *Curr Opin Plant Biol* **9** (3), 234-40

Adamska, I., Kruse, E. and Kloppstech, K. (2001). Stable insertion of the early light-induced proteins into etioplast membranes requires chlorophyll a. *J Biol Chem* **276** (11), 8582-7

Adamska, I., Roobol-Boza, M., Lindahl, M. and Andersson, B. (1999). Isolation of pigment-binding early light-inducible proteins from pea. *Eur J Biochem* **260** (2), 453-60

Adir, N. and Ohad, I. (1988). Structural properties of the D1 and surrounding photosystem II polypeptides as revealed by their interaction with cross-linking reagents. *J Biol Chem* **263** (1), 283-9

Amann, K., Lezhneva, L., Wanner, G., Herrmann, R.G. and Meurer, J. (2004). ACCUMULATION OF PHOTOSYSTEM ONE1, a member of a novel gene family, is required for accumulation of [4Fe-4S] cluster-containing chloroplast complexes and antenna proteins. *Plant Cell* **16** (11), 3084-97

Anandan, S., Morishige, D.T. and Thornber, J.P. (1993). Light-induced biogenesis of light-harvesting complex I (LHC I) during chloroplast development in barley (*hordeum vulgare*). Studies using cDNA clones of the 21- and 20-kilodalton LHC I apoproteins. *Plant Physiol* **101** (1), 227-36

Andersen, B., Koch, B. and Scheller, H.V. (1992). Structural and functional analysis of the reducing side of photosystem I. *Physiol. Plant.* **84** (1), 154-61

Anderson, J.M. (2002). Changing concepts about the distribution of Photosystems I and II between grana-appressed and stroma-exposed thylakoid membranes. *Photosynth Res* **73** (1-3), 157-64

Anderson, J.M. and Melis, A. (1983). Localization of different photosystems in separate

regions of chloroplast membranes. Proc Natl Acad Sci U S A **80** (3), 745-9

Apel, K. and Kloppstech, K. (1978). The plastid membranes of barley (*Hordeum vulgare*). Light-induced appearance of mRNA coding for the apoprotein of the light-harvesting chlorophyll a/b protein. Eur J Biochem **85** (2), 581-8

Apel, K., Santel, H.J., Redlinger, T.E. and Falk, H. (1980). The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare L.*). Isolation and characterization of the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. Eur J Biochem **111** (1), 251-8

Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A. and Schagger, H. (1998). Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. EMBO J **17** (24), 7170-8

Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in beta vulgaris. Plant Physiol **24** (1), 1-15

Aziz Ouazzani Chahdi, M., Schoefs, B. and Franck, F. (1998). Isolation and characterization of photoactive complexes of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from wheat. Planta **206** (4), 673-80

Barbato, R., Polverino De Laureto, P., Rigoni, F., De Martini, E. and Giacometti, G.M. (1995). Pigment-protein complexes from the photosynthetic membrane of the cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC 6803*. Eur J Biochem **234** (2), 459-65

Barthelemy, X., Bouvier, G., Radunz, A., Docquier, S., Schmid, G.H. and Franck, F. (2000). Localization of NADPH-protochlorophyllide reductase in plastids of barley at different greening stages. Photosynth Res **64** (1), 63-76

Bassi, R., Hoyer-Hansen, G., Barbato, R., Giacometti, G.M. and Simpson, D.J. (1987). Chlorophyll-proteins of the photosystem II antenna system. J Biol Chem **262** (27), 13333-41

Bassi, R. and Simpson, D. (1987). Chlorophyll-protein complexes of barley photosystem I. Eur J Biochem **163** (2), 221-30

Batschauer, A. and Apel, K. (1984). An inverse control by phytochrome of the expression of two nuclear genes in barley (*Hordeum vulgare L.*). Eur J Biochem **143** (3), 593-7

Ben-Shem, A., Frolow, F. and Nelson, N. (2003). Crystal structure of plant photosystem I. Nature **426** (6967), 630-5

Bengis, C. and Belson, N. (1977). Subunit structure of chloroplast photosystem I reaction center. J. Biol. Chem. **252** (13), 4564-9

Bengis, C. and Nelson, N. (1975). Purification and properties of the photosystem I reaction center from chloroplasts. J Biol Chem **250** (8), 2783-8

Bhaya, D. and Castelfranco, P.A. (1985). Chlorophyll biosynthesis and assembly into chlorophyll-protein complexes in isolated developing chloroplasts. Proc Natl Acad Sci U S A **82** (16), 5370-4

Birve, S.J., Selstam, E. and Johansson, L.B. (1996). Secondary structure of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase examined by circular dichroism and prediction methods. Biochem J **317** (Pt 2), 549-55

Bisle, B. (2000). Gelelektrophoretische Untersuchungen zur Assemblierung des Photosystems II. Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis **8** (2), 93-9

Boddi, B., Kis-Petik, K., Kaposi, A.D., Fidy, J. and Sundqvist, C. (1998). The two spectroscopically different short wavelength protochlorophyllide forms in pea epicotyls are both monomeric. Biochim Biophys Acta **1365** (3), 531-40

Boddi, B., Ryberg, M. and Sundqvist, C. (1991). The Formation of a Short-Wavelength Chlorophyllide Form at Partial Phototransformation of Protochlorophyllide in Etioplast Inner Membranes. Photochem. Photobiol. **53** (5), 667-73

Boddi, B., Lindsten, A., Ryberg, M. and Sundqvist, C. (1989). On the aggregational states

of protochlorophyllide and its protein complexes in wheat etioplasts. *Physiol. Plant.* **76** (2), 135-43

Boddi, B., Ryberg, M. and Sundqvist, C. (1992). Identification of four universal protochlorophyllide forms in dark-grown leaves by analyses of the 77 K fluorescence emission spectra. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **12** (4), 389-401

Boronowsky, U., Wenk, S., Schneider, D., Jager, C. and Rogner, M. (2001). Isolation of membrane protein subunits in their native state: evidence for selective binding of chlorophyll and carotenoid to the b(6) subunit of the cytochrome b(6)f complex. *Biochim Biophys Acta* **1506** (1), 55-66

Breyton, C., Tribet, C., Olive, J., Dubacq, J.P. and Popot, J.L. (1997). Dimer to monomer conversion of the cytochrome b6 f complex. Causes and consequences. *J Biol Chem* **272** (35), 21892-900

Butler, W.L. and Briggs, W.R. (1966). The relation between structure and pigments during the first stages of proplastid greening. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biophysics including Photosynthesis* **112** (1), 45-53

Caffarri, S., Frigerio, S., Olivieri, E., Righetti, P.G. and Bassi, R. (2005). Differential accumulation of Lhcb gene products in thylakoid membranes of *Zea mays* plants grown under contrasting light and temperature conditions. *Proteomics* **5** (3), 758-68

Carbajo, R.J., Kellas, F.A., Runswick, M.J., Montgomery, M.G., Walker, J.E. and Neuhaus, D. (2005). Structure of the F1-binding domain of the stator of bovine F1Fo-ATPase and how it binds an alpha-subunit. *J Mol Biol* **351** (4), 824-38

Carbajo, R.J., Silvester, J.A., Runswick, M.J., Walker, J.E. and Neuhaus, D. (2004). Solution structure of subunit F(6) from the peripheral stalk region of ATP synthase from bovine heart mitochondria. *J Mol Biol* **342** (2), 593-603

Casano, L.M., Zapata, J.M., Martin, M. and Sabater, B. (2000). Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. Plastoquinone as electron transporter between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. *J Biol Chem* **275** (2), 942-8

Chitnis, P.R. (2001). PHOTOSYSTEM I: Function and Physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 593-626

Cline, K., Ettinger, W.F. and Theg, S.M. (1992). Protein-specific energy requirements for protein transport across or into thylakoid membranes. Two luminal proteins are transported in the absence of ATP. *J Biol Chem* **267** (4), 2688-96

Cohen, Y., Yalovsky, S. and Nechushtai, R. (1995). Integration and assembly of photosynthetic protein complexes in chloroplast thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1241** (1), 1-30

Cramer, W.A., Zhang, H., Yan, J., Kurisu, G. and Smith, J.L. (2004). Evolution of photosynthesis: time-independent structure of the cytochrome b6f complex. *Biochemistry* **43** (20), 5921-9

Dahlin, C., Aronsson, H., Wilks, H.M., Lebedev, N., Sundqvist, C. and Timko, M.P. (1999). The role of protein surface charge in catalytic activity and chloroplast membrane association of the pea NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR) as revealed by alanine scanning mutagenesis. *Plant Mol Biol* **39** (2), 309-23

Danielsson, R., Suorsa, M., Paakkarinen, V., Albertsson, P.A., Styring, S., Aro, E.M. and Mamedov, F. (2006). Dimeric and monomeric organization of photosystem II. Distribution of five distinct complexes in the different domains of the thylakoid membrane. *J Biol Chem* **281** (20), 14241-9

Dekker, J.P. and Boekema, E.J. (2005). Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta* **1706** (1-2), 12-39

Domanskii, V., Rassadina, V., Gus-Mayer, S., Wanner, G., Schoch, S. and Rudiger, W. (2003). Characterization of two phases of chlorophyll formation during greening of etiolated barley leaves. *Planta* **216** (3), 475-83

Dominici, P., Caffarri, S., Armenante, F., Ceoldo, S., Crimi, M. and Bassi, R. (2002). Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant. *J Biol Chem* **277** (25), 22750-8

Dreyfuss, B.W. and Thornber, J.P. (1994). Assembly of the Light-Harvesting Complexes (LHCs) of Photosystem II (Monomeric LHC IIb Complexes Are Intermediates in the Formation of Oligomeric LHC IIb Complexes). *Plant Physiol* **106** (3), 829-39

Dreyfuss, B.W. and Thornber, J.P. (1994). Organization of the Light-Harvesting Complex of Photosystem I and Its Assembly during Plastid Development. *Plant Physiol* **106** (3), 841-8

Dunkley, P.R. and Anderson, J.M. (1979). The light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex from barley thylakoid membranes. Polypeptide composition and characterization of an oligomer. *Biochim Biophys Acta* **545** (1), 174-87

Egneus, H., Reftel, S. and Sellden, G. (1972). The Appearance and Development of Photosynthetic Activity in Etiolated Barley Leaves and Isolated Etio-chloroplasts. *Physiol. Plant.* **27** (1), 48-55

Eichacker, L.A., Helfrich, M., Rudiger, W. and Muller, B. (1996). Stabilization of chlorophyll a-binding apoproteins P700, CP47, CP43, D2, and D1 by chlorophyll a or Zn-pheophytin a. *J Biol Chem* **271** (50), 32174-9

Eichacker, L.A., Muller, B. and Helfrich, M. (1996). Stabilization of the chlorophyll binding apoproteins, P700, CP47, CP43, D2, and D1, by synthesis of Zn-pheophytin a in intact etioplasts from barley. *FEBS Lett* **395** (2-3), 251-6

Eichacker, L.A., Soll, J., Lauterbach, P., Rudiger, W., Klein, R.R. and Mullet, J.E. (1990). *In vitro* synthesis of chlorophyll a in the dark triggers accumulation of chlorophyll a apoproteins in barley etioplasts. *J Biol Chem* **265** (23), 13566-71

Eijkelhoff, C., Vacha, F., van Grondelle, R., Dekker, J.P. and Barber, J. (1997). Spectroscopic characterization of a 5 Chl a photosystem II reaction center complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1318** (1-2), 266-74

Fairclough, W.V., Forsyth, A., Evans, M.C., Rigby, S.E., Purton, S. and Heathcote, P. (2003). Bidirectional electron transfer in photosystem I: electron transfer on the PsaA side is not essential for phototrophic growth in *Chlamydomonas*. *Biochim Biophys Acta* **1606** (1-3), 43-55

Fischer, M., Funk, E. and Steinmüller, K. (1997). The Expression of Subunits of the Mitochondrial Complex I-Homologous NAD(P)H-Plastoquinone-Oxidoreductase during Plastid Development. *Z. Naturforsch.* **52c**, 481-6

Forreiter, C., Cleve, B., Schmidt, A. and Apel, K. (1991). Evidence for a general light-dependent negative control of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in angiosperms. *Planta* **183** (1), 126-32

Fromme, P., Jordan, P. and Krauss, N. (2001). Structure of photosystem I. *Biochim Biophys Acta* **1507** (1-3), 5-31

Funk, C., Schroder, W.P., Napiwotzki, A., Tjus, S.E., Renger, G. and Andersson, B. (1995). The PSII-S protein of higher plants: a new type of pigment-binding protein. *Biochemistry* **34** (35), 11133-41

Garavito, R.M. and Ferguson-Miller, S. (2001). Detergents as tools in membrane biochemistry. *J Biol Chem* **276** (35), 32403-6

Giroud, C. and Siegenthaler, P.A. (1988). Development of Oat Prothylakoids into Thylakoids during Greening Does Not Change Transmembrane Galactolipid Asymmetry but Preserves the Thylakoid Bilayer. *Plant Physiol* **88** (2), 412-7

Gounaris, K., Chapman, D.J., Booth, P., Crystall, B., Giorgi, L.B., Klug, D.R., Porter, G. and Barber, J. (1990). Comparison of the D1/D2/cytochrome b559 reaction centre complex of photosystem two isolated by two different methods. *FEBS Lett* **265** (1-2), 88-92

Granvogl, B., Reisinger, V. and Eichacker, L.A. (2006). Mapping the proteome of thylakoid membranes by *de novo* sequencing of intermembrane peptide domains. *Proteomics* **6** (12), 3681-95

Gregory, R.P., Borbely, G., Demeter, S. and Faludi-Daniel, A. (1982). Chiroptical properties of chlorophyll-protein complexes separated on Deriphat/polyacrylamide gel. *Biochem J* **202** (1), 25-9

Griffiths, W.T. (1978). Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast

membranes. *Biochem J* **174** (3), 681-92

Groth, G. and Pohl, E. (2001). The structure of the chloroplast F1-ATPase at 3.2 Å resolution. *J Biol Chem* **276** (2), 1345-52

Guera, A., de Nova, P.G. and Sabater, B. (2000). Identification of the Ndh (NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase) complex in etioplast membranes of barley: changes during photomorphogenesis of chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **41** (1), 49-59

Guergova-Kuras, M., Boudreaux, B., Joliot, A., Joliot, P. and Redding, K. (2001). Evidence for two active branches for electron transfer in photosystem I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (8), 4437-42

Hamel, P., Olive, J., Pierre, Y., Wollman, F.A. and de Vitry, C. (2000). A new subunit of cytochrome b6/f complex undergoes reversible phosphorylation upon state transition. *J Biol Chem* **275** (22), 17072-9

Hankamer, B., Nield, J., Zheleva, D., Boekema, E., Jansson, S. and 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** (1-2), 422-9

Hansson, A., Amann, K., Zygadlo, A., Meurer, J., Scheller, H.V. and Jensen, P.E. (2007). Knock-out of the chloroplast-encoded PSI-J subunit of photosystem I in *Nicotiana tabacum*. *FEBS J* **274** (7), 1734-46

Heddad, M., Noren, H., Reiser, V., Dunaeva, M., Andersson, B. and Adamska, I. (2006). Differential expression and localization of early light-induced proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **142** (1), 75-87

Henderson, J.N., Zhang, J., Evans, B.W. and Redding, K. (2003). Disassembly and degradation of photosystem I in an *in vitro* system are multievent, metal-dependent processes. *J Biol Chem* **278** (41), 39978-86

Henningsen, K.W. and Boynton, J.E. (1974). Macromolecular physiology of plastids. IX.

Development of plastid membranes during greening of dark-grown barley seedlings. *J Cell Sci* **15** (1), 31-55

Heukeshoven J. and Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6** (3), 103-12

Hippler, M., Rimbault, B. and Takahashi, Y. (2002). Photosynthetic complex assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist* **153** (3), 197-220

Holtorf, H., Reinbothe, S., Reinbothe, C., Berezina, B. and Apel, K. (1995). Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (8), 3254-8

Holtorf, H. and Apel, K. (1996). The regulation of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductases A and B in green barley plants kept under a diurnal light/dark cycle. *Planta* **199** (2), 289-95

Hooper, K.J. and Eggink, L.L. (1999). Assembly of light-harvesting complex II and biogenesis of thylakoid membranes in chloroplasts. *Photosynthesis research* **61** (3), 197-215

Horn, R., Grundmann, G. and Paulsen, H. (2007). Consecutive binding of chlorophylls a and b during the assembly *in vitro* of light-harvesting chlorophyll-a/b protein (LHCIIb). *J Mol Biol* **366** (3), 1045-54

Horn, R. and Paulsen, H. (2004). Early steps in the assembly of light-harvesting chlorophyll a/b complex: time-resolved fluorescence measurements. *J Biol Chem* **279** (43), 44400-6

Horn, R. and Paulsen, H. (2002). Folding *In vitro* of Light-harvesting Chlorophyll a/b Protein is Coupled with Pigment Binding. *J. Mol. Biol.* **318** (2), 547-56

Horwitz, B.A., Thompson, W.F. and Briggs, W.R. (1988). Phytochrome Regulation of Greening in *Pisum*: Chlorophyll Accumulation and Abundance of mRNA for the Light-Harvesting Chlorophyll a/b Binding Proteins. *Plant Physiol* **86** (1), 299-305

Huang, D., Everly, R.M., Cheng, R.H., Heymann, J.B., Schagger, H., Sled, V., Ohnishi,

T., Baker, T.S. and Cramer, W.A. (1994). Characterization of the chloroplast cytochrome b6/f complex as a structural and functional dimer. *Biochemistry* **33** (14), 4401-9

Hurt, E. and Hauska, G. (1982). Identification of the polypeptides in the cytochrome b6/f complex from spinach chloroplasts with redox-center-carrying subunits. *J Bioenerg Biomembr* **14** (5-6), 405-24

Ihalainen, J.A., Jensen, P.E., Haldrup, A., van Stokkum, I.H., van Grondelle, R., Scheller, H.V. and Dekker, J.P. (2002). Pigment organization and energy transfer dynamics in isolated photosystem I (PSI) complexes from *Arabidopsis thaliana* depleted of the PSI-G, PSI-K, PSI-L, or PSI-N subunit. *Biophys J* **83** (4), 2190-201

Ikeuchi, M. and Inoue, Y. (1988). A new photosystem II reaction center component (4.8 kDa protein) encoded by chloroplast genome. *FEBS Lett* **241** (1-2), 99-104

Iwai, M., Katayama, M. and Ikeuchi, M. (2006). Absence of the psbH gene product destabilizes the Photosystem II complex and prevents association of the Photosystem II-X protein in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus BP-1*. *Photosynth Res* **87** (3), 313-22

Jansson, S. (1999). A guide to the Lhc genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* **4** (6), 236-40

Jensen, P.E., Haldrup, A., Zhang, S. and Scheller, H.V. (2004). The PSI-O subunit of plant photosystem I is involved in balancing the excitation pressure between the two photosystems. *J Biol Chem* **279** (23), 24212-7

Jolley, C., Ben-Shem, A., Nelson, N. and Fromme, P. (2005). Structure of plant photosystem I revealed by theoretical modeling. *J Biol Chem* **280** (39), 33627-36

Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W. and Krauss, N. (2001). Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411** (6840), 909-17

Kay, S.A. and Griffiths, W.T. (1983). Light-Induced Breakdown of NADPH-

Protochlorophyllide Oxidoreductase *In vitro*. *Plant Physiol* **72** (1), 229-36

Kim, J., Eichacker, L.A., Rudiger, W. and Mullet, J.E. (1994). Chlorophyll regulates accumulation of the plastid-encoded chlorophyll proteins P700 and D1 by increasing apoprotein stability. *Plant Physiol* **104** (3), 907-16

Kis-Petik, K., Böddi, B., Kaposi, A.D. and Fidy, J. (1999). Protochlorophyllide forms and energy transfer in dark-grown wheat leaves. Studies by conventional and laser excited fluorescence spectroscopy between 10 K–100 K. *Photosynthesis Research* **60** (1), 87-98

Kleffmann, T., von Zychlinski, A., Russenberger, D., Hirsch-Hoffmann, M., Gehrig, P., Gruissem, W. and Baginsky, S. (2007). Proteome dynamics during plastid differentiation in rice. *Plant Physiol* **143** (2), 912-23

Klein, R.R., Mason, H.S. and Mullet, J.E. (1988). Light-regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of *psaA-psaB*, *psbA*, and *rbcL* are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J Cell Biol* **106** (2), 289-301

Klement, H., Helfrich, M., Oster, U., Schoch, S. and Rudiger, W. (1999). Pigment-free NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from *Avena sativa* L. Purification and substrate specificity. *Eur J Biochem* **265** (3), 862-74

Klimmek, F., Sjodin, A., Noutsos, C., Leister, D. and Jansson, S. (2006). Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants. *Plant Physiol* **140** (3), 793-804

Klinkert, B., Ossenbuhl, F., Sikorski, M., Berry, S., Eichacker, L. and Nickelsen, J. (2004). PrtA, a periplasmic tetratricopeptide repeat protein involved in biogenesis of photosystem II in *Synechocystis sp. PCC 6803*. *J Biol Chem* **279** (43), 44639-44

Klockare, B. and Virgin, H.I. (1983). Chlorophyll(ide) forms after partial phototransformation of protochlorophyll(ide) in etiolated wheat leaves. *Physiol. Plant.* **57** (1), 28-34

Komenda, J., Kuvikova, S., Granvogl, B., Eichacker, L.A., Diner, B.A. and Nixon, P.J.

(2007). Cleavage after residue Ala352 in the C-terminal extension is an early step in the maturation of the D1 subunit of Photosystem II in *Synechocystis PCC 6803*. *Biochim Biophys Acta* **1767** (6), 829-37

Komenda, J., Tichy, M. and Eichacker, L.A. (2005). The PsbH protein is associated with the inner antenna CP47 and facilitates D1 processing and incorporation into PSII in the cyanobacterium *Synechocystis PCC 6803*. *Plant Cell Physiol* **46** (9), 1477-83

Krabben, L., Schlodder, E., Jordan, R., Carbonera, D., Giacometti, G., Lee, H., Webber, A.N. and Lubitz, W. (2000). Influence of the axial ligands on the spectral properties of P700 of photosystem I: a study of site-directed mutants. *Biochemistry* **39** (42), 13012-25

Krause, F. (2006). Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. *Electrophoresis* **27** (13), 2759-81

Kurusu, G., Zhang, H., Smith, J.L. and Cramer, W.A. (2003). Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* **302** (5647), 1009-14

Kuttkat, A., Edhofer, I., Eichacker, L.A. and Paulsen, H. (1997). Light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein stably inserts into etioplast membranes supplemented with Zn-pheophytin a/b. *J Biol Chem* **272** (33), 20451-5

Kyle, D.J. and Zalik, S. (1982). Development of Photochemical Activity in Relation to Pigment and Membrane Protein Accumulation in Chloroplasts of Barley and Its Virescens Mutant . *Plant Physiol* **69** (6), 1392-400

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259), 680-5

Lebedev, N. and Timko, M.P. (1999). Protochlorophyllide oxidoreductase B-catalyzed protochlorophyllide photoreduction *in vitro*: insight into the mechanism of chlorophyll formation in light-adapted plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (17), 9954-9

Lee, W.J. and Whitmarsh, J. (1989). Photosynthetic Apparatus of Pea Thylakoid

Membranes: Response to Growth Light Intensity. *Plant Physiol* **89** (3), 932-40

Li, X.P., Gilmore, A.M., Caffarri, S., Bassi, R., Golan, T., Kramer, D. and Niyogi, K.K. (2004). Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *J Biol Chem* **279** (22), 22866-74

Li, X.P., Gilmore, A.M. and Niyogi, K.K. (2002). Molecular and global time-resolved analysis of a psbS gene dosage effect on pH- and xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching in photosystem II. *J Biol Chem* **277** (37), 33590-7

Lilley, K.S. and Friedman, D.B. (2004). All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Rev Proteomics* **1** (4), 401-9

Lindsten, A., Ryberg, M. and Sundqvist, C. (1988). The polypeptide composition of highly purified prolamellar bodies and prothylakoids from wheat (*Triticum aestivum*) as revealed by silver staining. *Physiol. Plant.* **72** (1), 167-76

Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X. and Chang, W. (2004). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428** (6980), 287-92

Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A. and Biesiadka, J. (2005). Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* **438** (7070), 1040-4

Lopez, M.F., Berggren, K., Chernokalskaya, E., Lazarev, A., Robinson, M. and Patton, W.F. (2000). A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels. *Electrophoresis* **21** (17), 3673-83

Lütz, C., Röper, U., Beer, N.S. and Griffiths, T. (1981). Sub-etioplast Localization of the Enzyme NADPH: Protochlorophyllide Oxidoreductase. *Eur. J. Biochem.* **118** (2), 347-53

Ma, J., Peng, L., Guo, J., Lu, Q., Lu, C. and Zhang, L. (2007). LPA2 is required for efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **19** (6), 1980-93

Mackintosh, J.A., Choi, H.Y., Bae, S.H., Veal, D.A., Bell, P.J., Ferrari, B.C., Van Dyk, D.D., Verrills, N.M., Paik, Y.K. and Karuso, P. (2003). A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **3** (12), 2273-88

Mannan, R.M., Pakrasi, H.B. and Sonoike, K. (1994). The PsaC protein is necessary for the stable association of the PsaD, PsaE, and PsaL proteins in the photosystem I complex: analysis of a cyanobacterial mutant strain. *Arch Biochem Biophys* **315** (1), 68-73

Markwell, J.P., Thornber, J.P. and Boggs, R.T. (1979). Higher plant chloroplasts: Evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** (3), 1233-5

Martin, G.E., Timko, M.P. and Wilks, H.M. (1997). Purification and kinetic analysis of pea (*Pisum sativum L.*) NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase expressed as a fusion with maltose-binding protein in *Escherichia coli*. *Biochem J* **325** (Pt 1), 139-45

Masuda, T., Fusada, N., Oosawa, N., Takamatsu, K., Yamamoto, Y.Y., Ohto, M., Nakamura, K., Goto, K., Shibata, D., Shirano, Y., Hayashi, H., Kato, T., Tabata, S., Shimada, H., Ohta, H. and Takamiya, K. (2003). Functional analysis of isoforms of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR), PORB and PORC, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **44** (10), 963-74

Mathis, J.N. and Burkey, K.O. (1987). Regulation of Light-Harvesting Chlorophyll Protein Biosynthesis in Greening Seedlings : A Species Comparison. *Plant Physiol* **85** (4), 971-7

Metz, J.G., Krueger, R.W. and Miles, D. (1984). Chlorophyll-Protein Complexes of a Photosystem II Mutant of Maize : Evidence that Chlorophyll-Protein a-2 and a Chlorophyll-Protein Complex Derived from a Photosystem I Antennae System Comigrate on Polyacrylamide Gels. *Plant Physiol* **75** (1), 238-41

Minagawa, J. and Takahashi, Y. (2004). Structure, function and assembly of Photosystem II and its light-harvesting proteins. *Photosynth Res* **82** (3), 241-63

Morais, F., Barber, J. and Nixon, P.J. (1998). The chloroplast-encoded alpha subunit of

cytochrome b-559 is required for assembly of the photosystem two complex in both the light and the dark in *Chlamydomonas reinhardtii*. J Biol Chem **273** (45), 29315-20

Mosinger, E., Batschauer, A., Apel, K., Schafer, E. and Briggs, W.R. (1988). Phytochrome Regulation of Greening in Barley : Effects on mRNA Abundance and on Transcriptional Activity of Isolated Nuclei. Plant Physiol **86** (3), 706-10

Müller, B. and Eichacker, L.A. (1999). Assembly of the D1 precursor in monomeric photosystem II reaction center precomplexes precedes chlorophyll a-triggered accumulation of reaction center II in barley etioplasts. Plant Cell **11** (12), 2365-77

Müller, B. (2000). Biogenese des Photosyntheseapparates der Gerste: Regulation der Assemblierung des Photosystems I und II. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Nelson, N. and Ben-Shem, A. (2005). The structure of photosystem I and evolution of photosynthesis. BioEssays **27** (9), 914-22

Nelson, N. and Yocum, C.F. (2006). Structure and function of photosystems I and II. Annu Rev Plant Biol **57**, 521-65

Nield, J. and Barber, J. (2006). Refinement of the structural model for the Photosystem II supercomplex of higher plants. Biochim Biophys Acta **1757** (5-6), 353-61

Nielsen, O.F. (1974). Photoconversion and regeneration of active protochlorophyll(ide) in mutants defective in the regulation of chlorophyll synthesis. Arch Biochem Biophys **160** (2), 430-9

Ohashi, K., Tanaka, A. and Tsuji, H. (1989). Formation of the Photosynthetic Electron Transport System during the Early Phase of Greening in Barley Leaves. Plant Physiol **91** (1), 409-14

Oosawa, N., Masuda, T., Awai, K., Fusada, N., Shimada, H., Ohta, H. and Takamiya, K. (2000). Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett **474** (2-3),

133-6

Peng, L., Ma, J., Chi, W., Guo, J., Zhu, S., Lu, Q., Lu, C. and Zhang, L. (2006). LOW PSII ACCUMULATION1 is involved in efficient assembly of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **18** (4), 955-69

Peter, G.F. and Thornber, J.P. (1991). Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *J Biol Chem* **266** (25), 16745-54

Pierre, Y., Breyton, C., Lemoine, Y. , Robert, B., Vernotte, C. and Popot, J.L. (1997). On the presence and role of a molecule of chlorophyll a in the cytochrome b6 f complex. *J Biol Chem* **272** (35), 21901-8

Plesnicar, M. and Bendall, D.S. (1973). The photochemical activities and electron carriers of developing barley leaves. *Biochem J* **136** (3), 803-12

Plücken, H., Müller, B., Grohmann, D., Westhoff, P. and Eichacker, L.A. (2002). The HCF136 protein is essential for assembly of the photosystem II reaction center in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **532** (1-2), 85-90

Poggese, C., Polverino de Laureto, P., Giacometti, G.M., Rigoni, F. and Barbato, R. (1997). Cytochrome b6/f complex from the cyanobacterium *Synechocystis 6803*: evidence of dimeric organization and identification of chlorophyll-binding subunit. *FEBS Lett* **414** (3), 585-9

Preiss, S. and Thornber, J.P. (1995). Stability of the Apoproteins of Light-Harvesting Complex I and II during Biogenesis of Thylakoids in the Chlorophyll b-less Barley Mutant Chlorina f2. *Plant Physiol* **107** (3), 709-17

Reinbothe, C., Apel, K. and Reinbothe, S. (1995). A light-induced protease from barley plastids degrades NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase complexed with chlorophyllide. *Mol Cell Biol* **15** (11), 6206-12

Reinbothe, S., Reinbothe, C., Lebedev, N. and Apel, K. (1996). PORA and PORB, Two Light-Dependent Protochlorophyllide-Reducing Enzymes of Angiosperm Chlorophyll

Biosynthesis. *Plant Cell* **8** (5), 763-9

Reinbothe, S., Reinbothe, C., Runge, S. and Apel, K. (1995). Enzymatic product formation impairs both the chloroplast receptor-binding function as well as translocation competence of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase, a nuclear-encoded plastid precursor protein. *J Cell Biol* **129** (2), 299-308

Reisinger, V. (2001). Untersuchung der Zusammenhänge zwischen der Stabilisierung, Akkumulation und Assemblierung der Chl a-bindenden Proteine in isolierten Plastiden aus Gerste. Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Rochaix, J.D., Perron, K., Dauvillee, D., Laroche, F., Takahashi, Y. and Goldschmidt-Clermont, M. (2004). Post-transcriptional steps involved in the assembly of photosystem I in *Chlamydomonas*. *Biochem Soc Trans* **32** (Pt 4), 567-70

Rogl, H., Schodel, R., Lokstein, H., Kuhlbrandt, W. and Schubert, A. (2002). Assignment of spectral substructures to pigment-binding sites in higher plant light-harvesting complex LHC-II. *Biochemistry* **41** (7), 2281-7

Rogner, M., Boekema, E.J. and Barber, J. (1996). How does photosystem 2 split water? The structural basis of efficient energy conversion. *Trends Biochem Sci* **21** (2), 44-9

Rokka, A., Suorsa, M., Saleem, A., Battchikova, N. and Aro, E.M. (2005). Synthesis and assembly of thylakoid protein complexes: multiple assembly steps of photosystem II. *Biochem J* **388** (Pt 1), 159-68

Ryberg, M. and Sundqvist, C. (1982). Characterization of prolamellar bodies and prothylakoids fractionated from wheat etioplasts. *Physiol. Plant.* **56** (2), 125-32

Ryberg, M. and Sundqvist, C. (1982). Spectral forms of protochlorophyllide in prolamellar bodies and prothylakoids fractionated from wheat etioplasts. *Physiol. Plant.* **56** (2), 133-8

Saenger, W., Jordan, P. and Krauss, N. (2002). The assembly of protein subunits and cofactors in photosystem I. *Curr Opin Struct Biol* **12** (2), 244-54

Santel, H.J. and Apel, K. (1981). The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). The effect of light on the NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur J Biochem* **120** (1), 95-103

Santini, C., Tidu, V., Tognon, G., Ghiretti Magaldi, A. and Bassi, R. (1994). Three-dimensional structure of the higher-plant photosystem II reaction centre and evidence for its dimeric organization *in vivo*. *Eur J Biochem* **221** (1), 307-15

Sarvari, E. and Nyitrai, P. (1994). Separation of chlorophyll-protein complexes by Deriphat polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis* **15** (8-9), 1068-71

Sazanov, L.A., Burrows, P.A. and Nixon, P.J. (1998). The plastid *ndh* genes code for an NADH-specific dehydrogenase: isolation of a complex I analogue from pea thylakoid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (3), 1319-24

Schagger, H. and von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199** (2), 223-31

Scheller, H.V., Jensen, P.E., Haldrup, A., Lunde, C. and Knoetzel, J. (2001). Role of subunits in eukaryotic Photosystem I. *Biochim Biophys Acta* **1507** (1-3), 41-60

Scherer, K. (2005). POR Komplexe im Etioplasten und ihre Veränderung während der Ergrünung. Diplomarbeit an der Ludwig Maximilians Universität München

Schoch, S., Helfrich, M., Wiktorsson, B., Sundqvist, C., Rudiger, W. and Ryberg, M. (1995). Photoreduction of zinc protoporphorbide b with NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase from etiolated wheat (*Triticum aestivum* L.). *Eur J Biochem* **229** (1), 291-8

Schoefs, B. and Franck, F. (2003). Protochlorophyllide reduction: mechanisms and evolutions. *Photochem Photobiol* **78** (6), 543-57

Schwenkert, S., Umate, P., Dal Bosco, C., Volz, S., Mlcochova, L., Zoryan, M., Eichacker, L.A., Ohad, I., Herrmann, R.G. and Meurer, J. (2006). PsbI affects the stability, function, and phosphorylation patterns of photosystem II assemblies in tobacco. *J Biol Chem* **281** (45), 34227-38

- Seelert, H., Poetsch, A., Dencher, N.A., Engel, A., Stahlberg, H. and Muller, D.J. (2000).** Structural biology. Proton-powered turbine of a plant motor. *Nature* **405** (6785), 418-9
- Shibata, K. (1957).** Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves. *J Biochem (Tokyo)* **44** (3), 147-73
- Shioi, Y. and Sasa, T. (1983).** Compositional heterogeneity of protochlorophyllide ester in etiolated leaves of higher plants. *Arch. Biochem. Biophys.* **220** (1), 286-92
- Sigrist, M. and Staehelin, L.A. (1994).** Appearance of type 1, 2, and 3 light-harvesting complex II and light-harvesting complex I proteins during light-induced greening of barley (*Hordeum vulgare*) etioplasts. *Plant Physiol* **104** (1), 135-45
- Silverthorne, J. and Tobin, E.M. (1984).** Demonstration of transcriptional regulation of specific genes by phytochrome action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81** (4), 1112-6
- Standfuss, J. and Kuhlbrandt, W. (2004).** The three isoforms of the light-harvesting complex II: spectroscopic features, trimer formation, and functional roles. *J Biol Chem* **279** (35), 36884-91
- Stockel, J. and Oelmüller, R. (2004).** A novel protein for photosystem I biogenesis. *J Biol Chem* **279** (11), 10243-51
- Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.L. and Picot, D. (2003).** An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex. *Nature* **426** (6965), 413-8
- Sugimoto, I. and Takahashi, Y. (2003).** Evidence that the PsbK polypeptide is associated with the photosystem II core antenna complex CP43. *J Biol Chem* **278** (45), 45004-10
- Sundqvist, C. and Dahlin, C. (1997).** With chlorophyll pigments from prolamellar bodies to light-harvesting complexes. *Physiol. Plant.* **100** (4), 748-59
- Tanaka, A., Yamamoto, Y. and Tsuji, H. (1991).** Formation of Chlorophyll-Protein Complexes during Greening. 2. Redistribution of Chlorophyll among Apoproteins. *Plant Cell Physiol.* **32** (2), 195-204

Thompson, W.F., Everett, M., Polans, N.O., Jorgensen, R.A. and Palmer, J.D. (1983). Phytochrome control of RNA levels in developing pea and mung-bean leaves. **158** (6), 487-500

Thornber, J.P., Gregory, R.P., Smith, C.A. and Bailey, J.L. (1967). Studies on the nature of the chloroplast lamella. I. Preparation and some properties of two chlorophyll-protein complexes. *Biochemistry* **6** (2), 391-6

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** (9), 4350-4

Tsiotis, G., Psylinakis, M., Woplensinger, B., Lustig, A., Engel, A. and Ghanotakis, D. (1999). Investigation of the structure of spinach photosystem II reaction center complex . *Eur J Biochem* **259** (1-2), 320-4

van Thor, J.J., Geerlings, T.H., Matthijs, H.C. and Hellingwerf, K.J. (1999). Kinetic evidence for the PsaE-dependent transient ternary complex photosystem I/Ferredoxin/Ferredoxin:NADP(+) reductase in a cyanobacterium. *Biochemistry* **38** (39), 12735-46

van Wijk, K.J. and Eichacker, L. (1996). Light is required for efficient translation elongation and subsequent integration of the D1-protein into photosystem II. *FEBS Lett* **388** (2-3), 89-93

Virgin, H.I., Kahn, A. and von Wettstein, D. (1963). The physiology of chlorophyll formation in relation to structural changes in chloroplasts. *Photochem. Photobiol.* **2**, 83-91

Von Wettstein, D., Gough, S. and Kannangara, C.G. (1995). Chlorophyll Biosynthesis. *Plant Cell* **7** (7), 1039-57

Wasylewski, Z. and Kozik, A. (1979). Protein--Non-ionic Detergent Interaction. *Eur. J. Biochem.* **95** (1), 121-6

Webber, A.N., Su, H., Bingham, S.E., Kass, H., Krabben, L., Kuhn, M., Jordan, R.,

Schlodder, E. and Lubitz, W. (1996). Site-directed mutations affecting the spectroscopic characteristics and midpoint potential of the primary donor in photosystem I. *Biochemistry* **35** (39), 12857-63

Wenk, S.O., Schneider, D., Boronowsky, U., Jager, C., Klughammer, C., de Weerd, F.L., van Roon, H., Vermaas, W.F., Dekker, J.P. and Rogner, M. (2005). Functional implications of pigments bound to a cyanobacterial cytochrome b6f complex. *FEBS J* **272** (2), 582-92

Wiktorsson, B., Engdahl, S., Zhong, L.B., Böddi, B., Ryberg, M. and Sundqvist, C. (1993). The effect of cross-linking of the subunits of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase on the aggregational state of protochlorophyllide. *Photosynthetica* **29**, 205–218

Wilkins, S., Borchardt, D., Weber, J. and Senior, A.E. (2005). Structural characterization of the interaction of the delta and alpha subunits of the Escherichia coli F1F0-ATP synthase by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **44** (35), 11786-94

Wittig, I., Karas, M. and Schagger, H. (2007). High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes. *Mol Cell Proteomics* **6** (7), 1215-25

Wittig, I. and Schagger, H. (2005). Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* **5** (17), 4338-46

Xu, Q., Odom, W.R., Guikema, J.A., Chitnis, V.P. and Chitnis, P.R. (1994). Targeted deletion of *psaJ* from the cyanobacterium *Synechocystis sp. PCC 6803* indicates structural interactions between the PsaJ and PsaF subunits of photosystem I. *Plant Mol Biol* **26** (1), 291-302

Yao, D., Kieselbach, T., Komenda, J., Promnares, K., Prieto, M.A., Tichy, M., Vermaas, W. and Funk, C. (2007). Localization of the small CAB-like proteins in photosystem II. *J Biol Chem* **282** (1), 267-76

Yi, X., Hargett, S.R., Frankel, L.K. and Bricker, T.M. (2006). The PsbQ protein is

required in *Arabidopsis* for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy under low light conditions. J Biol Chem **281** (36), 26260-7

Zhang, H., Whitelegge, J.P. and Cramer, W.A. (2001). Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome b6f complex. J Biol Chem **276** (41), 38159-65

Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W. and Orth, P. (2001). Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. Nature **409** (6821), 739-43

F Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Der Aufbau der Thylakoidmembrankomplexe und löslicher Komponenten der Lichtreaktion auf der Basis verschiedener Röntgenkristallstrukturen (Nelson et al., 2006).....	2
Abb.2	Membranproteinkomplexe in Etio- bzw. Chloroplasten nach BN-PAGE.....	31
Abb.3	Zusammensetzung der Membranproteinkomplexe des Chloroplasten nach BN/SDS-PAGE.....	34
Abb.4	Membranproteinkomplexzusammensetzung des Etioplasten nach BN/SDS-PAGE	36
Abb.5	Einfluss von Detergenzien auf die Markierungsintensität von CyDyes.....	38
Abb.6	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen in intakten Chloroplasten bei unterschiedlich langer Inkubationszeit mit CyDyes	39
Abb.7	Vergleich von Coomassie, Silber und CyDye Färbung nach BN/SDS-PAGE	42
Abb.8	Differenzielle Gelelektrophorese (DIGE) von Etio- / Chloroplastenmembrankomplexen.....	44
Abb.9	Trennung von Proteinmembrankomplexen nach der Eigenladung der Komplexe...	47
Abb.10	Vergleich von BN/SDS- und CNL/SDS- PAGE.....	49
Abb.11	Fluoreszenzdetektion von Membranproteinkomplexen nach BN- bzw. CNL-PAGE	51
Abb.12	Eigenfluoreszenz von Proteinen nach CNL/SDS-PAGE	52
Abb.13	Absorptionsspektren von Thylakoidmembrankomplexen nach BN- bzw. CNL-PAGE.....	53
Abb.14	Immunodetektion von Proteinkomplexen nach BN- bzw. CNL-PAGE.....	55
Abb.15	Fluoreszenzdetektion von Komplexen (A) und Einzelproteinen (B) des Chloroplasten.....	57
Abb.16	Identifikation von Chlorophyll-bindenden Proteinen durch Cy2.....	58
Abb.17	Immunodetektion von Proteinkomplexen des PS II bzw. der POR im Chloroplasten	61
Abb.18	Absorptionsspektren der Thylakoidmembrankomplexe.....	63
Abb.19	Fluoreszenzdetektion von Proteinkomplexen (A) und Einzelproteinen (B) des Etioplasten	65
Abb.20	Identifikation von Pigment-bindenden Proteinen durch Cy2.....	66
Abb.21	Absorptionsspektren des dimeren und monomeren Cyt b ₆ f-Komplexes.....	67
Abb.22	Identifikation des Tetrapyrolderivats im dimeren Cyt b ₆ f-Komplexes durch DC....	69

Abb.23	Vergleich der MS/MS-Spektren von Protochlorophyllid, Protochlorophyll und den Co-Faktoren des dimeren Cyt b ₆ f-Komplexes.....	70
Abb.24	Immunodetektion von D2- bzw. POR A- haltigen Komplexen im Etioplasten	72
Abb.25	DIGE von Membranproteinkomplexen des Etioplasten und Plastiden nach 1h L ...	74
Abb.26	Fluoreszenzdetektion von Proteinkomplexen (A) und Einzelproteinen (B) nach 1h L	76
Abb.27	Identifikation von Pigment-bindenden Proteinen durch Cy2	77
Abb.28	Immunodetektion von D2 Komplexen in 1h L Plastiden	79
Abb.29	Absorptionsspektren von Komplexen aus etiolierten Keimlingen nach einstündiger Belichtung.....	81
Abb.30	Absorptionsspektren von Komplexen aus 10 Sekunden belichteten (10 s L) Keimlingen	83
Abb.31	Detektion von Pigment-bindenden Untereinheiten durch Autofluoreszenz.....	84
Abb.32	DIGE von Membranproteinkomplexen von Plastiden nach 1h L und 2h L	86
Abb.33	Fluoreszenzdetektion von Proteinkomplexen (A) und Einzelproteinen (B) nach 2h L	88
Abb.34	Überlagerung von autofluoreszenten Cy2-markierten Proteinen	90
Abb.35	Immunodetektion von D2-haltigen Komplexen in 2h L Plastiden.....	92
Abb.36	Absorptionsspektren von Komplexen aus 2h L Keimlingen.....	94
Abb.37	DIGE von Membranproteinkomplexen von Plastiden nach 2h L und 4h L.....	96
Abb.38	Fluoreszenzdetektion von Proteinkomplexen (A) und Einzelproteinen (B) nach 4h L	98
Abb.39	Überlagerung von autofluoreszenten Einzelproteinen mit Cy2-markierten Proteinen	100
Abb.40	Immunodetektion von D2 Komplexen nach 4h L	103
Abb.41	Absorptionsspektren von Komplexen aus 4h L Keimlingen.....	105
Abb.42	DIGE von Membranproteinkomplexen aus Plastiden nach 4h L und Chloroplasten	107
Abb.43	Schematische Darstellung aller nach CNL-PAGE autofluoreszenten Komplexe während der Ergrünung	109
Abb.44	Möglicher Verlauf der Komplexassemblierung während der Ergrünung	144

Lebenslauf

Name	Veronika Reisinger
Geburtstag	21.01.1974
Geburtsort	München
Schulbildung	
1980-1984	Grundschule Zorneding
1984-1993	Gymnasium Grafing
	Abschluss: allgemeine Hochschulreife
Berufsausbildung	
1993-1995	Berufsfachschule Oberschleißheim
	Abschluss: veterinärmedizinisch-technische Assistentin
Hochschulbildung	
1995-2001	Ludwig-Maximilians-Universität München
	Abschluss: Diplom Biologie
6/2002	Beginn der Promotion am Department I Biologie- Bereich Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. Lutz Eichacker
Berufstätigkeit	
6/2004-5/2005	Mitarbeiterin der OMX GmbH
ab 11/2005	Technische Assistentin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eichacker am Department I Biologie- Bereich Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen, als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere ferner, dass ich die vorliegende Arbeit nicht schon als Doktor-, Magister- oder Diplomarbeit bei einer anderen Hochschule eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift