

**Biochemische Untersuchungen an der  
Chlorophyll Synthase  
aus *Avena sativa***

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München**

vorgelegt von

**Heidi Schmid**

**am 28.03.2003**

**1. Berichtstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger**

**2. Berichtstatter: Prof. Dr. H. Scheer**

**Tag der mündlichen Prüfung: 01. Juli 2003**

Die vorliegende Arbeit wurde im Department für Biologie I -Botanik- der Ludwig-Maximilians-Universität München am Lehrstuhl für Phytochemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Wolfhart Rüdiger angefertigt.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. W. Rüdiger herzlich dafür bedanken, daß ich an seinem Lehrstuhl die vorliegende Arbeit durchführen konnte. Die vielen hilfreichen Diskussionen, seine Offenheit gegenüber meinen eigenen Ideen und sein stetes Interesse haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Laborleiterin Dr. Ulrike Oster. Sie hat mich während der gesamten Arbeit sowohl fachlich als auch menschlich begleitet und war immer für mich und meine Probleme da. Durch ihre Geduld und ihr in mich gesetztes Vertrauen motivierte sie mich immer wieder auch über schwierige Zeiten hinwegzukommen.

Ferner möchte ich mich herzlich bedanken bei:

- allen Mitarbeitern im Labor Oster, mit welchen ich zusammenarbeiten durfte, insbesondere:
  - Herrn Karl Mayer, für die vielen unterhaltsamen Gespräche über das Leben, das Universum und den ganzen Rest.
  - Herrn Harald Klement, für das –teilweise fälschlich- in mich gesetzte Vertrauen bei Oddset-Wetten.
  - Frau Claudia Schultz-Fademrecht, Dr. Karina Nikulina und allen anderen für das angenehme Arbeitsklima und die netten Unterhaltungen.
- Frau Dr. Sigrid Schoch für die Überlassung von Chlorophyllid-Derivaten.
- Den Mitarbeitern der anderen Labors, insbesondere C. Schneid, E. Knieb, H. Waltenberger, A. Daxenberger und A. Drescher für den lehrstuhlübergreifenden Zusammenhalt und die netten Kontakte, die immer noch fortbestehen.

Meiner Mutter und meinem Vater möchte ich ganz herzlich für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt danken, auf den ich mein ganzes Leben jederzeit zählen konnte.



**Teile dieser Dissertation wurden publiziert:**

**Schmid, H. C., Oster, U., Kögel, J., Lenz, S. und Rüdiger, W. (2001)**

Cloning and Characterisation of Chlorophyll Synthase from *Avena sativa*

*Biol. Chem.*, **382**, 903-911

**Schmid, H. C., Rassadina V., Oster, U., Schoch, S. und Rüdiger, W. (2002)**

Pre-loading of Chlorophyll Synthase with Tetraprenyl Diphosphate is an Obligatory Step in Chlorophyll Biosynthesis

*Biol. Chem.*, **383**, 1769-1777



I.	EINFÜHRUNG .....	1
I.1.	Die Chlorophyll Biosynthese bis zum Chlorophyllid.....	1
I.2.	Die Isoprenoid Biosynthese.....	5
I.3.	Die Chlorophyll Synthase Reaktion .....	8
I.4.	Aufgabenstellung.....	10
II.	MATERIAL UND METHODEN .....	12
II.1.	Material.....	12
II.1.1.	Chemikalien und Geräte .....	12
II.1.2.	Organismen.....	13
II.1.3.	Plasmide.....	14
II.2.	Puffer und Lösungen .....	15
II.2.1.	Bakterienanzucht .....	15
II.2.2.	DNA-Gelelektrophorese.....	16
II.2.3.	Protein-Gelelektrophorese –denaturierend-.....	16
II.2.4.	Färbung von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue.....	17
II.2.5.	„Western-blot“ („semi-dry“) .....	17
II.2.6.	Immundetektion.....	17
II.2.7.	Protein-Gelelektrophorese (nativ) .....	18
II.2.8.	HCS-Enzym-Test.....	18
II.3.	Methoden.....	19
II.3.1.	Anzucht und Überproduktion in <i>E. coli</i> .....	19
II.3.1.1.	Anzucht von <i>E. coli</i> .....	19
II.3.1.2.	Protein-Überproduktion in <i>E. coli</i> .....	19
II.3.1.3.	Zellaufschluß .....	20
II.3.1.4.	Fraktionierung der Gesamtproteinmenge durch Ultrazentrifugation .....	20
II.3.2.	Anzucht und Membranfragmentierung von <i>Avena sativa</i> .....	21
II.3.2.1.	Anzucht von <i>A. sativa</i> .....	21
II.3.2.2.	Isolierung von Etioplasten .....	21
II.3.2.3.	Isolierung von Prolamellarkörpern (PLBs) und Prothylakoiden (PTs).....	21
II.3.3.	Techniken für die Klonierung.....	22
II.3.3.1.	Plasmid-DNS Präparation aus <i>E. coli</i> .....	22
II.3.3.2.	Quantifizierung von DNS.....	23
II.3.3.3.	Restriktion von DNS .....	24
II.3.3.4.	Ligation von DNS.....	24

II.3.3.5.	„Ligation“ durch T4 DNA Polymerase Reaktion.....	25
II.3.3.6.	Entsalzen von Ligationsansätzen.....	26
II.3.3.7.	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen.....	26
II.3.3.8.	Transformation durch Elektroporation.....	26
II.3.3.9.	Blau-Weiß-Selektion durch X-Gal / IPTG.....	27
II.3.3.10.	DNS-Gelelektrophorese.....	27
II.3.3.11.	DNS-Größenstandard.....	28
II.3.3.12.	Eluierung von DNS aus Agarose-Gelen.....	28
II.3.3.13.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
II.3.3.14.	<i>in vitro</i> -Mutagenese.....	30
II.3.4.	Proteinbiochemische Methoden.....	31
II.3.4.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	31
II.3.4.2.	Aufreinigung des Antigens.....	31
II.3.4.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
II.3.4.4.	Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant-Blue (Serva).....	33
II.3.4.5.	„Western-blot“ im „semi-dry“ Verfahren.....	33
II.3.4.6.	Immundetektion.....	35
II.3.4.7.	Reinigung spezifischer Antikörper mit Glycin/HCl.....	35
II.3.4.8.	Nichtdenaturierende Protein-Gelelektrophorese.....	36
II.3.4.9.	Protein-Marker für denaturierende Gele.....	36
II.3.5.	Methoden zum Enzymtest der HCS.....	37
II.3.5.1.	Gewinnung von Chlorophyllid aus Chlorophyll mit Chlorophyllase.....	37
II.3.5.2.	Test zur Bestimmung der Enzymaktivität von Chlorophyll Synthase.....	38
II.3.5.3.	Spektrometrische Quantifizierung des im Enzymtest gebildeten Chl.....	39
II.3.5.4.	Auswertung der Enzymtests durch „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC).....	39
III.	ERGEBNISSE.....	41
III.1.	Untersuchungen und Berechnungen zur Struktur und Verwandtschaft der HCS ....	41
III.1.1.	Sequenzvergleich der HCS mit weiteren bekannten (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen.....	41
III.1.2.	Importsequenz.....	43
III.1.3.	Verwandtschaftsgrad zwischen der HCS und weiteren bekannten (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen.....	43
III.1.4.	Bestimmung der Transmembranbereiche der HCS.....	44



III.1.5.	Vergleich der HCS mit anderen Enzymen ohne Chlorophyll Synthase-Aktivität ...	45
III.2.	Herstellung und Verwendung des Fusionsproteins MBP-HCS.....	47
III.2.1.	Klonierung des HCS-Gens in den Vektor pMal P2.....	47
III.2.2.	Zellaufschluß und Ultrazentrifugation der MBP-HCS produzierenden Zellen.....	48
III.2.3.	Abschätzung der Menge an HCS im Bakterienlysat .....	51
III.3.	Pigmentspezifität von aus <i>Avena sativa</i> gewonnener Chlorophyll Synthase und heterolog überproduzierter Chlorophyll Synthase.....	52
III.4.	Antikörper gegen die Chlorophyll Synthase aus Hafer .....	57
III.4.1.	Antigenherstellung.....	57
III.4.1.1.	Konstruktion des Vektors pET-32 Ek/LIC-HCS(1-432).....	57
III.4.1.2.	Überproduktion und Aufreinigung des Antigens .....	60
III.4.2.	Untersuchung der Antikörpersensitivität.....	62
III.4.3.	Spezifität des Anti-HCS(1-144)-Antiserums.....	64
III.5.	Mutationen der HCS .....	68
III.5.1.	Bestimmung des „Core-Proteins“ .....	68
III.5.2.	Bestimmung von für die Katalyse essentiellen Aminosäuren .....	71
III.5.2.1.	Vorversuche mit Hemmstoffen .....	71
III.5.2.2.	Prinzip der zielgerichteten Mutagenese.....	73
III.5.2.3.	Essentielle Arginine.....	75
III.5.2.4.	Essentielle Cysteine .....	77
III.5.2.5.	Weitere untersuchte Aminosäuren aus konservierten Bereichen .....	80
III.5.2.6.	Zusammenfassung und schematische Darstellung der induzierten Punktmutationen.....	83
III.6.	Analyse des Reaktionsmechanismus der HCS .....	85
III.6.1.	Mg <sup>2+</sup> -Abhängigkeit der HCS.....	85
III.6.2.	Enzym-Kinetiken ergeben „Ping-Pong-Mechanismus“ .....	87
III.6.2.1.	Vorversuche.....	87
III.6.2.2.	Analyse von Enzym-Kinetiken.....	92
III.6.3.	Bestimmung des erstgebundenen Substrats.....	94
III.6.3.1.	Fluoreszenzdetektion im nativen Gel-System mit Chlid bzw. mant-FPP .....	95
III.6.3.2.	Vorinkubationsversuche mit PhyPP .....	100
IV.	DISKUSSION .....	103
IV.1.	Untersuchungen und Berechnungen zur Struktur und Verwandtschaft der HCS ..	103
IV.2.	Herstellung und Verwendung des Fusionsproteins MBP-HCS.....	104

IV.3.	Pigmentspezifität von aus <i>Avena sativa</i> gewonnener Chlorophyll Synthase und heterolog überproduzierter Chlorophyll Synthase.....	105
IV.4.	Antikörper gegen die Chlorophyll Synthase aus Hafer .....	106
IV.5.	Bestimmung von für die Katalyse essentiellen Aminosäuren .....	107
IV.6.	Analyse des Reaktionsmechanismus der HCS .....	109
V.	ZUSAMMENFASSUNG .....	113
VI.	LITERATURVERZEICHNIS .....	115
VII.	ANHANG .....	127
VII.1.	verwendete Oligonukleotide.....	127
VII.2.	Sequenzen der in dieser Arbeit erstellten Mutanten.....	131

**ABKÜRZUNGEN**

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bdH <sub>2</sub> O	2-fach deionisiertes Wasser
Chl	Chlorophyll <i>a</i>
Chlid	Chlorophyllid <i>a</i>
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E <sub>λ</sub>	Extinktion <sub>(Wellenlänge)</sub>
Em	Emission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ex	Excitation
FPP	Farnesylpyrophosphat
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m s <sup>-2</sup> )
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
h	Stunde(n)
HCS	Chlorophyll Synthase aus <i>Avena sativa</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-Ethansulfonsäure
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
M	Molarität (mol l <sup>-1</sup> )
mA	Milliampere
mant-FPP	mit N-Methylantranilsäure markiertes FPP
min	Minute(n)
NBT	Nitrobluetetrazolium
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

---

Pchlid <i>a</i>	Protochlorophyllid <i>a</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pheid <i>a</i>	Pheophorbid <i>a</i>
PhyPP	Phytylpyrophosphat
PLB	Prolamellarkörper
POR	NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RP	“Reversed Phase”
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde (n)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	”unit” Einheit der Enzymaktivität. 1U verarbeitet 1µg DNS in 1 h
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β-D-galaktosid
bp	Basenpaar(e) der DNS
Kb	Kilobasen 1 Kb = 1000 bp
Zn Pheid	Zn-Pheophorbid

## **I. EINFÜHRUNG**

Ohne die Nettoenergiegewinnung der Photosynthese wäre ein Leben, wie wir es heute kennen nicht vorstellbar, da die unterste Basis allen Lebens, nämlich die Welt des Phytoplanktons und der Pflanzen, fehlen würde. Von dem für die Photosynthese essentiellen Pigment, dem Chlorophyll (Blattgrün) in seinen verschiedenen Formen, werden auf der Erde jährlich ca.  $10^9$  Tonnen synthetisiert und wieder abgebaut (Hendry *et al.*, 1987), ein Drittel davon an Land, zwei Drittel in den Ozeanen. Somit handelt es sich bei der Chlorophyll Biosynthese um einen Massenprozeß, der sogar vom All aus zu beobachten ist. So führt die NASA seit 1997 Absorptionsmessungen durch, durch welche der Chlorophyll *a* Gehalt in den Ozeanen und somit die Menge an Phytoplankton bestimmt werden kann. Die Vegetationsdichte auf den Kontinenten wird durch Infrarotmessungen erfasst.

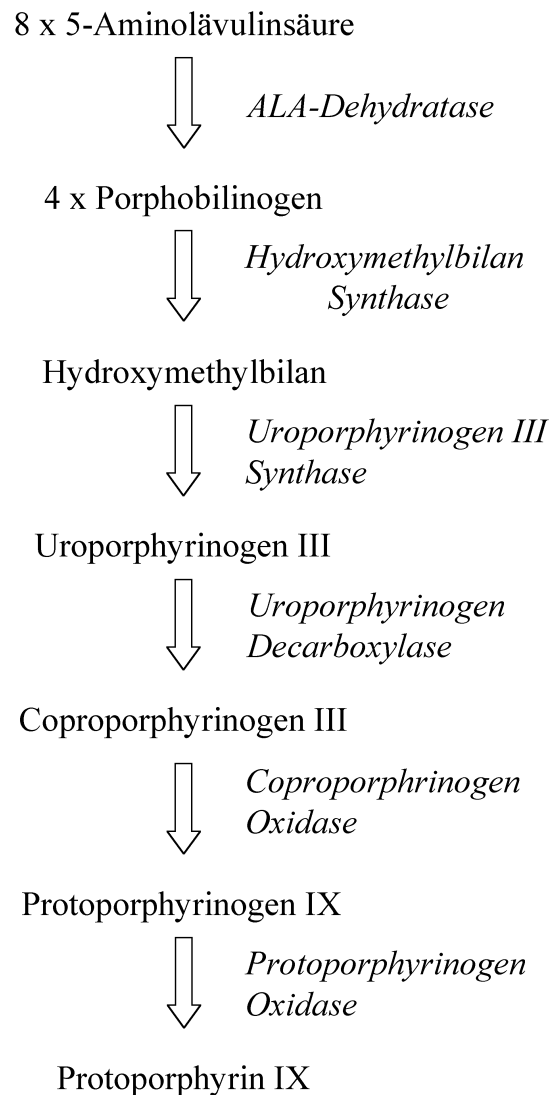
### **I.1. Die Chlorophyll Biosynthese bis zum Chlorophyllid**

In den letzten Jahren konnten alle Enzyme der Chlorophyll Biosynthese bestimmt werden und von fast allen dieser Enzyme sind mittlerweile die für sie kodierenden Gene bekannt.

Die Ausgangssubstanz für alle Porphyrine ist die 5-Aminolävulinsäure (ALA). Sie wird entweder über den C<sub>4</sub>-Weg aus Glycin und Succinyl-Coenzym A gebildet oder über den C<sub>5</sub>-Weg ausgehend von Glutaminsäure über die Glutamyl-tRNS<sup>Glu</sup>. Der C<sub>5</sub>-Weg ist der einzige bisher eindeutig nachgewiesene Syntheseweg von ALA in Pflanzen und findet in den Plastiden statt (v. Wettstein *et al.*, 1995, Kumar *et al.*, 1996(a, b), und Hori *et al.*, 1996).

Die meisten Biosyntheseschritte ausgehend von ALA sind in Pflanzen, Tieren und Bakterien gleich. Im weiteren wird jedoch ausschließlich auf die Tetrapyrrolsynthese in Pflanzen eingegangen. Die Biosyntheseschritte von ALA bis zum Protoporphyrin IX sind in Abbildung 1 zusammen mit den jeweils an der Umsetzung beteiligten Enzymen skizziert. Aus 8 ALA Molekülen entsteht am Ende ein Molekül Protoporphyrin IX. Die Hydroxymethylbilan Synthase katalysiert die Kondensation von vier Porphobilinogen Molekülen zum linearen Tetrapyrrol Hydroxymethylbilan. Das erste zyklische Tetrapyrrol in dieser Synthese stellt das Uroporphyrinogen III dar. Dieses wird durch Zyklisierung und Inversion eines Pyrrolrings aus Hydroxymethylbilan gebildet. Beide Einzelschritte werden von dem gleichen Enzym (Uroporphyrinogen III Synthase) katalysiert. Die weiteren Reaktionen sind schrittweise Decarboxylierungen der vier Acetat-Seitenketten vom Uroporphyrinogen III zum Coproporphyrinogen III und die nachfolgende oxidative Decarboxylierung von zwei Propionat-Seitenketten an C-3 und C-8 zum

Protoporphyrinogen IX (Jordan, 1991, Jordan, 1994 und Übersichtsartikel der Enzymreaktionen in Porra, 1997).



**Abbildung 1: Chlorophyll-Biosynthese von der 5-Aminolävulinäure zum Protoporphyrin IX**

Die jeweiligen Zwischenstufen sind in Normalschrift, die an der Umsetzung beteiligten Enzyme in *Kursivschrift* dargestellt.

Das nächste Enzym in der Biosynthese ist die Protoporphyrinogen Oxidase, welches in zwei Punkten besonders erwähnenswert ist: Erstens, ist es das erste Enzym der Tetrapyrrol-Biosynthese in Pflanzen, das in zwei verschiedenen Organellen auftritt, nämlich in Plastiden und Mitochondrien (Jacobs *et al.*, 1982 und Jacobs & Jacobs, 1984). Da alle vorherigen Enzyme auf die Plastiden beschränkt vorkommen, muß das Substrat Protoporphyrinogen IX in die Mitochondrien transportiert werden. Zweitens ist das Substrat Protoporphyrinogen IX die letzte farblose Substanz in der Tetrapyrrol-Biosynthese, da das Produkt

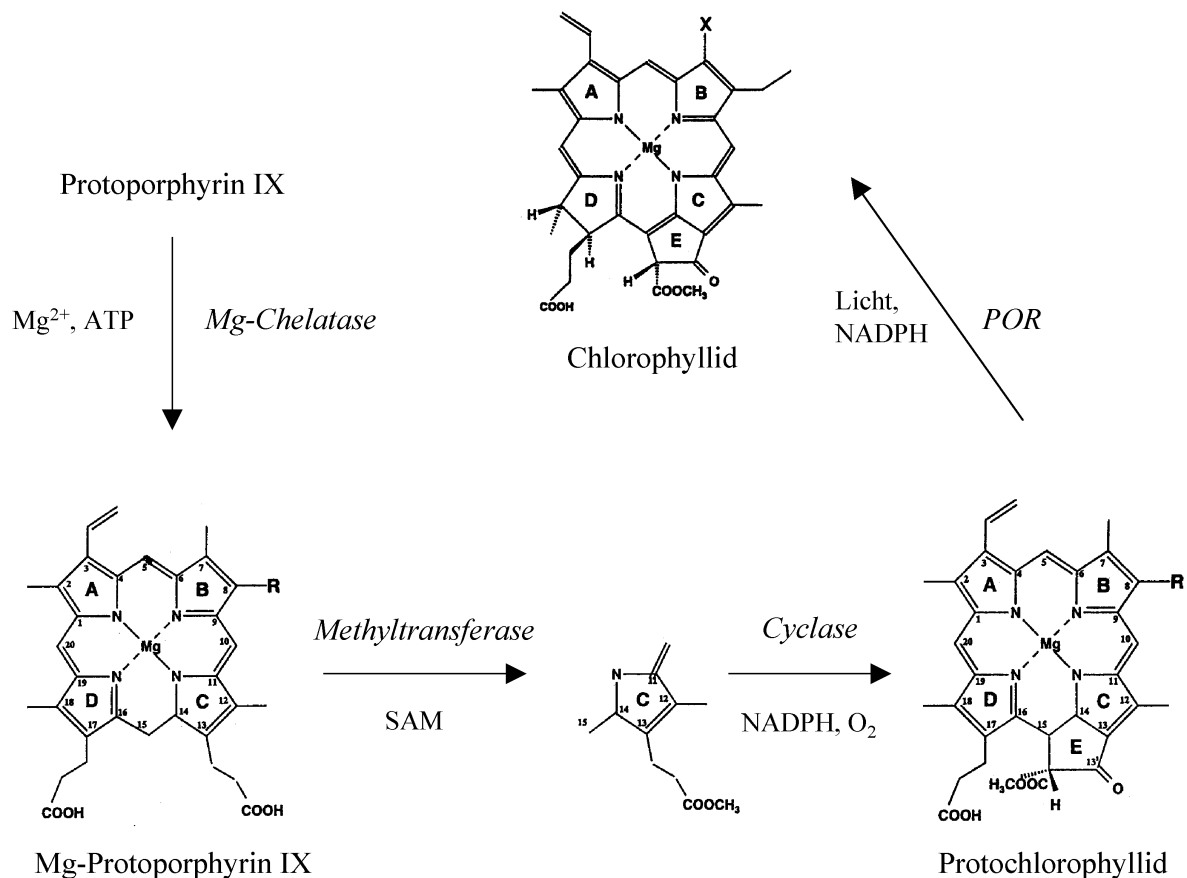
(Protoporphyrin IX) die erste farbige Verbindung und somit das erste Pigment in der Synthesekaskade darstellt.

Einen Meilenstein in den Untersuchungen der (Bakterio-) Chlorophyll-Biosynthese stellte die Entdeckung eines 46 kbp großen Genclusters („Photosynthese Gencluster“) in *Rhodobacter capsulatus* dar (Alberti *et al.*, 1995). In diesem Cluster liegen unter anderem alle Gene, die für die Enzyme des Mg-Wegs der Tetrapyrrol-Biosynthese kodieren. Die einzelnen Funktionen der Gene wurden durch spezifischen Gen-Knock-Out untersucht (Bauer, 1995). Über Homologien in Sequenzvergleichen konnten viele der Gene auch in höheren Pflanzen identifiziert werden, so z. B. die Magnesium Chelatase, die aus 3 Untereinheiten besteht und in *R. capsulatus* mit *bchH*, *bchD* und *bchI* bezeichnet wurden (Gibson *et al.*, 1995 und Willows *et al.*, 1996). Homologe Gene hierfür wurden z. B. in Cyanobakterien und Angiospermen gefunden (Jensen *et al.*, 1996 (a, b)). Insertion von  $Mg^{2+}$  in Protoporphyrin IX durch die Magnesium Chelatase ist ATP abhängig (s. Abbildung 2). Bei der Bildung von Hämen wird an dieser Stelle Eisen in das Protoporphyrin eingebaut und der Biosyntheseweg trennt sich. Die Magnesium Chelatase ist sehr spezifisch für Magnesium, obwohl z. B. Zink sehr leicht nicht-enzymatisch in Porphyrine inseriert werden kann (Castelfranco *et al.*, 1979). An dieser Stelle sollte auch erwähnt werden, daß das Magnesium-Zentralatom sehr leicht durch Säure aus Chlorophyll Derivaten entfernt werden kann, das Zink an dieser Stelle aber nicht. Deshalb werden Zn-Derivate oft für Untersuchungen an Chlorophyllen herangezogen (s. auch diese Arbeit).

Der nächste Schritt nach der Magnesium-Insertion ist die Bildung des Monomethylesters an der C-13 Propionat-Seitenkette durch S-Adenosyl-L-Methionin (SAM), der durch die Mg-Protoporphyrin IX Methyltransferase katalysiert wird (s. Abbildung 2).

Das für die Bildung des isozyklischen Rings verantwortliche Enzym ist die Cyclase (s. Abbildung 2, Übersichtsartikel: Porra 1997). Als Produkt entsteht das Protochlorophyllid. Das aus Pflanzen isolierte Enzym benötigt NADPH und molekularen Sauerstoff für die Bildung der Carbonylgruppe in C-13<sup>1</sup> (Walker *et al.*, 1989). In Bakterien sind zwei Wege bekannt: (a) Die Bildung der Carbonylgruppe aus  $H_2O$  (anaerobe Bakterien) (Porra *et al.*, 1995) oder (b) die Bildung der Carbonylgruppe aus  $O_2$  (aerobe Bakterien) (Porra *et al.*, 1996). Für den nächsten Schritt, die Hydrogenierung von Ring D, welcher vom Protochlorophyllid zum Chlorophyllid (Chlid) führt, können zwei Wege unterschieden werden (Übersichtsartikel: Fujita, 1996): Einerseits der lichtunabhängige, wahrscheinlich phylogenetisch ältere Weg und der lichtabhängige, „modernere“ Weg. In phototrophen Bakterien ist nur der lichtunabhängige Weg bekannt, wohingegen in Algen, Moosen, Farnen und Gymnospermen beide

Syntheseschritte nebeneinander vorkommen. Der lichtabhängige Weg scheint in allen Organismen mit oxidativer Photosynthese verbreitet zu sein, von den Cyanobakterien (Rowe *et al.*, 1995; Suzuki & Bauer, 1995) bis hin zu Angiospermen. Im weiteren Verlauf wird nur auf den für Angiospermen relevanten, lichtabhängigen Weg eingegangen (Schulz & Seneger, 1993; Reinbothe & Reinbothe, 1996). Die Reaktion wird von der NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR) katalysiert die das Hauptenzym der Prolamellarkörper in den Etioplasten darstellt und mit ihren Substraten Protochlorophyllid und NADPH einen ternären Komplex bildet. Das Enzym-gebundene Pigment kann als Photorezeptor angesehen werden, der seine eigene Hydrogenierung katalysiert.



**Abbildung 2: Chlorophyll-Biosynthese von Protoporphyrin IX zum Chlorophyllid**

SAM = S-Adenosyl-L-Methionin

bei Chlorophyllid (Chlid):  
 X =  $CH_3$  : Chlid a  
 X = CHO : Chlid b

Das Endprodukt, Chlorophyllid a, kann entweder über zwei Hydroxylierungsschritte durch die Chlorophyllid a Oxygenase zu Chlorophyllid b umgewandelt werden (Oster *et al.*, 2000)



oder es kann im letzten Schritt der Chlorophyll Biosynthese mit z. B. Phytol zu Chlorophyll verestert werden (auf die genaue Reaktion wird in I.3 eingegangen).

## **I.2. Die Isoprenoid Biosynthese**

Für den letzten Schritt der Chlorophyll Biosynthese werden die Polyprenylpyrophosphate Phytylpyrophosphat (PhyPP) bzw. Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) benötigt. Die C<sub>5</sub>-Vorläufer dieser Isoprenoide sind das Isopentenylpyrophosphat (IPP) bzw. sein Isomer, das Dimethylallylpyrophosphat. Diese können entweder über den klassischen, 1958 von Conrad Bloch und Feodor Lynen beschriebenen, Acetat-/Mevalonat-Weg gebildet werden (zusammengefaßt in: Spurgeon & Porter, 1981; Lichtenthaler *et al.*, 1997; Lichtenthaler, 1999) oder durch den rund 35 Jahre später entdeckten Mevalonat-unabhängigen 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat / 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat- (DOXP/MEP-) Weg (s. Abbildung 3). Letzterer ist bisher nur in Pflanzen (Schwender *et al.*, 1995; Schwender *et al.*, 1996, Lichtenthaler *et al.*, 1997), den meisten Algen und einigen Bakterienarten (unter anderem *Escherichia coli* und die Gruppe der Cyanobakterien) sowie im Malariaerreger *Plasmodium falciparum* nachgewiesen worden (zusammengefaßt bei Lichtenthaler, 1999). Hieraus ergibt sich, daß der neue DOXP/MEP-Weg ideale Angriffspunkte für Herbizide (z. B. Fosmidomycin) oder antibakterielle Substanzen liefert.

Der DOXP/MEP-Weg beginnt mit der Bildung von 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DOXP) ausgehend von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat katalysiert durch die DOXP Synthase (s. Abbildung 3), welche im Chloroplasten lokalisiert ist (für *Arabidopsis*: Araki *et al.*, 2000). Im zweiten Schritt von DOXP zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat (MEP) erfolgt eine C-C Isomerisierung und eine Reduktion, katalysiert durch die DOXP Reduktioisomerase (s. Abbildung 3). Durch Zugabe des Herbizids Fosmidomycin kann dieses Enzym spezifisch gehemmt werden und es erfolgt somit eine Blockade der Carotinoid-, Phytol- und Isoprenbiosynthese (Zeidler *et al.*, 1998).

Die folgenden drei Schritte im DOXP/MEP-Biosyntheseweg wurden erst vor kurzem von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben. Das 4-(Cytidin 5'-diphospho)-2-C-methylerythritol (CDP-ME) wird aus MEP durch die Reaktion mit CTP gebildet (Rohdich *et al.*, 1999; Kuzuyama *et al.*, 2000 (a)). Das diesen Schritt katalysierende Enzym, CDP-ME Synthase, wurde bisher aus *E. coli* und *A. thaliana* kloniert (Rohdich *et al.*, 2000). Das vierte Enzym des Mevalonat-unabhängigen Isoprenoid-Synthesewegs, die CDP-ME Kinase (Lüttgen *et al.*, 2000; Kuzuyama *et al.*, 2000 (b)), phosphoryliert in einer ATP-abhängigen Reaktion die 2-Hydroxy-Gruppe von CDP-ME (s. Abbildung 3). Der fünfte Schritt in der

IPP-Biosynthese ist die Bildung von 2-C-Methyl-D-Erythritol-2,4-Cyclodiphosphat (ME-Cyclodiphosphat) (Herz *et al.*, 2000; Takagi *et al.*, 2000), welches in verschiedenen Bakterienarten unter oxidativem Streß akkumuliert wird (Duvold *et al.*, 1997, Ostrovsky *et al.*, 1998).

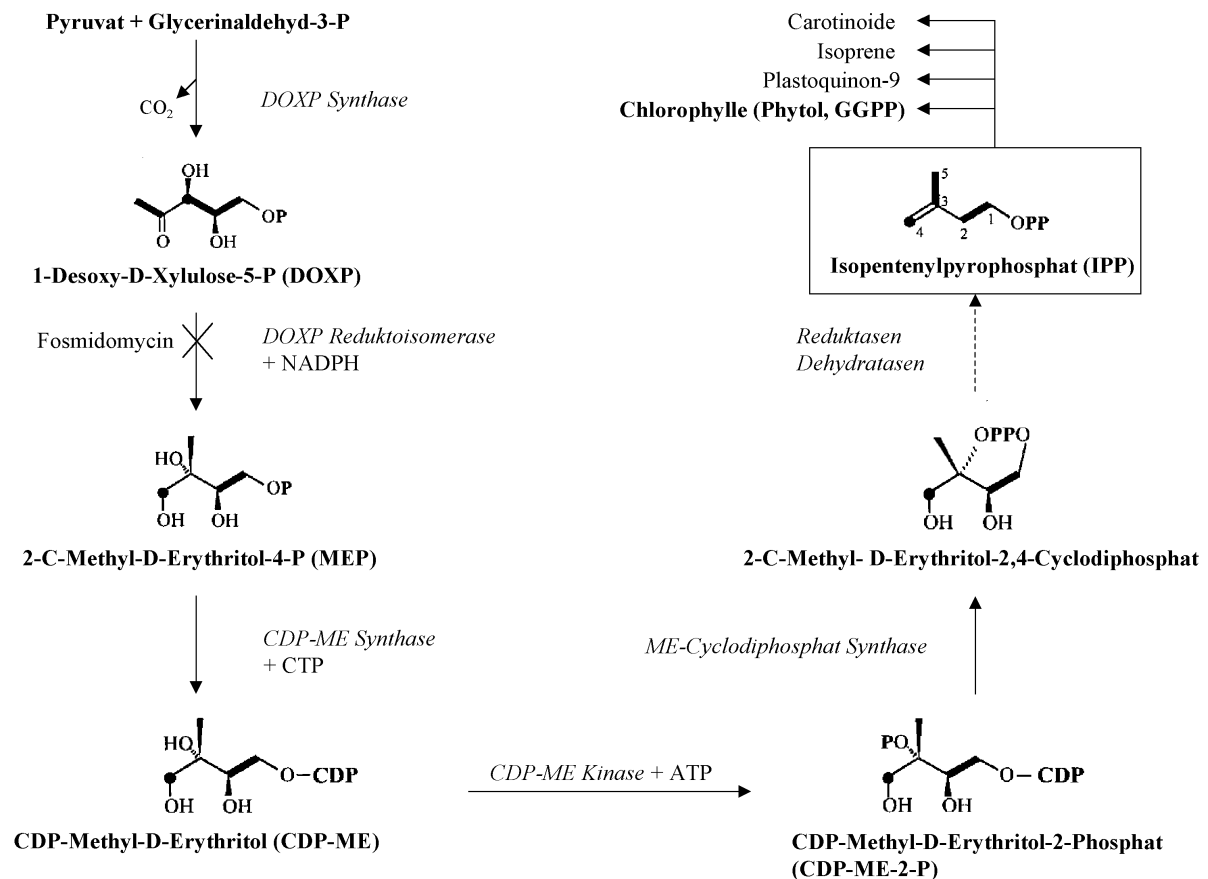
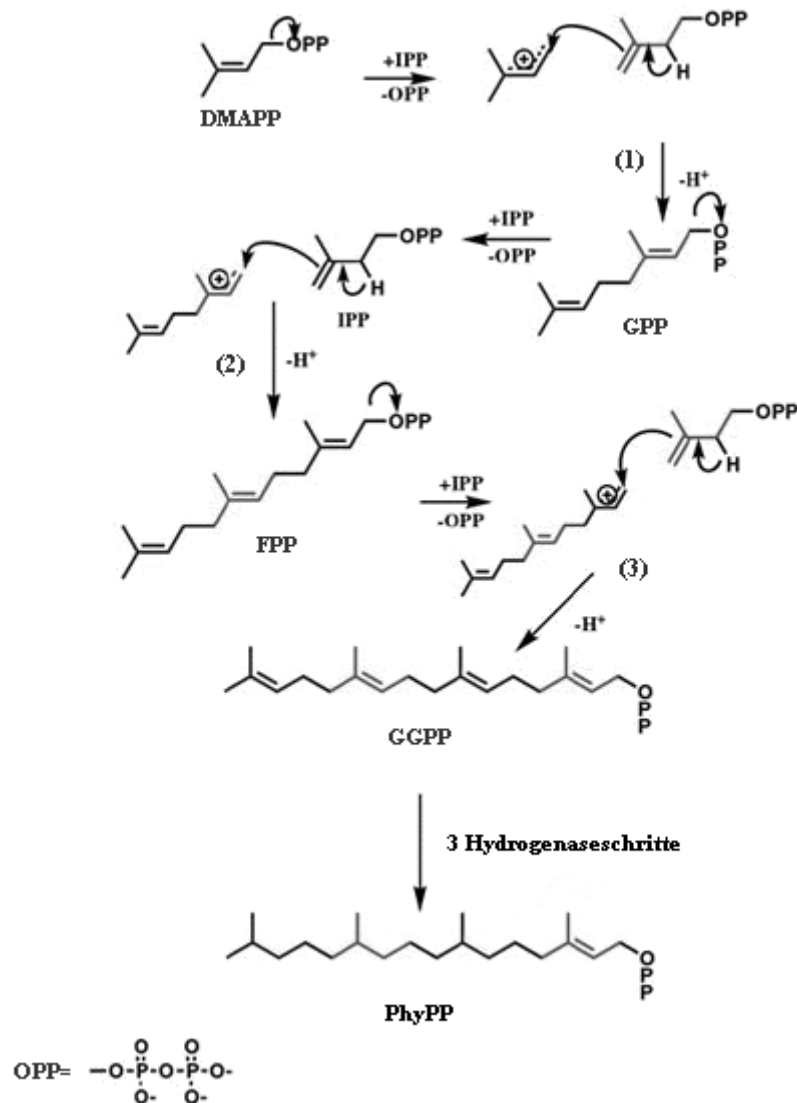


Abbildung 3: Der DOXP/MEP-Syntheseweg der IPP-Biosynthese in den Plastiden von Pflanzen

Die beteiligten Enzyme sind jeweils in *Kursivschrift* angegeben. Nur die ersten fünf Enzyme der IPP-Biosynthese über den Mevalonat-unabhängigen Syntheseweg sind bisher bekannt.

Der nächste Schritt in der IPP Biosynthese ist wahrscheinlich eine intramolekulare Eliminierung des Diphosphats aus dem ME-Cyclodiphosphat und die folgenden Schritte enthalten wahrscheinlich zwei Reduktase- und zwei Dehydratase-Schritte. Das hieraus resultierende IPP wird in Pflanzen anschließend durch eine Isomerase in sein Isomeres Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), das Startermolekül der Isoprenoidbiosynthese, umgewandelt, an welches durch Kopf-an-Schwanz-Kondensationen weitere IPP Moleküle angeknüpft werden, bis die gewünschte Länge des Isoprenoids erreicht ist. Diese Reaktionen werden von diversen Prenyltransferasen durchgeführt, deren Spezifität gegenüber der jeweiligen Isoprenoid-Kettenlänge stark differiert, so katalysiert die Geranylpyrophosphat

(GPP) Synthase (Abbildung 4, (1)) den Transfer eines einzigen DMAPP an IPP, wohingegen Gummitransferasen mehrere Elongationen mit IPP katalysieren können (Koyama & Ogura, 1999; Wang & Ohnuma, 1999).



**Abbildung 4: Biosynthese der Polyprenylpyrophosphate**

**DMAPP:** Dimethylallylpyrophosphat, **IPP:** Isopentenylpyrophosphat, **GPP:** Geranylpyrophosphat, **FPP:** Farnesylpyrophosphat, **GGPP:** Geranylgeranylpyrophosphat, **PhyPP:** Phytylpyrophosphat  
 (1) GPP Synthase, (2) FPP Synthase, (3) GGPP Synthase

Die Familie der „Kurz-Ketten-Prenyltransferasen“ besteht aus der GPP Synthase (Abbildung 4, (1)), die die Kondensation von DMAPP und IPP katalysiert und unter Abspaltung von Pyrophosphat GPP bildet, desweiteren aus der Farnesylpyrophosphat (FPP) Synthase, die FPP aus einer Reaktion von GPP und IPP bildet (Abbildung 4, (2)) und der

Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) Synthase (Abbildung 4, **(3)**), die FPP und IPP zum GGPP kondensiert (Ogura & Koyama, 1998, Koyama & Ogura, 1999).

Durch drei aufeinanderfolgende Hydrogenierungsschritte kann über Dihydrogeranylgeranylpyrophosphat und Tetrahydrogeranylgeranylpyrophosphat Phytylpyrophosphat (PhyPP) gebildet werden (s. Abbildung 4). Diese Reaktion wird von der Geranylgeranyl Reduktase (*chlP*) katalysiert, die auch, wie Keller *et al.* (1998) durch *in-vitro*-Studien zeigen konnte, aus  $\text{Chl}_{\text{GG}}$   $\text{Chl}_{\text{Phy}}$  herstellen kann. In *Nicotiana tabacum* konnte durch Einbringen der Antisense-RNA der Geranylgeranyl Reduktase das *chlP* Gen teilweise blockiert werden und somit eine Anhäufung von  $\text{Chl}_{\text{GG}}$  in den Pflanzen erreicht werden (Tanaka *et al.*, 1999).

Die Polyprenylpyrophosphate (vor allem GGPP bzw. PhyPP) finden z. B. in der Chlorophyll Synthase Reaktion (s. I.3) Verwendung.

### **I.3. Die Chlorophyll Synthase Reaktion**

Der letzte Schritt der Chlorophyll Biosynthese ist nun die Veresterung von Chlid *a* (aus dem Porphyrin-Biosyntheseweg, s. I.1) mit PhyPP bzw. GGPP (aus dem Isoprenoid-Biosyntheseweg, s. I.2) zum Chl *a*. Die Reaktion wird durch die **Chlorophyll Synthase** katalysiert, deren Funktion vor ca. 25 Jahren zum ersten Mal beschrieben wurde (Rüdiger *et al.* 1977, Rüdiger *et al.* 1980). Die Reaktion vom Chlid zum Chl verändert nicht die spektralen Eigenschaften des Ausgangspigments (z. B. Fluoreszenz, Absorption), aber es erhöht seinen lipophilen Charakter. Durch diesen kommt es zu spezifischen Interaktionen mit den Peptidketten der Proteine. Dies konnte durch dreidimensionale Röntgenstrukturanalyse von Chlorophyll-Protein-Komplexen nachgewiesen werden (Tronrud *et al.*, 1986, Kühlbrandt *et al.*, 1994, McDermott *et al.*, 1995, Hofmann *et al.*, 1996).

Die Aktivität der Chlorophyll Synthase konnte in den inneren Membransystemen der Etioplasten (Lindsten *et al.* 1990) und in den Thylakoidmembranen im Chloroplasten (Soll *et al.*, 1983) nachgewiesen werden. In frühen Arbeiten (zusammengefaßt in: Rüdiger & Schoch, 1991; Rüdiger 1993) konnte gezeigt werden, daß etiolierte Pflanzen nach Belichtung zuerst Chlorophyll, welches mit Geranylgeraniol ( $\text{Chl}_{\text{GG}}$ ) verestert ist, bilden. Dieses Pigment wird anschließend schrittweise reduziert, bis das mit Phytol veresterte Endprodukt  $\text{Chl}_{\text{Phy}}$  vorliegt (s. Abbildung 5). In grünen Pflanzen hingegen wird von Anfang an  $\text{Chl}_{\text{Phy}}$  gebildet (s. Abbildung 5). Das heißt, in diesem Fall muß das GGPP vor der Veresterung zum PhyPP reduziert worden sein.

Die Chlorophyll Synthese in Etioplasten akzeptiert für die Veresterungsreaktion Chlid *a* und Chlid *b*, aber kein Bakteriochlorophyllid (BChlid). Als Zentralatom kann Mg oder Zn vorliegen, nicht aber Cu, Co oder Ni. Die metallfreie Form des Pheophorbids wird ebenfalls nicht akzeptiert. Aus Versuchen mit verschiedenen modifizierten Chlorophylliden konnte eine besondere Funktion der Position 13<sup>2</sup> geschlossen werden (Helfrich *et al.*, 1994). In Chlorophyllid (und auch Chlorophyll) stehen die Substituenten an den Positionen C-13<sup>2</sup>, C17 und C18 aus der glatten Tetrapyrrolfläche heraus. Sperrige Seitenketten an C-13<sup>2</sup> müssen für eine Reaktion mit der Chlorophyll Synthase gegenüber der Propionatseitenkette in C-17 liegen.

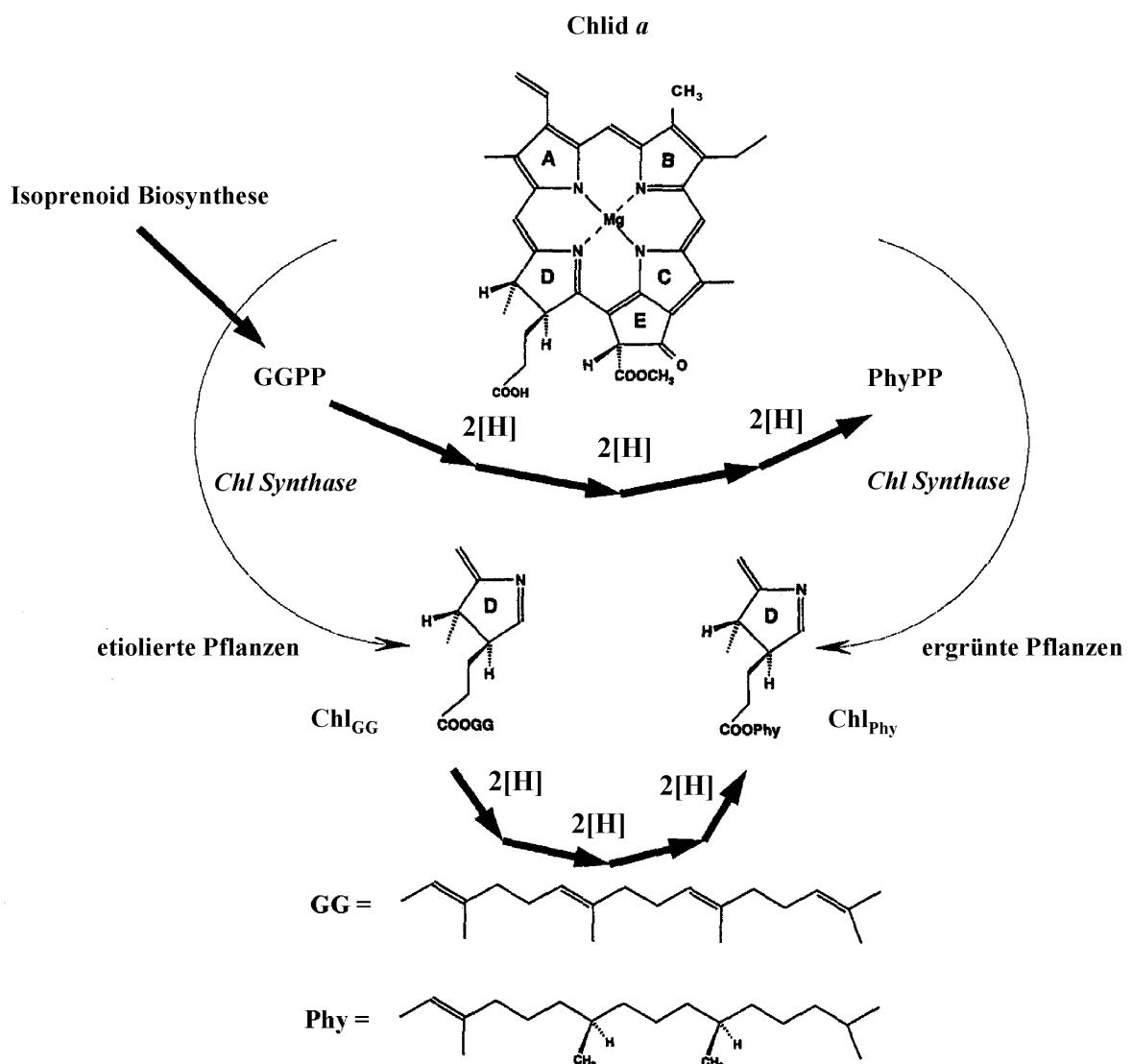


Abbildung 5: Die zwei Biosynthesewege vom Chlid zum Chl

Eine Konsequenz hieraus ist, daß Chlorophyllid  $a'$ , das Epimer von Chlid  $a$ , nicht verestert werden kann (Helfrich *et al.*, 1994). Wenn aber Chl  $a'$  als natürlicher Bestandteil im Reaktionszentrum I vorkommt (Kobayashi *et al.*, 1988), so muß es nach der Veresterung durch Epimerisierung von Chl  $a$  entstanden sein.

Inaktivierung des *bchG* Gens von *Rhodobacter capsulatus* durch Interposoninsertion ergab einen mutierten Stamm, der anstatt Bakteriochlorophyll (BChl) nur noch BChlid produzieren konnte (Gibson & Hunter, 1994; Bollivar *et al.*, 1994). Hieraus konnte geschlossen werden, daß das *bchG* Gen für die Bakteriochlorophyll Synthese kodiert.

Durch die heterologe Expression des *bchG* Gens aus *R. capsulatus* und dem homologen *chlG* Gen aus *Synechocystis* PCC 6803 in *E. coli* wurden Enzymtests mit verschiedenen Substraten *in-vitro* möglich (Oster *et al.*, 1997). Wie zu erwarten war, konnte das *chlG* Genprodukt Chlid verestern, nicht aber BChlid. Umgekehrt akzeptierte das *bchG* Genprodukt nur BChlid und nicht Chlid. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß beide Genprodukte PhyPP besser verestern konnten, als GGPP. Dies entspricht der beobachteten Gegebenheiten in Chloroplasten und liegt im Gegensatz zu der in Etioplasten bevorzugten Veresterung von GGPP.

Das erste Chlorophyll Synthase Gen in höheren Pflanzen, genannt *G4*, wurde in *Arabidopsis thaliana* gefunden (Gaubier *et al.*, 1995). Nach heterologer Überexpression des *Arabidopsis* Gens *G4* in *E. coli* konnte die Enzymaktivität der Chlorophyll Synthase nachgewiesen werden, wobei GGPP dem PhyPP bei der Veresterung vorgezogen wurde (Oster & Rüdiger, 1997), ähnlich der Situation in etiolierten Pflanzen. Da das Gen in Einzelkopie vorliegt und in grünen und ergrünenden Pflanzen exprimiert wird, muß noch geklärt werden, ob in grünen und etiolierten Pflanzen verschiedene Genprodukte vorliegen, oder ob die Substratspezifität mit den Umweltbedingungen (z. B. Lipidzusammensetzung der Membran) variiert.

In *Chloroflexus aurantiacus* konnten zwei verschiedene *bchG* Homologe detektiert werden (Niedermeier *et al.*, 1994 und Lopez *et al.*, 1996). Basierend auf dem gemeinsamen Auftreten der Gene wurde spekuliert, daß eine der beiden Chlorophyll Synthasen spezifisch für die Bakteriochlorophyll  $a$  Synthese im Reaktionszentrum und in den inneren Antennen ist und die andere für die Bakteriochlorophyll  $c$  Synthese in den Chlorosomen verantwortlich ist (Lopez *et al.*, 1996).

#### **I.4. Aufgabenstellung**

Das Ziel dieser Dissertation war nun, mehr über den Reaktionsmechanismus, das aktive Zentrum und die Verwandtschaft der Chlorophyll Synthase zu anderen Proteinen

herauszufinden. Die Arbeiten hierzu wurden mit der Chlorophyll Synthase aus *Avena sativa* (HCS), welche in *E. coli* überexprimiert wurde, durchgeführt (Schmid *et al.*, 2001).

In Lopez *et al.* (1996) wurde angedeutet, daß die Chlorophyll Synthasen mit Polyprenyltransferasen verwandt sind, die in die Ubichinon- und Metachinonbiosynthese involviert sind. Hierauf basierend sollten durch Sequenzvergleiche genauere Verwandtschaftsbeziehungen erarbeitet werden. Durch weitere theoretische Berechnungen sollten auch Erkenntnisse über etwaige Transportsequenzen und die Transmembranbereiche der HCS gefunden werden.

Desweiteren sollte durch Deletionsmutationen der für die Reaktion essentielle Teil des Enzyms herausgearbeitet werden und durch Punktmutationen sollte das aktive Zentrum des Enzyms eingegrenzt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die Entwicklung und Durchführung von Enzymkinetiken darstellen, durch welche die Veresterung der ersten Minuten gemessen werden könnten und Ableitungen über den Reaktionsmechanismus möglich sein sollten.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### II.1. Material

#### II.1.1. Chemikalien und Geräte

Alle eingesetzten Chemikalien sind analysenrein und stammen insbesondere von den Firmen Sigma, AppliChem und Roth.

##### Lösungsmittel

Vor Gebrauch destilliert wurde: Aceton  
 In p. A.-Qualität verwendet wurden: Hexan, Ethanol, Ethylacetat

##### Enzyme

Restriktionsenzyme und andere Enzyme New England BioLabs (Frankfurt a. M.),  
 Stratagene (La Jolla, CA, USA)

##### Detergenzien

Natriumdodecylsulfat (SDS) Serva (Heidelberg)  
 Triton-X-100 Roth (Karlsruhe)  
 Tween 20 Serva (Heidelberg)

##### Spektrometer

Dioden-Array-Spektrophotometer,  
 Modell 8451A Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA)  
 Fluoreszenz-Spektrophotometer F-2000 Hitachi (Berkshire, UK)

##### HPLC-Bestandteile

-Degaser: Gynkotec (Softron, Germering)  
 -Fluorimeter 1:  
   Spectrofluorimetric Detector RF-551: Shimadzu (Duisburg)  
 -Fluorimeter 2:  
   RF-1001 Gynkotec (Softron, Germering)  
 -Pumpe  
   High Precision Pump Model 480 Gynkotec (Softron, Germering)



sonstige Geräte für molekularbiologische und biochemische Arbeiten

-PCR-Maschine

MiniCycler PTC-150 HB MJ Research (Watertown, MA, USA)

-Inkubationsschüttler

Orbital Shaker Model 420 Forma Scientific (Marietta, OH, USA)

-French Pressure Cell

SLM Aminco (Thermo Spectronic, New York, USA)

-Zentrifugen

Tischzentrifuge EBA 12 Hettich (Tuttlingen)

Ultrazentrifuge 2330 Ultraspinn LKB (Bromma, Schweden)

Rotor: RPS 55T-2-151

Ultrazentrifuge TGA-55 Kontron (Neufahrn)

Kühlzentrifuge Centrikon H-401 Kontron (Neufahrn)

Rotoren: A 8.24, A 6.9

**II.1.2° Organismen**

***Avena sativa L.***

Stamm: „Irlbach“/ „Tomba“, ungebeizt BayWa (München)

***Escherichia coli***

Stämme:

- XL1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10* (Tet<sup>R</sup>)]

- CAG 597 (New England BioLabs, Frankfurt a. M.)

F' *rpoH165 (am) zhg::Tn 10* (Tet<sup>R</sup>) *lacZ(am) trp (am) pho (am) supC (ts) mal(am) rpsL*

- SG13009 [pREP4] (Qiagen, Hilden) Gottesman *et al.* (1981)

*nal<sup>s</sup> str<sup>s</sup>rif<sup>h</sup>thi<sup>-</sup>lac<sup>-</sup>ara<sup>+</sup> gal<sup>+</sup> mtl<sup>-</sup>F<sup>-</sup> recA1 uvr<sup>+</sup> lon<sup>+</sup>* (pREP4)

- AD494 (DE3) pLysS (Novagen, Madison, WI, USA)

*Δara-leu 7697 ΔlacX74 Δpho APvuII phoR ΔmalF3* F'[*lac<sup>+</sup>(lac<sup>q</sup>)pro*] *trxB::kan* (DE3) [pLysS] (Cm<sup>R</sup>)

### II.1.3. Plasmide

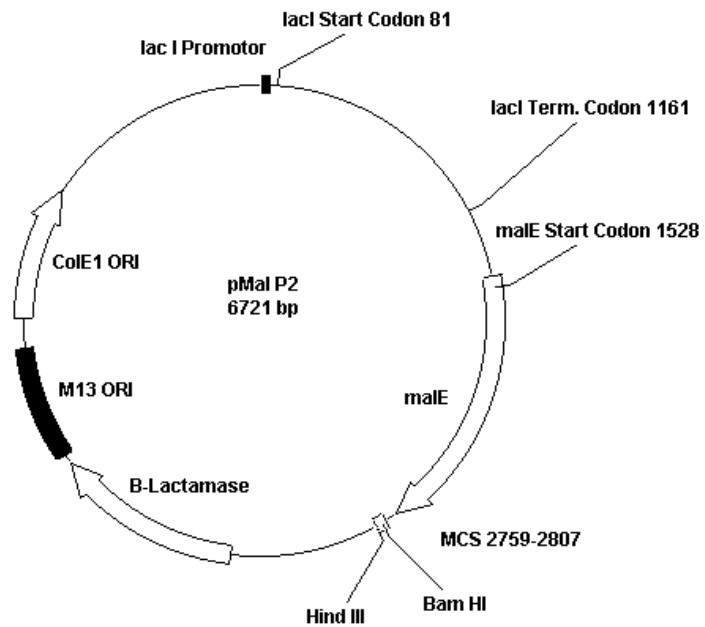


Abbildung 6: Schematische Karte des Vektors pMal P2 (NEB, Frankfurt a. M.)

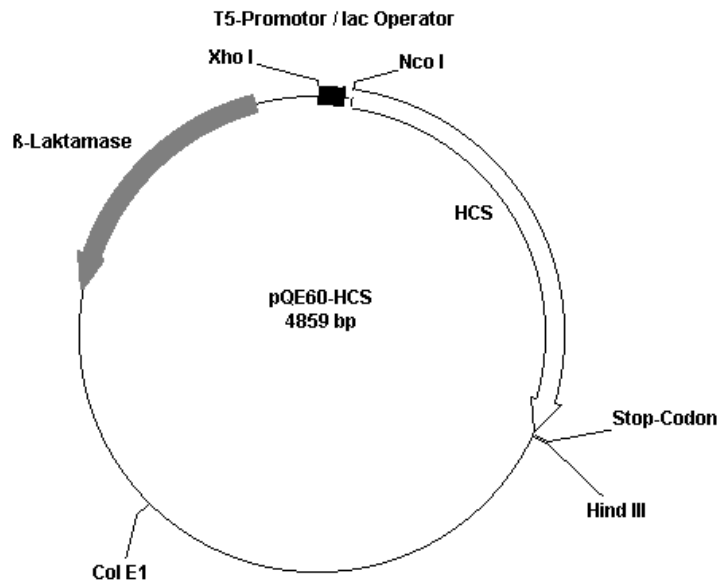


Abbildung 7: Schematische Karte des Vektors pQE60-HCS (Qiagen, Hilden)

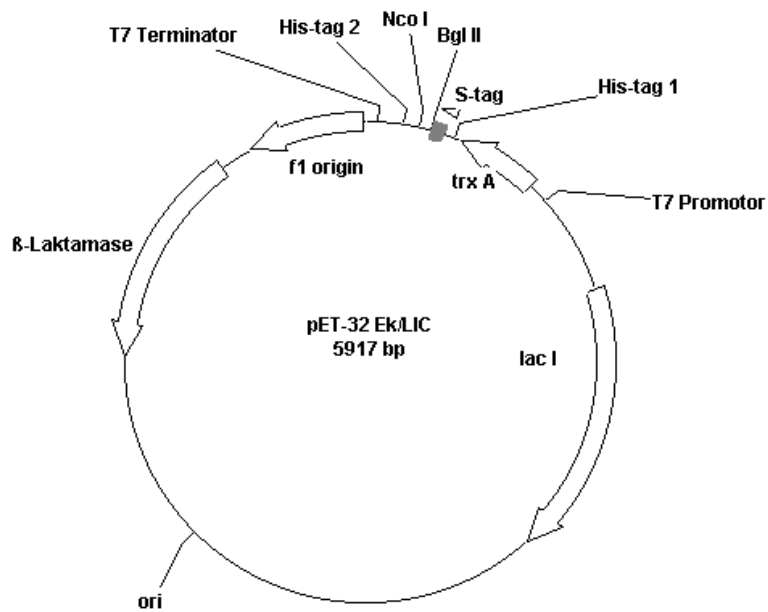


Abbildung 8: Schematische Karte des Vektors pET-32 Ek/LIC (Novagen, Madison, WI, USA)

## II.2. Puffer und Lösungen

### II.2.1. Bakterienanzucht

#### Supermedium

2,5 %	Trypton / Pepton
1,5 %	Hefeextrakt
0,5 %	NaCl

#### LB-Medium (pH 7,5)

1 %	Trypton/Pepton
0,5 %	Hefeextrakt
0,5 %	NaCl

**II.2.2. DNA-Gelelektrophorese****50 x TAE-Puffer (pH 8,5)**

2 M	Tris
1 M	Eisessig
0,1 M	EDTA

**10 x Auftragspuffer**

50 %	Glycerin
0,03 %	Bromphenolblau

**II.2.3. Protein-Gelelektrophorese –denaturierend-****SOL 2 (pH 8,8)**

1,5 M	Tris
0,4 %	SDS
8 mM	EDTA

**SOL 3 (pH 6,8)**

0,5 M	Tris
0,4 %	SDS
8 mM	EDTA

**10 x PAGE-Elektrophoresepuffer (pH 8,3)**

250 mM	Tris
2 M	Glycin
1 %	SDS

**4 x Probenpuffer reduzierend (pH 6,8)**

2,5 M	Tris
40 %	Glycerin
1 %	DTT (Dithiothreitol)
4%	SDS
0,02 %	Bromphenolblau

## II.2.4. Färbung von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue

### Coomassie-Lösung

0,1 %	Coomassie Brilliant Blue R 250 Serva
40 %	Methanol
10 %	Essigsäure

### Entfärber

40 %	Methanol
10 %	Essigsäure

## II.2.5th „Western-blot“ („semi-dry“)

### Anodenpuffer I (pH 10,4)

300 mM	Tris
20 %	Methanol

### Anodenpuffer II (pH 10,4)

30 mM	Tris
20 %	Methanol

### Kathodenpuffer (pH 9,4)

25 mM	Tris
40 mM	6-Aminohexansäure (=6-Aminocapronsäure)
20 %	Methanol

## II.2.6. Immundetektion

### TTBS Puffer (pH 7,5)

0,1 M	Tris
0,15 M	NaCl
0,1 %	Tween 20

### AP (Alkalische Phosphatase) Puffer (pH 9,5)

50 mM	Tris
50 mM	NaCl
2,5 mM	MgCl <sub>2</sub>

**2x Magermilchpuffer (pH 7,5)**

10 %	Magermilchpulver
0,2 M	Tris
0,3 M	NaCl
0,2 %	Tween 20

**BCIP-Stammlösung**

5 %	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, gelöst in Dimethylformamid
-----	--

**NBT-Stammlösung**

5 %	Nitrobluetetrazolium, gelöst in 70% Dimethylformamid
-----	--

**II.2.7. Protein-Gelelektrophorese (nativ)**

**10 x TBE-Puffer (pH 8,3)**

0,9 M	Tris
0,9 M	Borsäure
25 mM	EDTA

**10 x Auftragspuffer für native Proteinproben**

97 %	Glycerin
1 %	Bromphenolblau

**II.2.8th HCS-Enzym-Test**

**SP-Puffer (pH 7,5)**

120 mM	Kaliumacetat
10 mM	Magnesiumacetat
50 mM	HEPES
14 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
10 %	Glycerin

## **II.3. Methoden**

### **II.3.1. Anzucht und Überproduktion in *E. coli***

#### **II.3.1.1. Anzucht von *E. coli***

##### **II.3.1.1.1. Festmedium**

Für die Anzucht von *E. coli* auf Agar-Platten werden 1,5 % Agar in LB-Medium autoklaviert und anschließend bis auf ca. 50°C abgekühlt. Nun wird die Lösung mit den benötigten Antibiotika (Ampicillin: 100 µg/ml und / oder Kanamycin: 25 µg/ml je nach verwendetem Vektor) versetzt, und jeweils 25-30 ml werden in vorbereitete Petrischalen gegeben. Nach dem Erhärten des Agars sind die Platten einsatzbereit.

##### **II.3.1.1.2. Übernachtskultur in Flüssigmedium**

Für die Anzucht von *E. coli* in Flüssigmedium werden 3 ml (Plasmid-Mini-Präparation, s. II.3.3.1.1) bzw. 100 ml (Plasmid-Midi-Präparation, s. II.3.3.1.2) LB-Medium bzw. 200 ml Supermedium (Protein-Überproduktion, s. II.3.1.2) mit den gewünschten Zellen inokuliert. Nach Zugabe der entsprechenden Antibiotika (Ampicillin: 100 µg/ml und / oder Kanamycin: 25 µg/ml, je nach verwendetem Vektor) werden die Zellen über Nacht bei der jeweils vorgeschriebenen Temperatur (RT-37°C) geschüttelt (200 rpm).

#### **II.3.1.2. Protein-Überproduktion in *E. coli***

Um Proteine in *E. coli* Zellen überzuproduzieren, werden 500 ml antibiotikahaltiges Supermedium mit 5–25 ml (je nach Überproduktionstemperatur) der gewünschten Übernachtskultur (s. II.3.1.1) versetzt und bei der vorgeschriebenen Temperatur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 geschüttelt. Anschließend wird je nach verwendetem Vektor und *E. coli* Stamm 0,3-0,8 mM IPTG zugesetzt, und die Kulturen werden für weitere 2 - 4 Stunden geschüttelt. Nun werden die Bakterien möglichst schnell abgekühlt (auf Eis) und bei 6.000 g für 5 min in der Kühlzentrifuge (4°C) sedimentiert. Die Pellets werden anschließend in 50 mM HEPES-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das so entstandene Pellet wird in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei –20°C gelagert.

### **II.3.1.3. Zellaufschluß**

#### **II.3.1.3.1. *Enzymatischer Aufschluß***

Für die anfänglichen, qualitativen Enzymtests werden die eingefrorenen Zellen (s. II.3.1.2) auf Eis aufgetaut, wobei jedes aus 500 ml Anzuchtvolumen resultierende Pellet mit 4 ml 50 mM HEPES (pH 8,0) versetzt wird. Der Zellaufschluß erfolgt durch Zugabe von Lysozym und DNase A (je 500 µg auf ein Pellet aus 500 ml Medium) gefolgt von 4 - 5 Einfrier- und Auftauzyklen, bis die Zellsuspension eine durchsichtige, leicht grüne Färbung annimmt, welche die Lyse der Zellen andeutet. Die resultierende Suspension wird anschließend direkt zur Bestimmung von Enzymaktivitäten eingesetzt.

#### **II.3.1.3.2. *„French Press“***

Für quantitative biochemische Analysen werden die Zellen mit der French<sup>®</sup> Pressure Cell (SLM Aminco) aufgeschlossen. Hierzu werden die geernteten Zellen (s. II.3.1.2) pro tiefgefrorenem Pellet mit 5 ml 50 mM HEPES (pH 8,0) versetzt und bis zur vollständigen Homogenität mit einem Kleinspatel vorsichtig gerührt. Nun wird die Zellsuspension in den Aufschlußzylinder (40 K Zelle mit einem maximal Volumen von 35 ml) überführt und die Zellen werden durch zweimaligen Durchlauf bei 16.000 psi aufgebrochen.

#### **II.3.1.4. Fraktionierung der Gesamtproteinmenge durch Ultrazentrifugation**

Nach dem Zellaufschluß mit der French<sup>®</sup> Pressure Cell (s. II.3.1.3.2) können die löslichen Proteine von den membrangebundenen Proteinen durch Ultrazentrifugation (UZ) abgetrennt werden. Hierzu wird eine erste UZ für 30 min bei 30.000 g und 4°C durchgeführt, um nicht aufgebrochene Zellen und größere Zellfragmente von der Proteinsuspension abzutrennen. Der hieraus resultierende Überstand wird in einer weiteren UZ für 3 h bei 100.000 g und 4°C erneut zentrifugiert, wobei die nicht membrangebundenen Proteine im Überstand verbleiben und sich die membranassoziierten bzw. die Transmembranproteine im Pellet sammeln. Der Überstand wird abgenommen und bei -20°C gelagert. Das Pellet wird in ausreichend 50 mM HEPES (pH 8,0) bis zum Verschwinden von Membranaggregaten resuspendiert und kann nun ebenfalls bei -20°C gelagert werden.



### **II.3.2. Anzucht und Membranfragmentierung von *Avena sativa***

#### **II.3.2.1. Anzucht von *A. sativa***

Der Saathafer wird in einer Plastik-Schale mit den Maßen 54 x 37 x 11 cm angezogen. Hierzu werden 8 l Vermiculit in der Schale verteilt und mit 4,5 l H<sub>2</sub>O gewässert. Nun werden ca. 2,5 l Hafer gleichmäßig dick auf den feuchten Vermiculit aufgebracht. Zuletzt folgt eine dünne Schicht Vermiculit, die erneut leicht angefeuchtet und anschließend gut angedrückt wird, um eine gleichmäßige Wasserversorgung des Saatguts zu gewährleisten. Die Anzucht erfolgt nun im Brutschrank bei 28°C mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 80 % für 8 Tage, wobei auf eine ausreichende Wasserversorgung der jungen Pflanzen zu achten ist.

#### **II.3.2.2. Isolierung von Etioplasten**

Die Isolierung von Etioplasten wird in leicht abgeänderter Form nach Eichacker *et al.* (1996) durchgeführt. Das genaue Aufarbeitungsschema ist in Klement (2000), Kap. 2.2.2, dargestellt.

#### **II.3.2.3. Isolierung von Prolamellarkörpern (PLBs) und Prothylakoiden (PTs)**

Die weitere Aufarbeitung der isolierten Etioplasten erfolgt unter schwachem Grünlicht und die Puffer werden konstant auf 4°C gehalten. Ebenso erfolgen sämtliche Zentrifugationsschritte bei 4°C.

Jeweils 800-1000 µl in Waschpuffer (0,33 M Sorbit, 50 mM HEPES, pH 8,0) resuspendierte Etioplasten werden zur Lyse durch osmotischen Schock mit 20 ml Schockpuffer (50 mM HEPES, pH 8,0, 2 mM EDTA, 0,3 mM NADPH) versetzt und kurz geschwenkt. Die aufgebrochenen Etioplasten werden anschließend bei 7.000 g für 15 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird nun in 2,5 ml 20 % Saccharose mit 0,3 mM NADPH resuspendiert und anschließend mehrmals in einer Kanüle auf und ab gezogen, um die Etioplasten möglichst quantitativ aufzuschließen. Die resultierende Suspension wird nun auf vorher angefertigte Sucrose-Gradienten (24 ml von 20-50 % Sucrose auf einem Kissen von 8 ml 50 % Sucrose) geladen und für 1 h 45 min bei 92.000 g in der UZ zentrifugiert (Rotor TST 28.38). Die PLBs liegen nun im Bereich von ca. 35–40 % Sucrose als milchige Bande vor, die abpipettiert werden kann. Das Pellet besteht aus den PTs, die zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren werden. Die PLB-Fraktion wird mit dem 2,5-fachen Volumen an

Schockpuffer verdünnt und weitere 15 min bei 7.000 g zentrifugiert. Das Pellet aus PLBs kann nun ebenfalls bei -20°C gelagert werden.

### **II.3.3. Techniken für die Klonierung**

Grundsätzlich werden alle Versuche unter Abschnitt II.3.3 mit sterilem Material durchgeführt. Den Beschreibungen der Kits kann zumeist nicht die genaue Zusammensetzung der mitgelieferten Puffer entnommen werden. In diesen Fällen werden die Puffer mit der in der Kit-Anleitung üblichen Bezeichnung geführt.

#### **II.3.3.1. Plasmid-DNS Präparation aus *E. coli***

##### **II.3.3.1.1. *analytische Aufarbeitung***

Für die Isolierung kleiner Mengen (bis 10 µg) DNS wird die Plasmid-Mini-Präparation mit dem E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit I von Peqlab (Erlangen) durchgeführt. Hierzu werden 3 ml Bakterien-Kultur über Nacht bei 37°C angezogen (s. II.3.1.1.2). Am nächsten Tag werden 1,5 ml dieser Kultur bei 10.000 g für 1 min abzentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Das Bakterienpellet wird nun durch kräftiges Rütteln vollständig in 250 µl Lösung I / RNase A resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Lösung II und mehrmaligem vorsichtigem Schwenken werden die Zellen lysiert. Zu starkes Schütteln kann bei diesem Schritt die chromosomale DNS scheren und diese so in die Plasmidfraktion gelangen lassen. Das klare Lysat wird anschließend mit 350 µl Lösung III versetzt und mehrmals invertiert, bis ein flockiges, weißes Präzipitat entsteht (Fällung der Proteine und chromosomaler DNS). Die Lösung wird nun für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Anschließend wird der klare Überstand auf eine HiBind<sup>®</sup>-Miniprep-Zentrifugensäule, welche in einem 2 ml Reaktionsgefäß fixiert wurde, geladen. Nach einer Zentrifugation bei 10.000 g für 1 min wird der Durchfluß verworfen und die Silikamembran der Säule mit 500 µl HB-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 10.000 g für 1 min). Dieser Schritt dient zur effizienten Entfernung etwaiger Proteinkontaminationen. Nach einem weiteren Waschschrift mit 750 µl DNS-Waschpuffer wird das Säulenmaterial 2 min bei 14.000 g in der Zentrifuge getrocknet. Nun kann die DNS mit 50 µl sterilem bdH<sub>2</sub>O von der Säule eluiert werden. Hierzu wird ein 1,5 ml Reaktionsgefäß als Auffangbehältnis verwendet und die Zentrifugation erfolgt bei 10.000 g für 1 min. Anschließend kann die DNS bei -20°C gelagert werden.

### II.3.3.1.2. *präparative Aufarbeitung*

Größere Mengen an DNS (ca. 400 µg) werden mit kleinen Veränderungen mit dem „Plasmid Purification Kit“ von Qiagen aus *E. coli* isoliert. Hierzu werden 100 ml *E. coli* Übernachtskultur (s. II.3.1.1) für 5 min bei 6.000 g in der Kühlzentrifuge (4°C) abzentrifugiert. Die Zellen werden anschließend in 4 ml P1-Puffer resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 4 ml P2-Puffer und vorsichtiges Schwenken lysiert. Nach 5 min Inkubation bei RT werden 4 ml von auf 4°C gebrachtem P3-Puffer zugegeben, um Proteine zusammen mit genomischer DNS auszufällen. Nach vorsichtigem Schwenken erfolgt eine Inkubation für 10 min auf Eis. Das Zellysate wird nun durch einen Papierfilter gegeben um ausgefallene Proteine und genomische DNS abzutrennen. Alternativ kann das Proteinpräzipitat auch durch Zentrifugation bei 20.000 g für 30 min sedimentiert werden. Der Durchfluß bzw. Überstand mit dem „Rohplasmid“ wird anschließend auf die mit 4 ml QBT-Puffer voräquilibrierte „Qiagen-tip“ Säule aufgeladen. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule anschließend mit 2 x 10 ml QC-Puffer gespült. Die DNS kann nun mit 5 ml QF-Puffer von der Säule eluiert werden. Das Eluat wird nun mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und die DNS somit gefällt. Eine anschließende Zentrifugation für 30 min mit 15.000 g pelletiert die DNS. Nach einem Waschschriff mit 2 ml 70 % Ethanol (Zentrifugation 5 min, 15.000 g) kann das Plasmid-Pellet getrocknet werden und anschließend in der gewünschten Menge  $\text{bdH}_2\text{O}$  wieder gelöst und für weitere Versuche eingesetzt werden. Die Lagerung erfolgt bei  $-20^\circ\text{C}$ .

### II.3.3.2. **Quantifizierung von DNS**

Zur spektrometrischen Konzentrationsbestimmung von DNS wird 1 ml einer 1:500 Verdünnung der zu überprüfenden Nukleinsäurelösung hergestellt und in einer Quarzküvette bei 260 nm und 280 nm gegen  $\text{bdH}_2\text{O}$  gemessen. Liegt das  $E_{260} : E_{280}$  Verhältnis unter 1,8, so ist die Lösung mit Proteinen verunreinigt und muß weiter aufgereinigt werden. Die Berechnung der DNS-Menge erfolgt näherungsweise nach folgender Formel:

$$\text{DNS-Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor } 500 \times 50 : 1000$$

### II.3.3.3. Restriktion von DNS

Für den Verdau von Plasmiden in Fragmente definierter Länge, werden Restriktionsenzyme verwendet. Generell wird pro  $\mu\text{g}$  DNS 1 U Enzym eingesetzt, was im kleinen Ansatz aus pipettiertechnischen Gründen allerdings nicht immer gelingt.

#### Ansätze:

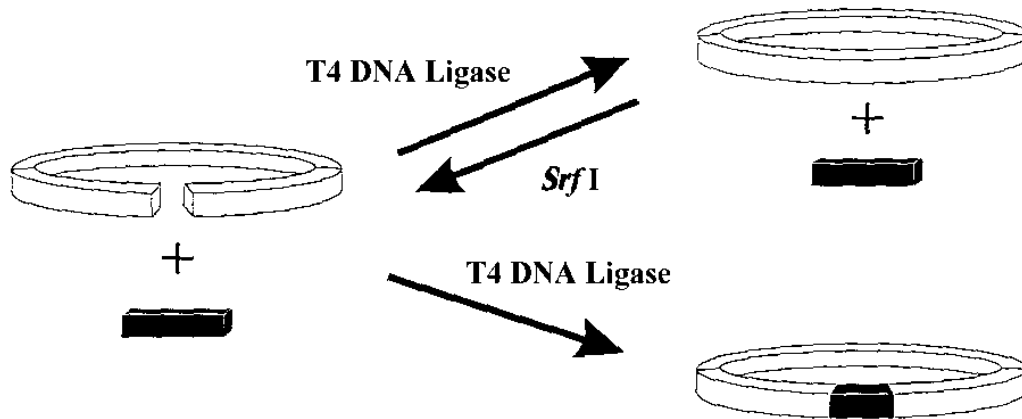
	<b>klein:</b>	<b>groß:</b>
DNS	2 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{g}$
10 X Puffer	2 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
Enzym	2 U	20 U
	-----	-----
bdH <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu\text{l}$	ad 100 $\mu\text{l}$

Die Restriktionsansätze werden je nach DNS Menge 1 - 3 h bei 37°C (bzw. bei 50°C im Fall von *Bcl*I) inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. II.3.3.10) analysiert.

### II.3.3.4. Ligation von DNS

Die Ligation von zwei DNS-Fragmenten mit kompatiblen Enden erfolgt mit der T4-DNS-Ligase (Stratagene, MBI-Fermentas). Die Abbildung 9 zeigt das allgemeine Ligationsprinzip. Für den Ligationsansatz wird ein molares Verhältnis Vektor zu Insert von 1:3 gewählt, wobei die Menge an eingesetztem Insert bei 1-3  $\mu\text{g}$  liegt. Je Ansatz werden auf ein Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  1 U Ligase und 1  $\mu\text{l}$  10 x Ligationspuffer zugegeben. Die Ligation erfolgt durch Inkubation für 1-2 h bei RT. Vor der Transformation des Ligationsansatzes muß die DNS-Lösung noch entsalzt werden (s. II.3.3.5).

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wird der „PCR-Script Cloning Kit“ von Stratagene verwendet. In dem 10  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz befinden sich neben dem gewünschten PCR-Produkt 1 x Reaktionspuffer, 0,5 mM ATP und 10 ng des *Srf*I verdauten pPCR-Script-Vektors. Desweiteren werden 5 U *Srf*I und 4 U T4-DNS-Ligase zugesetzt. Der Ansatz wird 1 h bei RT inkubiert und die Reaktion anschließend bei 65°C für 10 min gestoppt. Anschließend wird der Ligationsansatz entsalzt (s. II.3.3.5) und das Plasmid in *E. coli* XL1 Blue transformiert (s. II.3.3.8). Die Ligationseffizienz wird durch Blau-Weiß-Selektion (s. II.3.3.9) überprüft und weiße Kolonien werden durch DNS-Minipräparation (s. II.3.3.1.1) und anschließender Restriktionsanalyse (s. II.3.3.3) überprüft.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der PCR-Script™ Klonierungsmethode (nach Stratagene Handblatt)**

Der verwendete Vektor wird so lange wieder durch *Srf I* geschnitten, bis das zu klonierende PCR-Fragment in die Schnittstelle hineinligiert wird und somit die Schnittstelle für *Srf I* zerstört wird.

### II.3.3.5. „Ligation“ durch T4 DNA Polymerase Reaktion

Die Klonierung von PCR-Fragmenten in den pET-32 Ek/LIC Vektor (Novagen, Madison, WI, USA) erfolgt durch die unten beschriebene Reaktion, in welche die folgende Bestandteile eingesetzt werden:

14,6	μl	PCR-Fragment (300 ng DNS in bdH <sub>2</sub> O)
2	μl	10 x T4 Polymerase Puffer
2	μl	25 mM dATP
1	μl	100 mM DTT
0,4	μl	T4 Polymerase (2,5 U/μl)
<hr/>		
20	μl	Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde nun 30 min bei 22°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitze-Inaktivierung bei 75°C für 20 min. In das nun folgende „Annealing“ wurden

1	μl	pET-32 Ek/LIC Vektor ( $\hat{=}$ 0,01 pmol)
2	μl	T4 Polymerase behandeltes Insert ( $\hat{=}$ 0,02 pmol)
1	μl	25 mM EDTA

in einem Gesamtvolumen von 4 μl eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei 22°C.

1 μl dieses Ansatzes wurde direkt für die nachfolgende Transformation in AD494 verwendet.

**II.3.3.6. Entsalzen von Ligationsansätzen**

1 % Agarose mit 100 mM Glucose (aus 1 M Glucose-Stammlösung, welche zuvor sterilfiltriert worden war) werden im Mikrowellenofen kurz aufgeköcht (bis zum vollständigen Lösen der Agarose) und anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt. Durch eine ca. 4 mm große Öffnung im Deckel, welche mit einem sterilen Zahnstocher gebohrt wurde, wird im noch heißen Zustand eine 200 µl Pipettenspitze gesteckt, so daß sich eine etwa 50 µl fassende Einkerbung in der polymerisierten Agarose ergibt. Die abgekühlten Gefäße werden nun mit der zu entsalzenden DNA-Lösung befüllt und 1,5 h auf Eis inkubiert. Die DNS kann nun abpipettiert und in die Elektroporation (s. II.3.3.8) eingesetzt werden.

**II.3.3.7. Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen**

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen werden 4 ml einer Übernachtskultur (s. II.3.1.1.2) von dem gewünschten *E. coli* Stamm in frisches, vorgewärmtes LB-Medium gegeben und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen. Anschließend wird die Zellsuspension so schnell wie möglich auf Eis bis auf 4°C abgekühlt und bei 3.000 g in der Kühlzentrifuge sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Zellen mit 100 ml vorgekühltem, sterilem 10 % Glycerin resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Nach insgesamt vier dieser Waschschrte wird der vorhandene Niederschlag in 500 µl 10 % Glycerin resuspendiert und sofort in 50 µl Aliquots auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen können nun bis zu ihrer Verwendung bei -70°C gelagert werden.

**II.3.3.8. Transformation durch Elektroporation**

Zur Transformation werden elektrokompetente Zellen (s. II.3.3.7) auf Eis aufgetaut und mit bis zu 5 µl salzfreier zirkulärer DNS für 5 min inkubiert. Zeitgleich wird auch eine Elektroporationsküvette (2 mm Spaltbreite, Peqlab) auf Eis gestellt. Die Zellen mit der DNS werden nun in die Küvette überführt, und nach weiteren 3 min auf Eis wird die Elektroporation durchgeführt. Dazu stellt man die Küvette zügig in den Elektroporator (Easyject Prima, Peqlab), setzt die Schutzkappe über die Küvette und zündet den Spannungsstoß (2500 V). Nach erfolgter Poration wird die Küvette sofort entnommen. Die Zellen werden in 800 µl LB-Medium suspendiert und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend werden die

Zellen auf eine vorbereitete LB-Platte mit den benötigten Antibiotika (s. II.3.1.1.1) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **II.3.3.9. Blau-Weiß-Selektion durch X-Gal / IPTG**

Um nach einer Transformation Klone mit Insert von solchen ohne Insert unterscheiden zu können, wird eine Blau-Weiß-Selektion mit X-Gal und IPTG durchgeführt. Hierzu wird auf einer LB-Platte (s. II.3.1.1.1) mit Zusatz des jeweiligen Antibiotikums eine Mischung aus 100 µl bdH<sub>2</sub>O, 40 µl IPTG (23,8 mg/ml) und 40 µl X-Gal (20 mg/ml, gelöst in Dimethylformamid) ausplattiert. Nach ca. 30 min wird zusätzlich der Transformationsansatz auf die Platte aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Klone, die ein Insert im β-Galaktosidase-Gen besitzen, können X-Gal nicht umsetzen; die Kolonie bleiben also weiß. Klone ohne Insert hingegen haben ein intaktes β-Galaktosidase-Gen und können aus X-Gal den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol bilden.

#### **II.3.3.10. DNS-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNS in Agarose-Gelen werden die Kammern LKB GNA 100 der Firma Amersham-Pharmacia verwendet. Die verwendeten Gele sind 11 x 8 cm groß und die zugehörigen Kämmen bilden entweder fünf 10 mm Taschen (präparativ) oder zwei Reihen à elf 3 mm Taschen (analytisch). In dieser Arbeit werden generell nur Gele mit 1 % Agarosegehalt hergestellt. Als Puffer wird 1 x TAE-Puffer (s. II.2.2) verwendet, der auch zur Gelherstellung eingesetzt wird. Hierzu wird die Agarose in Puffer in einem Mikrowellenofen aufgeköcht. Anschließend läßt man sie wieder auf ca. 50°C abkühlen und gibt dann 7 µl 1 % Ethidiumbromid pro 400 ml Lösung zu. Nun wird die flüssige Agarose in den abgedichteten Gelschlitten gegossen, der gewünschte Kamm eingesetzt und bis zum Erstarren des Gels gewartet. Währenddessen werden die DNS-Proben vorbereitet: Hierzu werden die aufzutrennenden Restriktionsansätze (s. II.3.3.3) mit 1/10 Volumen 10 x Auftragspuffer (s. II.2.2) versetzt. Als Größenstandard wird die 1 kB Leiter von Gibco-BRL verwendet (s. II.3.3.11). Die angelegte Spannung beträgt 80 V. Die Auftrennung der DNS wird durch eine Hand-UV-Lampe kontrolliert und bei genügender Auftrennung gestoppt. Anschließend kann die DNS auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden und bei präparativen Gelläufen die DNS ausgeschnitten werden (s. II.3.3.12).

### II.3.3.11. DNS-Größenstandard

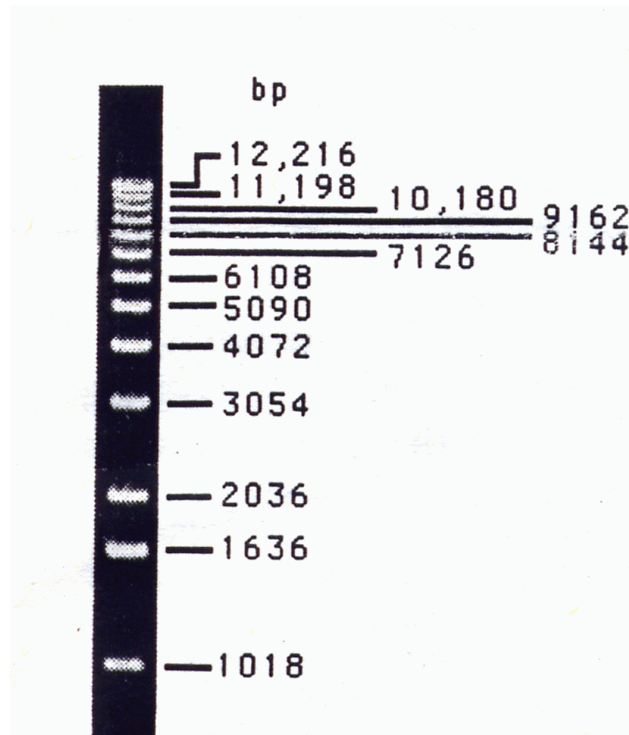


Abbildung 10: Größe der DNS-Fragmente der 1 kb Leiter von Gibco-BRL

### II.3.3.12. Eluierung von DNS aus Agarose-Gelen

DNS wird aus Agarose-Gelen mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen eluiert. Hierzu wird die gewünschte DNS-Bande unter dem UV-Transilluminator aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten, in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 3 Volumen an Puffer QX1 versetzt. Nun wird die Probe für 10 min im Wasserbad bei 50°C erhitzt, bis die Agarose geschmolzen ist. Die Lösung wird anschließend auf eine QIAquick Säule gegeben und für 2 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule wird nun mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Anschließend wird die Säule ohne Puffer für 1 min bei 10000 g zentrifugiert um das Säulenmaterial zu trocknen. Zur Elution wird die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und die DNS mit 50 µl bdH<sub>2</sub>O durch Zentrifugation von der Säule gewaschen. Anschließend kann die DNS in die Ligation (s. II.3.3.4) eingesetzt werden.



### II.3.3.13. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Herstellung der Verkürzungsmutanten wird eine Standard-PCR verwendet. Hierzu werden je Mutante zwei verschiedene Oligonukleotide kreiert (Oligo 1 + 2), die jeweils an einem Ende des gewünschten DNS-Stücks liegen. Sie enthalten neben ca. 15 bp des Originalstrangs noch jeweils eine Restriktionsenzym-Schnittstelle, um die nachfolgende Subklonierung zu vereinfachen. In die eigentlich PCR-Reaktion werden folgende Bestandteile eingesetzt:

1 µl	DNS (= 10 ng DNS)
2 µl	Oligo 1 (= 20 pmol)
2 µl	Oligo 2 (= 20 pmol)
1 µl	dNTPs (= 500 nmol je dNTP)
5 µl	10 x <i>Pwo</i> -Reaktions-Puffer komplett (Peqlab)
2 µl	<i>Pwo</i> -Polymerase (= 2 U) (Peqlab)
37 µl	bdH <sub>2</sub> O
-----	
50 µl	Reaktionsansatz

Die Ansätze werden auf Eis pipettiert, um eine unspezifische Reaktion der Polymerase zu verhindern. Um eine hohe Ausbeute an PCR-Fragment zu erhalten werden 10 Parallel-Ansätze pipettiert. Die PCR wird nach folgendem Programm durchgeführt:

1.	5 min	94°C	Aufschmelzen
2.	2 min	94°C	Aufschmelzen
3.	1 min	60°C	Anlagern
4.	2 min	72°C	Elongation
5.	29 mal		Schritte 2-5
6.	10 min	72°C	abschließende Elongation
7.	15 min	16°C	Abkühlen

Nach der PCR-Reaktion werden die 10 Parallel-Proben mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ vereinigt und aufkonzentriert. Hierzu werden zu den vereinigten Ansätzen 5 Volumen von Puffer PB gegeben und kräftig gemischt. Anschließend gibt man die Lösung auf eine QIAquick Säule und zentrifugiert diese für 1 min bei

13.000 g. Der Überstand wird verworfen und die an der Säule befindliche DNS wird mit 700 µl PE-Puffer gewaschen. Zum Trocknen der Säule wird abermals 1 min bei 13.000 g zentrifugiert. Die DNS kann nun mit 20-50 µl bdH<sub>2</sub>O eluiert werden und direkt für die Ligation in den pPCR-Script-Vektor (s. II.3.3.4) eingesetzt werden.

#### II.3.3.14. *in vitro*-Mutagenese

Die *in vitro*-Mutagenese des HCS-Gens wird im Vektor pQE-60 von Qiagen nach dem „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis“ Verfahren von Stratagene durchgeführt. Für die Mutagenese werden spezielle Oligonukleotide (MWG-Biotech, Ebersberg) erstellt, die jeweils zu den beiden Einzelsträngen der Template-DNS komplementär sind, sich genau gegenüberliegen und die gewünschte Mutation enthalten. Durch Einhaltung der erforderlichen Mindestschmelztemperatur von 78°C, ergeben sich Oligonukleotide zwischen 35 und 45 bp, je nach GC-Gehalt und Anzahl der zu mutierenden Basen. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Oligonukleotide wird nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC-Gehalt}) - 675 : N - \% \text{ ausgetauschter bp}$$

N = Länge des Oligos in Basen

Die konstruierten Oligonukleotide werden mit 100 ng pQE-60-HCS DNS in folgende PCR eingesetzt:

#### Zusammensetzung:

100	ng	DNS
125	ng	je Oligonukleotid
12,5	nmol	dNTP Mix
1	x	Reaktionspuffer
2	U	<i>Pwo</i> -Polymerase (Peqlab)
-----		
ad 50	µl	mit bdH <sub>2</sub> O

**PCR-Parameter:**

1.	30 sec	95°C
2.	30 sec	95°C
3.	1 min	55°C
4.	12 min	68°C
5.	ab 2.	18 mal wiederholen
6.	20 min	68°C
7.	15 min	16°C

Durch die PCR entsteht Tochter-DNS, die die Mutation enthält, nicht methyliert ist und einen „nick“ am jeweiligen Ende der Oligonukleotide trägt. Nach der PCR wird der Ansatz mit 20 U *DpnI* verdaut, um die parentale, methylierte DNS zu linearisieren, damit diese nicht mehr transformiert werden kann. Nach der *DpnI*-Behandlung wird die DNS entsalzt (s. II.3.3.5) und anschließend in *E. coli* XL-1 Blue transformiert (s. II.3.3.8). Die entstanden Klone werden durch Restriktionsverdau (s. II.3.3.3) mit geeigneten Enzymen und durch Sequenzierung (MediGenomix und Toplab, beide Martinsried) auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

**II.3.4. Proteinbiochemische Methoden****II.3.4.1. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wird nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Die zu messende Proteinlösung wird je nach Bedarf verdünnt. Anschließend werden in einer Plastikkuvette 795 µl *bdH<sub>2</sub>O*, 5 µl der verdünnten Proteinlösung und 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad, München) vereinigt und gemischt. Die Nullprobe wird nur mit *bdH<sub>2</sub>O* hergestellt. Nach 5 min Inkubation bei RT wird im Spektrometer die  $E_{596}$  ermittelt und die korrespondierende Proteinkonzentration aus einer zuvor gemessenen BSA-Eichgerade (1-40 µg) abgelesen.

**II.3.4.2. Aufreinigung des Antigens**

Überproduziertes Antigen wird über eine Affinitätschromatographie mit S-Protein-Agarose aufgereinigt. Hierzu folgt eine Inkubation von 5 ml (= ca. 100 mg Gesamtprotein der löslichen Proteine) des Überstands mit 2 ml S-Protein-Agarose-Mischung (50 % S-Protein-Agarose in 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM

EDTA, 0,2 % Natriumazid; Novagen, Madison, WI, USA) für 30 min in einem 15 ml Röhrchen, wobei das Röhrchen langsam über Kopf geschwenkt wurde. Das Binden des Antigens an die S-Protein-Agarose erfolgt bei RT. Anschließend wird der Ansatz für 10 min bei 500 g zentrifugiert und der resultierende Überstand verworfen. Die Agarose wird nun in 5 ml Wasch- / Binde-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Triton) resuspendiert und erneut 10 min bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen. Dieser Waschschrift wird 3 mal wiederholt, um ungebundene Proteine möglichst vollständig zu entfernen.

Anschließend wird die Agarose in 2 ml Gesamtvolumen mit Wasch- / Binde-Puffer resuspendiert. Zu dieser Mischung werden nun 15 U (= 6 µl) rekombinante Enterokinase (rEK) gegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht (> 16 h) im Überkopfrührer bei RT. Durch diesen Schritt wird der C-terminale Bereich des Antigens, der hinter der Enterokinase-Schnittstelle liegt und 177 AS groß ist, von der S-Protein-Agarose abgetrennt. Der N-terminale Teil verbleibt an der Agarose. Um die rEK aus dem antigenhaltigen Überstand zu entfernen, werden zu der Suspension 750 µl EKapture-Agarose (50 % Agarose in Phosphatpuffer pH 7,3, 0,5 M NaCl, 0,02 % Thimerosal) gegeben und der gesamte Ansatz für 10 min bei RT über Kopf langsam geschüttelt. Anschließend wird der Ansatz in einen Zentrifugationsfilter gegeben, der die Agarose-Bestandteile zurückhält, die flüssige Phase mit Antigen aber hindurchläßt. Die Filterkatusche wird in ein 15 ml Röhrchen gestellt und 5 min bei 500 g zentrifugiert. Der Durchlauf wird gesammelt. Die Agarose wird nun in der Katusche mit 2 x 1,5 ml gewaschen, wobei der Durchlauf jeweils aufgefangen und zum Schluß vereinigt wird. Die Gesamtausbeute an Antigen beträgt in etwa 500 µg pro 400 mg eingesetztem Gesamtprotein, das entspricht ca. 1,25 ‰.

#### **II.3.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Jeweils 20-30 µg an Gesamtprotein (bei aufgereinigtem Antigen nur 1-3 µg) werden auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht, mit 6 µl Probenpuffer (s. II.2.3) versetzt und 5 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert.

Für die Gelelektrophorese wird die Kammer Protean II der Größe 10 x 8,5 cm von Biorad (München) verwendet. Die verwendeten Abstandshalter haben eine Dicke von 1 mm.

**Zusammensetzung der Gele:** (es werden immer 4 Gele gleichzeitig in der „Mighty Small Multiple Gel Caster SE 200 Series“-Kammer von Biorad (München) gegossen)

- 12 % Trenngel:

Acrylamid / Bisacrylamid (30 % : 0,8 %)	12 ml
Sol 2	7,5 ml
bdH <sub>2</sub> O	10 ml
TEMED	30 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	450 µl

- 4,5 % Sammelgel:

Acrylamid / Bisacrylamid (30 % : 0,8 %)	1,5 ml
Sol 3	2,5 ml
bdH <sub>2</sub> O	5,58 ml
TEMED	10 µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	150 µl

Als Größenstandard wird ein „Prestained Marker“ verwendet (s. II.3.4.9).

Die Elektrophorese findet im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 200 V so lange statt, bis die Bromphenolblau-Bande am unteren Ende des Gels angelangt ist.

#### II.3.4.4. Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant-Blue (Serva)

Zur Detektion der aufgetrennten Proteine werden die Gele nach der Elektrophorese für 15-20 min in einer Coomassie-Lösung (s. II.2.4) gefärbt. Anschließend werden die Gele bis zur Entfärbung des Hintergrunds mehrmals 10 min in Entfärber (s. II.2.4) geschwenkt. Nun können die Gele 1 h auf einem Gelrockner bei 80°C unter Vakuum getrocknet werden.

#### II.3.4.5. „Western-blot“ im „semi-dry“ Verfahren

Für den Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran (PROTRAN BA 85, Schleicher & Schüll, Dassel) wurde die Semiphor-TE-70 Apparatur (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA) verwendet. Der schematische Aufbau der „semi-dry“-blotting-Apparatur nach Khyse-Andersen (1984) ist in Abbildung 11 dargestellt.

Die vorbereiteten Whatman-Papiere, die zugeschnittene Membran und das Gel werden in den angegebenen Puffern (s. II.2.5th und Abbildung 11) eingeweicht und anschließend in der angegebenen Reihenfolge jeweils blasenfrei übereinandergelegt und abschließend mit einer harten Rolle glatt gestrichen.

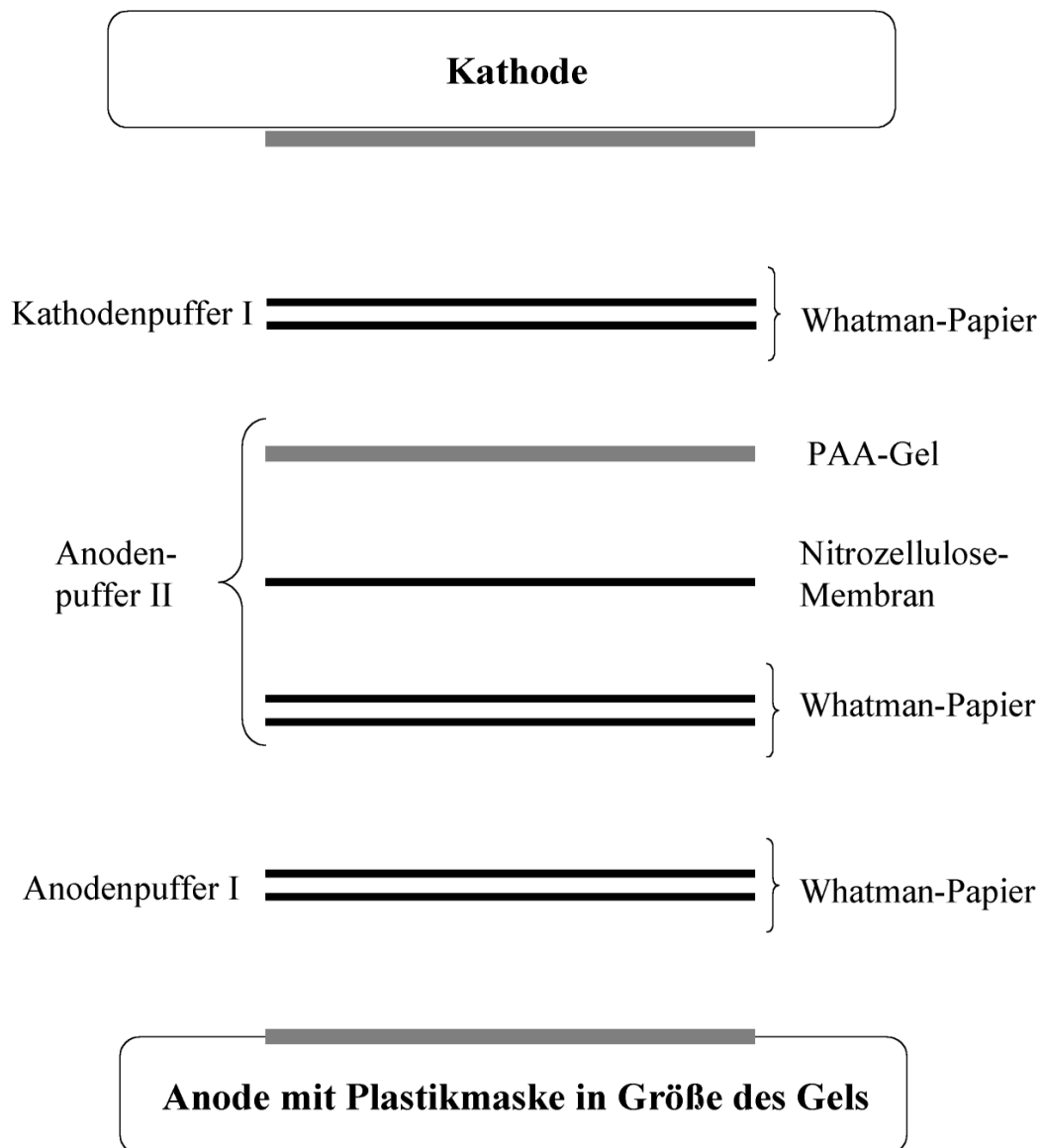


Abbildung 11: Aufbau einer „Western-blot“-Apparatur nach dem „semi-dry“ Verfahren

Der Deckel wird aufgesetzt und mit einem Buch gleichmäßig beschwert. Die nun angelegte Stromstärke errechnet sich aus der Größe des Gels mittels der empirisch bestimmten Formel

$$I = \text{Fläche des Gels in cm}^2 \times 0,9 \text{ mA}$$

(so wurde z. B. bei einem Gel mit einer Fläche von 70 cm<sup>2</sup> eine Stromstärke von 63 mA angelegt). Die Transferzeit variiert je nach Größe des zu untersuchenden Proteins zwischen 35 min (<50 kDa) und 90 min (>80 kDa). Das geblottete Protein kann nun durch Immundetektion (s. II.3.4.6) nachgewiesen werden.

#### **II.3.4.6. Immundetektion**

Die auf Nitrozellulosemembranen (Protran, Schleicher & Schüll, Dassel) transferierten Proteine können mittels Antikörpern selektiv sichtbar gemacht werden. Dazu wird die Membran 30 min mit Magermilchpuffer geblockt. Anschließend folgt für 30 min die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper (Anti-„His-tag“ (Verdünnung 1:5000), Anti-Chlorophyll Synthase (Verdünnung 1:100) oder Anti-Maltose-Bindeprotein (Verdünnung 1:10000)) in Magermilchpuffer. Nun wird die Membran 4 mal 5 Minuten mit TTBS-Puffer gewaschen, bevor die 30-minütige Inkubation mit sekundärem Antikörper (Anti-Hase IgG Sigma # A2556 bzw. Anti-Maus IgG Sigma # A3438) in einer Verdünnung von 1:10000 in TTBS-Puffer erfolgt (der sekundäre Antikörper ist in beiden Fällen ein Konjugat aus Antikörper und alkalischer Phosphatase). Nach erneutem Waschen (4 mal 5 Minuten) mit TTBS-Puffer wird die Membran kurz in AP-Puffer geschwenkt. Anschließend erfolgt die Detektion der Proteine mit NBT (0,33 mg/ml in AP-Puffer) und BCIP (0,165 mg/ml in AP-Puffer) in 10 ml AP-Puffer (Stammlösungen s. II.2.6). Die Dauer der Färbung beträgt zwischen 2 und 20 min, je nach Intensität des Signals. Die Reaktion wird durch Waschen der Membran mit Wasser gestoppt.

#### **II.3.4.7. Reinigung spezifischer Antikörper mit Glycin/HCl**

Die Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern über „geblottetes“ Antigen (s. II.3.4.5) wurde folgendermaßen durchgeführt: 300 µg Antigen wurden mittels SDS-PAGE (s. II.3.4.2) aufgetrennt. Anschließend wurde zur Lokalisation des Proteins ein kleiner Streifen am Rand des Gels abgeschnitten und mit Coomassie gefärbt (s. II.3.4.4). Die erhaltene Protein-Bande wurde nun aus dem ungefärbten Teil des Gels ausgeschnitten und durch „Western-blot“ auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (s. II.3.4.5).

Dieses fixierte Antigen wird nun 30 min bei RT mit Roh-Antiserum unter Schwenken inkubiert. Anschließend wird das verbleibende Serum abpipettiert und das „geblottete“

Antigen 3 mal mit TTBS-Puffer (s. II.2.6) gewaschen. Die Elution des gebundenen Antikörpers erfolgt mit 50 mM Glycin / 150 mM NaCl, pH 2,3. Um den pH-Wert anschließend schnell in den neutralen Bereich zurückzubringen wird das Eluat sofort mit 0,5 M Tris (freie Base) versetzt (65 µl / 1 ml Eluat). Der Antikörper wird 1:1 mit 2 x Magermilchpuffer (II.2.6) verdünnt und kann nun bei –20°C gelagert werden.

#### II.3.4.8. Nichtdenaturierende Protein-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen unter nativen Bedingungen wird folgender Gelansatz für die gleiche Gelapparatur wie für die SDS-PAGE (s. II.3.4.2) hergestellt:

3,9	%	Acrylamid
0,1	%	N, N'-Methylenbisacrylamid
10	%	Glycerin
10	%	10 x TBE-Puffer (s. II.2.7)
0,1	%	TEMED
0,04	%	Ammoniumpersulfat

Die Bestandteile werden in einem 50 ml Röhrchen gemischt und das Gel wird anschließend sofort gegossen. Nach ca. 1 h Polymerisationszeit wird das Gel in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte (s. II.2.7) Elektrophorese-Kammer gestellt und 30 min bei 80 V vorelektrophoretisiert. Die aufzutrennende Proteinlösung wird mit 10 % 10 x Auftragspuffer (s. II.2.7) versetzt und die Proteine werden nun bei 100 V so lange aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-Bande gerade den unteren Rand des Gels erreicht hat. Anschließend wird das Gel auf dem UV-Transiluminator analysiert.

#### II.3.4.9. Protein-Marker für denaturierende Gele

Verwendet wird der „Prestained SDS-PAGE Standard Low Range“ Marker der Firma Biorad. Je SDS-PAGE werden 10 µl Marker in eine Tasche gegeben. Die Auftrennung der Proteine auf einem Standard-Gel ist in Abbildung 12 dargestellt.



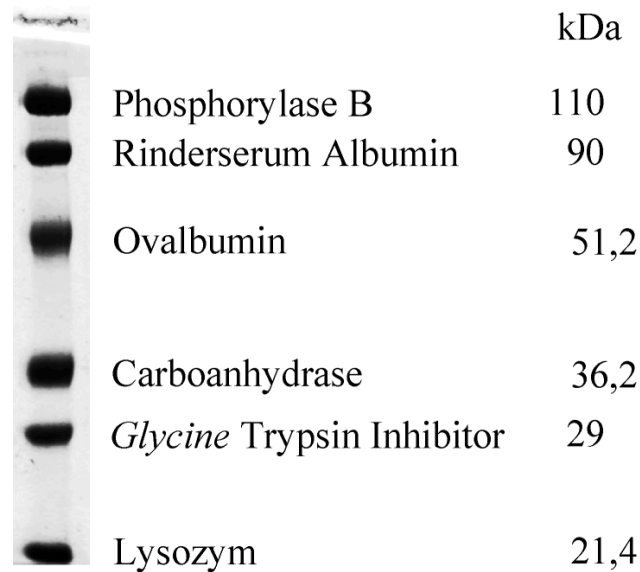


Abbildung 12: „Prestained SDS-PAGE Standard Low Range“ Marker der Firma Biorad (München)

### II.3.5. Methoden zum Enzymtest der HCS

#### II.3.5.1. Gewinnung von Chlorophyllid aus Chlorophyll mit Chlorophyllase

Das verwendete Chlid wird aus bereits aufgereinigtem Chl *a* aus *Spirulina spec.* hergestellt.

Die Abspaltung des Phytyl-Restes erfolgt in leicht abgewandelter Form nach Willstätter und Stoll (1913) und McFeeters *et al.* (1971). Blätter von *Aillanthus spec.* werden mit flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und anschließend im Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben. Dieses Pulver wird anschließend mehrmals mit 80 % Aceton gewaschen, bis das in den Blättern enthaltene Chlorophyll entfernt ist. Abschließend folgt ein Waschschrift mit 100 % Aceton. Das entfärbte Pulver wird nun auf einem Saugpapier zum Trocknen ausgelegt. Die Herstellung des Chlorophyllase-Extrakts erfolgt nun durch Inkubation von 150 mg Chlorophyllase-Pulver mit 10 ml Phosphatpuffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM KCl und 0,24 % Triton, pH 7,0) über Nacht bei 4°C. Nach einer Zentrifugation bei 6.000 g für 10 min ist der Extrakt (= Überstand) einsatzbereit. Für die eigentliche Abspaltung des Phytyl-Restes von Chl *a* werden nun folgende Lösungen zusammengegeben und 1 h bei 36°C inkubiert:

1 ml	Chlorophyllase-Extrakt (s. o.)
5 ml	Phosphatpuffer (s. o.)
150 $\mu$ l	Natriumascorbat (10 % in Phosphatpuffer)
6 $\mu$ l	Pyridin
100 $\mu$ l	Chl <i>a</i> (= 500 nmol, gelöst in Aceton)

Der Reaktionsansatz wird auf 80 % Aceton gebracht (+25 ml) und 20 min bei 13.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wird nun zweimal mit gleicher Menge an Hexan im Scheidetrichter extrahiert, wobei sich die Acetonphase mit dem darin gelösten Chlid stets unten im Trichter befindet. Die Hexanphase hingegen enthält das nicht umgesetzte Chl *a*. Anschließend erfolgt eine Extraktion mit gleicher Menge an Ethylacetat. Zur besseren Phasentrennung wird in diesem Schritt kristallines NaCl bis zum klaren Erkennen der Phasen zugegeben. Das Chlid liegt nun in der Ethylacetatphase vor, welche anschließend zweimal mit dem gleichen Volumen an Wasser gewaschen wird. Die Probe wird nun am Rotationsverdampfer eingengt. Für Enzymtests wird das Chlid wieder in Aceton gelöst (0,5 nmol /  $\mu$ l) und direkt in die Reaktionsansätze pipettiert.

### II.3.5.2. Test zur Bestimmung der Enzymaktivität von Chlorophyll Synthase

Für den Enzymtest werden 3 mg Gesamtprotein (s. II.3.1.3.2) mit SP-Puffer (s. II.2.8th) bzw. 50 mM HEPES-Puffer (pH 8,0) auf ein Gesamtvolumen von 220  $\mu$ l gebracht. Anschließend werden in der Regel 450  $\mu$ M PhyPP bzw. GGPP (Sigma, Steinheim) zugegeben. Unter Grünlicht werden nun standardmäßig 4,8  $\mu$ M Chlid *a* (s. II.3.5.1) zu dem Ansatz pipettiert und im Standard-Enzymtest für 45 min bei 29°C im Heizblock inkubiert. Durch Zugabe von 750  $\mu$ l zu dem jeweiligen Ansatz wird die Reaktion gestoppt. Das ausgefällte Protein wird durch 5 min Zentrifugation bei 14.000 g in der Tischzentrifuge abgetrennt. Der Überstand enthält die Pigmente.

Für die Enzym-Kinetiken wird ein 6-facher Ansatz für die sechs gezogenen Meßpunkte in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Die Reaktion läuft ebenfalls bei 29°C im Heizblock ab. Nach 1, 2, 3, 5, 7, oder 10 min wird ein Aliquot für die Chl-Bestimmung entnommen, in ein neues Gefäß mit 750  $\mu$ l Aceton überführt (so wird die Veresterung sofort gestoppt) und 5 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Für die Messung der Enzym-Kinetiken wurden verschiedene Konzentrationen an PhyPP und

Chlid verwendet, auf die im Kapitel „Ergebnisse und Diskussion“ näher eingegangen wird.

### II.3.5.3. Spektrometrische Quantifizierung des im Enzymtest gebildeten Chl

Die Quantifizierung wird in leicht abgeänderter Form nach Helfrich *et al.* (1994) durchgeführt. Hierzu wird der pigmenthaltige Überstand abgenommen und im Spektrometer gegen 664 und 750 nm gemessen. Aus den resultierenden Meßwerten wird der Gesamtgehalt an Pigmenten anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt, wobei vor der Berechnung die Basislinie ( $E_{750}$ ) von der Extinktion bei 664 nm subtrahiert wird.

$$c = E / (\epsilon * d)$$

$c$  = Konzentration des Pigments in  $\mu\text{mol/ml}$  (=mM)

$E$  = gemessene Extinktion

$\epsilon$  = Extinktionskoeffizient (Chl *a* in Hexan:  $90,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (=Wert in Ether),  
Chlid *a*, Chl *a* in Aceton:  $76,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Porra, 1991))

$d$  = Schichtdicke der Küvette in cm

Zu obigem Überstand werden nun  $30 \mu\text{l}$   $100 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$ ,  $50 \text{ mg DE52 Sepharose}$  und  $500 \mu\text{l}$  Hexan gegeben und ca.  $20 \text{ sec}$  stark gemixt (Vortex). Anschließend wird erneut  $5 \text{ min}$  abzentrifugiert, die obere (=Hexan-) Phase in ein neues  $1,5 \text{ ml}$  Reaktionsgefäß überführt und im Spektrometer bei  $662$  und  $750 \text{ nm}$  gegen Hexan gemessen. In der Hexanphase sammelt sich ausschließlich das hydrophobe Chl *a*. Die Menge an verestertem Pigment wird nun ebenfalls durch das Lambert-Beer'sche Gesetz (s. o.) berechnet, wobei  $E_{750}$  ebenfalls als Basislinie dient und vor der Berechnung von  $E_{662}$  abgezogen werden muß. Aus dem Verhältnis von Chl *a* zu Gesamtpigment kann nun die Veresterungsrate in Prozent errechnet werden.

### II.3.5.4. Auswertung der Enzymtests durch

#### „High Performance Liquid Chromatography“ (HPLC)

Nach dem Enzymtest (s. II.3.5.2) wird die Aceton-Phase im Spektrometer bei  $664$  und  $750 \text{ nm}$  gemessen. Aus der Extinktion bei diesen beiden Wellenlängen erfolgt die Berechnung der Gesamtpigmentmenge des Ansatzes (genaue Vorgehensweise: s. II.3.5.3). Zur Aceton-Phase werden nun  $100 \mu\text{l}$  gesättigte NaCl-Lösung zur besseren

Phasentrennung gegeben und das Pigment wird mit 500 µl Ethylacetat extrahiert (kräftiges Schütteln und Zentrifugation bei 13.000 g). Die entstandene obere Phase wird vorsichtig abgenommen und im Rotationsverdampfer unter Vakuum im Wasserbad bei 50°C bis zur Trockene eingeengt. Die Pigmente können in diesem Zustand bei –20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Für die anschließende HPLC-Analyse wird der zu untersuchende Ansatz in 35 µl Aceton gelöst und in ein Probengläschen überführt. Durch Zugabe von 10 µl 0,25 M HCl und Inkubation für ca. 5 min wird das Mg aus den Pigmenten herausgelöst, wodurch das unempfindlichere metallfreie Phäophorbid (Pheid) bzw. Phäophytin (Phe) entsteht. 20 µl dieser Lösung werden nun auf eine RP18 Säule (GROM-SIL, 120 ODS-5 ST, 5 µm, 250 x 4 mm, Grom, Herrenberg) geladen, und die Pigmente werden durch folgendes Programm aufgetrennt:

Start:	60 % Aceton
3 min	60 % Aceton
20 min	Gradient nach 100 % Aceton
3 min	100 % Aceton
1 min	Gradient nach 60 % Aceton
5 min	60 % Aceton

Das  $\text{bdH}_2\text{O}$  zur Herstellung des 60 % Aceton wird zuvor mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 3,5 gebracht. Die Fluorimetereinstellung beträgt für Pheid / Phe 410 nm für die Excitation und 670 nm für die Emission. Die Fläche der einzelnen Gipfel wird mit dem Programm Chromstar, Version 4.08 berechnet.

### III. ERGEBNISSE

#### III.1. Untersuchungen und Berechnungen zur Struktur und Verwandtschaft der HCS

Die für die nachfolgenden „Alignments“ und Berechnungen verwendete Sequenz der Chlorophyll Synthase aus Hafer wurde in Zusammenarbeit mit U. Oster nach folgendem Schema gewonnen (Schmid *et al.*, 2001): Aus etiolierten Haferkeimlingen wurde eine cDNA-Bank erstellt. Aus der Chlorophyll Synthase Sequenz von *Arabidopsis thaliana* (Gaubier *et al.*, 1995) wurden aus den konservierten Bereichen von Nukleotid 109-115 und Nukleotid 358-366 Oligonukleotide erstellt und mit der isolierten cDNA in einer PCR Amplifikation eingesetzt. Das hieraus resultierende Stück DNA (754 bp) wurde durch RACE-PCR (Frohmann *et al.*, 1988, Rashtchian *et al.*, 1992) am 3'- und 5'-Ende vervollständigt. Hieraus resultierte die Vollängensequenz der HCS von 1428 bp mit der kodierenden Region von Nukleotid 1-1137. Die Basenabfolge wurde durch Sequenzierung bei Toplab festgestellt und anschließend in der EMBL-Datenbank unter der Zugangsnummer AJ277210 abgelegt. Dieser kodierende Bereich der Sequenz (bp1-1137) wurde für die folgenden Berechnungen verwendet. Das Gen wurde von U. Oster in den Expressionsvektor pQE60 inkloniert, um die Funktionalität des gewonnenen Proteins zu überprüfen. So konnten mit 3 mg an HCS-haltigem bakteriellen Gesamtlysat in 45 min ca. 55-60 % des eingesetzten Chlids zu Chl umgesetzt werden (~ 0,6 nmol Chl aus 1 nmol Chlid) (Daten nicht gezeigt).

##### III.1.1. **Sequenzvergleich der HCS mit weiteren bekannten (Bakterio-) Chlorophyll Synthesen**

Auf der Suche nach dem aktiven Zentrum der HCS wurden Multialignments zwischen der HCS Sequenz mit Sequenzen anderer (Bakterio-) Chlorophyll Synthesen ((B)CS) durchgeführt (s. Abbildung 13). Die untersuchten Organismen reichten von anderen Angiospermen (*A. thaliana*) über Cyanobakterien (*Synechocystis PCC6803*) bis hin zu anderen Bakteriengruppen wie Proteobacteria, grünen Schwefelbakterien und nicht-grünen Schwefelbakterien.

ASCS	1	-----MATSHPLAAAAATSSSSATFRPPLRFSSPPSSLTLNRRRSFPVVCAADADAKETTKKFTIPDKAPAAAGS
ATCS	1	MTSILNTVSTIHSRRVTSVDRVGVLSLRNSDSVEFTRRRSGFSTLIYESPGRRFVVRAAETDTRKVKVQIPDKAPAGGS
SCS	1	-----MSDTQNTGQONQAK
RGBCS	1	-----
RRBCS	1	-----
RCBCS	1	-----
CTBCS	1	-----
CABCS	1	-----MNGSDTLNPELQLNIDEKLGQSGISQSRQK
HMBCS	1	-----MSDMSDQTRL
CABCS2	1	-----MSVNNIRE
Konsensus	1	-----
ASCS	72	FNQLGIGKAK-QETNIWKIRLQLEKPVTFWPLVWVLCGAAASGNFHTVED---VTKSIVCMMSGFCCLTEYTOTIN
ATCS	81	INQLGIGKAS-QETNKWKIRLQLEKPVTFWPLVWVLCGAAASGNFHTPED---VAKSILCMMSGFCCLTEYTOTIN
SCS	14	ARQLGKMGKAAPGESSIWKIRLQLEKPVTFWPLVWVLCGAAASGNYTQSVED---FLKALTCMLLSGELMTYTOTIN
RGBCS	1	-----MARPALSABAELEKPIVTFWPLVWVLCGAAASGNYTQSVED---WFLVFLGVLILAGLVCATSOAVN
RRBCS	1	-----MQRTAVLFYVQLKPIVTFWPLVWVLCGAAASGNYTQSVED---WPFVIALGVLLCGPLVCGTQAVN
RCBCS	1	-----MSAQDLSPSRRSIPPEPRAMLELEKPVTFWPLVWVLCGAAASGNYTQSVED---KGVVVLLGLVLAGPLVCGMSOAVN
CTBCS	31	IIRQALENVNRPGRFIEPSAILEKPVTFWPLVWVLCGAAASGNYTQSVED---ISILVRGVILAGPLVCGMSOAVN
CABCS	12	SPPSPLHKQPQSRYAWLVRSTQLEKPVTFWPLVWVLCGAAASGNYTQSVED---IGRLLGLMFMAGPFLCGLSQVNV
HMBCS	9	SPATIDTNAITPDSATIWRVRLKLEKPIVTFWPLVWVLCGAAASGNYTQSVED---ILYGALMFLILGPLVCGMSOAVN
CABCS2	1	-----MISTEQRVSLSRKIRAHIEADPVTWISPLVLCFCGALASGNERGFDWTRPDHWWMLMLGALMTGPIGTGFSOSIN
Konsensus	81	l k rlgLmqPvTFppwafllCGavaag iw v lvilgmlI GPlIcg sQtIn
ASCS	147	DWMDRIDDAINEPVRPIPSG-AISENEVITQIWIYLLGGTGLGALDDIWAAGHDFPIIFYLALGGSLLSYIYSAPPLKLLKO
ATCS	156	DWMDRIDDAINEPVRPIPSG-AISEPEVITQVWVLLGGTGLGALDDIWAAGHDFPIIFYLALGGSLLSYIYSAPPLKLLKO
SCS	90	DFMDRIDDAINEPVRPIPSG-AISVPPQVVQILVLLVAGLGVAYGLDVAQHDFPIMMVLTLGAFVAYIYSAPPLKLLKO
RGBCS	63	DWDRHVDVAINEPVRPIPSG-RIPGRWGLYIAGWIALSLVAVLQGLPVG-----EGAAVLGLILAWAYSAPPLKLLKO
RRBCS	63	DWDRHVDVAINEPVRPIPSG-RIPGRVGLYIAGWIALSLVAVLQGLPVG-----EGAAVIFGLILAWAYSAPPLKLLKO
RCBCS	73	DWDRHVDVAINEPVRPIPSG-RIPGLWGLYIAIAMSLLSVAVVQGLCSG-----EVALTLGVAAWAYSAPPLKLLKO
CTBCS	105	DYFDREVDVAINEPVRPIPSG-KISKQASWLTIFGILLTGFVALSITHPV-----MAINFVGLMSEHAYSAPPLKLLKO
CABCS	87	DYADREVDVAINEPVRPIPSG-QVSLRHVYLLTAVLTLGASIALFLGRQV-----AFFVALGLVFPALAYSAPPLKLLKO
HMBCS	85	DYMDADVDVAINEPVRPIPSG-CAKYPKLFKLLATNVAVLSLAAMAIALAFRIE-----IFLVVAGLLIVAGVYSAPPLKLLKO
CABCS2	77	DYFDREVDVAINEPVRPIPSG-IISLNEARWNWVILGAAATLVLVSVLFGNPL-----IVLFEVYGLVLSVYYSAPPLKLLKO
Konsensus	161	DwyDrdrvDAINEP Rpipsg ris gi lvtlgtlgvwa llg wa if lallGilllayaYsapPlrIkG
ASCS	226	NGWLENFALGASYICLPWVWAGQALFQT---LTPDIVVLTCLYSIAGLGLAIIVNDFKSVEGDRRLGLOSLPVAFCMETA
ATCS	235	NGWVGNFALGASYISLPWVWAGQALFQT---LTPDVVLTCLYSIAGLGLAIIVNDFKSVEGDRRLGLOSLPVAFCMETA
SCS	169	NGWLGNYALGASYIALPWWAGHALFQT---LNPTIMVLTCLYSIAGLGLAIIVNDFKSVEGDRRLGLOSLPVMFCIGTA
RGBCS	135	NGWVGNAAAGISYEGGLAWVTGAAVVIAG---AMPASHSLALALLYSLGAGHIMTNDFKAVEGDRKMGVGLSPVRLGVDA
RRBCS	145	NGWVGNAAAGISYEGGLAWVTGAAVVIAG---ALPDTRIVLAVLYSLGAGHIMTNDFKAVEGDRKMGVGLSPVRLGVDA
RCBCS	145	SGWVSEGLVGLAYEGLPWITGAAVLLATADTSPGFPIVMMATLYALGAGHIMTNDFKAVEGDRKMGVGLSPVRLGVDA
CTBCS	177	NGWLENLIVGLAYEGLVWLTGSAFTQGG---VPSKESIALALLYSLGAGHIMTNDFKSVVGDRIKRVASHPVQLGKNA
CABCS	159	NGWLENLIVGLAYEGLVWLTGSAFTQGG---LTG-ESVITALLYSLGAGHIMTNDFKSVVGDRIKRVASHPVQLGKNA
HMBCS	159	NGWLENLIVGLAYEGLVWLTGSAFTQGG---LTPPEQTIIVAFVYALGSHCFMTNDFKSVVGDRIKRVASHPVQLGKNA
CABCS2	150	HFWRGPPAVGLGIVSMSSWAGHLIFAP---LWQSVVVALINGGLAAGLLFLNDIKRSVEGDRKMGVGLSPVRLGVDA
Konsensus	241	ngWiGn avglSyeGlpWvaG alfg It divvLallyslgahGimtvNDFKsveGDR lglkSlpv fGm a
ASCS	301	KWICVGAIDITOLSVAAYFLSTGKLYYALALLGLTIPOVILQFYELKDFVVKYDVKYQASAPFPVFGLLVLTALATSH--
ATCS	310	KWICVGAIDITOLSVAAYFLSTGKLYYALALLGLTIPOVILQFYELKDFVVKYDVKYQASAPFPVFGLLVLTALATSH--
SCS	244	AWICVIMIDVFOAGLACYLIVYHQQLYATVLLLLIPIQTFODMYPLRNPLENDVKYQASAPFPVFGLLVLTALATSH--
RGBCS	213	ARTACLVMAVPOIIVTCMLVQWGAVWHAFAIGALLVAGVGLVWV-FMKDFVKRALFYSFGVPLFVSGMMVSAFALRATG
RRBCS	212	ARLACAVMAVPOMVVIGLVASWDRPYHAGAVGLLLAQFVLMAR-LLKRRELAIPWYNATGTTLYVIGMMVSAFALRATG
RCBCS	225	AKIACVTVMGLAQALVITMELFESKPYHATAVLVLLCGQFWAMS-VWMDPEGKAPWYNGTGVVYVSGMMVSAFALRATG
CTBCS	254	ALIASAVMIAQIAAIAIIVAKGSTIPTAIAVTLIAAQSPMOKI-LIDHBAEKAVWYNATGTTLYVLSMMVCAVIRP--
CABCS	234	ARMVVTIMVGAQIAVIGLFWHGHFVAATVVAIILAAQSLPNAR-FIRDENNEVFNATAIMLYVWGMMAAAGLAA--
HMBCS	234	LKIALGLMLMASQLMVAAYVAYLGDYIGSIVLVGLLDAQVFFOKK-LKQDEKANAPWYNATPANSFELSMMVAAYIR---
CABCS2	225	LIVAVVTINSFEAMLMILALIWQYVWVAFMFLAVAPVYNQIILKLYQEPVQONYVRYLLASNEVVALIQITISGLVGGYF
Konsensus	321	ariavgmm i qlivigmlI wGk y a allllliaqvi q k flkdp avfynasacqpfvlgmmvta al
ASCS	-----	-----
ATCS	-----	-----
SCS	324	I-----
RGBCS	292	GVA-----
RRBCS	291	GAVELAPLIGAAP
RCBCS	304	V-----
CTBCS	-----	-----
CABCS	-----	-----
HMBCS	-----	-----
CABCS2	305	G-----
Konsensus	401	-----

Abbildung 13: Vergleich der Sequenz der Chlorophyll Synthese aus Hafer mit Sequenzen von verschiedenen anderen veröffentlichten Chlorophyll Synthesen (CS) und Bakteriochlorophyll Synthesen (BCS)

Das Alignment mit dem Programm ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt. Identische AS sind schwarz hinterlegt, ähnliche grau. In der Konsensus-Sequenz stehen große Buchstaben für „in allen CS gleich“ und kleine Buchstaben für „in mehr als 50% der Fällen gleich“.

ASCS = *Avena sativa*, ATCS = *Arabidopsis thaliana*, SCS = *Synechocystis* PCC6803, RGBCS = *Rhodocyclus gelatinosus* (GGPP-BCS), RRBCS = *Rhodospirillum rubrum*, RCBCS = *Rhodobacter capsulatus*, CTBCS = *Chlorobium tepidum*, CABCS = *Chloroflexus aurantiacus*, HMBCS = *Heliobacillus mobilis*, CABCS2 = *Chloroflexus aurantiacus* (GGPP-BCS)

### III.1.2. Importsequenz

Der N-Terminus der HCS enthält eine typische Transitsequenz für den Import in Chloroplasten. Diese umfaßt nach den Berechnungen des Programms „ChloroP“ (Emanuelsson *et al.* 1999) die AS 1-45. Sie enthält das konservierte Dipeptid Met-Ala (AS1-2) und eine große Anzahl von Serin-Resten (AS 4, 14-17, 28-29, 32-33, 41) (von Heijne *et al.* 1989). Die postulierte Schnittstelle Val-Val-Cys↓Ala entspricht dem semikonservierten Motiv (Ile/Val)-X-(Ala/Cys)↓Ala (Gavel und von Heijne, 1990). Desweiteren liegen drei Arginin-Reste in den Positionen minus 7 bis 9. Diese Beobachtung korreliert mit der Tatsache, daß positiv geladene AS im C-terminalen Bereich in vielen, wenngleich nicht in allen, Chloroplasten-Transit-Peptiden gefunden werden (von Heijne & Nishikawa (1991); Keegstra & von Heijne (1992)).

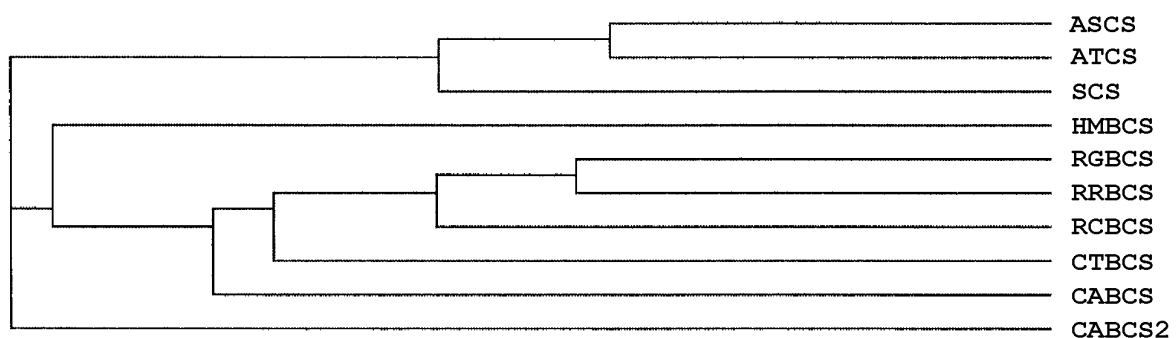
### III.1.3. Verwandtschaftsgrad zwischen der HCS und weiteren bekannten (Bakterio)-Chlorophyll Synthasen

**Tabelle 1: Vergleich der Chlorophyll Synthase aus *Avena sativa* mit anderen bekannten (Bakterio)-Chlorophyll Synthasen.**

Das mature Enzym bezeichnet den Bereich, der laut Berechnung mit „ChloroP“ (s. III.1.2) nicht zur Importsequenz gehört. Das „Core“-Protein umfaßt den mindestens für die Reaktion notwendigen Part des Enzyms (s. III.5.1). Die Sequenzvergleiche für die Auswertung der Identität / Ähnlichkeit wurden mit FASTA3 (Pearson & Lipman, 1988) durchgeführt.

Pflanzenmaterial	Gen	Matures Protein (AS 47-378)		„Core“-Protein (AS 87-378)	
		Identität	Ähnlichkeit	Identität	Ähnlichkeit
<i>Arabidopsis thaliana</i>	G4 (chlG)	83 %	95 %	89 %	97 %
<i>Synechocystis PCC6803</i>	chlG	61 %	86 %	65 %	89 %
<i>Rhodocyclus gelatinosus</i>	bchG	35 %	59 %	40 %	67 %
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	bchG	34 %	61 %	38 %	69 %
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	bchG2	33 %	61 %	38 %	69 %
<i>Heliobacillus mobilis</i>	bchG	33 %	61 %	38 %	68 %
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	bchG	33 %	54 %	38 %	62 %
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	bchG	32 %	58 %	37 %	66 %
<i>Chlorobium tepidum</i>	bchG	29 %	61 %	33 %	68 %

In Tabelle 1 sind die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den verschiedenen, in III.1.1 verglichenen (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen prozentual dargestellt. Ein von diesem Sequenzvergleich abgeleiteter Stammbaum ist in Abbildung 14 gezeigt. Wie zu erkennen ist, bilden die Chlorophyll Synthasen der beiden Angiospermen *A. sativa* und *A. thaliana* zusammen mit dem Enzym von *Synechocystis PCC6803* eine Verwandtschaftsgruppe. Die unterschiedlichen bakteriellen Chlorophyll Synthasen stellen eine zweite Gruppe. Nur die durch das *bchG2* Gen kodierte GGPP veresternde Bakterio-Chlorophyll Synthase aus *C. aurantiacus* nimmt eine Einzelstellung bezüglich ihrer Sequenz ein.



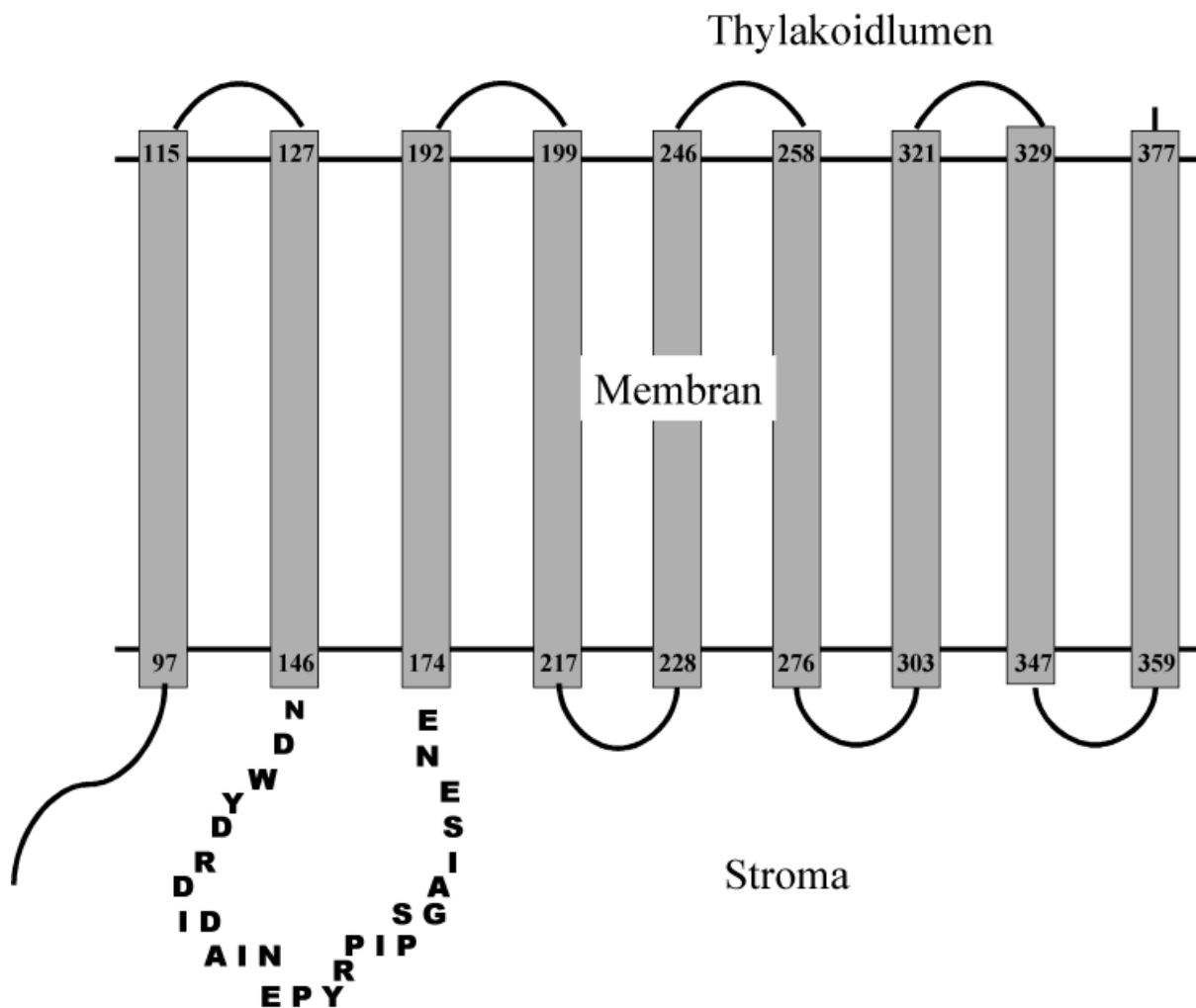
**Abbildung 14: Evolutive Beziehung bekannter Chlorophyll Synthasen, erstellt aus dem Sequenzvergleich in Abbildung 13 mit dem Programm Phylips 3.6 integriert in Clustal W (Thompson *et al.*, 1994)**

ASCS = *Avena sativa*, ATCS = *Arabidopsis thaliana*, SCS = *Synechocystis PCC6803*, RGBCS = *Rhodocyclus gelatinosus* (GGPP-BCS), RRBCS = *Rhodospirillum rubrum*, RCBCS = *Rhodobacter capsulatus*, CTBCS = *Chlorobium tepidum*, CABCS = *Chloroflexus aurantiacus*, HMBCS = *Heliobacillus mobilis*, CABCS2 = *Chloroflexus aurantiacus* (GGPP-BCS)

#### III.1.4. Bestimmung der Transmembranbereiche der HCS

Bei der HCS handelt es sich, wie Hydrophobizitätsplots ergeben haben, um ein membrandurchspannendes, äußerst hydrophobes Enzym. Die Anzahl und Lage der Transmembranbereiche wurden mit dem Programm HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop.server/hmmtop.cgi>) berechnet. Hierzu wurde ein Sequenzvergleich aus den verschiedenen (B)CS (s. III.1) erstellt, aus welchem HMMTOP anschließend die Konsensus-Membranhelices berechnete. Die Lage der Transmembranbereiche ist in Abbildung 15 dargestellt. Es handelt sich um 9 Helices, welche in der Sequenz sehr dicht aufeinander folgen. Der N-Terminus bis AS 96 stellt den längsten hydrophilen, außerhalb der Membran liegenden Bereich dar. Der Bereich zwischen Helix 2 und 3 (AS 146-173) enthält den zweitgrößten hydrophilen Bereich des Enzyms.





**Abbildung 15: Modell der Transmembranbereiche der HCS welche auf der Berechnung mit HMMTOP basieren**

Angegeben ist jeweils die erste bzw. letzte AS eines Membrandurchgangs. Der Bereich, welcher die postulierte PhyPP-Bindestelle enthält, ist mit den jeweiligen Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code dargestellt.

### III.1.5. Vergleich der HCS mit anderen Enzymen ohne Chlorophyll Synthase-Aktivität

Durch Datenbank-Vergleiche mit den Programmen BLAST (Altschul et al., 1997) und FASTA Version 3.3t09 (Pearson und Lipman, 1988) konnte die Chlorophyll Synthase in die Familie der Polyprenylpyrophosphat Transferasen der UbiA-Gruppe eingegliedert werden (vgl. Lopez *et al.* 1996), die unter PF01040 in der Pfam-Datenbank bzw. unter PS00943 in der Prosite-Datenbank abgelegt ist. Alle Enzyme dieser Gruppe sind Transmembranproteine mit zumeist neun Transmembranhelices (berechnet mit HMMTOP <http://www.enzim.hu/hmmtop.server/hmmtop.cgi>).

**Tabelle 2: Konsensus-Sequenzen der verschiedenen Untergruppen der Polyprenyl Transferasen**

In jeder Untergruppe wurde die Sequenz des "Leit"-Enzyms mit anderen verwandten Enzymen dieser Untergruppe verglichen, die mit dem Programm FASTA version 3.3t09 (Pearson und Lipman, 1988) in der SWISS-PROT ALL Datenbank gefunden wurden, und die Konsensus-Sequenz ermittelt. Die Tabelle gibt die Konsensus-Sequenz der Domäne II (Ashby & Edwards, 1990, Carattoli *et al.* 1991) wieder, welche zwischen den Transmembranhelices 2 und 3 lokalisiert ist (III.1.4). Die AS, welche in weniger als 10 % der überprüften Sequenzen unterschiedlich sind, wurden unterstrichen und fett gedruckt. Kommen bestimmte, vom Konsensus abweichende AS in mehr als 10 % der Sequenzen vor, wurden sie unter der Konsensus-Sequenz vermerkt. Bei mehr als vier unterschiedlichen AS wurde die Position in der Sequenz mit X gekennzeichnet. Die Abkürzungen sind wie folgt: **(B)CS**: (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen, **Toc-PT**: Tocopherol Polyprenyltransferasen, **HB-PT**: Hydroxybenzoat Poly- und Octaprenyltransferasen, **Häm-FT**: Protohäm IX Farnesyltransferasen, **UbiA**: bisherige Konsensus-Sequenz der Polyprenyltransferasen des UbiA-Typs nach Prosite Eintrag PS00943.

Untergruppe	Eintragungsnummer eines "Leit"-Enzyms dieser Untergruppe	Anzahl der Homologen	Konsensus-Sequenz des hydrophilen Bereichs zwischen Transmembranhelix 2 und 3
(B)CS	Q9M3W5	12	NDxxDRxVDAINEPx--RPiPxG A I D LCA
Toc-PT	AAL35412	5	NQxxDxxIDKxNKPx--LPxAxG
HB-PT	Q10252	46	<u>ND</u> xxDxxxDxxVxRTxxRxxxx <u>G</u> D N
Häm-FT	P21592	27	NxxxDxxxDxxMxRTxxRPxxx <u>G</u> E V
UbiA Konsensus			NxxxDxxLDxxVxRSxxRxxxxG E I M T H M F
<b>Neuer Konsensus</b>			<b>NxxxDxxxDxxVxPx--RxxxxG</b> <b>D E M R L</b> N

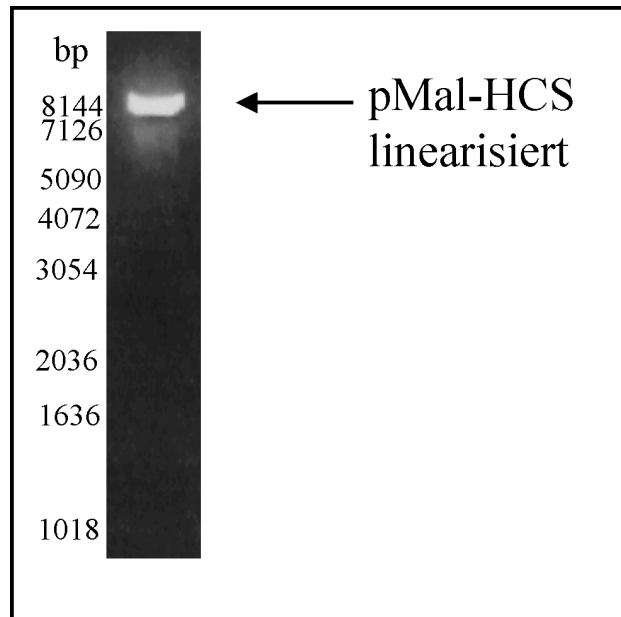
In dieser UbiA-Gruppe tritt vor allem der Bereich zwischen dem 2. und 3. Transmembranbereich hervor, welcher sehr hoch konserviert ist. Dieser Bereich wird als Polyprenylpyrophosphat Bindestelle postuliert (Ashby *et al.* 1992, Melzer & Heide, 1994, Suzuki *et al.*, 1994). Die jeweilige Konsensus-Sequenz ist, nach Untergruppen aufgeteilt, in Tabelle 2 dargestellt.

Sequenzvergleiche der HCS mit anderen Chl- oder Chlid-bindenden Enzymen wie NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (Q01289, Spano *et al.* 1992), Chlorophyll *a* Oxigenase (Tanaka *et al.* 1998) und Chlorophyllase (AAF27046, Tsuchiya *et al.* 1999) ergaben keinerlei Übereinstimmungen, die auf eine ähnlich geartete Bindung des Chlids hinweisen würden.

## **III.2. Herstellung und Verwendung des Fusionsproteins MBP-HCS**

### **III.2.1. Klonierung des HCS-Gens in den Vektor pMal P2**

Neben dem, zu Beginn dieser Dissertation vorliegenden, Plasmid pQE60-HCS wurde ein weiterer Vektor mit dem ChlG Gen aus Hafer erstellt. Durch diesen sollte es möglich sein, ein Fusionsprotein zu erhalten, welches durch einen käuflichen Antikörper nachgewiesen werden kann. Hierzu wurde das Maltose-Binde-Protein (MBP) gewählt, welches in dem Vektor pMal P2 durch das malE-Gen kodiert ist. Der Vektor pMal P2 kodiert im Unterschied zu pMal C2 zusätzlich für ein Signalpeptid, das den Export ins Periplasma vermittelt, was für die Überproduktion von Membranproteinen oft von Nutzen ist. Für die Klonierung wurde das HCS-Gen aus pQE60-HCS mit den Oligonukleotiden HCS22BclI-2 und HCS23 (s. VII.1) mittels PCR amplifiziert. Durch das Oligonukleotid HCS22BclI-2 wurde hierbei am 5'-Ende der Sequenz eine *BclI* Schnittstelle eingefügt. Am 3' Ende wurde durch HCS23 eine *HindIII* Schnittstelle eingebaut. Das so entstandene PCR-Produkt wurde auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und aus der Agarose eluiert. Nun wurde die eluierte DNS in den pPCR-Script-Vektor ligiert. Das Ligationsprodukt wurde anschließend entsalzt und durch Elektroporation in *E. coli* XL1 Blue transformiert. Die durch Blau-Weiß-Selektion sichtbar gemachten Klone mit Insert (weiße Klone) wurden durch Plasmid-DNS Präparation im analytischen Maßstab und Restriktionanalyse mit *BclI* und *HindIII* auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Nach der Plasmidisolierung aus einem gewünschten Klon im präparativen Maßstab wurde das Plasmid abermals mit *BclI* und *HindIII* verdaut. Die resultierenden Fragmente wurden anschließend auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Nach Isolation der bei ca. 1400 bp migrierenden Bande wurde das erhaltene DNS-Fragment in den zuvor mit *BamHI* und *HindIII* verdauten Vektor pMal P2 ligiert und der Stamm XL1 Blue mit dem Ligationsprodukt transformiert. Nach einer Plasmid-Minipräparation aus einem korrekten Klon wurde die DNA mit *BamHI* und *HindIII* verdaut. Hiernach sollte pMal-HCS in linearisierter Form vorliegen, da zwar *BclI* und *BamHI* die gleichen Überhänge erzeugen, nicht aber die gleiche Erkennungssequenz haben. Bei dem erzeugten Plasmid sollte daher die *BamHI* Schnittstelle zerstört sein, nicht aber die von *HindIII*. Die Größe des Gesamtplasmids liegt, laut Berechnung, bei 8149 bp (6721 pMal P2 + 1428 HCS-Sequenz). Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, entspricht die detektierte Größe des linearisierten Plasmids im Agarose-Gel sehr genau der erwarteten Größe.



**Abbildung 16: Analyse des Vektors pMal-HCS**

Das Plasmid pMal-HCS wurde mit *BclI* und *BamHI* verdaut, anschließend in einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt und auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

### III.2.2. Zellaufschluß und Ultrazentrifugation der MBP-HCS produzierenden Zellen

Die anfänglichen Versuche dieser Arbeit wurden nach dem etablierten Zellaufschlußverfahren mit DNase und Lysozym durchgeführt. Diese Variante eignet sich sehr gut, um die Enzymaktivität der HCS zu untersuchen. Sie ist allerdings nur eingeschränkt dazu geeignet, Proteine aufzureinigen bzw. Membranfraktionen von *E. coli* Zellen herzustellen, da die Zellen nur geöffnet, nicht aber die Membranen in kleine Micellen zerteilt werden. Auch ist es durch das enzymatische Aufschlußverfahren nicht möglich, eine hoch homogene Proteinsuspension herzustellen, da die noch immer sehr großen Zellfragmente unregelmäßig auf die Ansätze verteilt werden könnten. Dies aber wäre gerade z. B. für die Durchführung von Enzymkinetiken von größter Wichtigkeit.

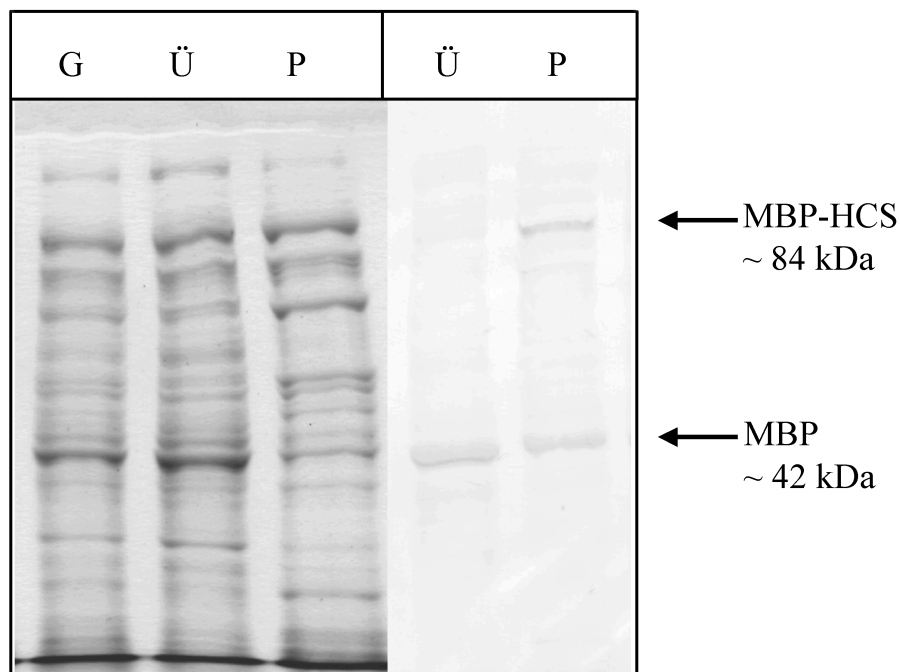
So wurde in dieser Arbeit ein weiteres Zellaufschlußverfahren ausgearbeitet, welches auf der Verwendung der „French Pressure Cell“ beruht. Die Überproduktion des Fusionsproteins wurde zu Beginn in *E. coli* AD494 durchgeführt. Dieser Stamm ermöglicht die Bildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma durch eine Mutation im Thioredoxin Reduktase Gen *trxB*. Dies könnte von Vorteil für die Überproduktion der HCS sein, falls Disulfidbrücken das Enzym stabilisieren.

Der Aufschluß wurde bei 5000 psi, 8000 psi, 12000 psi und 16000 psi durchgeführt. Die jeweilige Enzymaktivität im Gesamtlysat ist in Tabelle 3 dargestellt. Da bei allen vier unterschiedlichen Druckvarianten kein signifikanter Unterschied in der Enzymaktivität aufgetreten ist, wurde für die weiteren Versuche standardmäßig ein Druck von 16000 psi verwendet, da in diesem Fall die Vesikelgröße am kleinsten und die Suspension somit homogen war.

**Tabelle 3: Enzymaktivität im Gesamtlysat nach French Press-Behandlung mit unterschiedlichem Druck**

Die Aktivität der überproduzierten MBP-HCS wurde im Enzymtest nach Zugabe von 1 nmol Chlid und 90 nmol GGPP und einer Inkubation von 45 min bei 29°C bestimmt. Nach spektrometrischer Auswertung konnte eine Aktivität von ca. 55 % - 60 % Veresterung in 45 min ermittelt werden. Angegeben ist die Menge an gebildetem Chl im Verhältnis zum zugegebenen Chlid. Dieser Wert liegt exakt in dem Bereich, der auch für die überproduzierte HCS ohne Fusionspartner in dieser Arbeit bestimmt wurde (Daten nicht gezeigt).

	5000 psi	8000 psi	12000 psi	16000 psi
Veresterung	55 %	57 %	60 %	60 %



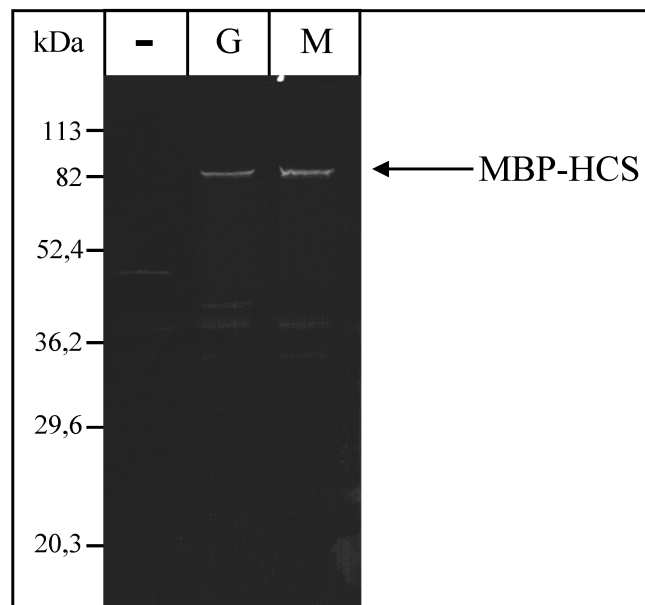
**Abbildung 17: Analyse des Zellysates eines MBP-HCS produzierenden Stammes (AD494) mittels Coomassie-Färbung (linke Seite) und Immundetektion (rechte Seite)**

Je Spur wurden 20 µg Protein auf einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAG) aufgetrennt, wobei G dem bakteriellen Gesamtlysat mit überproduzierter MBP-HCS entspricht und Ü (Überstand) bzw. P (Pellet) die jeweilige Fraktion nach der Ultrazentrifugation bei 100.00 g bezeichnet. Die Immundetektion erfolgte mit Anti-MBP-Antikörper.

Das Zellysate wurde nun zur Fraktionierung in lösliche und membrangebundene Proteine zwei Ultrazentrifugationschritten unterzogen (30 min bei 30.000 g und 3 h bei 100.000 g). Nach

der zweiten Zentrifugation wurden die Proteine des Überstands und des Sediments mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Ein Westernblot mit anschließender Immundetektion diente zur Identifizierung des MBP-HCS Fusionsproteins (Abbildung 17).

Die Enzymaktivität lag in der Fraktion der löslichen Proteine bei 9 % Veresterung unter Standardbedingungen, in der Pelletfraktion bei 58 %. Es konnte somit eine Anreicherung der HCS in der Membranfraktion ohne signifikanten Aktivitätsverlust erzielt werden. Unter den gewählten Überproduktionsbedingungen konnte allerdings eine nicht geringe Menge an reinem MBP detektiert werden (wahrscheinlich ein Spaltprodukt). Für die korrekte Quantifizierung der HCS mittels MBP-spezifischer Antikörper mußte das Protein aber möglichst vollständig als MBP-Fusion vorliegen. Um dies zu erreichen wurde statt AD494 der *E. coli* Stamm CAG597 verwendet, welcher defizient an periplasmatischen Proteasen ist (s. Abbildung 18).



**Abbildung 18: Immundetektion von MBP-HCS in *E. coli* Gesamtlysate mit Anti-MBP-AK**

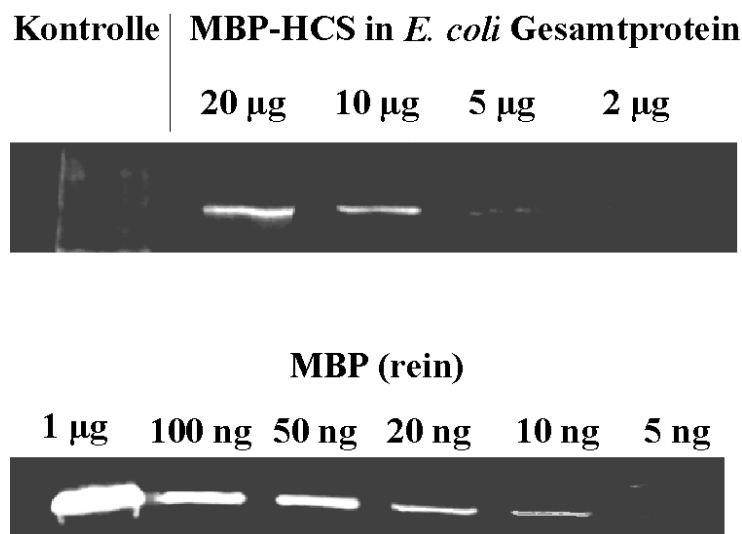
20 µg *E. coli* Gesamtprotein wurden auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose übertragen. Durch Immunodetektion mit Anti-MBP-Antikörpern konnte das Fusionsprotein sichtbar gemacht werden. Auf dem abgebildeten „Western-blot“ ist einmal reines CAG597 Lysat (-) aufgetragen. Die anderen beiden Spuren enthalten *E. coli* Lysat mit überproduzierter MBP-HCS, wobei das Gesamtprotein mit **G** gekennzeichnet ist, die Membranfraktion mit **M**.

Wie zu erkennen ist, ist in den Spuren G und M im Gegensatz zur Negativkontrolle eine Bande bei ca. 82 kDa im Immunoblot zu erkennen. Dies deutet auf das Vollängenprodukt MBP-HCS hin. Eine sehr schwache Bande kann bei ca. 40 kDa detektiert werden. Hierbei handelt es sich vermutlich um Reste von MBP, die aber zu vernachlässigen sind. Durch den

Vergleich der Spur mit Gesamtprotein (G) und Spur M (Membranfraktion) fällt eine leichte Anreicherung der MBP-HCS durch Aufreinigung der bakteriellen Membranen auf.

### III.2.3. Abschätzung der Menge an HCS im Bakterienlysat

Um die Menge an überproduzierter HCS im *E. coli* Lysat ungefähr abschätzen zu können, wurde über die Immunodetektion mit Anti-MBP-Antikörpern die Menge an MBP-HCS und somit indirekt auch die an HCS bestimmt. Hierzu wurden zunehmende Mengen (5 ng – 1 µg) von gekauftem MBP auf einem SDS-PAG aufgetrennt. Anschließend folgte ein Western-blot und eine Detektion mit Anti-MBP-Antikörper. Parallel dazu wurde eine Konzentrationsreihe mit überproduzierter MBP-HCS in *E. coli* Lysat ebenfalls wie oben beschrieben analysiert und mit dem Standard-MBP verglichen (s. Abbildung 19). Da MBP und HCS in etwa die gleiche Masse haben (42,5 kDa zu 41,5 kDa), konnte aus dem Vergleich dieser beiden Reihen die Menge an aufgetragenem MBP abgelesen und daraus die Menge an HCS im *E. coli* Lysat abgeschätzt werden. Sie lag bei etwas weniger als 10 ng MBP (=HCS) pro 10 µg bakteriellem Gesamtprotein.



**Abbildung 19: Bestimmung des Anteils an MBP-HCS am *E. coli* Gesamtprotein**

Verschiedene Mengen an Bakterien-Gesamtlysat mit überproduzierter MBP-HCS (**oberer Bereich**) bzw. gekauftem MBP (Sigma, Steinheim) (**unterer Bereich**) wurden auf einem SDS-PAG aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Die anschließende Immunodetektion erfolgte mit Anti-MBP-Antikörpern. Aus dem Vergleich der beiden Teilabbildungen konnte die ungefähre Menge von MBP-HCS abgelesen werden: ca. 10 ng HCS pro 10 µg Gesamtprotein.

### III.3. Pigmentspezifität von aus *Avena sativa* gewonnener Chlorophyll Synthase und heterolog überproduzierter Chlorophyll Synthase

Um die Übertragbarkeit der mit in *E. coli* überproduzierter HCS durchgeführten Versuche auf das native System in Hafer zu überprüfen, wurde die Veresterung von verschiedenen Pigmenten durch überproduzierte HCS (s. Abbildung 20) mit den Daten aus den Arbeiten von M. Helfrich (Helfrich *et al.* 1994, Helfrich 1995) verglichen, die mit nativem Enzym erhalten worden waren. Die verwendeten Pigmente wurden dankenswerter Weise von M. Helfrich und S. Schoch zur Verfügung gestellt. Die Enzymtests wurden nach II.3.5.2 durchgeführt.

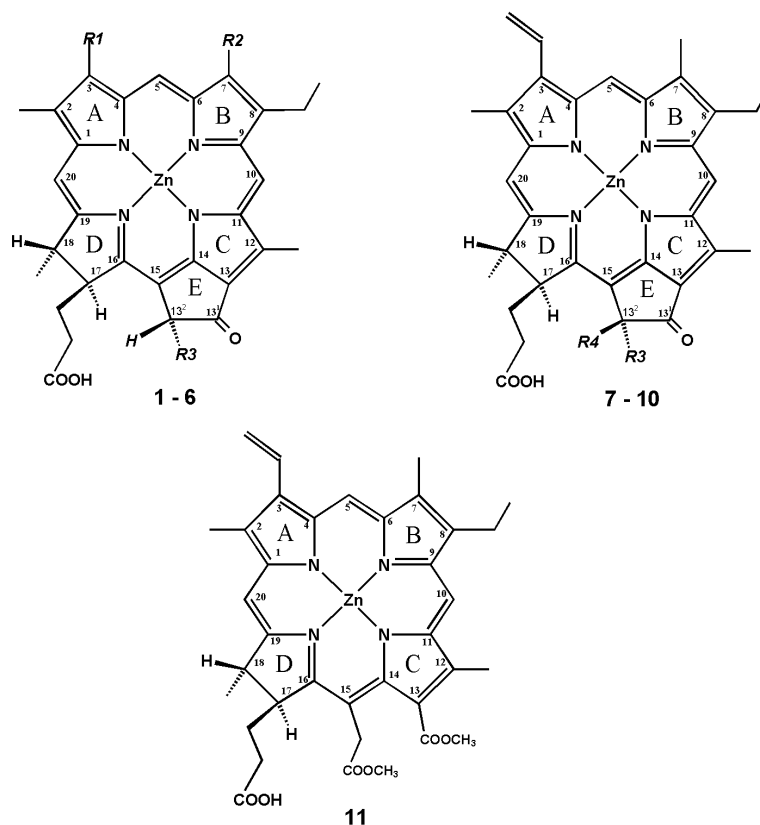
**Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten  $\lambda_{\max}$ ,  $\epsilon_{mM}$ , Excitations- und Emissionswerte und der erhaltenen Retentionszeiten**

Die  $\epsilon_{mM}$  Werte in Klammern sind aus den jeweiligen Werten der Mg-Verbindung berechnet worden. Die Quellen sind wie folgt:

Verbindungen **1.**, **3.**, **7.**, **8.** und **10.** aus Jones *et al.* (1977), **2.** berechnet aus Holt and Morley (1959), Verbindung **4.** und **5.** aus Klement *et al.* (1999), **6.** und **9.** berechnet aus Pennington *et al.* (1964) und Verbindung **11.** berechnet aus Porra (1991)

Nr.	Pigment	$\lambda_{\max}$	$\epsilon_{mM}$ ( $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) in 80% Aceton	Ex / Em (nm)	Retentionszeit (unverstert / verestert)
1.	Zn-Pheid a	660	77,3	425 / 665	11,2 / 21,7
2.	Zn-Pheid d	683	(85)	425 / 665	9,1 / 20,9
3.	Zn-Pheid b	642	51,3	460 / 645	8,5 / 20,3
4.	Zn-7 <sup>1</sup> -OH-Pheid a	655	(65,7)	425 / 665	5,0 / 19,5
5.	Zn-7 <sup>1</sup> -OH-Pyro-Pheid a	660	(65,7)	425 / 665	10,8 / 21,2
6.	Zn-Pyro-Pheid a	660	(69)	425 / 665	11,7 / 21,9
7.	Zn-13 <sup>2</sup> -(S)-OMet-Pheid a	660	77,3	425 / 665	10,6 / 21,2
8.	Zn-13 <sup>2</sup> -(R)-OMet-Pheid a	660	77,3	425 / 665	14,6 / -
9.	Zn-13 <sup>2</sup> -(R)-OMet-Pyro-Pheid a	660	(69)	425 / 665	11,7 / 21,9
10.	Zn-13 <sup>2</sup> -(S)-OEt-Pheid a	660	77,3	425 / 665	11,4 / 21,6
11.	Zn-Chlorin-e <sub>6</sub> -dimethylester	640	(48,0)	400 / 635	12,5 / 21,9





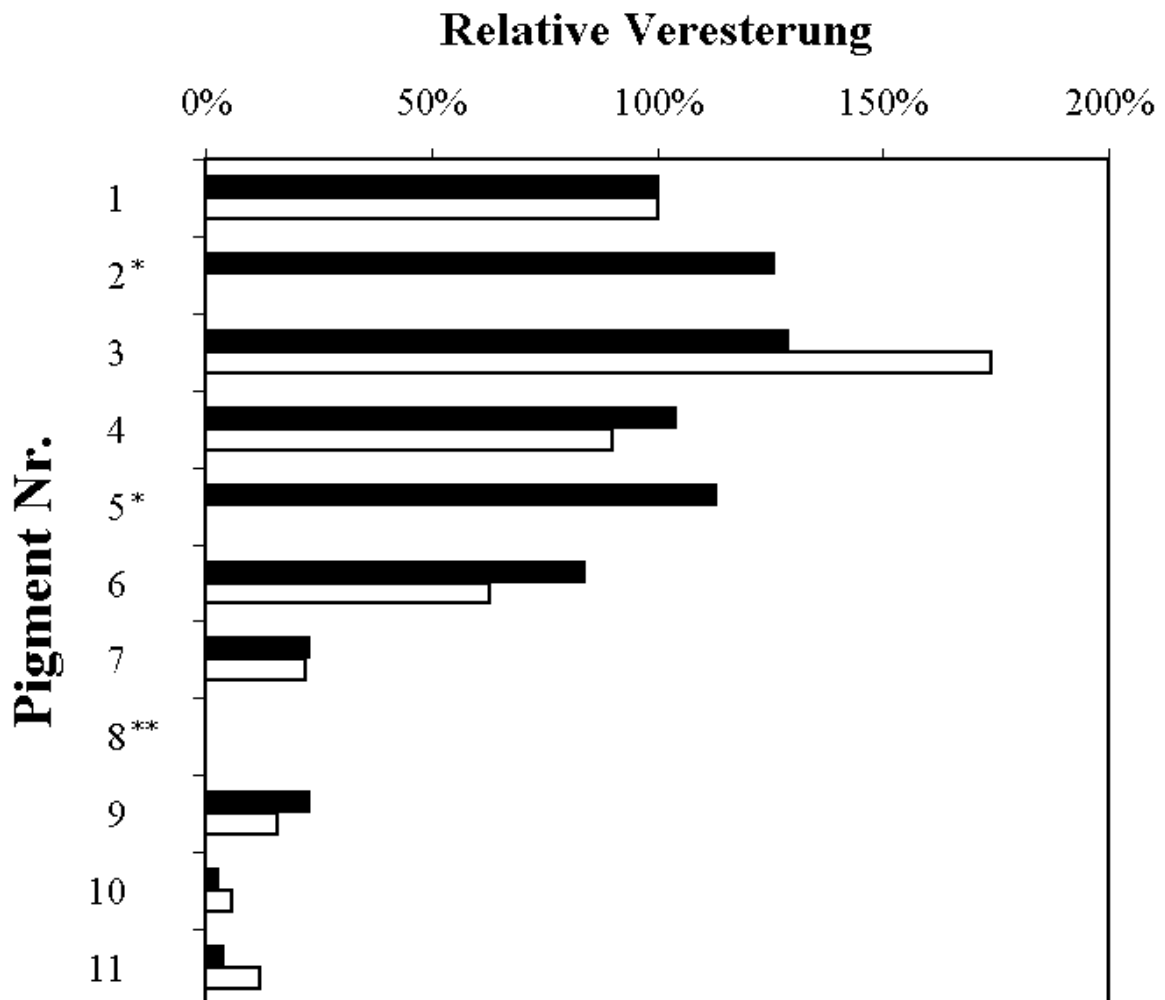
	R1	R2	R3
1.	CH=CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>
2.	CHO	CH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>
3.	CH=CH <sub>2</sub>	CHO	COOCH <sub>3</sub>
4.	CH=CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> OH	COOCH <sub>3</sub>
5.	CH=CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> OH	H
6.	CH=CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	H
	R3	R4	
7.	COOCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	
8.	OCH <sub>3</sub>	COOCH <sub>3</sub>	
9.	OCH <sub>3</sub>	H	
10.	COOCH <sub>3</sub>	OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	

#### Abbildung 20: Pigmentstrukturen

1. Zn-Pheid *a*, 2. Zn-Pheid *d*, 3. Zn-Pheid *b*, 4. Zn-7<sup>1</sup>-OH-Pheid *a*, 5. Zn-7<sup>1</sup>-OH-Pyro-Pheid *a*, 6. Zn-Pyro-Pheid *a*, 7. Zn-13<sup>2</sup>-(S)-OMet-Pheid *a*, 8. Zn-13<sup>2</sup>-(R)-OMet-Pheid *a*, 9. Zn-13<sup>2</sup>-(R)-OMet-Pyro-Pheid *a*, 10. Zn-13<sup>2</sup>-(S)-OEt-Pheid *a*, 11. Zn-Chlorin-*e*<sub>6</sub>-dimethylester

Die verwendeten molaren Extinktionskoeffizienten mit  $\lambda_{\max}$  sind in Tabelle 4 aufgelistet. Aus ihnen wurde die Konzentration der Pigmentlösungen bestimmt, und je Test wurde 1 nmol des jeweiligen Pigments (gelöst in 2  $\mu$ l Aceton) eingesetzt. Die Reaktionsdauer betrug 45 min. Der Anteil an verestertem Pigment wurde aus dem Verhältnis der Flächen der Gipfel des veresterten zum Gesamtpigment (verestert + unverestert) aus dem HPLC-Elutionsprofil

abgelesen und berechnet und mit den Werten von Helfrich (1995) verglichen (Abbildung 21). Die Retentionszeiten des unveresterten bzw. des veresterten Pigments sind in Tabelle 4 dargestellt.



**Abbildung 21: Relative Veresterung der getesteten Pigmente. Vergleich von aus Etioplasten gewonnenem Protein (weiße Balken) mit überproduziertem Protein (schwarze Balken)**

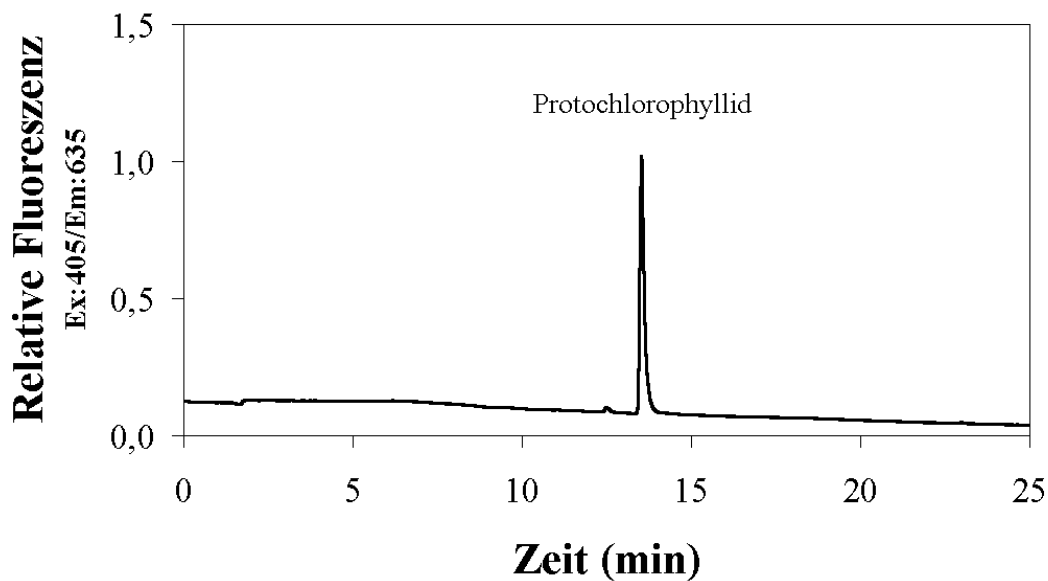
In beiden Fällen wurde jeweils die Veresterung von Zn-Pheid *a* gleich 100 % gesetzt. Die Pigmente sind analog zu Abbildung 20 nummeriert.

\* diese Pigmente wurden nur mit der überproduzierten HCS getestet

\*\* in diesem Fall fand in beiden Fällen keinerlei Veresterung statt

Es ergibt sich in allen Fällen eine gute Übereinstimmung der Veresterbarkeit der einzelnen Pigmente durch beide Varianten der HCS. So kann Zn-Pheid *b* effizienter verestert werden als alle anderen getesteten Substrate. Verbindung 4. ist in etwa genauso gut veresterbar wie Zn-Pheid *a*.

(A)



(B)

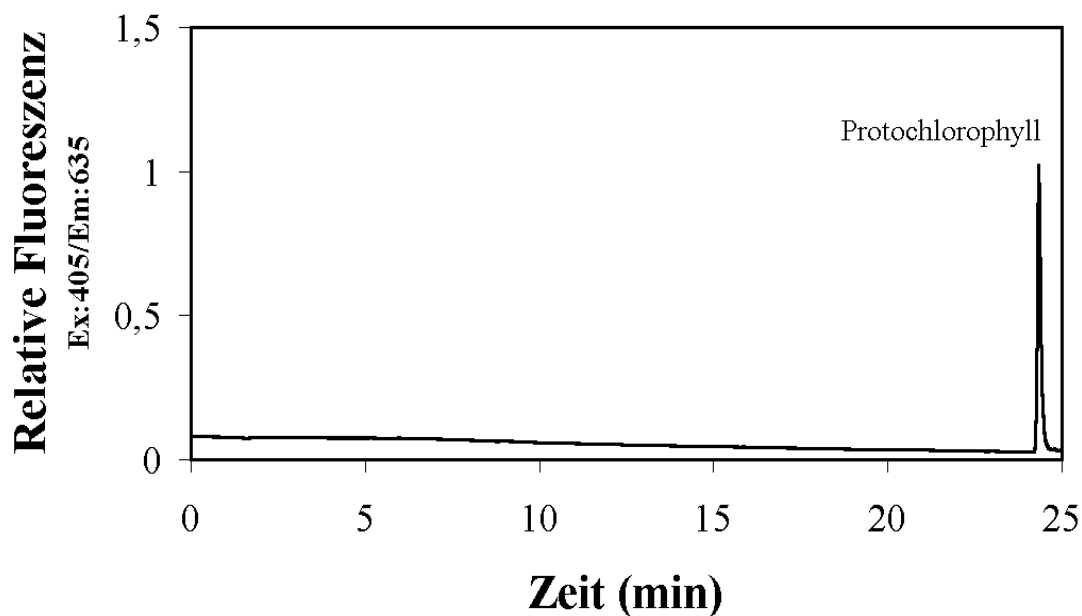


Abbildung 22: Untersuchungen zur Veresterung von Protochlorophyllid

- (A) 1 nmol Protochlorophyllid und 90 nmol PhyPP wurden mit der überproduzierter HCS in 3 mg bakteriellem Gesamtprotein 45 min lang bei 29°C inkubiert. Die Auswertung des Enzymtests erfolgte über HPLC.
- (B) Elutionsverhalten von reinem Protochlorophyll unter den in (A) verwendeten Bedingungen

Zn-Pyro-Pheid *a* liegt nur noch bei rund 80 bzw. 60 % der Veresterung von Zn-Pheid *a*. Von den  $^{13}\text{C}$ -Verbindungen werden **7.** und **9.** etwa gleich gut als Substrat akzeptiert, wohingegen **10.** nur noch sehr wenig (< 10 %) verestert werden kann.

Zn- $^{13}\text{C}$ -(R)-OMet-Pheid *a* kann weder durch das native noch das überproduzierte Enzym verestert werden. Aus der allgemeinen Übereinstimmung der erhaltenen Werte kann postuliert werden, daß die nur mit der überproduzierten HCS getesteten Substrate **2.** und **5.** auch mit dem nativen Hafer-Enzym eine ähnliche Veresterungsrate ergeben würden.

Ebenso läßt sich ableiten, daß die weiteren Ergebnisse, welche mit dem überproduzierten Protein entstanden sind, auf die Verhältnisse im Hafer übertragbar sind.

Aufgrund der identischen biochemischen Eigenschaften der beiden Proteine wurde die Veresterung von Protochlorophyllid mit der überproduzierten HCS untersucht, da bisher nicht eindeutig nachgewiesen war, ob Protochlorophyllid mit der HCS verestert werden kann oder nicht. Hierzu wurde 1 nmol Protochlorophyllid in einen Enzymtest mit 90 nmol PhyPP eingesetzt. Nach 45 min Reaktionszeit wurde der Versuch gestoppt und die Menge an Protochlorophyll durch HPLC Analyse bestimmt. Das HPLC-Elutionsprofil ist in Abbildung 22 (A) zu sehen. Zur Bestimmung der Retentionszeit des erwarteten Produkts wurde reines Protochlorophyll (s. Abbildung 22 (B)) in einem weiteren HPLC-Lauf aufgetrennt. Die Retentionszeit von Protochlorophyll liegt demnach bei ca. 24 min. In dem Elutionsprofil des Enzymtests kann aber bei dieser Zeit kein Gipfel detektiert werden. Somit kann die überproduzierte HCS das zugegebene Protochlorophyllid nicht verestern.

### **III.4. Antikörper gegen die Chlorophyll Synthase aus Hafer**

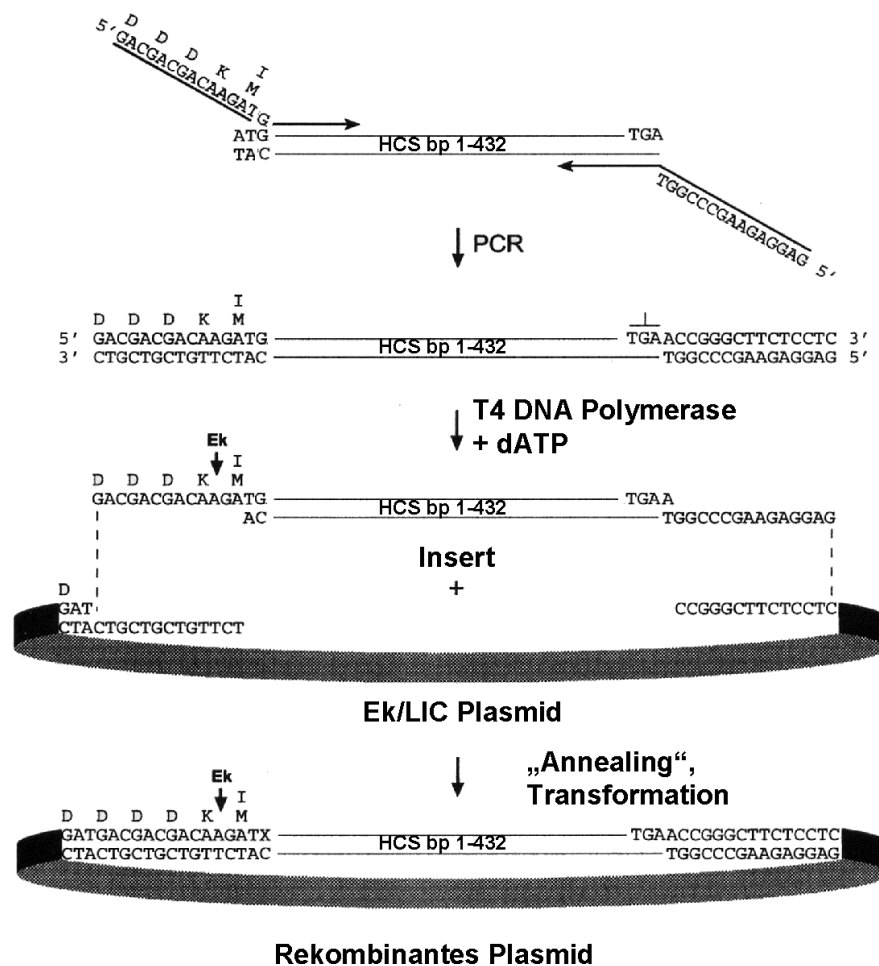
#### **III.4.1. Antigenherstellung**

##### **III.4.1.1. Konstruktion des Vektors pET-32 Ek/LIC-HCS(1-432)**

Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Versuche unternommen Antikörper gegen die Chlorophyll Synthase aus Hafer zu gewinnen, so z. B. durch Immunisierung mit vier verschiedenen Massenfraktionen der inneren Etioplastenmembran (Lauterbach, 1993), in Auftraggabe von Peptidantikörpern (U. Oster, unveröffentlicht) oder durch Anreicherung der HCS-Aktivität in Membranfraktionen, welche anschließend zur Immunisierung verwendet wurden (U. Oster, unveröffentlicht). Mit keinem der bisher hergestellten Antiseren konnte aber die Chlorophyll Synthase detektiert werden. In dieser Arbeit wurde ein erneuter Versuch unternommen, einen Antikörper, diesmal über das rekombinante Enzym, zu gewinnen. Die ersten Versuche zur Herstellung eines geeigneten Antigens, in welchen die HCS als Fusionsprotein mit MBP bzw. His-tag kloniert und überproduziert wurde, schlugen fehl, da die HCS in diesen Fällen nur durch 0,5 % SDS zu solubilisieren war (Daten nicht gezeigt). Unter diesen Bedingungen liegt das MBP aber denaturiert vor und kann nicht mehr durch Affinitätschromatographie an einer Amylose-Säule aufgereinigt werden, da die spezifische Bindung zwischen MBP und Amylose nicht mehr ausgebildet werden kann. Der Versuch, die Aufreinigung mittels IMAC („immobilized metal affinity chromatography“) über Ni-NTA-Sepharose mit einem His-tag-HCS-Konstrukt durchzuführen, scheiterte nicht am Fusionsprotein selbst, da der His-tag auch in denaturierter Form funktionell ist. Allerdings wird durch die hohe SDS-Konzentration die Komplexbildung des Nickels durch die Histidine verhindert (Daten nicht gezeigt).

Ein neuerlicher Versuch wurde mit der Subklonierung eines Teilbereichs der HCS unternommen (s. generelle Vorgehensweise Abbildung 23): Hierfür wurden die ersten 144 AS des N-Terminus ausgewählt, da es sich bei diesem Bereich um den hydrophilsten in der HCS handelt (nur 2 Transmembran-Bereiche, s. III.1.4). Außerdem konnte zu diesem Bereich in der Datenbanksuche mit dem Programm BLAST (Altschul et al., 1997) kein homologes Protein gefunden werden, welches mehr als zwei identische AS in Folge aufweist. Somit wurden für die Generierung eines Antikörpers gegen die ersten 144 AS der HCS die ersten 432 bp, ausgehend vom 5' Ende, in den Vektor pET-32 Ek/LIC kloniert. Um hierfür das gewünschte Stück DNS zu erhalten und um es für das anschließende Einfügen in den pET-32

Vektor vorzubereiten, wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden HCS 44 und HCS 45 (Sequenz s. VII.1) durchgeführt.

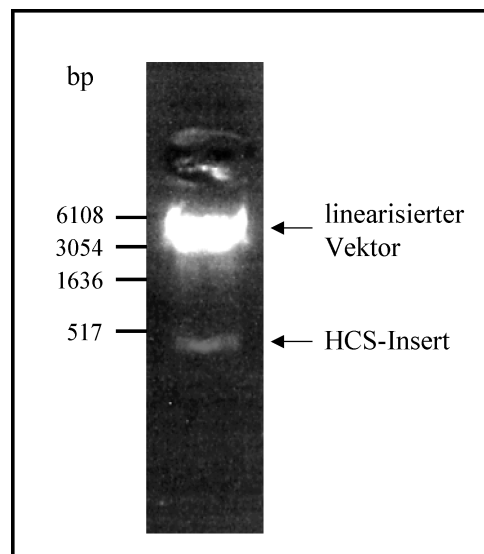


**Abbildung 23: Vorgehensweise bei der Herstellung des Plasmids pET-32 Ek/LIC-HCS1-432 verändert nach pET-32-Ek/LIC Datenblatt (Novagen, Madison, WI, USA)**

Mit den Oligonukleotiden HCS 44 und HCS 45 wurden die ersten 432 bp der HCS durch PCR amplifiziert. Nach einer T4 DNA Polymerase Behandlung in Gegenwart von dATP kann das Insert in das lineare, ebenfalls mit Polymerase vorbehandelte Plasmid eingebaut und anschließend transformiert werden.

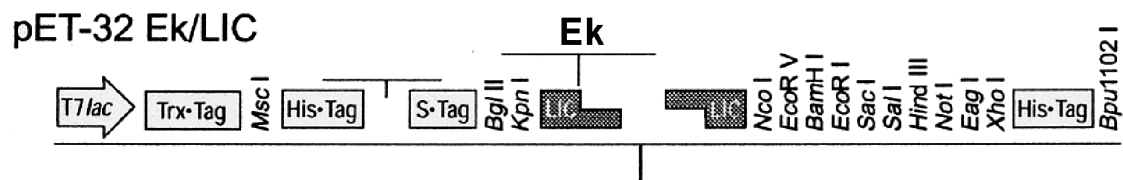
Das erhaltene Fragment wurde auf einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert. Der gekaufte Vektor von Novagen war bereits linearisiert und mit T4 DNA Polymerase so vorbehandelt, daß durch deren 3' -> 5' Exonuklease-Aktivität ein definierter Einzelstrang-Abbau bis zum ersten Adenin vom Ende der DNS her stattgefunden hatte. Da in dem Reaktionsansatz ausschließlich dATP zur Verfügung stand, überwog an dieser Stelle die Polymerasetätigkeit die Exonuklease-Aktivität.

So entstanden definierte Überhänge, die exakt komplementär zum amplifizierten DNS-Fragment sind, welches, wie im Folgenden beschrieben, vor dem „Annealing“ ebenfalls T4 DNA Polymerase behandelt wurde. Nach der „Ligation“ durch die T4 DNA Polymerase Reaktion, nachfolgende Transformation in *E. coli* XL1 Blue und Plasmid-Minipräparation konnte das Plasmid durch einen anschließenden Restriktionverdau mit *Bgl*II und *Nco*I auf seine Richtigkeit hin überprüft werden (s. Abbildung 24). Eine nachfolgende Sequenzierung bestätigte das Ergebnis.



**Abbildung 24: Restriktionsverdau des Vektors pET-32 Ek/LIC-HCS**

Der Vektor wurde mit *Bgl*II und *Nco*I verdaut und anschließend auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Der linearisierte Vektor hat eine Größe von ca. 5880 bp, das Insert von ca. 470 bp.



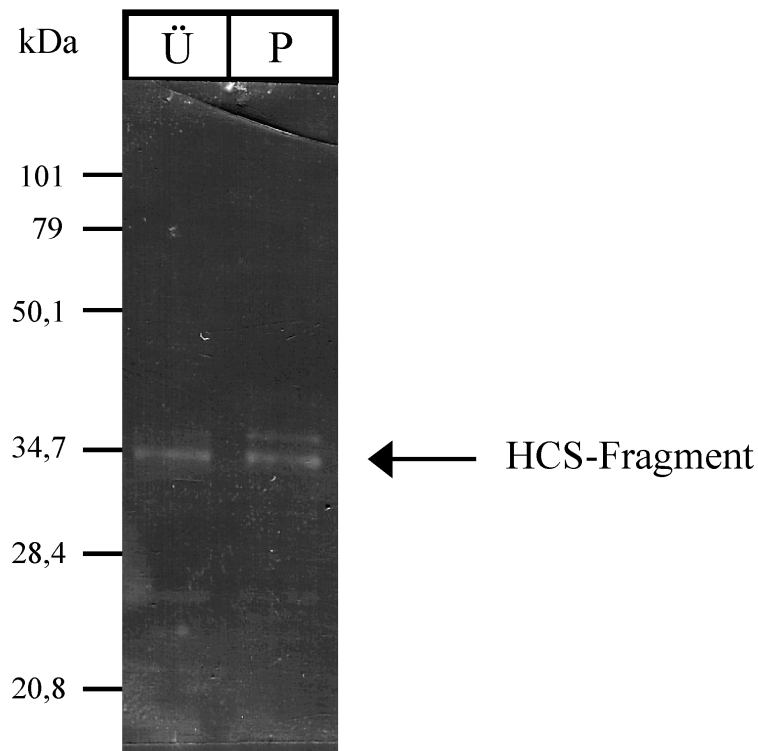
**Abbildung 25: Darstellung des Fusionsprotein-kodierenden Bereichs von pET-32 Ek/LIC**

Das Konstrukt kodiert von 5' nach 3' für folgende Bestandteile: **Trx-Tag<sup>TM</sup>** (Thioredoxin, 109 AS), **His-Tag<sup>®</sup>** (6 AS), **Thrombin-Schnittstelle**, **S-Tag<sup>TM</sup>** (S-Protein, 15 AS), **LIC** Klonierungssystem mit **Enterokinase-Schnittstelle (Ek)** und **His-Tag<sup>®</sup>** (s. o.). Das 432 bp (144 AS) lange Teilstück der Chlorophyll Synthase wurde in den mit LIC bezeichneten Bereich kloniert (s. Abbildung 23). Die gesamte Sequenz des Fusionsproteins umfaßt 1005 bp ( $\hat{=}$  335 AS  $\sim$  37 kDa).

Ein Diagramm der auf dem Vektor kodierten „tags“ und relevanten Protease-Schnittstellen des Fusionsproteins ist in Abbildung 25 dargestellt.

### III.4.1.2. Überproduktion und Aufreinigung des Antigens

Der in III.4.1.1 konstruierte Vektor wurde nun in den *E. coli* Stamm AD494 transformiert und das auf ihm kodierte Protein anschließend produziert. In den anfänglichen Versuchen erfolgte die Überproduktion durch Induktion mit 0,3 mM IPTG und die Expressionsdauer betrug 4 Stunden. Die Resuspension des Bakterien-Pellets nach der Überproduktion fand in Wasch- / Binde-Puffer statt. Der Aufschluß erfolgte durch das French Press-Verfahren. Allerdings wurde in dieser langen Expressionszeit das Antigen in die bakteriellen Membranen eingebaut und konnte durch 8 M Harnstoff nicht wieder in Lösung gebracht werden (Daten nicht gezeigt).

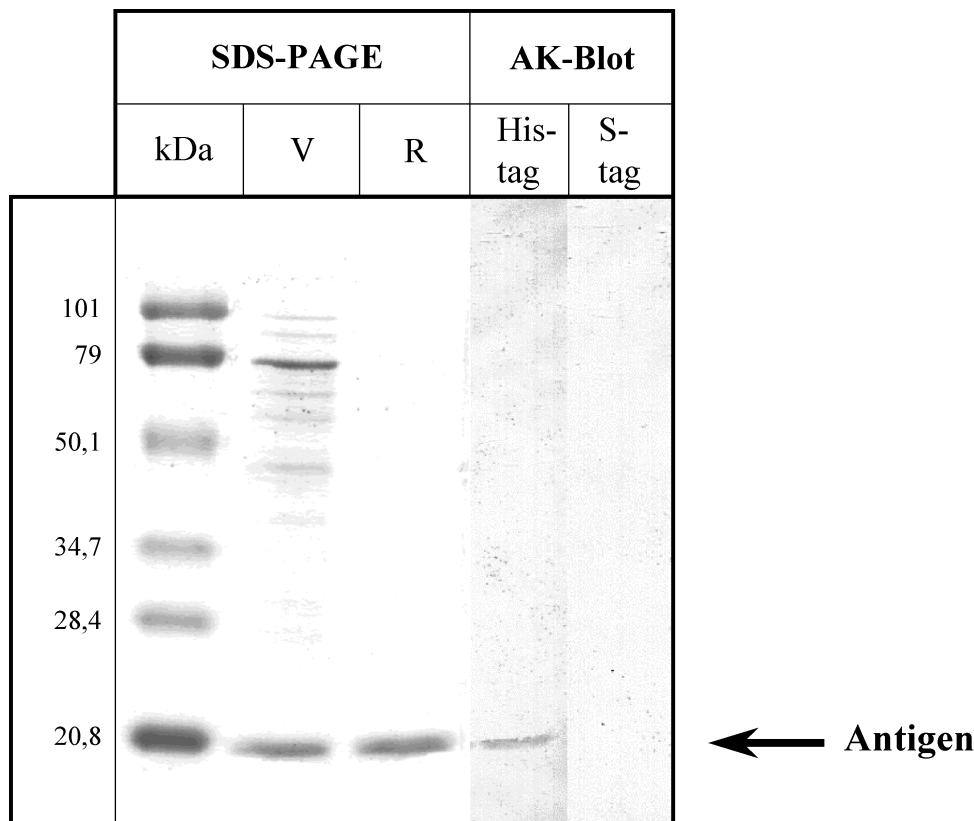


**Abbildung 26: Aufteilung des überproduzierten Antigens auf Überstand (Ü) und Niederschlag (P) nach Ultrazentrifugation**

Das *E. coli* AD494 Lysat mit überproduziertem Antigen wurde nach einer Ultrazentrifugation bei 100.000 g separat als Pellet (P) und Überstand (Ü) in einem SDS-PAG aufgetrennt und anschließend im Western-„blot“ auf Nitrocellulose transferiert. Durch Immundetektion mit Anti-His-Antikörper wurde das Fusionsprotein sichtbar gemacht. Der Anteil von Antigen zu Gesamtprotein beträgt ca. 1,25%.



Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die IPTG Menge schrittweise erhöht und gleichzeitig die Produktionsdauer verringert. Durch Induktion mit 0,8 mM IPTG und Expression für nur 1,5 Stunden konnten ca. 50 % des Antigens nach einem UZ-Lauf bei 100.000 g im Überstand gehalten werden. Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, sind in beiden Spuren (Ü und P) etwa gleich viel Antigen enthalten.



**Abbildung 27: Detektion des aufgereinigten Antigens**

Über S-Protein-Agarose aufgereinigtes Antigen (je Spur 2  $\mu$ g) wurde direkt nach der Aufreinigung (V) bzw. nach Zentrifugation über „spin-column“ (R) auf einer SDS-PAGE aufgetrennt. 1  $\mu$ g der (R)-Fraktion wurden nach der SDS-Gelelektrophorese auf Nitrozellulose geblottet und anschließend mit His-tag-AK bzw. S-tag-Ak detektiert. Wie erwartet, konnte nur noch mit His-tag-AK eine Reaktion beobachtet werden, da das S-Protein durch Enterokinase-Verdau abgetrennt worden war.

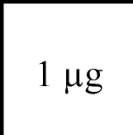
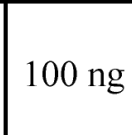
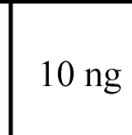
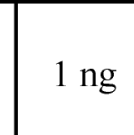
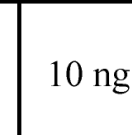
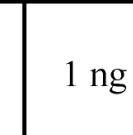
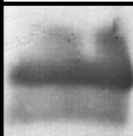
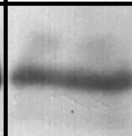
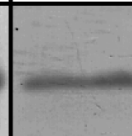
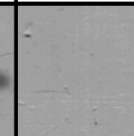
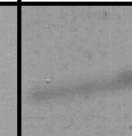
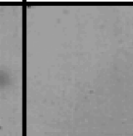
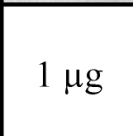
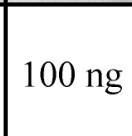
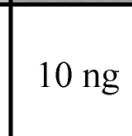
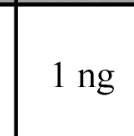
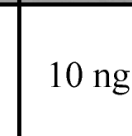
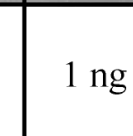
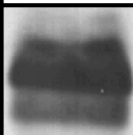
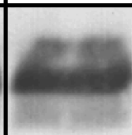
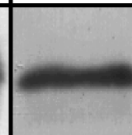

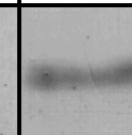

Aus der Überstandsfraktion wurde nun das Antigen isoliert. Durch die Inkubation des Ansatzes mit rekombinanter Enterokinase wurde der C-terminale Bereich des Antigens, der hinter der Enterokinase-Schnittstelle liegt und 177 AS ( $\hat{=}$  19,7 kDa, s. Abbildung 25) groß ist, von der S-Protein-Agarose abgetrennt. Der N-terminale Teil verbleibt an der Agarose. So behält das Antigen nur einen His-tag am C-Terminus. Um den Erfolg der Reinigungsprozedur zu überprüfen, wurde reines Antigen nach einem „Western-blot“ einerseits mit His-tag-Antikörper und andererseits mit S-tag-Antikörper detektiert (s. Abbildung 27, Ak-blot). Wie

zu erkennen ist, kann nur noch der His-tag-Antikörper mit dem aufgereinigten Antigen reagieren. Der S-tag wurde also wie erwünscht durch die rekombinante Enterokinase abgespalten.

Die Generierung eines Antiserums gegen das aufgereinigte Antigen wurde durch Eurogentec (Herstal, Belgien) durchgeführt. Zur Immunisierung wurden zwei Hasen herangezogen.

### III.4.2. Untersuchung der Antikörpersensitivität

Je Hase wurde von Eurogentec ein Präimmunserum zur Verfügung gestellt, welches vor der Immunisierung mit HCS-Antigen entnommen wurde und somit nicht mit der HCS reagiert. Desweiteren wurde ein erstes Test-Serum, (nach 5 Wochen Immunisierung), Serum des „Large Bleedings“ (nach 9 Wochen) und das aus dem Restblut gewonnene Serum („Final Bleeding“ nach 12 Wochen) bereit gestellt.

Serum	1:10				1:100	
	1 µg	100 ng	10 ng	1 ng	10 ng	1 ng
Hase 1						
						
Hase 2						
						

**Abbildung 28: Sensitivität des Antikörperserums gegen das Antigen (HCS AS 1-144)**

Verschiedene Konzentrationen an aufgereinigtem Antigen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Protein wurde anschließend durch Western-„blot“ auf Nitrozellulose-Membranen transferiert, mit Anti-HCS-AK / Anti-Hase-AK markiert und durch NBT-BCIP gefärbt. Die Versuche wurden mit dem „Large Bleeding“-Serum durchgeführt.

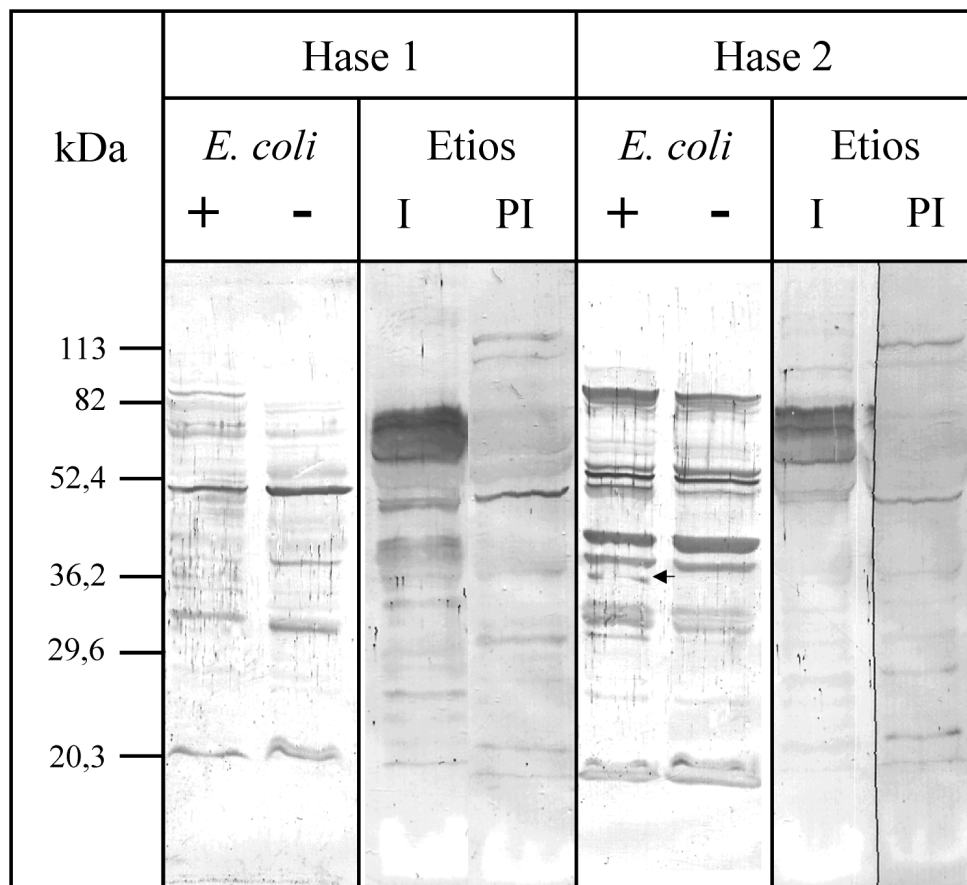
Um die Empfindlichkeit des gewonnenen Antiserums zu bestimmen, wurde gereinigtes Antigen in verschiedenen Konzentrationen durch einen Western-„blot“ auf Nitrozellulose-Membranen transferiert und anschließend mit dem gewonnenen Antiserum (primärer AK)

und Anti-Hase-AK (sekundärer AK) durch NBT-BCIP gefärbt (s. Abbildung 28). Die maximale Nachweisbarkeit des Antigens liegt sowohl in der 1:10 als auch in der 1:100 Verdünnung des Antiserums knapp unter 10 ng Antigen. Im Original-„blot“ konnte bei der 1:10 Verdünnung noch eine sehr schwache Bande bei 1 ng detektiert werden. Generell ergibt die Färbung mit Serum von Hase 2 stärkere Signale als mit dem von Hase 1.

Da die Ergebnisse aus den Antikörper-Untersuchungen mit MBP-HCS / MBP-AK auf einen ungefähren Gehalt von 0,1 % HCS am *E. coli* Gesamtprotein schließen lassen (s. III.2.3), sollte der gewonnene Anti-HCS-Antikörper in 20 µg *E. coli* Gesamtprotein (= ca. 20 ng HCS) die Chlorophyll Synthase detektieren können.

### III.4.3. Spezifität des Anti-HCS(1-144)-Antiserums

Das gewonnene Antiserum wurde nach der Sensitivitätsbestimmung an *E. coli* Gesamtextrakt und Haferetioplasten getestet (s. Abbildung 29). Leider konnte im *E. coli* Lysat, welches einmal mit überproduzierter HCS (+), einmal ohne (-) analysiert wurde, kein Protein eindeutig detektiert werden, welches ausschließlich in der (+)-Probe vorkommt. Das in der Positiv-Kontrolle / Hase 2 mit einem Pfeil markierte Protein ist zwar nur in dieser erkennbar, das Ergebnis war aber nicht reproduzierbar.



**Abbildung 29: Reaktion von Anti-HCS(1-144)-Antiserum mit *E. coli*- und Etioplastenlysat**

20 µg Bakterienlysat bzw. Etioplastenlysat wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend durch Western-„blot“ auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Anti-HCS-AK detektiert, wobei die *E. coli*-Proben ((+) = pQE60-HCS in SG13009, (-) = nur pQE60 in SG13009) und die mit **I** bezeichnete Spalte bei den Etioplasten mit Serum der letzten Blutung der Hasen 1 bzw. 2 analysiert wurden. Als Negativkontrolle wurde die Etioplastenfraktion mit Präimmunsereum (**PI**) behandelt, welches nicht mit der HCS reagiert. Der kleine Pfeil bei Hase 2, *E. coli*-Lysat, deutet auf ein Protein hin, welches nur in der HCS-Fraktion vorkommt.

Auch ist ein direkter Vergleich nicht unbedingt möglich, da *E. coli* Zellen, welche mit der Überproduktion eines Transmembranproteins metabolisch belastet werden, durchaus

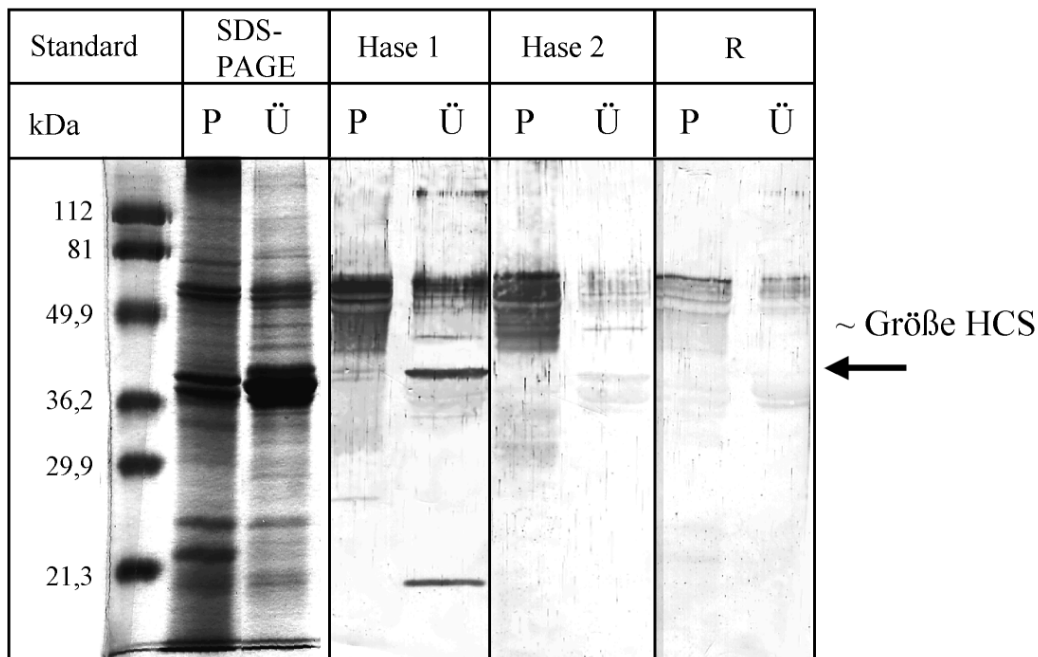
zusätzliche Streßproteine oder Hitzeschock-Proteine produzieren können, die das Ergebnis verfälschen. Generell ist die Reaktion des Antikörpers als relativ unspezifisch anzusehen. Ähnliches gilt für die Reaktion des Anti-HCS-Antikörpers mit lysierten Etioplasten. Aus Mangel an einer Negativ-Kontrolle wurde hier zum Vergleich eine Probe mit Präimmenserum analysiert. Aber auch hier läßt sich, bis auf die sehr prominente Bande bei ca. 70 kDa, keine deutliche „Zusatzbande“ erkennen. Diese Bande liegt aber nicht im Größenbereich der HCS (ca. 41 kDa bzw. potentiell Dimer 82 kDa). Das weitere Ziel war also, unspezifische Hintergrundreaktionen zurückzudrängen, bzw. Material zu gewinnen, in welchem die HCS in höherer Konzentration vorliegt (s. u. PLBs und PTs).

Um dies zu erreichen, wurde das Rohserum über „geblottetes“ Antigen aufgereinigt. Es wurde nur die aus dem Gel ausgeschnittene Protein-Bande „geblottet“, um eventuelle, durch Coomassie-Färbung nicht detektierbare Verunreinigungen auszuschließen. Außerdem wurde die zu färbende Membran mit Milchpulverpuffer geblockt. Zuvor wurden die unspezifischen Bindungen ausschließlich mit Tween 20 abgesättigt. Desweiteren wurden aus den Etioplasten PLBs und PTs aufgereinigt. Nach Lindsten *et al.* (1990) ist nach Zugabe von exogenem Substrat (Chlid + GGPP) in Weizen-PLBs innerhalb der ersten 10 min Reaktionszeit die Veresterungsgeschwindigkeit 2,5-fach höher als in Gesamtioplasten, bei nur 2,5 % der eingesetzten Proteinmenge. Die Veresterungsrate der PTs liegt bei gleichen Bedingungen bei etwa 50 % der PLBs. Hieraus folgt, daß die Chlorophyll Synthase in PTs und PLBs lokalisiert sein muß und durch die Aufreinigung dieser Membranen eine starke Anreicherung der Chlorophyll Synthase stattfindet.

Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, liefert die Analyse des PLB-Überstands mit Anti-HCS(1-144)-Serum aus Hase 1 eine dominante Bande bei ca. 40 kDa. Diese Größe würde dem Erwartungshorizont für die HCS entsprechen. Leider verschwindet diese Bande, wenn der Antikörper zuvor mit Hilfe eines Antigen-„blots“ aufgereinigt wurde. Auch tritt diese besagte Proteinbande in der Detektion mit Antiserum aus Hase 2 nicht auf. Somit scheint es sich auch in diesem Fall um eine unspezifische Reaktion zu handeln.

Die Untersuchung der PTs ergab ebenfalls keinen Hinweis auf eine Antikörperreaktion im Größenbereich der HCS (s. Abbildung 31). Die prominenten Banden im Bereich zwischen 81 und 50 kDa, die ebenfalls bei der Analyse der PLBs auftreten, konnte nicht identifiziert werden. Voraussichtlich handelt es sich aber um eine Verschmutzung (z. B. Keratin), welches während der Aufarbeitung durch Chemikalien oder Arbeitsgeräte in die Präparation gelangt ist. Wahrscheinlich sind auch die Hasen mit dieser oft als „Fingerprotein“ bezeichneten

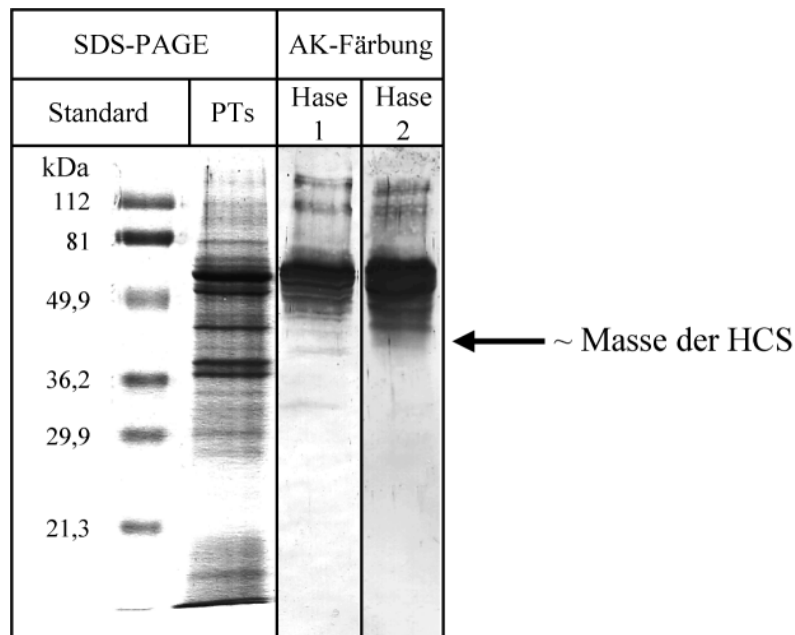
Substanz in Kontakt gekommen. Durch Aufreinigung des Antikörpers wird diese Bande stark abgeschwächt (s. Abbildung 30).



**Abbildung 30: Immundetektion von HCS in solubilierten PLBs**

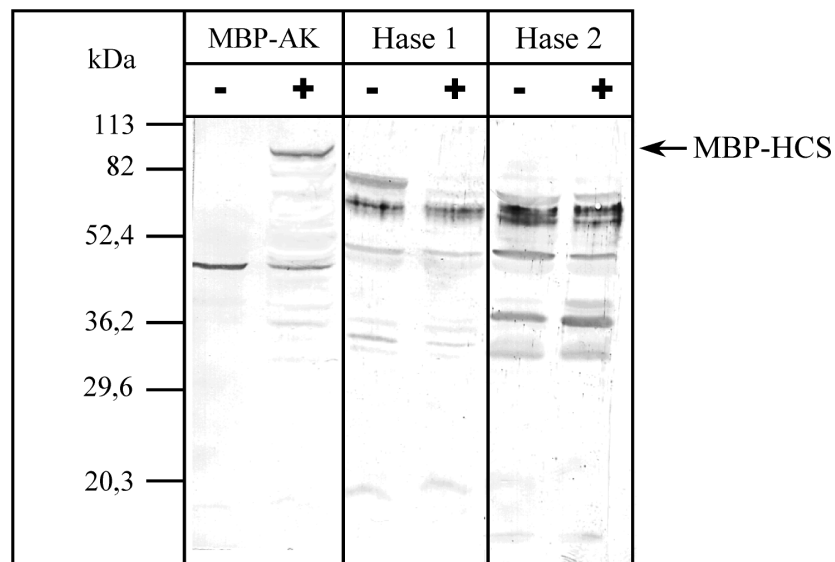
PLBs wurden 30 min auf dem Überkopf-Rührer mit 15 mM Octylglycosid bei RT solubiliert. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 15000 g. Jeweils 20 µg des Pellets (**P**) bzw. des Überstands (**Ü**) wurden auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und entweder direkt mit Coomassie gefärbt (SDS-PAGE) bzw. anschließend auf Nitrozellulose-Membranen mittels Western-, „blot“ transferiert. Die Proben wurden nun mit Anti-HCS-AK (**Hase 1 und Hase 2**), bzw. dem aufgereinigten Serum von Hase 1 (**R**) behandelt und mit NBT-BCIP detektiert. Der Pfeil markiert die prominente Bande, die auf der erwarteten Größe der HCS entsprechen würde.

Aus den vorhergehend beschriebenen Versuchen stellte sich die Frage, ob der hergestellte Antikörper überhaupt mit der HCS interagiert. Um dies zu überprüfen, wurde erneut das Fusionsprotein MBP-HCS überproduziert und parallel mit Anti-MBP-Antikörper bzw. Anti-HCS-Antiserum detektiert. Das Ergebnis ist Abbildung 32 zu entnehmen: Es konnte weder mit dem Antikörper aus Hase 1 noch mit dem aus Hase 2 eine Reaktion im Größenbereich des Fusionsproteins nachgewiesen werden. Da bei 30 µg aufgetragenem Gesamtprotein mindestens 30 ng HCS vorhanden sind (vgl. HCS-Mengenbestimmung III.2.3) müßte die Anti-HCS-Antikörpersensitivität ausreichen (Detektionsgrenze nach Überprüfung mit Antigen liegt bei ca. 5-10 ng, s. III.4.2) um die HCS nachweisen zu können, auch wenn das Antigen nur ca. 1/3 der Masse des Gesamtproteins besitzt.



**Abbildung 31: Immundetektion von HCS in aufgereinigten PTs**

Jeweils 10  $\mu\text{g}$  aufgereinigte PTs wurden auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und entweder direkt mit Coomassie gefärbt (**SDS-PAGE**) bzw. anschließend auf Nitrozellulose-Membranen mittels Western-„blot“ transferiert. Die Proben wurden in diesem zweiten Fall mit Anti-HCS-Antikörper (**Hase 1 und Hase 2**) behandelt und mit NBT-BCIP detektiert. Der Pfeil gibt die Position im Gel / „blot“ an, in welcher die HCS ihrer Masse nach laufen müßte.



**Abbildung 32: Immunodetektion von MBP-HCS, überproduziert in *E. coli***

Jeweils 30  $\mu\text{g}$  *E. coli* Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose-Membranen mittels Western-„blot“ transferiert. Die Proben wurden mit Anti-MBP-Antikörper (**MBP-AK**) bzw. Anti-HCS-Antiserum (**Hase 1 und Hase 2**) analysiert und mit NBT-BCIP gefärbt. Die Negativ-Kontrolle (= *E. coli* Extrakt ohne MBP-HCS) ist jeweils mit (-) bezeichnet, die MBP-HCS enthaltende Spur mit (+). Der Pfeil markiert die Laufhöhe des MBP-HCS Fusionsproteins, welches durch den MBP-AK bestimmt wurde.

### III.5. Mutationen der HCS

#### III.5.1. Bestimmung des „Core-Proteins“

Um neben den rein rechnerisch bestimmten Daten zur Importsequenz (s. III.1) auch das tatsächlich für die Katalyse notwendige „Core“-Protein bestimmen zu können, wurden Deletionsmutanten erstellt, die den N- und den C-Terminus der HCS betreffen. Hierzu wurden durch PCR mit unterschiedlichen Oligonukleotiden (s. Tabelle 5 und VII) Teilstücke der HCS-Gens amplifiziert, die jeweils eine *NcoI*-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *HindIII*-Schnittstelle am 3'-Ende besitzen. Die jeweiligen Teilstücke wurden anschließend in den Vektor pPCR-Script ligiert, in *E. coli* XL1-Blue transformiert und auf ihre Richtigkeit hin durch DNS-Minipräparation und anschließender Restriktionsanalyse mit *NcoI* und *HindIII* überprüft. Ein entsprechender Klon wurde in präparativem Maßstab angezogen und die isolierte DNS wurde präparativ mit den oben genannten Restriktionsenzymen verdaut und auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Das Fragment mit der PCR-amplifizierten HCS-Teilsequenz wurde nun aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Nach einer anschließenden Ligation in den ebenfalls mit *NcoI* und *HindIII* verdauten Vektor pQE60 wurde die DNS in *E. coli* XL 1 transformiert und nachfolgend wie oben beschrieben auf ihre Richtigkeit überprüft. Die Mutante 87-S377A wurde durch zielgerichtete Mutagenese nach dem in II.3.3.14 und III.5.2.2 beschriebenen Verfahren erzeugt.

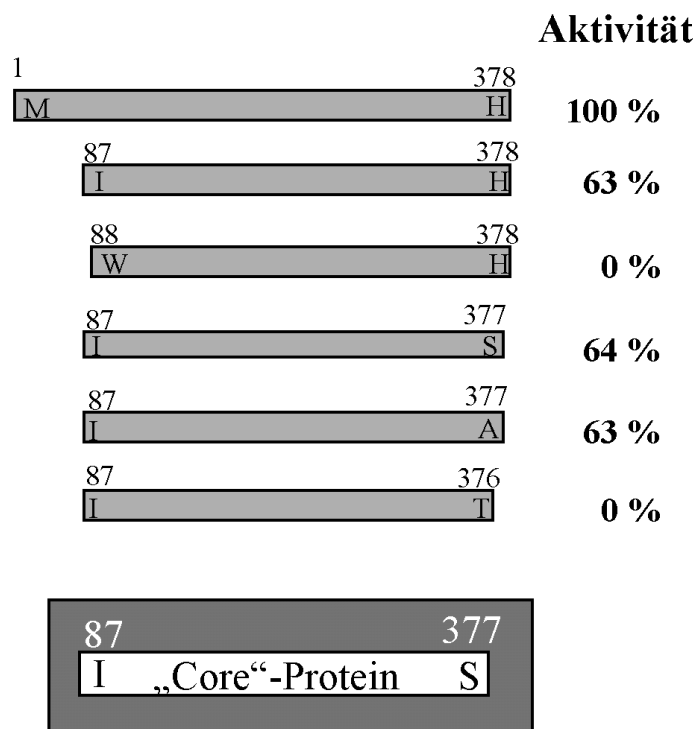
**Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung der angeführten Deletionsmutanten**

Die genaue Sequenz der Oligonukleotide im Anhang VII.1 zu finden.

Enzym von AS X bis Y	Oligo 5' Ende	Oligo 3' Ende
1-378 (Volllänge)	HCS 22	HCS 29
87-378	HCS 105	HCS 29
88-378	HCS 106	HCS 29
87-377	HCS 105	HCS 41
87-S377A	HCS 105	HCS 46
87-376	HCS 105	HCS 47



Die Konstrukte wurden in den Überexpressionsstamm SG13009 transformiert und die verkürzten HCS-Varianten überexprimiert. Nach einem enzymatischen Zellaufschluß konnte das Gesamtprotein in den Standard-Enzymtest eingesetzt werden. Die relative Aktivität der Mutanten ist in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33: Enzymatische Aktivität der verkürzten HCS-Varianten**

Die terminalen AS der exprimierten HCS-Teilproteine sind zusammen mit den korrespondierenden Positionen in der Wildtyp-Sequenz angegeben. Das „Core“-Protein entspricht dem Teilenzym mit der minimalen Größe, welches noch > 60% Aktivität aufweist.

Die Präsequenz am N-Terminus konnte ohne Auswirkungen auf die Veresterungsrate entfernt werden. Dies liegt nicht unbedingt auf der Hand, da die Importsequenz wichtig für den Einbau des Enzyms in die Membran und somit für seine Funktionalität verantwortlich sein könnte. Dies ist aber, zumindest in *E. coli*, nicht der Fall. Auch eine Deletion der Aminosäuren 1-86 ergab nur eine um ca. 40% eingeschränkte Aktivität. Wurden allerdings 87 AS vom N-Terminus abgeschnitten, so war keine Aktivität mehr zu detektieren. Somit beginnt der essentielle Bereich am N-Terminus bei AS I87 (s. Abbildung 33). Am C-Terminus konnte allerdings nur eine AS (H378) entfernt werden, ohne einen Totalverlust der Aktivität zu bewirken. Wurde S377 ebenfalls deletiert, so war keine Aktivität mehr nachweisbar. Allerdings scheint es nicht per se auf das Serin an dieser Position anzukommen,

sondern nur auf die Länge der Aminosäuren-Kette, da die Mutante S377A immerhin noch 63 % der vollen Aktivität aufweist, was ziemlich genau der Aktivität der Deletionsmutante 87-377S entspricht. Diese Beobachtung dürfte damit zusammenhängen, daß der letzte Membrandurchgang laut Berechnung (s. III.1.4) mit S377 endet. Eine Deletion führt wahrscheinlich zum Verlust der letzten Membrandomäne und somit zum Funktionsausfall, wohingegen H378 ohne Funktion zu sein scheint.

### III.5.2. Bestimmung von für die Katalyse essentiellen Aminosäuren

#### III.5.2.1. Vorversuche mit Hemmstoffen

Um erste Anhaltspunkte für essentielle Aminosäuren in einem Enzym zu erhalten werden oft Tests mit für bestimmte Aminosäuren spezifischen Hemmstoffen durchgeführt. So wurde die Inaktivierung der Leber-Prenyltransferase nach Inkubation mit Phenylglyoxal von Barnard und Popjak (1980) als die Anwesenheit eines essentiellen Arginins interpretiert. Für die HCS wurde die Hemmung durch Diacetyl das spezifisch an Arginin bindet, (Riordan *et al.*, 1977) und N-Phenylmaleinimid (NPM), das spezifisch an Cystein bindet, (Pradier *et al.*, 1989) (s. Abbildung 34) untersucht.

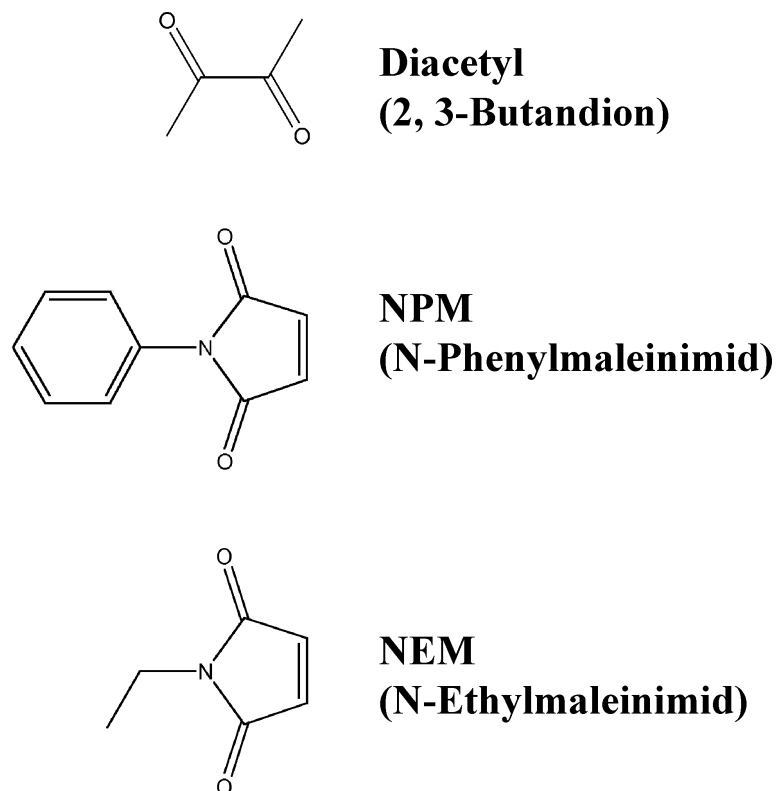
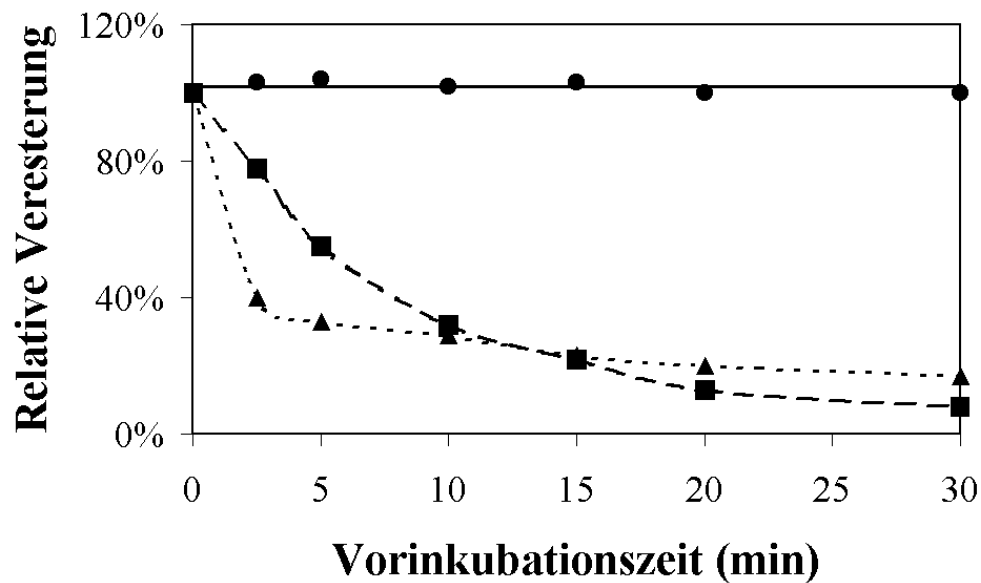


Abbildung 34: Strukturformeln der verwendeten Hemmstoffe Diacetyl, NPM und NEM

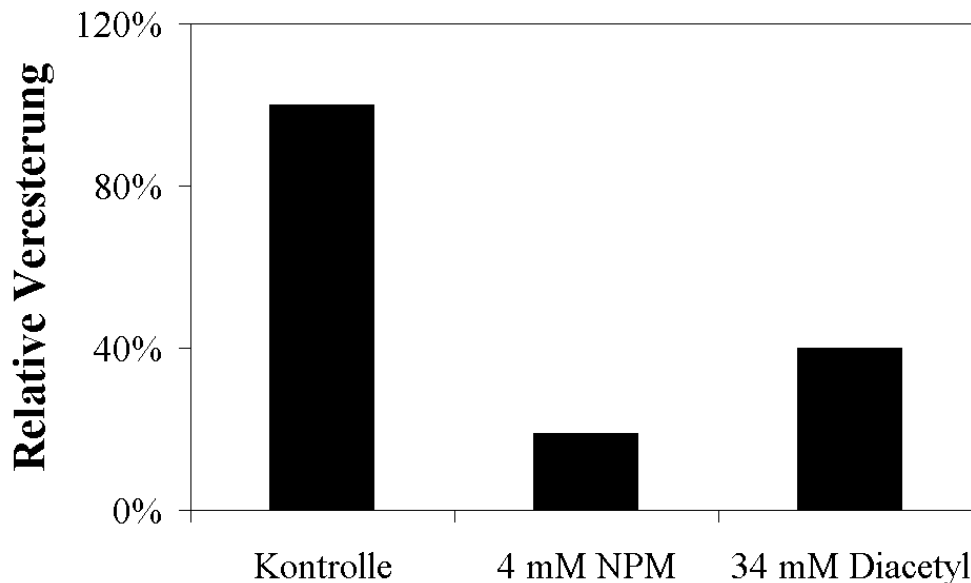
Die Effizienz der verschiedenen Inhibitoren wurde durch verschieden lange Inkubation der HCS mit den Hemmstoffen bestimmt. In Abbildung 35 ist der Verlauf der Inhibition nach verschiedenen Inkubationszeiten aufgeführt.



**Abbildung 35: Inhibition der HCS durch Diacetyl (▲) und NPM (■) im Vergleich zum unbehandelten Enzym (●)**

3 mg *E. coli* Gesamtlisat mit überproduzierter HCS wurden 2,5; 5; 10; 15; 20 und 30 min mit 34 mM Diacetyl, 4 mM NPM bzw. 50 mM HEPES (pH 8,0) (Kontrolle) vorinkubiert. Anschließend folgte ein Standard-Enzymtest. Auf der Y-Achse ist die Veresterung relativ zur Positiv-Kontrolle aufgetragen.

Die Hemmung durch Diacetyl trat sehr viel schneller auf als die mit NPM. So ergab die Inkubation mit Diacetyl schon nach 2,5 min eine Hemmung von 60 %. Dieser Grad der Hemmung wurde bei NPM erst nach 10 min Inkubation beobachtet. Da für beide Hemmstoffe die maximale Inhibition nach 30 min Inkubationszeit erreicht ist, wurde für weitere Tests standardmäßig diese Inkubationszeit verwendet. Aus diesen Versuchen konnte abgeleitet werden, daß sich in der HCS sowohl mindestens ein essentielles Arginin, als auch mindestens ein essentielles Cystein befinden sollten. Um die Relevanz dieser Ergebnisse auch auf das native Protein aus Hafer übertragen zu können, wurden die Hemmstofftests zusätzlich mit Etioplasten aus *A. sativa* durchgeführt (s. Abbildung 36), welche durch mehrfache Einfrier-Auftau-Zyklen aufgebrochen worden waren. Auch hier erzielte man sowohl mit Diacetyl als auch mit NPM eine Hemmung der Ausgangsaktivität um 80 bzw. 60 %.



**Abbildung 36: Inhibition der aus lysierten Hafer-Etioplasten gewonnenen HCS durch Diacetyl bzw. NPM**

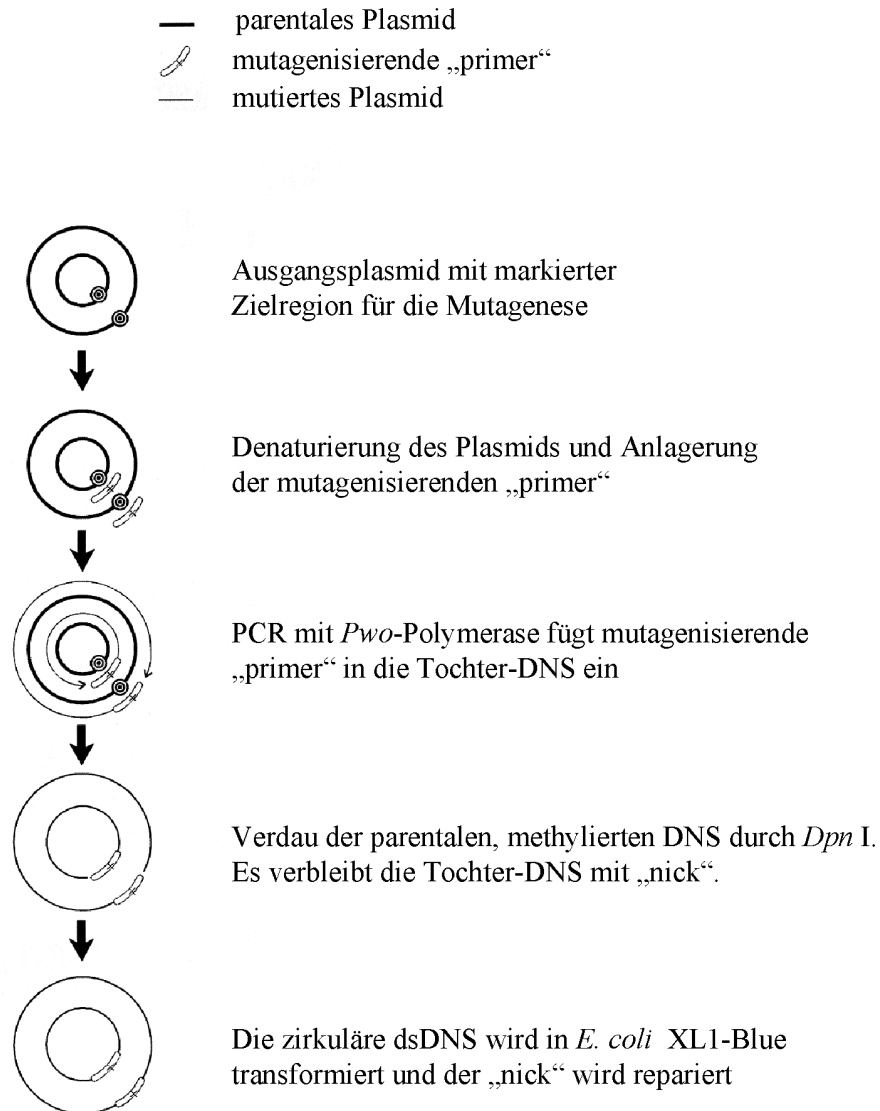
1 mg Etioplasten-Gesamtprotein wurde 30 min mit 4 mM NPM, 34 mM Diacetyl bzw. 50 mM HEPES (pH 8,0) (Kontrolle) vorinkubiert. Anschließend wurde ein Standard-Enzymtest durchgeführt. Die Höhe der Balken zeigt die Veresterung relativ zur Kontrolle.

### III.5.2.2. Prinzip der zielgerichteten Mutagenese

Da durch Untersuchungen mit Hemmstoffen nicht immer zuverlässige Resultate zu erhalten waren und da keine Aussagen darüber gemacht werden können, welches Arginin oder Cystein die essentielle Rolle spielt, boten sich für das weitere Vorgehen Punktmutationen an.

Für die zielgerichtete Mutagenese von Plasmiden gibt es aber mittlerweile viele unterschiedliche Verfahren. Das Prinzip der *in-vitro*-Mutagenese, welche im Rahmen dieser Dissertation auf die HCS adaptiert und angewandt wurde (s. II.3.3.14), ist mit einer Ausbeute an richtigen Mutanten von 100 % sehr zuverlässig und zugleich zeitsparend (s. Abbildung 37): Für das Plasmid mit dem zu mutierenden Gen (pQE60-HCS) werden Oligonukleotide erstellt, welche die gewünschte Mutation enthalten und zueinander exakt komplementär sind. Diese Oligonukleotide werden in eine PCR mit dem Ausgangsplasmid als Matrize eingesetzt, so daß Tochter-Stränge, mit der gewünschten Mutation gebildet werden. Diese sind, im Gegensatz zu den parentalen DNA-Strängen nicht methyliert. In den meisten *E. coli* Stämmen wird die synthetisierte DNA hingegen *dam* methyliert. Durch Behandlung des PCR-Ansatzes mit *DpnI*, welches ausschließlich methylierte oder hemimethylierte DNA schneidet, wird die parentale Plasmid-DNA fragmentiert. Da *DpnI* nur eine tetramere

Erkennungssequenz besitzt (GA↓TC), ist die Wahrscheinlichkeit nahezu 100 %, daß jedes parentale Plasmid zumindest linearisiert wird und so nicht funktionell in *E. coli* transferiert werden kann.



**Abbildung 37: Schema der zielgerichteten Mutagenese**

Nach der Restriktion mit *Dpn*I erfolgt ein Transfer in ultrakompetente Zellen (Effizienz  $> 10^9$  Zellen pro  $\mu\text{g}$  eingesetztem Plasmid), da die Transformationseffizienz durch den „nick“, welcher durch die PCR entsteht, stark verringert ist. Durch dieses Prinzip wurden alle nachstehend beschriebenen Mutationen eingeführt.

### III.5.2.3. Essentielle Arginine

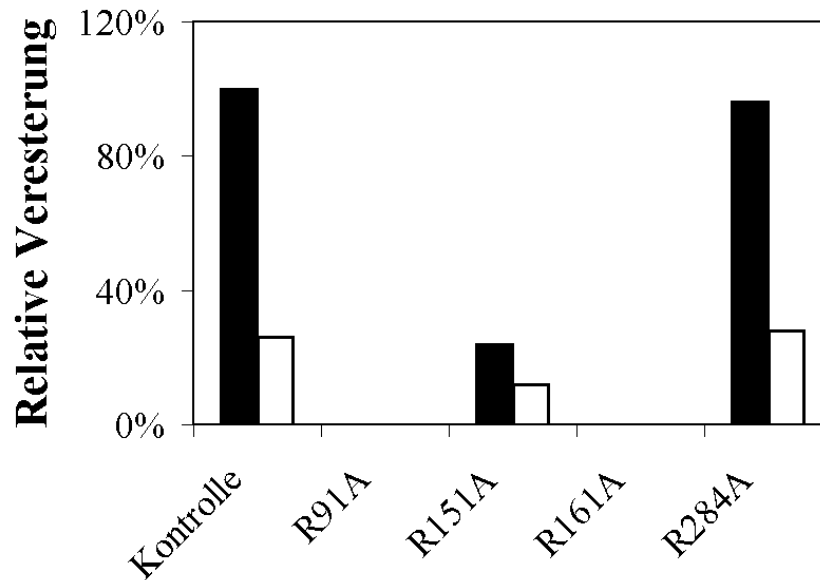
Basierend auf den Hemmstoffversuchen mit Diacetyl, welche erste Hinweise auf essentielle Arginin-Reste in der HCS ergeben haben (s. III.5.2.1), wurden alle vier Arginine des „Core“-Enzyms (s. III.5.1) einzeln durch *in-vitro*-Mutagenese (s. II.3.3.14, III.5.2.2) in Alanin umgewandelt, um ihre Relevanz für die Aktivität zu überprüfen. Die hierzu verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 6 bzw. die genaue Sequenz in VII.1 abgebildet.

**Tabelle 6: Oligonukleotide für den gerichteten Austausch der Arginin-Reste des „Core“-Enzyms gegen Alanin**

Die genaue Sequenz der Oligonukleotide und die Sequenz der Mutanten ist im Anhang VII.1 und VII.2 zu finden.

Mutation	Oligo-Paar
R91A	HCS 107 / HCS 108
R151A	HCS 62 / HCS 63
R161A	HCS 74 / HCS 75
R284A	HCS 109 / HCS 110

Die Veresterungsrate der erhaltenen Mutanten ist in Abbildung 38 mit schwarzen Balken dargestellt. Wie man erkennen kann, sind R91 und R161 essentiell für die Reaktion. R151 hat noch eine Restaktivität von ca. 25 % und dürfte somit keine bedeutende Rolle in der Substrat-Umsetzung spielen. R284 ist nicht notwendig für die Enzymaktivität. Durch Behandlung der Mutanten mit Diacetyl (Abbildung 38, weiße Balken) konnte gezeigt werden, daß die Bindung von Diacetyl und die daraus resultierende Hemmung des Enzyms im Fall der HCS-Varianten mit Austausch an den nicht-essentiellen Positionen, wie erwartet, immer noch vorhanden war. Somit muß Diacetyl an R91 und / oder R161 binden.



**Abbildung 38: Aktivität der Arginin-Mutanten mit und ohne Diacetyl-Vorinkubation**

Die vier Arginin-Reste des „Core“-Proteins wurden durch *in-vitro*-Mutagenese in Alanin umgewandelt. In einem anschließenden Standardenzymtest wurden die Mutanten auf ihre Aktivität hin überprüft (schwarze Balken). Zusätzlich wurden die Mutanten mit 34 mM Diacetyl vorinkubiert und anschließend ihre Aktivität im Standardenzymtest bestimmt (weiße Balken).

Die beiden essentiellen Arginin-Reste R91 und R161 werfen die Frage auf, ob an dieser Stelle ein Arginin benötigt wird oder nur eine positive Ladung, z. B. für die Aufrechterhaltung des Ladungsgefälles zur Determinierung der Membraninnen- bzw. -außenseite oder die Interaktion mit einem der Substraten bzw. die Katalyse, vonnöten ist.

**Tabelle 7: Oligonukleotide für den Austausch der Arginin-Reste R91 und R161 zu Lysin bzw. Histidin**

Die genaue Sequenz der Oligonukleotide und die Sequenz der Mutanten sind im Anhang VII.1 und VII.2 zu finden. Die angegebene Aktivität stellt das Verhältnis von gebildetem Chl zu zugegebenem Chlid dar.

Mutation	Oligo-Paar	Aktivität
R91K	HCS 115 / HCS 116	10 %
R91H	HCS 117 / HCS 118	30 %
R161K	HCS 119 / HCS 120	34 %
R161H	HCS 121 / HCS 122	1 %



Um diese Frage zu klären wurden jeweils zwei weitere Mutanten hergestellt: R→K und R→H. Die hierzu verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 7 aufgeführt. Wie Tabelle 7 weiter zu entnehmen ist, kann an beiden Positionen zumindest entweder Lysin oder Histidin die Funktionalität des Enzyms bis zu einem gewissen Grad aufrechterhalten.

#### III.5.2.4. Essentielle Cysteine

Die Hemmung von Enzymen durch Thiol-modifizierende Reagenzien (z. B. NEM, NPM) wird oft als Hinweis auf in die Enzymreaktion involvierte Cysteine gewertet. Die Ergebnisse, die mit der HCS in Bezug auf essentielle Cysteine gewonnen werden konnten, gehen aber nicht in diese Richtung.

Aufgrund der Hemmung der HCS durch NPM (s. III.5.2.1), wurden alle fünf Cysteine des „Core“-Enzyms (s. III.5.1) durch Punktmutationen einzeln gegen Alanin ausgetauscht. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8 aufgeführt.

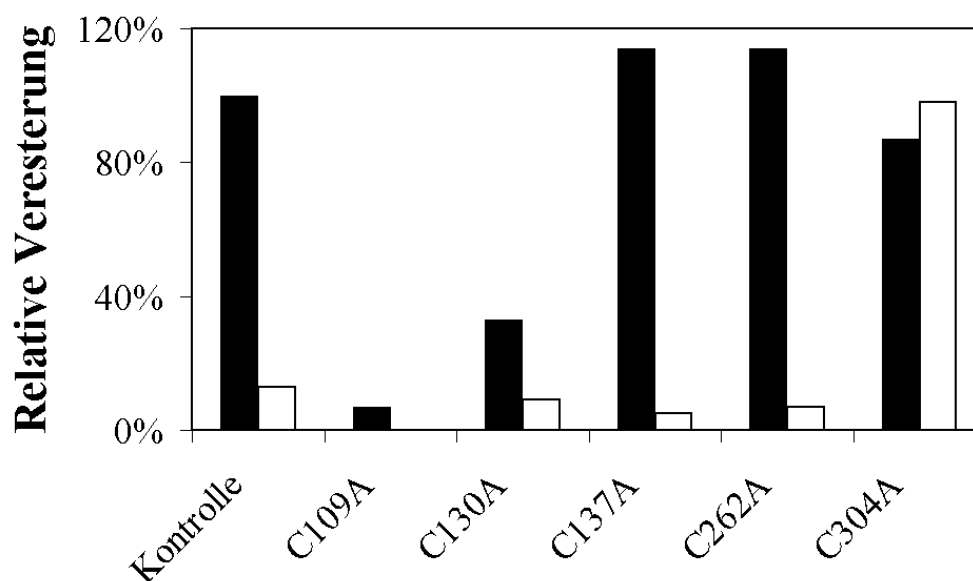
**Tabelle 8: Oligonukleotide für den Austausch der Cysteine des „Core“-Enzyms gegen Alanin**

Die genaue Sequenz der Oligonukleotide und die Sequenz der Mutanten sind im Anhang VII.1 und VII.2 zu finden.

Mutation	Oligo-Paar
C109A	HCS 52 / HCS 53
C130A	HCS 50 / HCS 51
C137A	HCS 94 / HCS 95
C262A	HCS 96 / HCS 97
C304A	HCS 54 / HCS 55

Die Mutanten wurden in einem Standardzymtest auf ihre Aktivität getestet. Die jeweilige Veresterungsrate ist in Abbildung 39 (schwarzer Balken) zu sehen. Hieraus ist zu erkennen, daß C109, welches als einziges Cystein in allen (Bakterio-) Chlorophyll Synthesen konserviert ist, das einzige für die Aktivität entscheidende Cystein mit einer Restaktivität von unter 10 % im Fall seines Austausches gegen Alanin ist. Die HCS mit dem Austausch C130A hat noch eine eingeschränkte Aktivität von < 40 %. Die drei restlichen Cysteine im „Core“-Protein sind für die Veresterung nicht notwendig.

Durch eine Vorinkubation der Mutanten mit NPM ergab sich allerdings noch ein unerwartetes Ergebnis, welches die Grundintuition der Hemmstofftests in Frage stellt: Es fällt auf, daß alle Mutanten noch von NPM gehemmt werden, außer der mit der Mutation an Position 304 (s. Abbildung 39, weiße Balken), obwohl dieser Cystein-Rest für die Reaktion nicht erforderlich ist. Was folgt hieraus? C304 muß das einzige Cystein in der HCS sein, an welches NPM bindet und durch dessen Modifikation zugleich eine Hemmung der Enzymaktivität auftritt, obwohl C304 nicht essentiell für die Funktionalität ist. Der eigentliche Erwartungshorizont wäre gewesen, daß die Hemmung des Enzyms durch Bindung von NPM an C109 auftritt. Wie kommt die Hemmung dann zustande? Eine Erklärung wäre, daß NPM, nachdem es an C304 gebunden hat, durch seine Größe eine sterische Hemmung auslöst, d. h. eines der beiden Substrate kann nicht mehr in seine Bindungstasche gelangen, da NPM den Eingang versperrt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, daß das Enzym durch die Bindung von NPM an C304 eine Konformationsänderung durchmacht. In diesem Fall wäre das aktive Zentrum der HCS vermutlich zerstört.

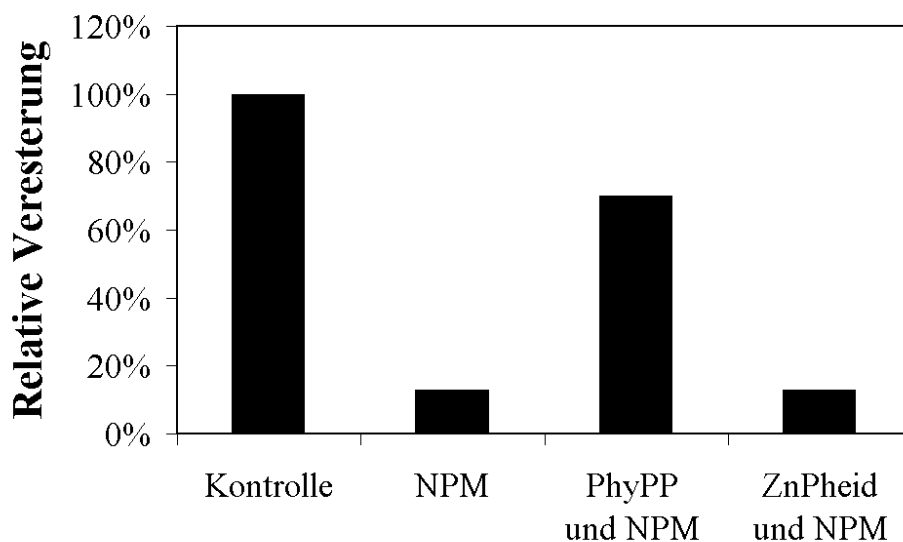


**Abbildung 39: Aktivität der Cystein-Mutanten mit und ohne NPM-Vorinkubation**

Die Cystein-Reste des „Core“-Proteins wurden durch *in-vitro*-Mutagenese in Alanin umgewandelt. In einem anschließendem Standardenzymtest wurden die Mutanten auf ihre Aktivität hin überprüft (schwarze Balken). Zusätzlich wurden die Mutanten mit 4 mM NPM vorinkubiert und anschließend ihre Restaktivität bestimmt (weiße Balken).

Um den blockierten Bereich der HCS noch stärker einzuschränken und so vielleicht die hemmende Wirkung zu verlieren, wurde der Versuch mit dem kleineren NEM

(s. Abbildung 34), welches ebenfalls spezifisch an Cystein-Reste bindet, wiederholt. Das Aktivitätsmuster der Mutanten blieb jedoch das gleiche: Auch hier war im Fall der C304 Mutation, im Gegensatz zu den anderen Cystein-Mutanten, keine Hemmung zu beobachten (Abbildung 39). Die sterische Blockade des Zugangs zum aktiven Zentrum hängt also nicht nur von dem großen Phenylrest des NPM ab, sondern muß spezifischer sein. Um nun genauere Informationen über das Substrat, welches am Zugang zu seiner Bindetasche gehemmt wird, zu erhalten, wurden Vorinkubationstests in Gegenwart von jeweils einem der beiden Substrate durchgeführt. Wie in Abbildung 40 zu erkennen ist, konnte die Wirkung von NPM durch Vorinkubation mit PhyPP um ca. 60 % herabgesetzt werden, wohingegen die Vorinkubation mit ZnPheid keinen Schutz des Enzyms zur Folge hatte. ZnPheid, das Zn-Derivat des Chlid, wurde aufgrund seiner größeren chemischen Stabilität gewählt, damit ein Abbau des Substrats während der Vorinkubationszeit ausgeschlossen werden konnte. Zugleich wurde die Stabilität beider Substrate durch 60-minütige Vorinkubation des Enzyms und einen anschließenden Enzymtest sichergestellt (Daten nicht gezeigt). Somit scheint NPM den Zugang zur Bindetasche von PhyPP zu versperren. Diese Wirkung des Hemmstoffs kann aber durch vorherige Zugabe von PhyPP reduziert werden.



**Abbildung 40: Einfluß von PhyPP und ZnPheid auf die Hemmung der HCS durch NPM**

3 mg *E. coli* Gesamtlisat mit überproduzierter HCS wurden 20 min entweder nur mit 50 mM HEPES (pH 8,0) bzw. mit 360 µM PhyPP oder mit 6 µM ZnPheid vorinkubiert. Anschließend folgte eine 30 min lange Vorinkubation mit 4 mM NPM. Der Start des Enzymtests erfolgte durch Zugabe des jeweils fehlenden Substrats. Die Aktivität wurde durch einen Standardenzymtest überprüft.

Dieses Ergebnis gibt auch einen weiteren Hinweis darauf, daß sich der Zugang zur Bindungstasche, zumindest für PhyPP / GGPP, laut dem Topologiemodell (s. III.1.4) auf der Stroma-Seite der Thylakoidmembran befindet. Dies stimmt sehr gut mit den Erkenntnissen aus den Sequenzvergleichen mit anderen Polyprenyl-Transferasen überein, nach denen die postulierte PhyPP-Bindestelle zwischen N146 und E170 liegt (s. III.1.5).

### III.5.2.5. Weitere untersuchte Aminosäuren aus konservierten Bereichen

#### III.5.2.5.1. Aminosäuren der postulierten Pyrophosphat-Bindestelle

Um nähere Kenntnisse über die postulierte Bindung des Pyrophosphats über Magnesium an den Oligo-Aspartat-Bereich (s. III.1.5) zu erhalten, wurden die zwischen den verschiedenen (B)CS konservierten Aspartat-Reste und ein konserviertes Asparagin im Bereich zwischen AS 146 und 170 durch zielgerichtete Mutagenese in Alanin umgewandelt. Die Oligonukleotide, welche für die jeweilige Mutagenese verwendet wurden, sind in Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 9: Oligonukleotide für den Austausch der konservierten Aspartat-Reste und des Asparagins im Bereich zwischen AS 138 und 160**

Die genaue Sequenz der Oligonukleotide und die Sequenz der Mutanten sind im Anhang VII.1 und VII.2 zu finden. Die angegebene Aktivität stellt das Verhältnis von gebildetem Chl zu zugegebenem Chlid dar.

Mutation	Oligo-Paar	Aktivität
N146A	HCS 123 / HCS 124	0 %
D147A	HCS 125 / HCS 126	0 %
D150A	HCS 127 / HCS 128	0 %
D154A	HCS 129 / HCS 130	0 %

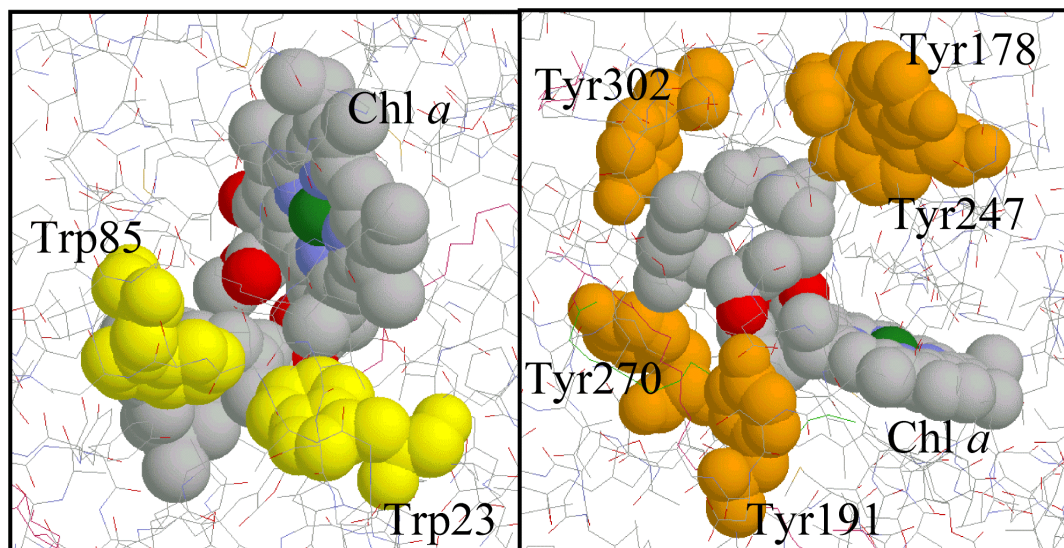
Wie zu erkennen ist, sind alle mutierten AS für die Aktivität der HCS essentiell. Zusammen mit den Erkenntnissen aus den Sequenzvergleichen mit anderen Polyprenyltransferasen (s. III.1.5) liegt die Interpretation nahe, daß sich in diesem Bereich das aktive Zentrum befindet.

### III.5.2.5.2. *Essentielles Histidin*

In den meisten bisher untersuchten Fällen stellt Histidin den axialen Liganden am Metallatom in Porphyrinen dar (z. B. Eisen: Ishikawa et al. (1998), Magnesium: Mac *et al.* (1996)). In der Chlorophyll Synthase liegt genau ein Histidin im „core“-Protein (H197). Ob dieses Histidin aber an der Bindung des Chlorophylls beteiligt ist, scheint zweifelhaft, da es im Thylakoid-Lumen liegt und bisherige Erkenntnisse das aktive Zentrum auf der Stroma-Seite vermuten lassen. Trotzdem hatte die Mutante H197A (Oligonukleotide: HCS 60 / HCS 61) nur mehr eine Aktivität von 2 % Veresterung gegenüber dem Wildtyp. Das könnte einerseits daran liegen, daß H197 auf der lumenzugewandten Seite eine essentielle positive Ladung in das Enzym einführt oder daß durch das Austauschen von Histidin gegen Alanin die gesamte Struktur der HCS verändert wird und somit auch das aktive Zentrum, was die Veresterungsrate gegen Null gehen ließe.

### III.5.2.5.3. *Aromatische Aminosäuren*

Tyrosin und Tryptophan sind oftmals in die Chlorophyll-Bindung involviert (s. Abbildung 41). Sie binden im Gegensatz zu Histidin meist am hydrophoben Phytylrest oder stabilisieren den Tetrapyrrolring.



**Abbildung 41:** Schematische Darstellung der Positionen von Tryptophan (links) bzw. Tyrosin (rechts) im Verhältnis zu Chl a im Peridinin-Chlorophyll Protein (1ppr in der Brookhaven Datenbank)

Die Tryptophan- bzw. Tyrosin-Reste sind mit ihrer Positionsnummer in der Aminosäurekette versehen, wobei der linke Teil der Illustration aus Kette O herausvergrößert ist und der rechte Teil aus Kette N. Die Abbildung wurde mit Raswin Molecular Graphics Version 2.6 erstellt.

In der Chlorophyll Synthase konnten drei der konservierten Tryptophan- bzw. Tyrosin-Reste (Mutation gegen Phenylalanin, um die Struktur der HCS möglichst zu erhalten) durch Punktmutagenese als essentiell detektiert werden (s. Tabelle 10).

**Tabelle 10: Oligonukleotide für den Austausch der konservierten aromatischen Aminosäuren und Aktivität dieser Mutanten**

Die genaue Sequenz der Oligonukleotide und die Sequenz der Mutanten sind im Anhang VII.1 und VII.2 zu finden. Die angegebene Aktivität stellt das Verhältnis von gebildetem Chl zu zugegebenem Chlid dar.

Mutation	Oligo-Paar	Aktivität
Y204F	HCS 84 / HCS 85	2 %
Y214F	HCS 86 / HCS 87	50 %
Y216F	HCS 92 / HCS 93	50 %
Y238F	HCS 88 / HCS 89	57 %
W243A	HCS 66 / HCS 67	1 %
Y264F	HCS 90 / HCS 91	19 %
W302A	HCS 80 / HCS 81	0 %

#### III.5.2.5.4. Aminosäuren des konservierten Bereichs zwischen AS 275-284

Neben dem stark konservierten Bereich, der in Kapitel III.5.2.5.1 behandelt wurde, fällt beim Betrachten des „Multialignments“ der (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen (s. III.1) eine weitere stark konservierte Region in den Sequenzen auf: Der Bereich zwischen N275 und R284. Da, wie in Kapitel III.5.2.5.2 beschrieben ist, das Histidin 197 kaum für die Bindung des Mg-Zentralatoms im Chl in Frage kommt, könnte diese Rolle einem der beiden konservierten Aspartat-Reste in dem oben genannten Bereich zufallen. Aspartat übernimmt z. B. im Lichtsammel-Komplex II von Purpur-Bakterien (B800 in *Rhodospirillum rubrum*, Koepke *et al.*, 1996) die Bindung des Mg-Atoms im Chl über den Sauerstoff in  $\delta$ -Stellung. Die drei Mutationen, die im Bereich zwischen N275 und R284 eingeführt wurden, sind in Tabelle 11 abgebildet.

Wie durch die strikte Konservierung durch alle (B)CS hindurch zu erwarten war, sind alle drei untersuchten Aminosäuren essentiell für die Aktivität des Enzyms. Leider konnte bisher

aufgrund fehlender „Screening“-Methoden noch nicht geklärt werden, ob es sich in diesem Bereich tatsächlich um die Chlid-Bindestelle handelt.

**Tabelle 11: Oligonukleotide für den Austausch dreier konservierter AS im Bereich von N275 bis R284**

Die genaue Sequenz der Oligonukleotide und die Sequenz der Mutanten sind im Anhang VII.1 und VII.2 zu finden. Die angegebene Aktivität stellt das Verhältnis von gebildetem Chl zu zugegebenem Chlid dar.

Mutation	Oligo-Paar	Aktivität
N275A	HCS 68 / HCS 69	1 %
D276A	HCS 58 / HCS 59	0 %
K278A	HCS 78 / HCS 79	0 %

### III.5.2.6. Zusammenfassung und schematische Darstellung der induzierten Punktmutationen

Die meisten Aminosäuren, die in den vorhergehenden Kapiteln untersucht wurden und die für die Chlorophyll Synthese Reaktion essentiell sind, liegen im Bereich des Stromas (s. Abbildung 42). Die meisten für die Reaktion notwendigen Aminosäuren liegen zwischen Transmembranbereich II und III (I145-V173) und Transmembranbereich VI und VII (N275-I303) (s. Abbildung 42).

Von den insgesamt 24 untersuchten Aminosäuren, die aus konservierten Bereichen der HCS stammten sind 14 essentiell für die Veresterungsreaktion, 3 sind wichtig für die Chlorophyllbildung und 7 konnten ohne Reaktivitätsverlust ausgetauscht werden (s. Abbildung 42).

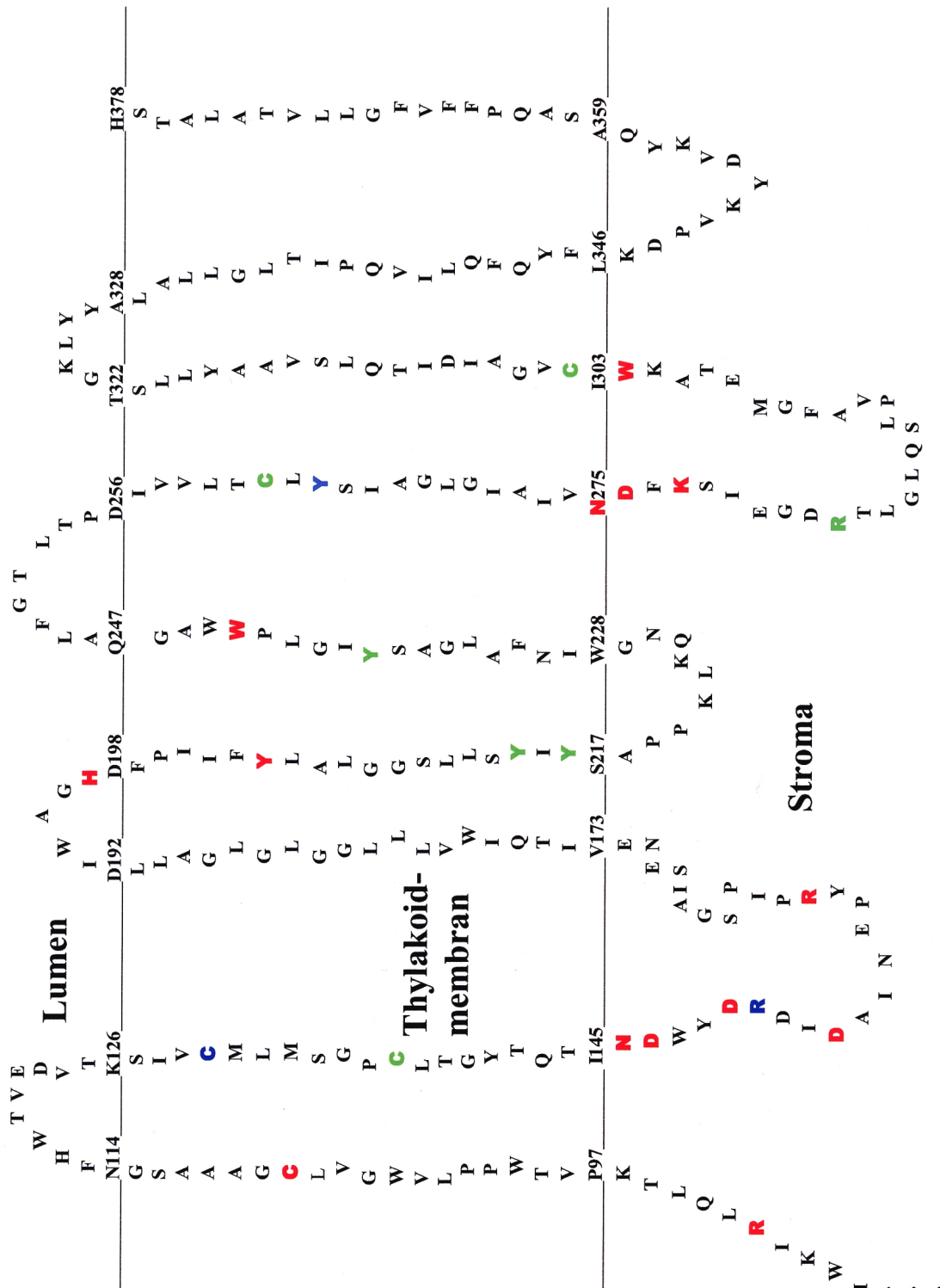


Abbildung 42: Schematische Darstellung der HCS mit mutierten AS und deren jeweiliger Aktivität.

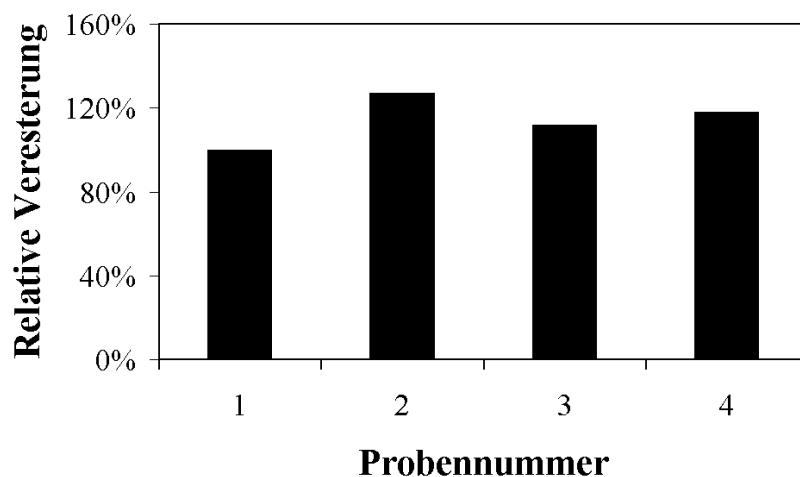
Diese Darstellung der HCS beruht auf den Ergebnissen der Hydrophobizitätsberechnung mit HMMTOP (s. III.1.4). Die Farben stehen für die Aktivität der jeweiligen Mutante: rot = Aktivität < 10 %, blau = Aktivität < 30 %, grün = Aktivität > 30%.



### III.6. Analyse des Reaktionsmechanismus der HCS

#### III.6.1. $Mg^{2+}$ -Abhängigkeit der HCS

Für viele Polyprenyl-Transferasen ist bekannt, daß sie  $Mg^{2+}$  oder  $Zn^{2+}$  für ihre Aktivität benötigen. Zum Zeitpunkt dieser Dissertation war allerdings noch offen, ob die Chlorophyll Synthasen ebenfalls zu dieser Gruppe gehören (Lopez *et al.* 1996). In ersten Versuchen (s. Abbildung 43) wurde der Einfluß von  $Mg^{2+}$  Ionen bzw. von bis zu 12 mM EDTA im Reaktionspuffer auf die Aktivität getestet. Abbildung 43 zeigt, daß weder diese geringen Mengen an EDTA (höhere Mengen würden das Mg im Chlid komplexieren) noch  $Mg^{2+}$  Ionen einen signifikanten Einfluß auf die Veresterungsrate haben.



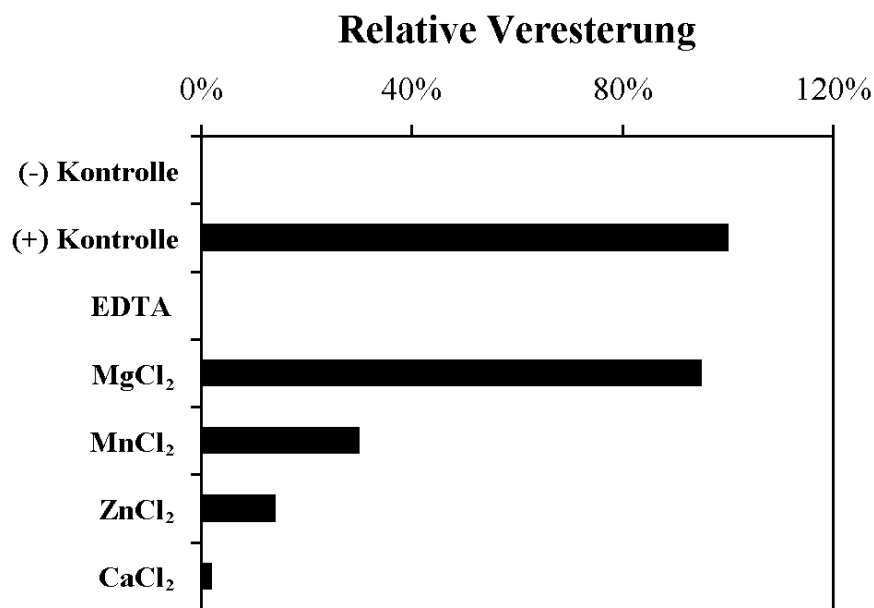
**Abbildung 43: Einfluß von  $Mg^{2+}$  und EDTA auf die Aktivität der HCS**

Der Enzymtest wurde nach Standardvorschrift in den jeweiligen Puffern (s. u.) durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug 45 min. Probennummer **1**: Kontrolle mit SP-Puffer (pH 7,6) entspricht 100 %. **2**: 50 mM HEPES (pH 8,0). **3**: 50 mM HEPES (pH 8,0), 10 mM  $MgCl_2$ . **4**: 50 mM HEPES (pH 8,0), 12 mM EDTA.

Um die Menge an EDTA erhöhen zu können, wurde eine Methode ausgearbeitet, in welcher das zugesetzte EDTA vor dem Enzymtest wieder entfernt wurde, so daß es den Test nicht mehr stören konnte. Hierzu wurden die *E. coli* Membranen mit rekombinanter HCS 30 min in 100 mM EDTA / 50 mM HEPES (pH 8,0) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (16.000 g, 15 min) und der Niederschlag mit 50 mM HEPES (pH 8,0) resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde 4 mal wiederholt. Nun wurden die Membranen wieder in 50 mM HEPES pH 8,0 resuspendiert und auf das ursprüngliche Ausgangsvolumen

gebracht. Jeweils 3 mg Protein wurden dann in einem Standardenzymtest eingesetzt. In diesem Fall war keine Veresterung mehr nachzuweisen (s. Abbildung 44).

Um zu testen, ob das Enzym durch die EDTA-Gabe irreversibel zerstört worden war, oder ob es nur reversibel inaktiviert worden war, wurden Rekonstitutionsversuche mit verschiedenen zweiwertigen Kationen durchgeführt. Hierzu wurde das EDTA-behandelte Enzym für 30 min mit entweder 4 mM  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  oder  $\text{CaCl}_2$  in 50 mM HEPES (pH 8,0) inkubiert und anschließend in einen Standardenzymtest eingesetzt.



**Abbildung 44: Aktivität von EDTA-behandelter HCS nach Inkubation mit zweiwertigen Kationen**

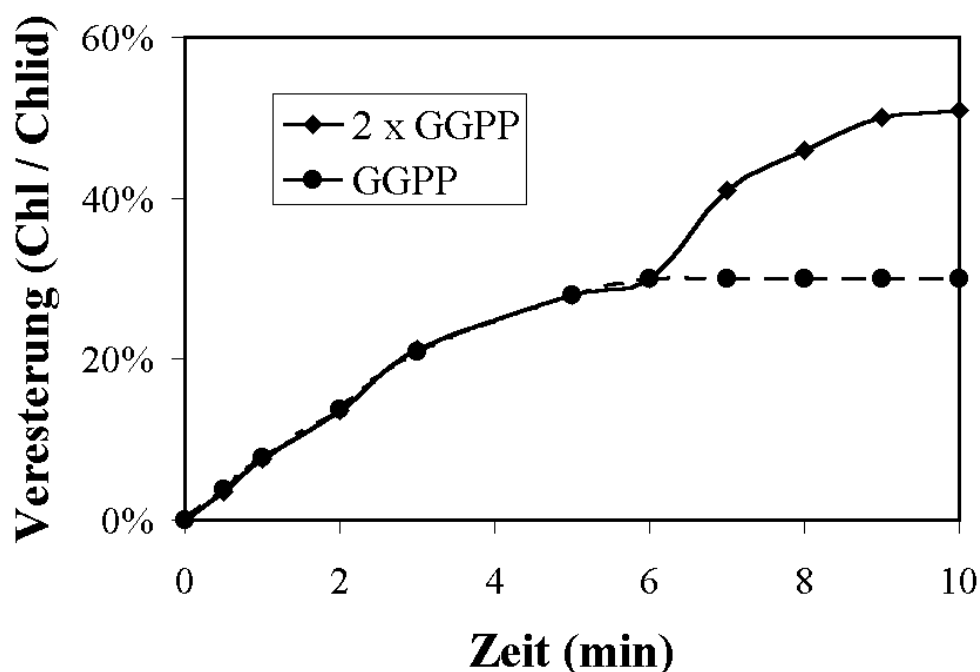
Die (-) **Kontrolle** zeigt die Chl-Bildung ohne HCS. Die (+) **Kontrolle** stellt das Ergebnis eines Standardenzymtests mit 1 nmol Chlid und 90 nmol PhyPP dar. Die Chl-Ausbeute ist gleich 100% gesetzt. Nach einer Behandlung des Enzyms mit 100 mM EDTA (**EDTA**) konnte im anschließenden Enzymtest keine Veresterung mehr festgestellt werden. Die Rekonstitutionsrate nach Inkubation mit jeweils 4 mM der Salze  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$  oder  $\text{CaCl}_2$  für 30 min ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt.

Wie in Abbildung 44 verdeutlicht wird, erreicht die Chlorophyll Synthase nach  $\text{Mg}^{2+}$ -Inkubation im Enzymtest wieder fast die Ausgangsaktivität. Das heißt, das Enzym wurde durch EDTA nicht irreversibel zerstört.  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen konnten die Aktivität der HCS immerhin zu 30 % wiederherstellen.  $\text{Zn}^{2+}$ -Vorinkubation brachte immerhin noch 14 % Veresterung.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen konnten nahezu keine Veresterung bewirken. Dies könnte am größeren Ionenradius (99 pm  $\text{Ca}^{2+}$  zu 72 pm  $\text{Mg}^{2+}$ ) liegen. Somit scheint  $\text{Ca}^{2+}$  nicht mehr genau in die Bindetasche zu passen. Andere chemische Eigenschaften könnten für die sehr niedrige Aktivität mit  $\text{Ca}^{2+}$  aber ebenfalls eine Rolle spielen.

### III.6.2. Enzym-Kinetiken ergeben „Ping-Pong-Mechanismus“

#### III.6.2.1. Vorversuche

Aus der Messung und Auswertung von Enzym-Kinetiken lassen sich oft interessante Rückschlüsse auf Art und Bindung potentieller Hemmstoffe für ein bestimmtes Enzym gewinnen (z. B. kompetitive / nicht-kompetitive Hemmung) oder es können allosterische Interaktionen (z. B. Hämoglobin) untersucht werden. Desweiteren ist es möglich, durch Enzym-Kinetiken Informationen über den Reaktionsmechanismus zu erhalten (Reihenfolge der Substratbindung, Ablauf der Reaktion).



**Abbildung 45: Veresterung von Chlid mit GGPP nach einmaliger bzw. zweimaliger GGPP Zugabe**

In einem Standard-Enzymtest wurden in der Kontrolle (●) zu Beginn der Reaktion 1 nmol Chlid und 20 nmol GGPP (Sigma, Steinheim) zugegeben und der Verlauf der Veresterung nach 0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 und 10 min gemessen. Zum Vergleich wurde in einem weiteren Ansatz nach 5 min Reaktionszeit erneut 20 nmol GGPP zugegeben, wobei zu den gleichen Zeitpunkten Meßwerte genommen wurden (◆).

Auch für die Chlorophyll Synthase wurden die Enzym-Kinetiken analysiert, um Hinweise auf den möglichen Ablauf der Reaktion zu erhalten. Die Chlorophyll Synthase kann sowohl GGPP als auch PhyPP verestern. Um vor allem die Stabilität von GGPP, welches nicht nur im pflanzlichen Stoffwechsel eine Rolle spielt, im bakteriellen Lysat zu untersuchen, wurde Chlid : GGPP in einem Verhältnis 1:20 in einem Enzymtest eingesetzt (s. Abbildung 45).

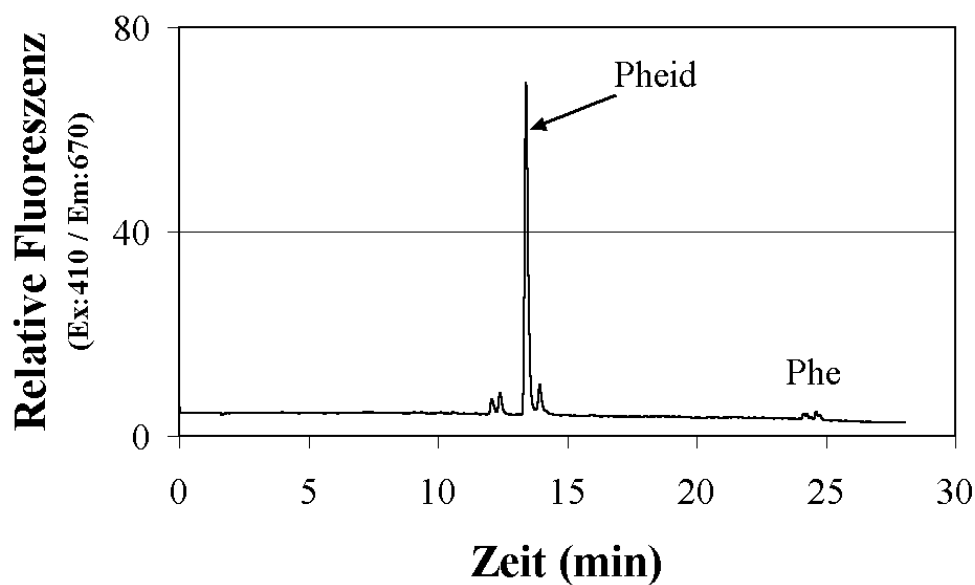
Die Veresterungsrate verläßt schon nach 3-4 min den linearen Bereich, obwohl erst 30 % des Chlid umgesetzt sind. Nach erneuter Zugabe von 80  $\mu$ M GGPP erfolgt ein weiterer Veresterungsschritt bis auf ca. 50 % Veresterung. Das heißt, obwohl ursprünglich der 20-fache Überschuß an GGPP im Verhältnis zu Chlid vorhanden war, wurde es zum limitierenden Faktor. Bei dem gleichen Versuch mit PhyPP erbrachte eine erneute Zugabe von PhyPP nach 5 min keinen erneuten Schub an Veresterung. Das muß bedeuten, daß GGPP im bakteriellen Stoffwechsel umgesetzt werden kann, PhyPP aber nicht. Um dies zu überprüfen, wurde Bakterienlysate 10 min mit 80  $\mu$ M GGPP bzw. PhyPP vorinkubiert. Nach dem Start der Reaktion mit Chlid konnte innerhalb der ersten 10 min bei GGPP-Vorinkubation nur noch eine Veresterung von max. 10 % (im Gegensatz zu den 30 % ohne Vorinkubation) erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Bei der Vorinkubation mit PhyPP konnte ebenso wie ohne Vorinkubation eine Veresterung von ca. 28 % nach 10 min Reaktionszeit gemessen werden (s. auch III.6.3.2). Mit PhyPP liegt die Veresterungsrate auch nach 7 min Reaktion noch im linearen Bereich (s. Abbildung 47).

Für die folgenden Enzym-Kinetiken wurde aus diesem Grund immer PhyPP verwendet.

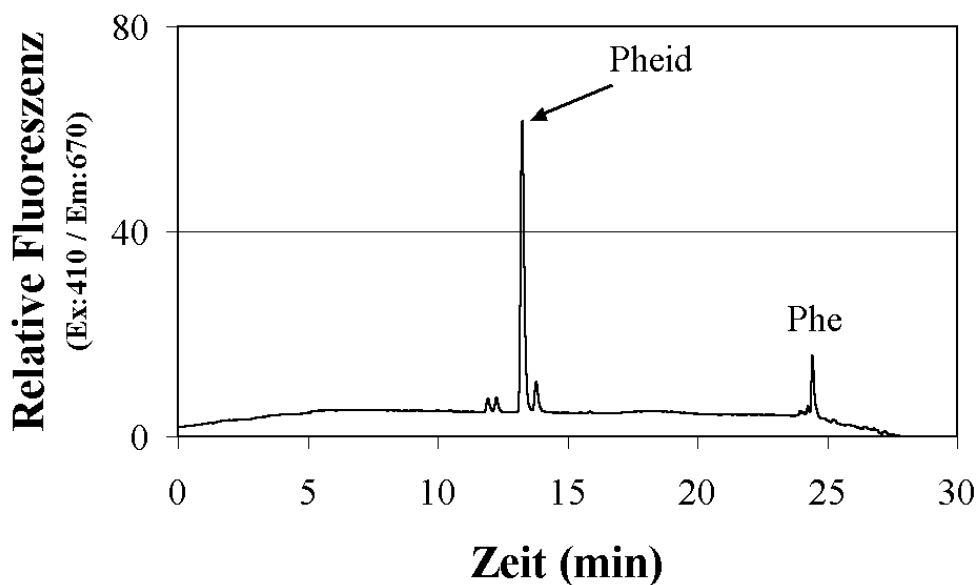
Um vor allem die geringen Chl-Mengen in den frühen Veresterungsphasen möglichst genau messen zu können, wurde in dieser Dissertation ein neues Verfahren zur Chl-Mengen-Bestimmung entwickelt, welches in diesem Bereich empfindlicher ist als das zuvor entwickelte Extraktionsverfahren von Helfrich *et al.* (1994). So liegt bei dem Verfahren nach Helfrich die Nullkontrolle (= Chlid + PhyPP in Bakterienlysate ohne HCS) bei ca. 60 pmol Chl pro 1 nmol zugegebenem Chlid. Wie HPLC-Analysen zeigten, handelt es sich hierbei aber nicht etwa um verestertes Produkt, sondern um kleine Mengen an Chlid, die aufgrund einer nicht vollständigen Trennung bei der Extraktion in die Hexanphase übergehen. Durch das unten vorgestellte HPLC-Verfahren umgeht man dieses Problem.

Der Enzymtest wurde, wie in II.3.5.2 beschrieben, durchgeführt. Die anschließende Bestimmung der Menge an Gesamtpigment und die Durchführung der HPLC-Läufe ist in II.3.5.4 dargelegt. Vor der Analyse der Proben in der HPLC wurden die Pigmente mit HCl behandelt. Hierdurch wurde das Magnesium aus dem Chlid bzw. Chl entfernt; es wurde also zum Pheid bzw. Phe. Die Verwendung von einem leicht sauren Laufmittel (durch Essigsäure) gewährleistet eine gleichmäßig Ladung der Pigmente und unterstützt so die sehr scharfe Auftrennung der einzelnen Pigmente im Elutionsprofil.

(A)



(B)



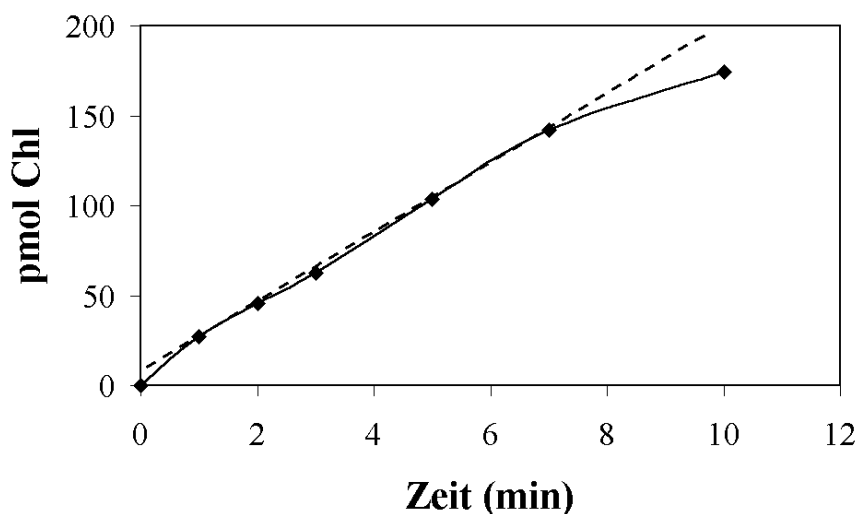
**Abbildung 46: Diagramm zweier typischer HPLC-Läufe zur Analyse der Pigmentverteilung in den Reaktionsansätzen**

Dargestellt ist die Pigmentverteilung eines Enzymtest nach 1 min (A) bzw. nach 7 min (B) Veresterungszeit. Für diese Kinetik wurden  $4,8 \mu\text{M}$  Chlid und  $40 \mu\text{M}$  PhyPP als Substrate zugesetzt.

In einigen Versuchen konnten trotz der HCl Behandlung der Proben vor dem HPLC-Lauf Spuren von Chlid detektiert werden. In diesen Fällen wurde das Verhältnis von Phe zu (Pheid

+ Chlid) berechnet. Durch diese indirekte Art der Berechnung konnten etwaige Pipettierfehler bzw. Unterschiede in der Resuspendierbarkeit der Pigmente vor dem HPLC-Lauf ausgeschaltet werden.

Zur Aufnahme und Auswertung der HPLC-Läufe wurde das Programm Chromstar (SCPA GmbH) Version 4.08 von Hofer Scientific Instruments (San Francisco, CA, USA) verwendet. Durch die Verwendung des in II.3.5.4 beschriebenen HPLC-Programms konnten beide Pigmente (Pheid und Phe) in ein und dem selben Lauf aufgetrennt und analysiert werden. Das erst ermöglicht die Berechnung der Menge an verestertem Pigment aus dem Verhältnis von Phe zu Pheid plus Phe (s. Abbildung 46), welches aus der Fläche der „peaks“ des Elutionsprofils von Chromstar berechnet wurde. Unter Zuhilfenahme der zuvor bestimmten Gesamtmenge an Pigment (s. II.3.5.3) konnte nun die absolute Menge an Phe und damit an gebildetem Chl berechnet werden. Die Mengenbestimmung wurde jeweils nach verschiedenen Reaktionszeiten bestimmt und, wie in Abbildung 47 gezeigt, graphisch dargestellt, so daß der lineare Bereich der Veresterung sichtbar wurde.



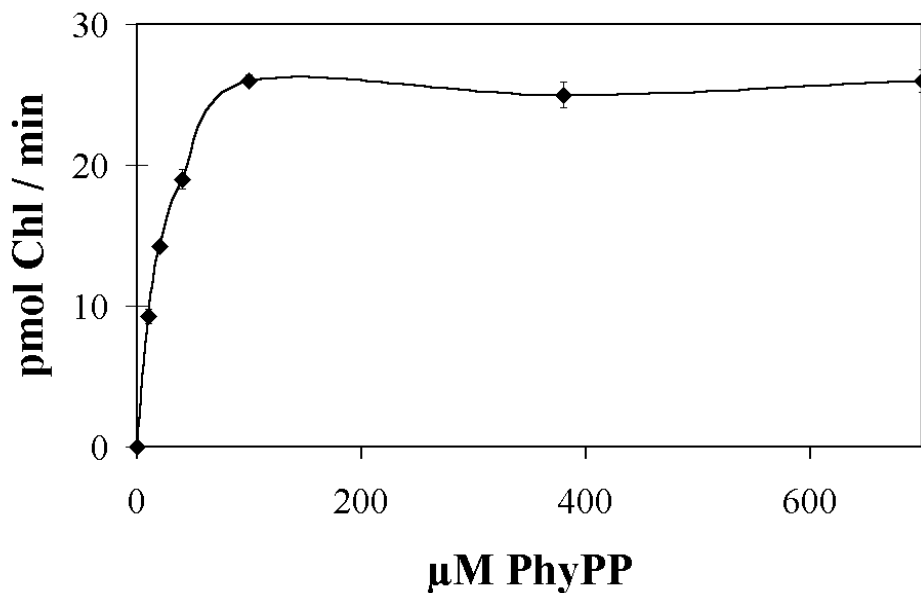
**Abbildung 47: Kinetik der Veresterung von Chlid und PhyPP durch die HCS zwischen 1 und 10 min nach Reaktionsstart**

Aufgetragen ist die Menge an verestertem Chl nach 1, 2, 3, 5, 7 und 10 min. Die Steigung (----) wird aus dem linearen Bereich zwischen 1 und 7 min berechnet. In diesem Beispiel wurden  $4,8 \mu\text{M}$  Chlid und  $80 \mu\text{M}$  PhyPP eingesetzt.

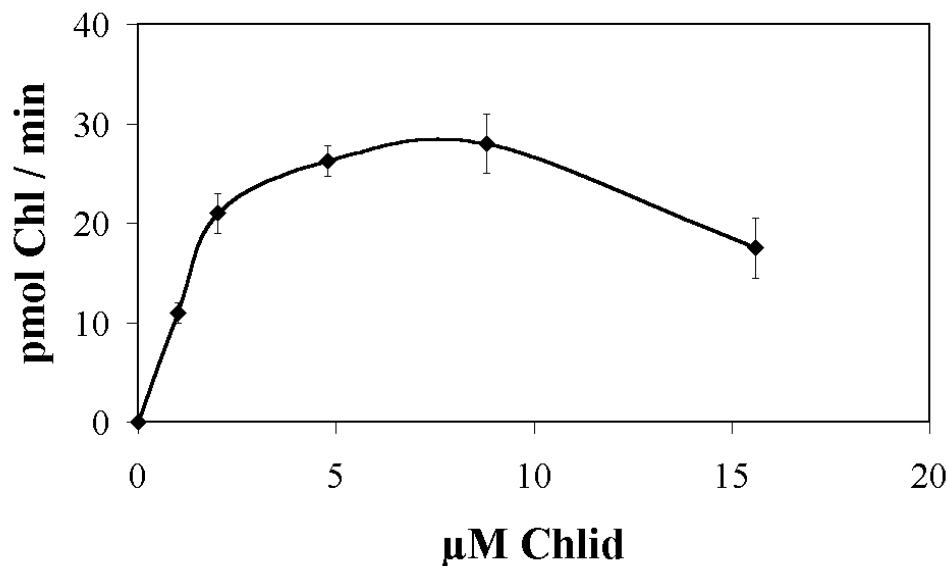
Dieser lineare Bereich zwischen 1-7 min Veresterungszeit wurde für die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit gewählt. Hierzu wurde je Meßpunkt die Geschwindigkeit in

pmol Chl / min berechnet. Auf das Phänomen, daß die Ausgleichsgerade nicht direkt durch den Nullpunkt verläuft, wird in Kapitel III.6.3.2 eingegangen.

(A)



(B)



**Abbildung 48: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit den Substratkonzentrationen**

- (A) Variierende Konzentration an PhyPP bei konstanten 4,8  $\mu\text{M}$  Chlid  
(B) Variierende Konzentration an Chlid bei konstanten 360  $\mu\text{M}$  PhyPP

Vorversuche zur Abhängigkeit der Veresterungsrate von der Substratkonzentration, welche mit der Methode nach Helfrich et al. (1994) durchgeführt wurden, ergaben für PhyPP eine

Standard-Sättigungskurve, für Chlid hingegen eine typische Substrathemmungskurve (s. Abbildung 48). Bisher konnte aber nicht bestätigt werden, ob es sich in diesem Fall wirklich um Substrathemmung handelt. Eine weitere Erklärung könnte nämlich die Aggregatbildung des Chlids darstellen, welche bei Konzentrationen über 10  $\mu\text{M}$  auftritt. Somit würde ein Teil des Substrats aus dem Reaktionsansatz ausfallen und es stände also weniger Substrat für die Veresterungsreaktion zur Verfügung.

Die Maximal-Konzentration der Substrate für die folgenden Enzym-Kinetiken wurde auf 7,6  $\mu\text{M}$  Chlid und 100  $\mu\text{M}$  PhyPP festgelegt.

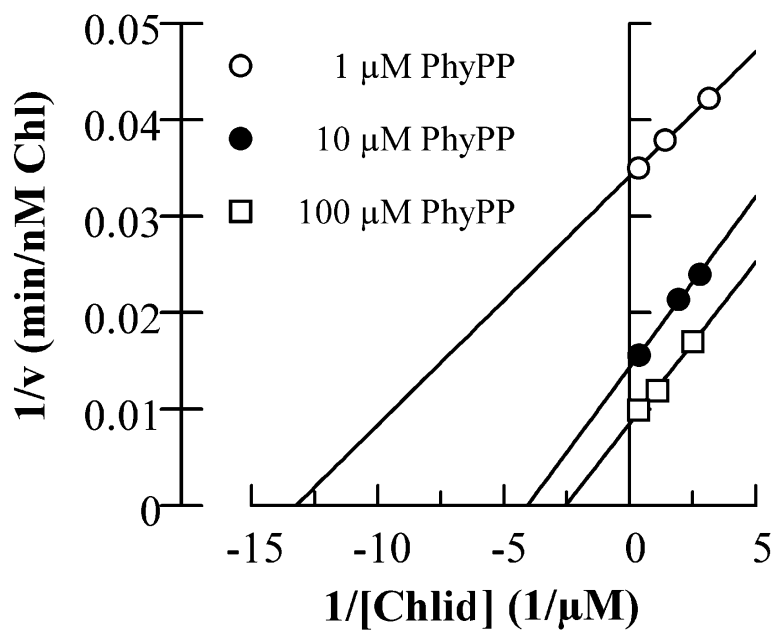
### III.6.2.2. Analyse von Enzym-Kinetiken

Für die HCS wurden Enzym-Kinetiken mit drei konstanten Konzentrationen des einen Substrats (PhyPP: 1, 10, 100  $\mu\text{M}$ , Chlid: 2,4, 4,8, 7,6  $\mu\text{M}$ ) mit verschiedenen Konzentrationen des anderen Substrats (PhyPP: 8-40  $\mu\text{M}$ , Chlid: 0,4-2,4  $\mu\text{M}$ ) bestimmt. Für die Darstellung der Daten im Lineweaver-Burk-Plot wurde der Mittelwert der 5 berechneten Geschwindigkeiten (nach 1, 2, 3, 5 und 7 min) ermittelt. Unterschiedliche Durchschnittsgeschwindigkeiten, die mit verschiedenen Substratkonzentrationen erzielt wurden, wurden mit GraFit, Version 3.01 (Erithacus Software Ltd., Staines, UK) graphisch dargestellt und die Ausgleichsgeraden berechnet. Der „Lineweaver-Burk-Plot“ für diese Enzymtests ist in Abbildung 49 abgebildet.

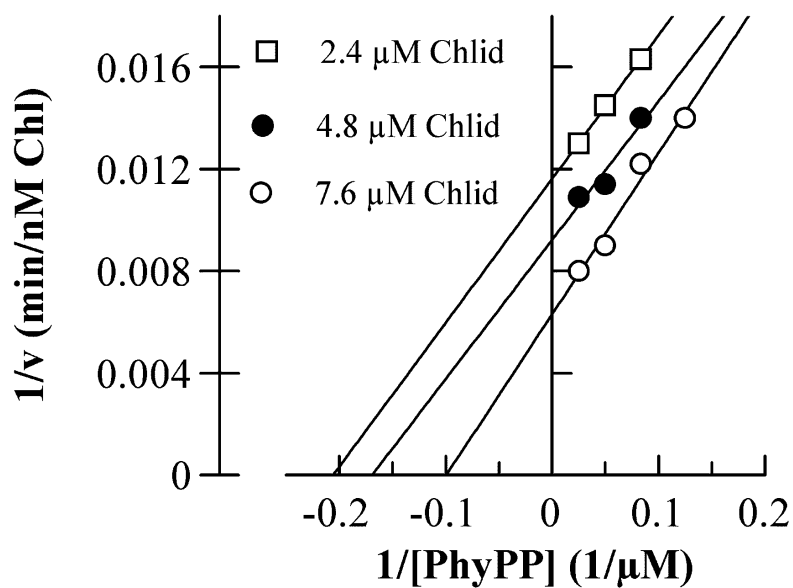
Wie zu erkennen ist, liegen die jeweils 3 Geraden jedes Lineweaver-Burk-Diagramms, die bei Variation der Konzentration des zweiten Substrats erhalten werden, zueinander parallel. Es resultieren sozusagen „unterschiedliche  $K_M$ -Werte“. Bei einer sequenziellen Kinetik würde man erwarten, daß sich die Geraden, bestimmt unter verschiedenen Substratkonzentrationen, in ihrer Steigung unterscheiden und in einem Punkt im negativen Bereich der X-Achse schneiden. Die beobachtete Parallelverschiebung der Geraden weist eindeutig auf eine Reaktion nach dem Ping-Pong-Mechanismus hin.



(A)



(B)



**Abbildung 49: „Lineweaver-Burk-Plots“ der Chlorophyll Synthase Reaktion**

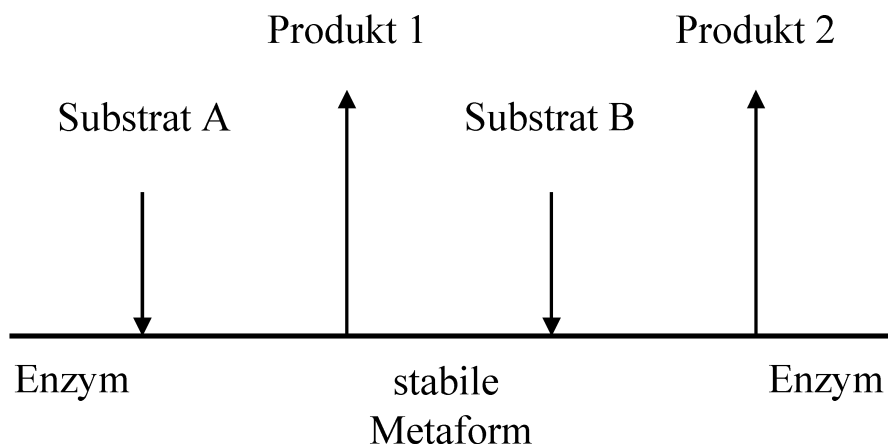
- (A) Abhängigkeit der Veresterungsrate von der Chlid Konzentration bei den angegebenen PhyPP Konzentrationen  
 (B) Abhängigkeit der Veresterungsrate von der PhyPP Konzentration bei den angegebenen Chlid Konzentrationen

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von den Substratkonzentrationen läßt sich bei Enzymen dieser Gruppe durch folgende Gleichung beschreiben (Voet und Voet, 1990):

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M^A}{V_{\max} [A]} + \frac{K_M^B}{V_{\max} [B]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

wobei  $v_0$  die Anfangsgeschwindigkeit ist,  $V_{\max}$  die maximale Geschwindigkeit bei sättigender Konzentration beider Substrate darstellt und die beiden  $K_M$ -Werte die Substratkonzentration von A bzw. B darstellen, die nötig sind, um  $\frac{1}{2} V_{\max}$  zu erhalten.

Den Ablauf einer Ping-Pong Bi Bi Reaktion kann man sich folgendermaßen vorstellen: Substrat A bindet an das Enzym, das Enzym modifiziert das gebundene Substrat und es wird Produkt 1 abgespalten. Es entsteht eine stabile Metaform des Enzyms. Nun kann Substrat B binden und die weitere Umwandlung von Substrat B ergibt Produkt 2 (s. Abbildung 50).



**Abbildung 50: Schematische Darstellung des Ping-Pong Bi Bi Mechanismus**

### III.6.3. Bestimmung des erstgebundenen Substrats

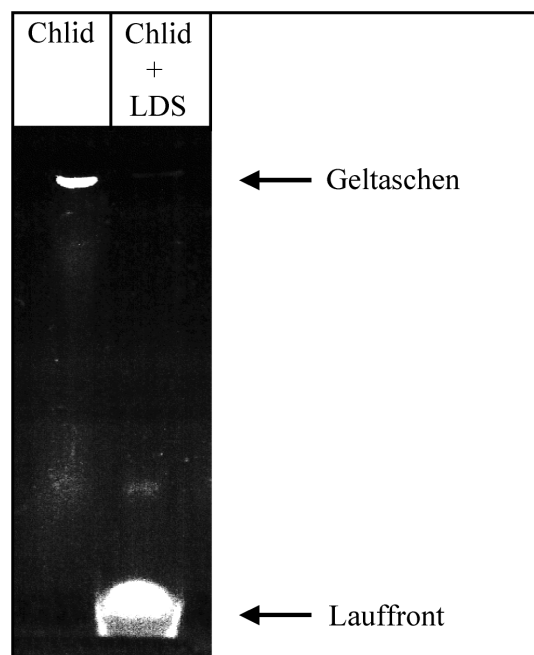
Nach den Erkenntnissen über den generellen Reaktionsmechanismus aus der Bestimmung der Enzym-Kinetiken (s. III.6.2.2) stellt sich die Frage, welches der beiden Substrate (PhyPP oder Chlid) zuerst an die HCS bindet und demzufolge zuerst modifiziert wird. Im Folgenden sind zwei verschiedene Ansätze zur Überprüfung dieses Problems dargestellt.

### III.6.3.1. Fluoreszenzdetektion im nativen Gel-System mit Chlid bzw. mant-FPP

Die erste Möglichkeit ergibt sich aus der Tatsache, daß, laut Theorie, eine stabile Metaform bei der Reaktion vorliegen muß. Diese sollte theoretisch nach Inkubation des Proteins mit dem zuerst bindenden Substrat unter gleichzeitigem Weglassen des zweiten Substrats nachzuweisen sein. Da entweder radioaktivmarkierte oder fluoreszierende Substrate am besten zu detektieren sind, wurde für die hier gezeigten Versuche einerseits das von Haus aus fluoreszierende Substrat Chlid und eine fluoreszenzmarkierte Form des GGPP (s. u.) verwendet. Die Idee war nun, das (markierte) Substrat an die HCS zu binden und anschließend in einem nicht-denaturierenden Gelelektrophorese-System aufzutrennen und zu detektieren.

Für den Nachweis der stabilen Zwischenstufe wurde folgender Versuchsaufbau verwendet:

Die überproduzierte HCS in 40 µg *E. coli* SG13009 Gesamtlysate wurde in einem 500 µl Reaktionsgefäß mit 15 pmol Chlid für 10 min bei RT inkubiert. Diese Menge an Chlid entspricht der Menge, welche standardmäßig in den HCS-Enzymtest eingesetzt wurde, allerdings in diesem Fall skaliert auf die 40 µg an eingesetztem Protein.



**Abbildung 51: Studie zur Bindung von Chlid an die HCS**

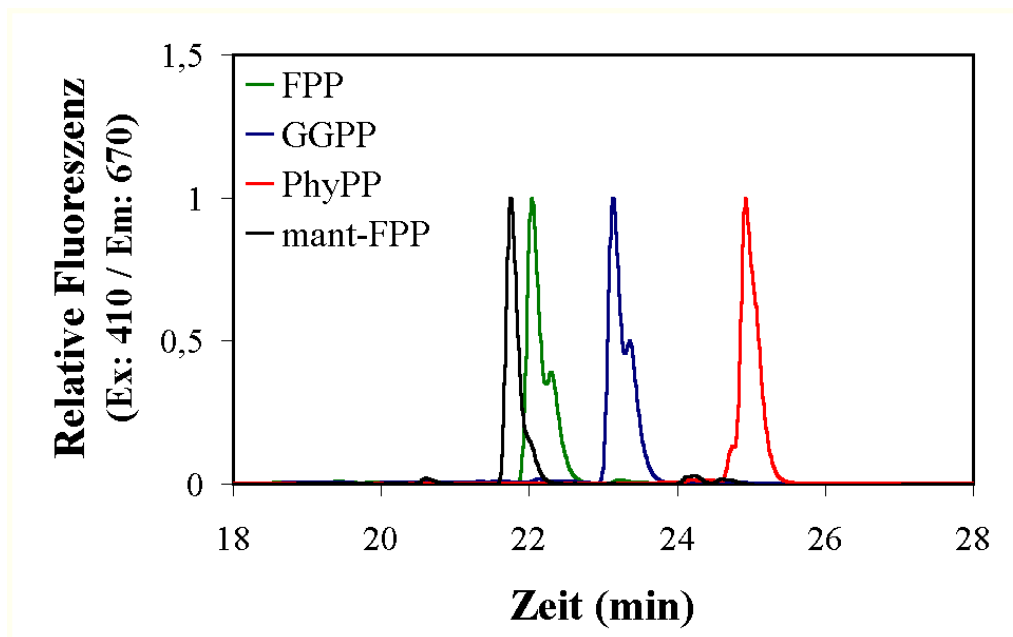
40 µg *E. coli* SG13009 Gesamtlysate mit überproduzierter HCS wurden einmal mit 15 pmol Chlid und einmal mit 15 pmol Chlid plus 0,1 % LDS für 10 min bei RT vorinkubiert und anschließend auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt (s. II.3.4.8). Das Gel wurde hiernach auf einem UV-Transilluminator photographiert. Zu sehen ist der Auftragspunkt der Proben (**Geltaschen**) in der Chlid-Probe und die **Lauffront** in der Chlid / LDS Probe.

Nach dieser Vorinkubation wurde der Ansatz durch eine nicht-denaturierende Protein-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel vorsichtig auf eine Frischhaltefolie transferiert und auf einem UV-Transilluminator bei 354 nm untersucht. Die Vorinkubation des Enzyms mit dem fluoreszierenden Chlid führte zu keiner detektierbaren Bande im Gel. Die Fluoreszenz von Chlid konnte ausschließlich in den Geltaschen nachgewiesen werden (s. Abbildung 51). Um ein besseres Einlaufen des Pigments in das Gel zu ermöglichen wurde eine Probe mit 0,1 % LDS versetzt. Hiernach konnte Chlid nur in der Lauffront detektiert werden. Dies ist aber kein Hinweis auf eine Interaktion mit dem Protein (s. Abbildung 51).

Für die Untersuchung des zweiten Substrats (PhyPP) wurde das mit fluoreszierender N-Methylantraniensäure markierte FPP (mant-FPP) verwendet, welches uns von Kirill Alexandrov (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) zur Verfügung gestellt wurde und nach Owen *et al.* (1999) hergestellt worden war. Die räumliche Struktur dieses Addukts entspricht in etwa der des GGPP, weshalb mant-FPP und nicht das längere mant-GGPP gewählt wurde. Auch hier sollte das markierte Substrat an die HCS gebunden werden, um anschließend in einem nicht-denaturierenden Gelelektrophorese-System aufgetrennt und detektiert werden zu können.

Um dies zu realisieren mußte primär geklärt werden, ob die HCS dieses synthetisch erstellte Substrat umsetzen kann. In einem Standard-Enzymtest wurde die Veresterung innerhalb von 45 min mit 4  $\mu\text{M}$  Chlid und 240  $\mu\text{M}$  mant-FPP gemessen. Die Veresterungsrate lag bei 45 % des eingesetzten Chlid und somit im Bereich der üblicherweise verwendeten Substrate GGPP bzw. PhyPP. In Abbildung 52 ist die Retentionszeit von  $\text{Chl}_{\text{mant-FPP}}$  im Vergleich zu den anderen von der HCS akzeptierten Substraten dargestellt. Die Abfolge der Retentionszeiten im Elutionsprofil ist folgendermaßen:  $\text{Chl}_{\text{mant-FPP}}$ ,  $\text{Chl}_{\text{FPP}}$ ,  $\text{Chl}_{\text{GGPP}}$  und  $\text{Chl}_{\text{PhyPP}}$ .

Da für die Versuche nur eine kleine Menge an mant-FPP zur Verfügung stand, wurden erste Bestimmungen zur Nachweisgrenze der Fluoreszenz dieser Substanz mit der Strukturverwandten Anthranilsäure (Sigma, Steinheim) durchgeführt. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen an Anthranilsäure in Methanol gelöst und in einer Fluoreszenzküvette im Fluorimeter bei  $\text{Ex} = 340 \text{ nm}$  gemessen. Der Emissionsgipfel lag hier bei 383 nm. Mengen bis zu 2 nM Anthranilsäure konnten so noch mit ausreichender Genauigkeit detektiert werden.



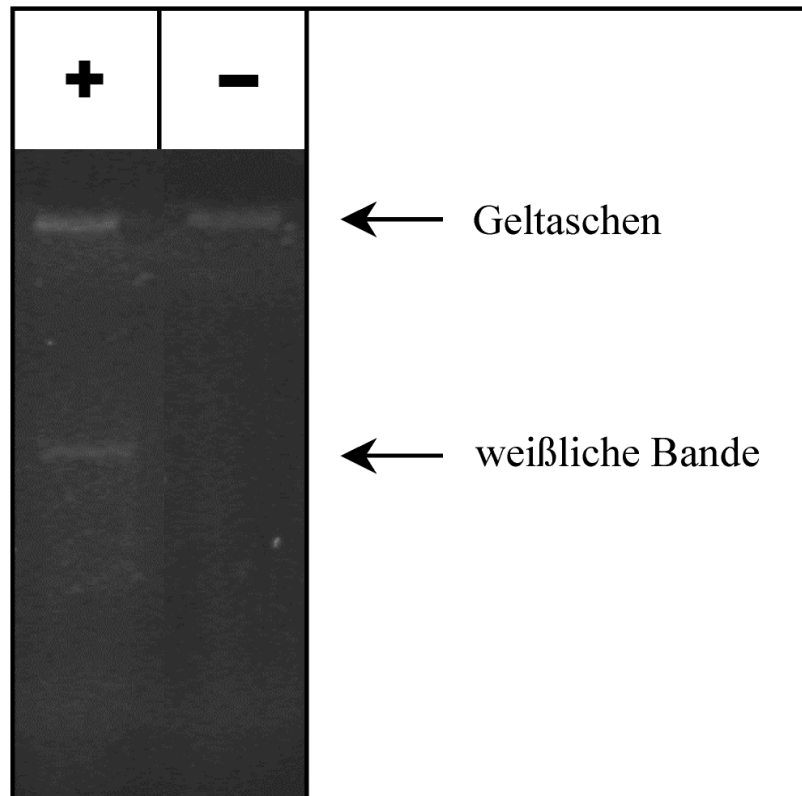
**Abbildung 52: Retentionszeiten der Chlorophylle mit den jeweils angegebenen Polyprenylpyrophosphaten**

In einem Standard-Enzymtest mit nachfolgender HPLC-Auswertung wurden alle vier in dieser Arbeit verwendeten Polyprenylpyrophosphate eingesetzt.

Nach der Mengenabschätzung der HCS in *E. coli* CAG597 Extrakt durch das Fusionsprotein MBP-HCS (s. III.2.3) sollten in 40 µg Bakterienlysat ca. 40 ng HCS vorliegen. Das entspricht ca. 1 pmol an HCS in 20 µl Auftragsvolumen, was einer Konzentration von ca. 50 nM HCS entspricht. Die Nachweisbarkeit der Fluoreszenz von Anthranilsäure liegt wie oben angegeben bei ca. 2 nM. Zwar läßt sich die Fluoreszenz in einem Gelstück nicht direkt mit der Fluoreszenz in einer Küvette mit Flüssigkeit vergleichen, aber eine Bindung von mant-FPP an die HCS sollte nach diesen Vorversuchen auf jeden Fall durch das Auftreten einer fluoreszierenden Bande im Gel zu detektieren sein.

Für den Nachweis der stabilen Zwischenstufe wurde folgender Versuchsaufbau verwendet:

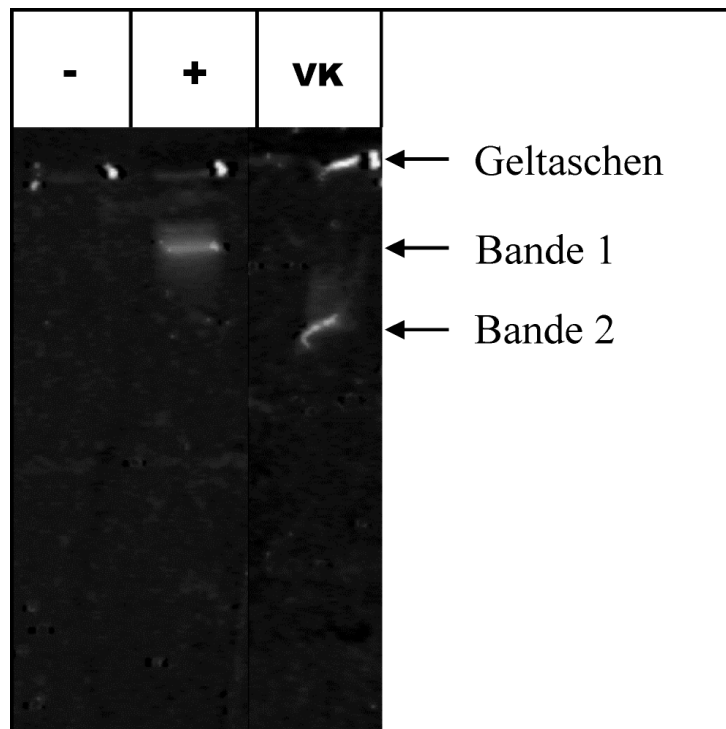
Die überproduzierte HCS in 40 µg *E. coli* SG13009 Gesamtlysat wurde in einem 500 µl Reaktionsgefäß mit 4 µM mant-FPP für 10 min bei RT inkubiert. Diese Menge an mant-FPP entspricht der Menge an Polyprenylpyrophosphat, welche standardmäßig in den HCS-Enzymtest eingesetzt wurde, allerdings in diesem Fall skaliert auf die 40 µg an eingesetztem Protein. Nach dieser Vorinkubation wurde der Ansatz durch eine nicht-denaturierende Protein-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel vorsichtig auf eine Frischhaltefolie transferiert und auf einem UV-Transilluminator bei 354 nm untersucht.



**Abbildung 53: Detektion einer weißen, irisierenden Bande nach nicht-denaturierender Gelelektrophorese**

40  $\mu\text{g}$  *E. coli* SG13009 Gesamtlysate, einmal mit überproduzierter HCS (+), einmal ohne HCS (-) wurden mit 4  $\mu\text{M}$  mant-FPP 10 min bei RT vorinkubiert und anschließend auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt. Die Gelmatrix wurde auf einen UV-Transilluminator gelegt und photographiert. Zu sehen ist der Auftragspunkt der Proben (**Geltaschen**) und in der Positiv-Probe eine weißlich-irisierende Bande (**weißliche Bande**).

Die in Abbildung 53 gezeigte Bande spiegelt genau das Ergebnis wieder, welches man für diesen Versuch erwarten würde: Das markierte Substrat reagiert mit der HCS zu einem stabilen Komplex und läßt sich über eine Gelelektrophorese auftrennen und anschließend detektieren. Allerdings war die Bande auch ohne UV-Licht zu sehen. Hieraus ergab sich die Frage, ob sie auch ohne Zugabe von mant-FPP auftritt. Genau dies konnte nach einer entsprechenden Elektrophorese gezeigt werden: Auch ohne Zugabe von mant-FPP war diese Bande präsent. Obwohl diese Bande nicht den Komplex zwischen der HCS und dem markierten FPP zeigt, handelt es sich dabei wohl trotzdem um die HCS, da Untersuchungen mit Verkürzungsmutanten (s. III.5, HCS 105 / HCS 29) eine nach unten versetzte Bande ergaben (s. Abbildung 54).



**Abbildung 54: Detektion von zwei weißen Banden im nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel**

40  $\mu\text{g}$  *E. coli* SG13009 Gesamtlysat, entweder ohne überproduzierte HCS (-) oder mit HCS (+) bzw. einer Verkürzungsform (VK) mit 291 AS (s. III.5.1) wurden auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt und anschließend auf einem UV-Transilluminator photographiert. Zu sehen ist der Auftragspunkt der Proben (Geltaschen) und in den Proben (+) und (VK) eine weißlich-irisierende Bande (Bande 1 und 2).

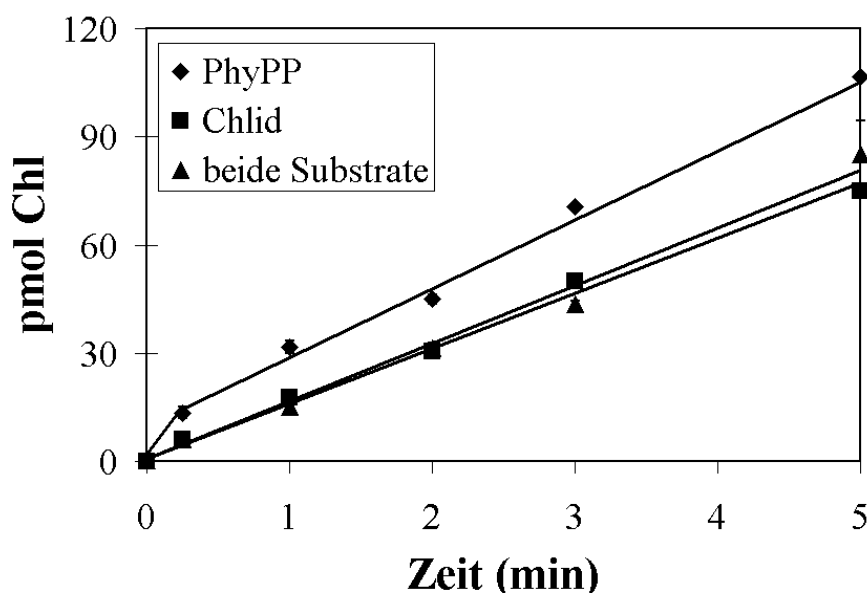
Nach einer Inkubation von einigen Stunden bei 8° C trat diese weißliche Bande sehr viel stärker zum Vorschein als zuvor. In *E. coli* CAG597, in welchen das Fusionsprotein MBP-HCS überproduziert wurde, konnte ebensowenig wie in Etioplasten, PLBs und PTs diese Bande nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es muß sich also um eine Substanz handeln, die ausschließlich von *E. coli* SG13009 gebildet wird bzw. die nur an die reine HCS ohne MBP binden kann. Es könnte sich um Lipide, Steroide oder ähnliches handeln, aber die Substanz, die die für die weißliche Färbung verantwortlich ist, konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht identifiziert werden.

Da es sich bei der stabilen Metaform der HCS um eine kovalente Bindung handeln könnte, wurde der gleiche Versuch mit mant-FPP bzw. Chlid-Vorinkubation ebenfalls im denaturierenden Gel-System durchgeführt. Hierbei konnte allerdings in keinem der beiden Fälle eine Bande auf dem UV-Tisch detektiert werden.

Somit konnte durch Messung der Fluoreszenz kein Nachweis über das erstgebundene Substrat erbracht werden.

### III.6.3.2. Vorinkubationsversuche mit PhyPP

Wie in Kapitel III.6.2.1 schon angedeutet verläuft die Ausgleichsgerade in den Enzym-Kinetiken nicht genau durch den Nullpunkt, sondern schneidet die Y-Achse im positiven Bereich (s. Abbildung 47). Wie könnte diese Beobachtung erklärt werden? Da für den Start einer Messung das PhyPP immer zuerst zugegeben wurde und dann, erst ca. 15 sec später, das Chlid unter Grünlicht, stellte sich die Frage, ob es für das Enzym einen Vorteil in der Veresterungsgeschwindigkeit bedeuten könnte, wenn es mit PhyPP vorinkubiert wurde. Das heißt, der Geschwindigkeits-bestimmende Schritt der Reaktion müßte schon vor Zugabe des zweiten Substrats abgelaufen sein.



**Abbildung 55: Veresterung während der ersten 5 min nach zuvor erfolgter Vorinkubation der HCS mit einem der beiden Substrate**

Je 3 mg bakterielles Gesamtlysate mit überproduzierter HCS wurden entweder mit **PhyPP** bzw. **Chlid** 10 min bei RT vorinkubiert und die Veresterung durch Zugabe des fehlenden Substrats gestartet. Als Kontrolle diente eine Probe, die ohne Vorinkubation mit **beiden Substraten** gleichzeitig gestartet wurde. Die Stichprobenzahl  $n$  betrug in diesem Fall 4. Der Fehlerbalken liegt in einigen Fällen direkt in den jeweiligen Markierungen und ist daher nicht sichtbar.

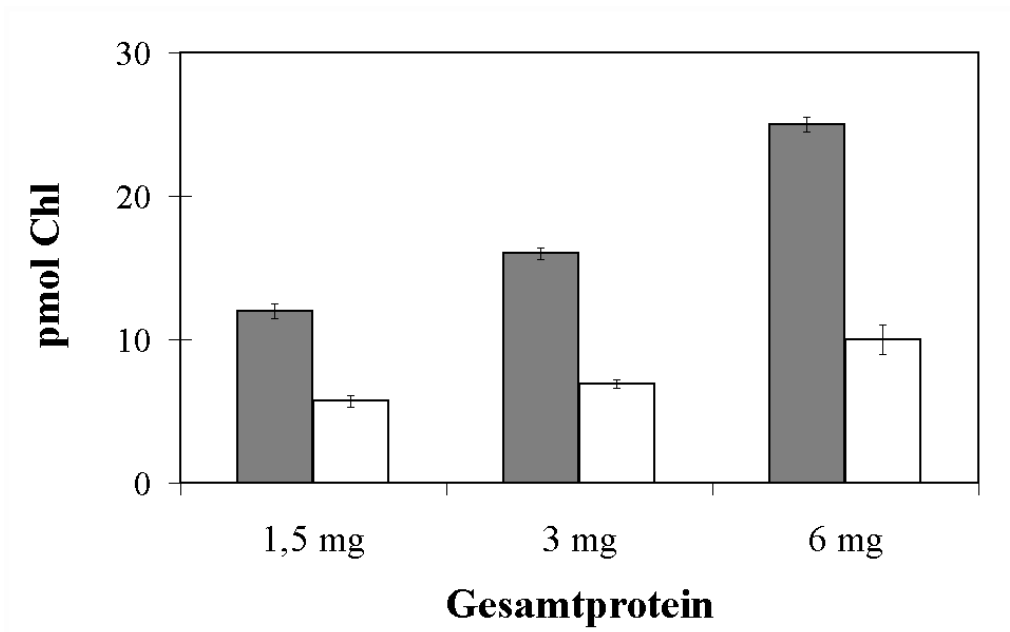
Um dies zu überprüfen wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten in einem Zeitraum von 0,25 – 5 min nach Start der Veresterung durchgeführt, wobei das Enzym einmal 10 min bei RT mit PhyPP vorinkubiert wurde, das andere Mal mit Chlid. Als Kontrolle wurden dem Enzym bereits vor dem Reaktionsstart gemischte Substrate zugegeben, um eine ungewollte Vorinkubation zu vermeiden. Wie in Abbildung 55 zu sehen ist, liegt die Veresterung in den



ersten 15 sec bei der PhyPP-vorinkubierten Probe ca. doppelt so hoch wie in der Chlid-vorinkubierten bzw. der Kontrolle. Dieser Vorsprung bleibt über die folgenden 5 min erhalten.

Erwartungsgemäß sollte mit erhöhtem Enzymeinsatz auch die Veresterung in den ersten 15 sec steigen, bei Vorinkubation mit dem zuerst bindenden Substrat noch mehr als bei dem zweiten Substrat. Um dies zu überprüfen wurden verschiedene Mengen an überproduzierter HCS in *E. coli* Gesamtlisat mit einem von beiden Substraten vorinkubiert.

Aus Untersuchungen zur Effizienz der Überproduktion mit dem Fusionsprotein MBP-HCS, die einen ungefähren HCS Anteil am Gesamtprotein in *E. coli* von 0,1 % ergeben haben (s. III.2.3), konnte die eingesetzte Menge von HCS auf ca. 1,5 µg, 3 µg und 6 µg (bei der jeweils 1000-fachen Menge an Gesamtlisat) geschätzt werden. Die Vorinkubation erfolgte in diesem Fall ebenso mit dem Fusionsprotein MBP-HCS, um einen genauen Vergleich zu ermöglichen.



**Abbildung 56: Veresterung der ersten 15 sec nach Vorinkubation mit einem der beiden Substrate**

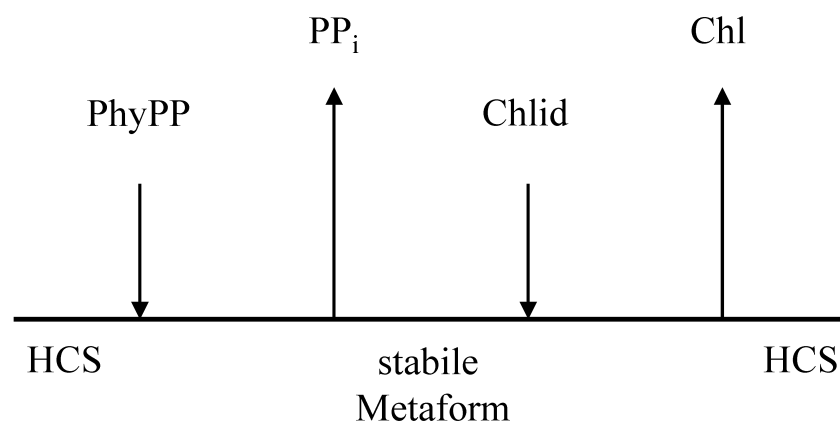
Jeweils 1,5, 3 und 6 mg Gesamtprotein mit überproduzierter HCS wurden entweder mit 360 µM PhyPP (**graue Balken**) bzw. mit 6 µM Chlid (**weiße Balken**) 10 min bei RT vorinkubiert. Durch Zugabe von 6 µM Chlid bzw. 360 µM PhyPP wurde der Enzymtest gestartet und nach 15 sec gestoppt. Die Auswertung erfolgte durch HPLC-Analyse. Die Standardabweichung (n=3) ist eingefügt.

Die Auswertung dieses Versuchs über HPLC (s. Abbildung 56) ergab eine deutlich höhere Veresterung in den ersten 15 sec Reaktionszeit nach Präinkubation mit PhyPP. Der Unterschied zur Chlid-vorinkubierten Probe liegt bei ca. 6 pmol Chl / 1,5 µg HCS. Berechnet

man die Menge an eingesetzter HCS in pmol, kommt man auf ein Verhältnis von ca. 1 : 6 bis 1 : 9 von mit PhyPP beladenem Enzym zu eingesetztem Enzym, wobei in niedrigkonzentrierter Proteinsuspension mehr HCS-Moleküle vorbeladen sind, als in höherkonzentrierter. Dieses Phänomen läßt sich leicht durch die zunehmende Viskosität der Suspension erklären, durch welche die Diffusion des Substrats herabgesetzt wird.

Diese Ergebnisse belegen, daß die Vorinkubation der HCS mit PhyPP in den ersten Sekunden der Veresterung einen deutlichen Vorsprung gegenüber der mit Chlid vorinkubierten Probe ergibt. Dies läßt sich nur dadurch erklären, daß ein Teil des vorhandenen Enzyms während der Präinkubation mit PhyPP reagiert und die postulierte stabile Metaform bildet, welche nach Zugabe des zweiten Substrats sehr viel schneller reagiert, als das unbeladene Enzym.

Somit kann das in Abbildung 50 beschriebene Modell, wie in Abbildung 57 gezeigt, angepaßt werden.



**Abbildung 57: Modell des Reaktionsablaufs der Veresterung von Chlid zu Chl durch die HCS**

PhyPP bindet an die Chlorophyll Synthase unter Abgabe von Pyrophosphat. Erst jetzt kann das zweite Substrat (Chlid) an diese stabile Zwischenform binden und die Veresterung erfolgen. Nach Abgabe des Chl liegt das Enzym unverändert vor.

## IV. DISKUSSION

### IV.1. Untersuchungen und Berechnungen zur Struktur und Verwandtschaft der HCS

Die Sequenz-Homologie der überprüften (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen aus sehr unterschiedlichen Organismengruppen ist erstaunlich: Die Chlorophyll Synthase Sequenz von *A. sativa* zu der von *A. thaliana* weist eine Identität von 89 % im „Core“-Protein auf (s. Tabelle 1) und immerhin noch 65 % Identität in den AS 87-378 mit *Synechocystis* PCC6803. Hieraus kann man schließen, daß die Evolution der (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen nur in sehr engen Grenzen verlaufen konnte. Diese wurden vermutlich durch die Transmembranbereiche (s. III.1.4), die Bindetaschen für die beiden unterschiedlichen, amphiphilen Substrate (Chlid und PhyPP) und die Katalyse und Abgabe des lipophilen Endprodukts Chl bestimmt.

Für die (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen wurden mit dem Programm HMMTOP neun membrandurchspannende Helices berechnet. Diese Struktur scheint der Faltung der Polyprenyl-Transferasen vom UbiA-Typ sehr ähnlich zu sein, für welche zwischen 6 und 9 Transmembranbereiche berechnet wurden, je nach verwendetem Programm.

Lopez *et al.* (1996) berechnete mit dem Programm PEPLOT für die Bakteriochlorophyll Synthase aus *Chloroflexus auranticus* 8 Transmembranhelices, für die Chlorophyll Synthasen hingegen nur 6. Zieht man aber die hohe Übereinstimmung in den AS-Sequenzen und die Gleichartigkeit der katalysierten Reaktion der verschiedenen (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen in Betracht, so erscheint es unwahrscheinlich, daß es bei einer so engen Verwandtschaft solch große Unterschiede in der Sekundärstruktur gibt.

Lopez stellte heraus, daß die (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen evolutionär mit einer Gruppe von Polyprenyltransferasen verwandt sind, welche in die Menachinon Biosynthese (menA) bzw. Ubichinon Biosynthese (ubiA und COQ2) involviert sind und, wie die HCS auch, intrinsische Membranproteine darstellen. Sie gehören zur Familie der UbiA-Prenyltransferasen, in welche auch Proteine zur Farnesylierung von Protohäm IX gehören (cyoE, ctaB, Cox10). Die Mitglieder dieser UbiA Familie enthalten Transmembranproteine mit 6-9 Membranhelices, wobei der stark konservierte Bereich (HCS: AS 146-170), der als Bindestelle des Polyprenylpyrophosphats vorgeschlagen wird (Ashby *et al.* 1992, Melzer & Heide, 1994, Suzuki *et al.*, 1994), immer zwischen dem 2. und 3. Membrandurchgang liegt. Die hierfür zugrundeliegenden Berechnungen wurden mit dem Programm HMMTOP durchgeführt. Dieser Bereich wird als Erkennungsmuster dieser Gruppe von Polyprenyltransferasen herangezogen (s. Tabelle 2). Eine diesem Bereich ähnliche

Konsensus-Sequenz (**F**irst**A**spartate**R**ich**M**otiv, [LIVM](2)-x-D-D-x(2,4)-D-x(4)-R-R-[GH]) der Polyprenyl Synthasen (PDOC00407, Prosite-Datenbank), welche ebenfalls stark konservierte Aspartat-Reste enthält, ist nämlich in dieser Gruppe für die Pyrophosphat Bindung verantwortlich (Wang & Ohnuma, 1999). Dies konnte durch Röntgenstrukturanalyse der Farnesylpyrophosphat Synthase aus *Gallus gallus* nachgewiesen werden (Tarshis *et al.* 1996). Die Bindung des Pyrophosphats erfolgt in diesem Fall über zwei im Enzym gebundene Magnesiumionen an drei Aspartat-Reste. Diese Art der Bindung könnte auch für die UbiA-Gruppe zutreffen, zumal in dieser Dissertation die absolute Abhängigkeit der HCS von Magnesiumionen nachgewiesen werden konnte (s. III.6.1).

#### **IV.2. Herstellung und Verwendung des Fusionsproteins MBP-HCS**

Durch das Fusionsprotein MBP-HCS war es erstmals möglich, die Chlorophyll Synthase in einer Immunodetektion zumindest indirekt sichtbar zu machen. Zuvor konnte die Anwesenheit der HCS nur durch einen anschließenden Aktivitätstest bestimmt werden, was sehr aufwendig ist und auch nur im nativen Zustand des Enzyms funktioniert.

Durch die in dieser Dissertation etablierte Aufschlußmethode durch hohen Druck nach dem French Press-Verfahren konnte ein aktives Enzym gewonnen werden, welches in einer höchst homogenen Suspension vorliegt. Dies waren die Grundlagen für weitere Aufreinigungsschritte zur Gewinnung von bakteriellen Membranen und zur Durchführung von reproduzierbaren Enzym-Kinetiken (s. III.6.2).

Bis jetzt ist die Bestimmung der Menge an HCS im bakteriellen Lysat nur indirekt möglich, nämlich durch Immunodetektion des Fusionsproteins MBP-HCS mit dem Anti-MBP-Antikörper und Vergleich der Färbungsintensität mit einer „Eich-Färbung“ an bekannten Mengen an aufgereinigtem MBP. Dadurch daß die HCS und das MBP in etwa die gleiche molekulare Masse besitzen, liegt in etwa gleich viel HCS wie MBP vor. Diese Methode ist sicher nicht die genaueste Form des Nachweises, da nicht ausgeschlossen werden kann, daß zumindest geringe Mengen an HCS als undetektierbare Spaltprodukte im Lysat vorliegen, aber sie erlaubt eine Abschätzung der Anhäufung an HCS während der Überproduktion. Dies ist wichtig für die Einschätzung der Detektierbarkeit von z. B. fluoreszenzmarkierten Substrat-Enzym-Komplexen (s. III.6.3.1) oder die Bestimmung der Menge an beladenem Enzym bei Vorinkubationsstudien (s. III.6.3.2).

Bakterielle Membranen und Plastidmembranen unterscheiden sich in einigen Punkten, wie z. B. der Lipidzusammensetzung. So enthält die Thylakoidmembran einen sehr hohen Anteil

an Glycolipiden, die am Glycerinrest anstelle eines Phosphats einen Zuckerrest enthalten (z. B. Monogalactosyldiglycerid und Digalactosyldiglycerid). Diese Glycolipide sind charakteristische Lipide der Plastidmembranen und sie spielen z. B. für die Aktivität der POR eine große Rolle (Klement, 2000). Um ausschließen zu können, daß sich die überproduzierte HCS in bakteriellen Membranen anders verhält, als ihr Gegenstück in der Thylakoidmembran wurde die Aktivität der überproduzierten HCS an verschiedenen Pigmenten getestet und mit den Ergebnissen im nativen System (Helfrich, 1995) verglichen. Die hier gezeigten Daten belegen, daß zumindest die Faltung des aktiven Zentrums beider Enzymformen gleich gestaltet sein muß, da die Veresterbarkeit und die Geschwindigkeit der Veresterung für die verschiedenen Pigmente stets in etwa gleich sind. Dies ist ein wichtiger Beleg für die Übertragbarkeit der Enzym-Kinetik-Daten und Erkenntnisse aus den Mutationsstudien auf die Verhältnisse *in vivo*.

#### **IV.3. Pigmentspezifität von aus *Avena sativa* gewonnener Chlorophyll Synthase und heterolog überproduzierter Chlorophyll Synthase**

Aus Untersuchungen mit modifizierten Substraten lassen sich erste Rückschlüsse auf die sterischen Anforderungen in der Bindungstasche für das Chlorophyll gewinnen. So konnte von Helfrich *et al.* (1994) gezeigt werden, daß die Chlorophyll Synthase Chl *a'* als Substrat nicht akzeptiert. Dies wurde durch die sterischen Begebenheiten im aktiven Zentrum erklärt. Für die Reaktion ist es wichtig, daß der Substituent, der an der C-13<sup>2</sup> Position auf der gleichen Seite des Tetrapyrrolrings sitzt wie die Propionat-Seitenkette in Position 17, ein Proton ist, wie im natürlichen Substrat Chlid *a*. Ersetzen des Protons durch eine Methoxy-Gruppe (Pigment 7) vermindert die Veresterung erheblich. Pigment 10 mit einer Ethoxy-Gruppe an dieser Position kann noch schlechter verestert werden (s. Abbildung 21). In Chlid *a'* ist das Proton durch die große Methoxycarbonyl-Gruppe ersetzt und deshalb kann dieses Pigment nicht mehr in die Bindungstasche wandern und verestert werden. Im Gegensatz dazu spielt der Substituent in Position 13<sup>2</sup> auf der dem Tetrapyrrolring gegenüberliegenden Seite keine so entscheidende Rolle. Wenn diese Gruppe im Chlid *a* bzw. Zn Pheid *a* durch eine Methoxy-Gruppe (Pigment 9) oder ein Proton (Pigment 6) ersetzt wird, ändert sich die Reaktivität nicht so signifikant. Es ist allerdings nicht selbstverständlich, daß der Austausch eines größeren Rests im natürlichen Substrat in einen kleineren vom Enzym immer toleriert wird. So bewirkt z. B. der Austausch der 13<sup>2</sup>-Methoxycarbonyl-Gruppe im Protochlorophyllid gegen ein Proton den totalen Reaktivitätsverlust des Pigments mit der NADPH:Protochlorophyllid-

Oxidoreduktase (Helfrich *et al.*, 1996). So muß die Methoxycarbonyl-Gruppe in der NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase eine spezifische Rolle im Reaktionsvorgang spielen, wohingegen die Ergebnisse mit der HCS eher auf gewisse sterischen Zwänge in der Umgebung der Bindetasche für C-13<sup>2</sup> des Substrats hinweisen. Eine Überraschung ist die Veresterbarkeit von Zn-Chlorin-e<sub>6</sub>-dimethylester. In diesem Pigment ohne isocyclischen Ring scheinen die Seitenketten an C-13 und C-15 so flexibel zu sein, daß sie immer noch in das aktiven Zentrum der HCS passen. Die Polarität des Substituenten in Position C-7 spielt keine größere Rolle, da sowohl Zn Pheid *a* als auch Zn Pheid *b* und Zn 7<sup>1</sup>-OH-Pheid *a* als Substrat akzeptiert werden und auch in etwa gleich gut verestert werden können.

#### **IV.4. Antikörper gegen die Chlorophyll Synthase aus Hafer**

In dieser Dissertation wurde ein erneuter Versuch unternommen, einen Antikörper gegen die Chlorophyll Synthase aus Hafer zu erstellen. Hierzu wurde ein Fragment der HCS, welches die ersten 144 AS umfaßt, produziert und aufgereinigt. Anschließend wurden 2 Hasen mit dem Antigen immunisiert. Die Sensitivität des so gewonnenen Antikörperserums gegen das Antigen ging bei Verdünnung des Antikörpers mit Puffer (1:100) bis ca. 1 ng aufgereinigtes Antigen. Allerdings war es bisher nicht möglich, die Chlorophyll Synthase mit dem gewonnenen Antikörperserum in PLBs bzw. PTs eindeutig nachzuweisen. Dies könnte an der sehr geringen Menge an HCS in den jeweiligen Organellkompartimenten liegen. Allerdings konnte die HCS auch nicht in Bakterienlysate mit überproduzierter MBP-HCS nachgewiesen werden, obwohl hier durch eine Überkreuzfärbung mit Anti-MBP-Antikörper die Menge an tatsächlich ins PAG eingelaufener HCS bestimmt werden konnte und sich die Menge weit über der durch Konzentrationsreihen mit aufgereinigtem Antigen bestimmten minimalen Nachweisgrenze des Antikörpers befand. Somit scheint das Protein in ausreichender Menge in das Gel einlaufen zu können. Eine Akkumulation der HCS in den Geltaschen kann demnach ausgeschlossen werden. Wie aber kann dann die fehlende Reaktion des Antikörpers gegen das Vollängenprotein erklärt werden, wenn doch das aufgereinigte Teilstück mit dem AK erkannt wird? Der einzige Unterschied zwischen beiden Proteinen ist, daß das Vollängenprotein funktionell und in die Membran eingebaut ist, das Teilstück sich aber nach einer Ultrazentrifugation unter den löslichen Proteinen und somit im Überstand befindet und nicht funktionell ist. Theoretische Untersuchungen der HCS-Sequenz mit dem Programm OMIGA haben ergeben, daß die HCS wahrscheinlich an einigen Aminosäuren, vor allem im N-terminalen Bereich, modifiziert wird. So findet das Programm unter den ersten 144 AS acht potentielle Phosphorylierungs- und vier Myristylierungsstellen. So könnte es sein, daß im

funktionell exprimierten Enzym gerade gut zugängliche Epitope durch Phosphorylierung blockiert sind. Da die Expressionsdauer des Antigens nur halb so lang wie die der HCS war, könnten die Modifikationsschritte beim Antigen nicht stattgefunden haben. Für das Vollängenprotein ist bekannt (Daten nicht veröffentlicht), daß Expressionszeiten unter 4 h zu stark herabgesetzter Aktivität führen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß zwar das hydrophile MBP im SDS-PAG vollständig aufgefaltet vorliegt, so daß der Anti-MBP-Antikörper greifen kann, die extrem hydrophobe HCS allerdings noch in einigen Bereichen gefaltet ist, so daß wichtige Epitope auch nach der Elektrophorese nicht zugänglich sind.

Ein Fehlen der Präsequenz, die ja ca. ein Drittel des Antigens ausmacht, kann zwar in PLBs und PTs nicht ausgeschlossen werden, im MBP-HCS-Fusionsprotein ist sie allerdings auf jeden Fall enthalten, da ja das MBP am N-Terminus der HCS liegt und das Fusionsprotein nach Abtrennen der Präsequenz in zwei Teile zerfallen würde.

#### **IV.5. Bestimmung von für die Katalyse essentiellen Aminosäuren**

Für die Interaktion von negativ geladenen Phosphaten bzw. Polyprenylpyrophosphaten mit dem aktiven Zentrum in Polyprenyltransferasen werden zwei verschiedene Möglichkeiten diskutiert: Die Bindung kann entweder an Arginin- bzw. Lysin-Reste stattfinden, welche in diesem Fall als Gegenionen fungieren würden (Kral *et al.* 1997; Park *et al.* 1997; Long *et al.* 1998) oder die Bindung entsteht über an Säuregruppen des DDXXD-Motivs komplexierte Magnesiumionen (Tarshis *et al.*, 1996). In der HCS liegen sowohl essentielle Arginine vor, als auch essentielle Aspartate. Somit könnte man sich folgendes Szenario vorstellen: Das Polyprenylpyrophosphat bindet über  $Mg^{2+}$ -Ionen (s. III.6.1) an die essentiellen Aspartate D147, D150 bzw. D154 (s. III.5.2.5.1). Nach katalytischer Abspaltung des Pyrophosphats bindet dieses an den essentiellen Arginin-Rest R161, welches im Bereich zwischen AS 146 und 170 und somit im postulierten Polyprenylpyrophosphat-Bindebereich liegt. So kann das Phosphat aus der Bindungstasche abtransportiert werden. Eine Interaktion zwischen Arginin und Polyprenylpyrophosphaten konnte auch durch Röntgen-Strukturanalyse und Punktmutationen nachgewiesen werden (Kral *et al.* 1997, Park *et al.* 1997, Long *et al.* 1998). Da R91 ebenfalls auf der Stroma-Seite des Enzyms liegt (s. III.5.2.6) könnte auch dieses essentielle Arginin mit an der Bindung des Pyrophosphats beteiligt sein. Mutationen der Arginine 91 und 161 in Lysin bzw. Histidin ergaben immer, im Gegensatz zu der Alanin-Mutante, eine Restaktivität. Also scheint vor allem eine positiv geladene AS an diesen Stellen

vonnöten zu sein. Dies kann einerseits darauf hindeuten, daß die Bindung des abgespaltenen Pyrophosphats an jedwede positive Ladung erfolgen kann. Oder eines bzw. beide essentiellen Arginine haben die Funktion auf der Stroma-Seite eine positive Ladung einzufügen, um durch die Ladungsverteilung die Determination von Membran-Innenseite zu Membran-Außenseite festzulegen.

Bei Proteinen ist eine Prenylierung durch Farnesyl- bzw. Geranylgeranyl-Gruppen sehr häufig zu beobachten (Gelb *et al.* 1998). Diese kommt in sehr vielen unterschiedlichen Gruppen von Proteinen vor und reicht von „mating“ Faktoren in Pilzen über das Lamin aus Säugern, welches für die Struktur der Kernhülle verantwortlich ist, bis hin zu den *Ras* und *Rab* Proteinen, die u. a. in die intrazelluläre Signaltransduktion involviert sind. Diese Prenylierung erfolgt immer an einem Cystein am oder in der Nähe des C-Terminus. In der HCS käme für diese Funktion nur C109 in Frage, welches in allen bekannten (B)CS konserviert ist. Allerdings ist die Lage dieses Cysteins eher im N-terminalen Bereich. Eine solche Prenylierung kann man aber, obwohl es sich bei der HCS um ein Polyprenylpyrophosphat veresterndes Enzym handelt, bisher nicht ausschließen.

Eine weitere mögliche Funktion dieses Cysteins könnte die Dimer-Bildung über eine Disulfidbrücke sein. Bisher konnte die Größe der HCS in ihrem nativen Zustand weder durch Coomassie-Färbung noch durch Antikörper-Nachweis bestimmt werden. Es ist also nicht auszuschließen, daß sie in Di- oder Oligomeren vorliegt. Eine interne Stabilisierung des Enzyms durch Disulfidbrücken ist nicht wahrscheinlich, da hierzu das zweite, essentielle Cystein fehlt.

Interessanterweise erfolgt die Hemmung der Enzym-Aktivität durch NPM über die Bindung an C304, welches ja für die Reaktion nicht essentiell ist. Da nur PhyPP und nicht ZnPheid die Hemmung durch NPM verringern kann, liegt die Vermutung nahe, daß NPM zu einer sterischen Hemmung der PhyPP-Bindung führt. Außer einer sterischen Hemmung wäre auch die Behinderung einer für die PhyPP-Bindung wichtigen Konformationsänderung durch NEM / NPM denkbar.

Auf jeden Fall kann davon ausgegangen werden, daß zumindest das PhyPP von der Stromaseite her an das Enzym gebunden wird, da auf eben dieser Seite auch das fragliche Cystein liegt, welches das NPM bindet. Der Zugang für das Chlid zum Enzym kann bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden, allerdings liegt auch hier die Vermutung nahe, daß es ebenfalls von der Stromaseite an das Enzym bindet, da Chlid durch seine Carboxylgruppe relativ polar ist und es somit eher unwahrscheinlich erscheint, daß das Substrat durch die Membran in das Enzym einwandert. Da sich für die Reaktion die Carboxylgruppe des Chlid



und der Phitylrest sehr nahe kommen müssen, sollten diese beiden Gruppen räumlich direkt nebeneinander liegen. Dies ist wesentlich einfacher zu bewerkstelligen, wenn das Chlid von der gleichen Seite wie das PhyPP in die HCS einwandert.

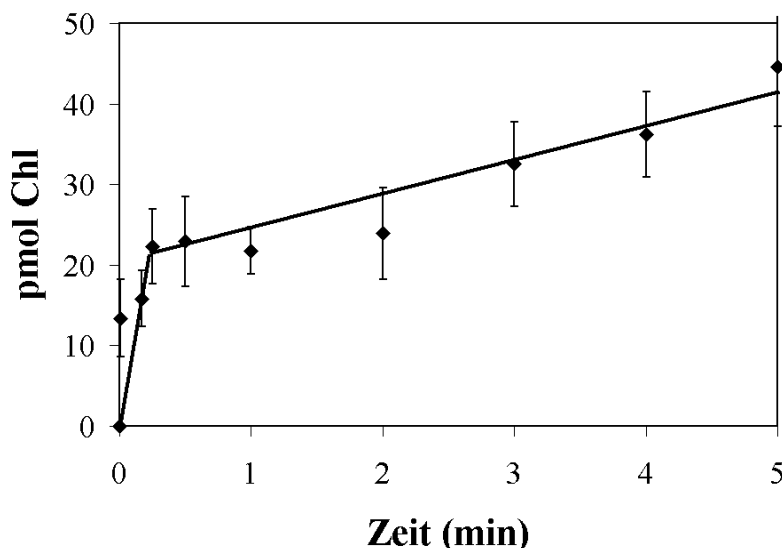
In der HCS ist das einzige Histidin (H197) für die Veresterung essentiell (s. III.5.2.5.2). Es ist allerdings sehr unwahrscheinlich, daß es an der Chlid-Bindung über das Magnesium beteiligt ist (s. III.5.2.5.2). Allerdings wird für die Bindung des Eisens von Protohäm IX im CyoE Protein H176 diskutiert, welches für dieses Protein ebenfalls essentiell ist (Saiki *et al.*, 1993, Mogi *et al.* 1994). Sequenz und Struktur von HCS und CyoE sind sehr ähnlich (HCS zu CyoE aus *E. coli*: 17 % identisch, 42 % ähnlich).

#### **IV.6. Analyse des Reaktionsmechanismus der HCS**

Da die Veresterung von Chlid zu Chl weder die UV/Vis Absorption noch die Fluoreszenzeigenschaften des Pigments verändert, sind direkte optische Nachweismethoden der Reaktion ausgeschlossen. Eine erhebliche Abnahme der Polarität von Chlid zu Chl erlaubt jedoch die Extraktion des Produkts durch n-Hexan, wodurch beide Pigmente getrennt werden können und einzeln analysiert werden können (Helfrich *et al.*, 1994). Diese Methode wurde in den meisten bereits veröffentlichten Arbeiten verwendet (Oster *et al.*, 1997, Oster und Rüdiger, 1997) und kam auch in dieser Dissertation des öfteren zum Einsatz (s. z. B. Bestimmung der Aktivität der Mutanten in Kapitel III.5). Für die Durchführung der Enzym-Kinetiken wurde allerdings eine andere Methode zur Bestimmung des Gehalts an Chl verwendet, nämlich die empfindlichere Methode der HPLC-Analyse, mit welcher kleinste Mengen bis 20 pmol Pigment bestimmt werden können. Der lineare Bereich in der Detektion geht hinauf bis 2,5 nmol Pigment.

Nach Durchführung von Enzym-Kinetiken und Auswertung der Daten im Lineweaver-Burk-Plot konnte für die HCS ein Ping-Pong-Mechanismus bestimmt werden. Dieser sollte aufgrund der sehr hohen Sequenzhomologie (s. III.1.3) auch für alle anderen (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen gelten. Ob er ebenfalls für alle anderen Enzyme der UbiA-Gruppe zutrifft, muß durch weitere Arbeiten untersucht werden. Da aber Mogi *et al.* (1994) postulieren, daß in den Protohäm IX Farnesyltransferasen FPP über  $Mg^{2+}$  an das Enzym gebunden wird, anschließend ein Polyprenylkation (Poulter und Rilling, 1981) entsteht und der Farnesylrest dann erst durch nukleophilen Angriff der Vinylgruppe vom Pyrrolring A des Protohäm IX auf die Position 2 der Vinylgruppe transferiert wird, kann auch für diese Gruppe ein Ping-Pong-Mechanismus in Betracht gezogen werden.

Wie in Domanskii und Rüdiger (2001) beschrieben, erfolgt die Veresterung von Chlid zu Chl in einer schnellen und einer nachfolgenden langsamen Phase, wenn die Reaktion in etiolierten Gerstenblättern durch einen Lichtblitz gestartet wurde. Wie in Abbildung 58 zu sehen ist, ist die schnelle Phase 15 sec nach dem Lichtblitz abgeschlossen. Bisher konnte aber nicht bewiesen werden, wie diese unterschiedlichen Geschwindigkeiten zustande kommen. Die gleiche Abfolge in der Enzym-Kinetik konnte in dieser Arbeit auch *in vitro* nachgewiesen werden, wenn das in *E. coli* produzierte Enzym mit PhyPP vorinkubiert wurde und die Reaktion anschließend durch Zugabe von Chlid gestartet wurde (s. Abbildung 55). Es liegt nahe, daß diese Situation der Vorinkubation mit der *in vivo* sehr ähnlich ist, da auch in etiolierten Pflanzen die Chlorophyll Synthase und PhyPP bzw. GGPP längere Zeit nebeneinander vorliegen und auch Kontakt haben. Nichts anderes ist ja die Vorinkubation des Enzyms mit PhyPP. Die Zugabe des Chlids *in vitro* entspricht dem Lichtblitz *in vivo*, durch den ja die POR aktiviert und damit aus Protochlid Chlid hergestellt wird. Protochlid kann von der HCS nicht verestert werden (s. Abbildung 22). Durch die Vorinkubationsversuche kann die schnelle Reaktion als die erste Runde der Veresterung (vorbeladenes Enzym reagiert mit Chlid) interpretiert werden. Die Veresterungsrate hängt in dieser ersten Veresterungsrunde ausschließlich von der Verfügbarkeit des Chlids und der für die Veresterungsreaktion benötigten Zeit ab.



**Abbildung 58: Schnelle und langsame Veresterungsphase in etiolierten Gerstenblättern (Messwerte von V. Rassadina)**

Veresterungskinetik in *Hordeum vulgare* Blättern in den ersten 5 min nach einem Lichtblitz. Die Bestimmung des Chlorophyll-Gehalts der Blätter erfolgte nach Domanskii und Rüdiger (2001). Die Menge an gebildetem Chlorophyll bezieht sich immer auf ein einzelnes Blatt.

Ausgehend von dieser Annahme entspricht die Menge an verestertem Chlorophyll in den ersten 15 sec der Menge an im Ansatz mit PhyPP vorbeladenem Enzym. Da, wie in dieser Arbeit beschrieben, bisher kein Antikörper gegen die HCS zur Verfügung steht, kann die Menge an HCS *in vivo* bisher nicht direkt bestimmt werden. Wie in III.2.3 beschrieben, wurde allerdings durch die Verwendung des MBP-HCS-Fusionsproteins erstmalig eine indirekte Abschätzung der Menge an HCS im Bakterienlysate möglich. Setzt man nun die indirekt bestimmte Menge an HCS in Verbindung mit den Ergebnissen in Abbildung 56, ergibt sich eine ca. 5-10 mal größere Menge an Gesamt-HCS im Verhältnis zur gebildeten Chl Menge in der schnellen Phase der Veresterung. Das bedeutet, daß ca. 11-17 % der HCS mit PhyPP vorbeladen waren. Die Werte sind natürlich nur als Annäherung zu sehen, da die Abschätzung der Proteinmenge über Western-blot immer nur eine ungefähre Aussage über Mengenverhältnisse erlaubt.

Die Bestimmung der Chl Menge unterliegt einer gewissen Unsicherheit, da für die Reaktionszeit in diesem Fall 15 sec gewählt wurden. In dem (sehr unwahrscheinlichen) Fall, daß die erste Runde der Veresterung länger als 15 sec dauern würde, wären die bestimmten Chl Werte zu niedrig. Allerdings gibt es hierfür keinerlei Hinweis.

Die Vorinkubation mit Chlid (im Gegensatz zu der mit PhyPP) führt, genauso wie die Inkubation nur mit Reaktionspuffer, zu einer „normalen“ Kinetik, mit einer linearen Anfangsgeschwindigkeit, die den Nullpunkt schneidet (s. Abbildung 55). Der Unterschied zwischen der Menge an Chl, die nach der Vorinkubation mit PhyPP gebildet wurde und der Menge, die nach Vorinkubation mit Chlid gebildet wurde, sollte die Menge an Chl ergeben, die von dem vorbeladenen Enzym gebildet wurde. Dieser Unterschied sollte auch während der langsamen Veresterungsphase konstant bleiben, falls nach der ersten Runde die Reaktion in beiden Fällen gleich ablaufen, d. h. in keinem der beiden Fälle eine Aktivierung oder Hemmung der Reaktion vorliegen sollte. Wie in Abbildung 55 aber zu erkennen ist, ist die Steigung der Kinetik nach der PhyPP Vorinkubation etwas steiler als die mit Chlid Vorinkubation. Dies könnte evtl. auf eine leichte Aktivierung bzw. Stabilisierung der HCS durch das PhyPP hindeuten. Dies konnte aber bisher nicht bestätigt werden.

Wie in Abbildung 56 leicht zu erkennen ist, wird bei doppelter Menge an HCS nicht ganz die doppelte Menge an Chl gebildet. Dieser Effekt ist besonders in den Kontrollproben ausgeprägt, in welchen die Veresterungsgeschwindigkeit von der Diffusion und Bindung beider Substrate abhängt, nämlich in den Proben mit Chlid Vorinkubation. In den Ansätzen mit PhyPP Vorinkubation ist dieses Phänomen nicht so deutlich zu erkennen, da die Reaktionsgeschwindigkeit ja nur von der Diffusion des Chlid bestimmt wird. Der Ping-Pong-

Mechanismus beruht ja auf dem Prinzip, daß zuerst ein Substrat im Enzym gebunden wird, anschließend modifiziert wird (was meistens mit einer Konformationsänderung im Enzym einher geht) und erst im Folgenden das zweite Substrat binden kann. Die hohe Viskosität der Membransuspension mit bis zu 24 mg Gesamtprotein pro ml könnte die Diffusion der Substrate zusätzlich verlangsamen.

**V. ZUSAMMENFASSUNG**

1. Im Sequenzvergleich mit anderen (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen wurde eine sehr weitreichende Verwandtschaft in dieser Gruppe gefunden. Desweiteren wurde gezeigt, daß die (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen eng mit den Polyprenyltransferasen vom UbiA-Typ verwandt sind.
2. Durch Berechnungen konnte herausgearbeitet werden, daß die Chlorophyll Synthase aus Hafer (HCS) eine Transportsequenz zum Chloroplasten enthält. Diese liegt im N-terminalen Bereich und umfaßt die Aminosäuren 1-45.
3. Die Kombination von Multialignments und Hydrophobizitätsbestimmungen der bekannten (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen zeigte, daß die Enzyme dieser Gruppe 9 Transmembranbereiche enthalten, die in der HCS wie folgt verteilt sind: AS97-115, AS127-146, AS174-192, AS199-217, AS228-246, AS258-276, AS303-321, AS329-347 und AS359-377.
4. Vergleichende Untersuchungen von aus Etioplasten gewonnener HCS mit in *E. coli* überproduzierter HCS ergaben für beide Enzyme ein sehr ähnliches Veresterungspotential von diversen vom Chlorophyllid *a* abgeleiteten Pigmenten. Somit sollten alle Ergebnisse, die mit dem überproduzierten Enzym entstanden sind, auch auf die HCS im pflanzlichen System übertragen werden können.
5. Die Behandlung der Chlorophyll Synthase mit den Hemmstoffen N-Phenylmaleinimid (reagiert spezifisch mit Cystein) und Diacetyl (reagiert spezifisch mit Arginin) ergab eine starke Beeinträchtigung der Enzymaktivität.
6. Durch Deletionsmutationen am N- und C-Terminus der HCS konnte ein „core“-Enzym von Aminosäure 87-377 herausgearbeitet werden. Dieses Teilstück hatte noch eine Enzymaktivität, die 63 % der Aktivität des Vollängenproteins entsprach.
7. In diesem für die Aktivität essentiellen Teil des Enzyms wurden Punktmutationen an Aminosäuren eingeführt, die in besonders stark konservierten Bereichen lagen bzw. bei welchen Hinweise auf eine Beteiligung an der Aktivität durch vorangegangene

Hemmstofftests vorlagen. Die konservierten Bereiche wurden durch Sequenzvergleiche mit anderen bekannten (Bakterio-) Chlorophyll Synthasen bestimmt. Als für die Veresterungsreaktion essentiell stellten sich folgende Aminosäuren heraus: R91, C109, N146, D147, D150, D154, R161, H197, Y204, W243, N275, D276, K278 und W302. Darüber hinaus schränkten Mutationen in den Aminosäuren R151, C130 und Y264 die Aktivität um mehr als die Hälfte ein.

8. Durch erneute Inkubation der Cystein-Mutanten mit N-Phenylmaleinimid konnte ein Sonderfall dokumentiert werden: C304 ist zwar nicht an der Reaktion beteiligt, aber es ist das einzige Cystein, an welches das N-Phenylmaleinimid bindet und durch welches die Reaktion gehemmt wird. Bei der Mutante C304A tritt durch Zugabe von N-Phenylmaleinimid keine Hemmung mehr auf. Durch Präinkubationstests konnte gezeigt werden, daß C304 im Zugang zur Polyprenyl-Bindestelle sitzt.
9. Die Klonierung und Überexpression eines Fusionsproteins von Maltose-Binde-Protein und HCS ermöglichte erstmals die indirekte Detektion der HCS durch den Anti-MBP-Antikörper. In Kombination mit Enzymkinetiken wurde für die HCS ein Anteil von ca. 0,1 % am bakteriellen Gesamtprotein bestimmt.
10. Vorinkubationsstudien von HCS mit einerseits EDTA und andererseits verschiedenen zweiwertigen Metallionen ergaben eine absolute Notwendigkeit von  $Mg^{2+}$  für die Veresterungsreaktion. Dieses ist im Enzym sehr fest gebunden und konnte nur mit EDTA-Konzentrationen über 100 mM aus der HCS herausgelöst werden. Eine Rekonstitution mit  $Mg^{2+}$  war möglich. Auch mit  $Mn^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  konnte die Aktivität zumindest teilweise wieder hergestellt werden.
11. Für die Auswertung von Enzymkinetiken wurde eine neue Methode der Chlorophyllid- bzw. Chlorophyll- Quantifizierung im pmol Bereich mit Hilfe von HPLC-Analyse entwickelt. Durch diese Enzymkinetiken konnte für die HCS ein Ping-Pong-Mechanismus belegt werden. Präinkubationsversuche haben gezeigt, daß das erstgebundene Substrat in der Reaktion PhyPP ist.

**VI. LITERATURVERZEICHNIS****Alberti, M., Burke, D. H. und Hearst, J. E. (1995)**

in: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*, ed. Blankenship, R. E., Madigan, M. und Bauer, C. E. Kluwer Academic Publishing, Amsterdam, Seite 1083

**Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J. Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997)**

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.

*Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.

**Araki, N., Kusumi, K., Masamoto, K., Niwa, Y. und Iba, K. (2000)**

Temperature-sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase within the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis.

*Physiol. Plant.* **108**, 19-24

**Ashby, M. N. und Edwards P. A. (1990)**

Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants: characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase.

*J. Biol. Chem.* **265**, 13157-13164

**Ashby, M. N., Kutsunai, S. Y., Ackerman, S., Tzagoloff, A. und Edwards P. A (1992)**

*COQ2* is a candidate for the structural gene encoding *para*-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase.

*J. Biol. Chem.* **267**, 4128-4136

**Bauer, C. (1995)**

in: *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, ed. Mathis, P. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Seite 899

**Barnard, G. und Popjak, G.(1980)**

Characterization of liver prenyl transferase and its inactivation by phenylglyoxal.

*Biochim. Biophys. Acta*, **617**, 169-182

**Bradford, M. M. (1976)**

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteinutilizing the principle of protein-dye binding.

*Anal. Biochem.* **72**, 248-254

**Bollivar, D. W., Wang, S., Allen, J. P. und Bauer, C. E. (1994)**

Molecular genetic analysis of terminal steps in bacteriochlorophyll a biosynthesis: characterization of a *Rhodobacter capsulatus* strain that synthesizes geranylgeraniol-esterified bacteriochlorophyll a.

*Biochemistry*, **33(43)**,12763-12738

- Carattoli, A., Romano, P., Ballario, P., Morelli, G. und Macino, G. (1991)**  
The *Neurospora crassacarotenoid* biosynthetic gene (Albino 3) reveals highly conserved regions among prenyltransferases.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 5854-5859
- Castelfranco, P. A., Weinstein, J. D., Schwarcz, S., Pardo, A. D. und Wezelman, B. E. (1979)**  
The Mg insertion step in chlorophyll biosynthesis.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, **192**, 592-598
- Domanskii, V. P und Rüdiger W (2001)**  
On the nature of the two pathways in chlorophyll formation from protochlorophyllide.  
*Photosynth. Res.*, **68**, 131-139
- Duvold, T., Bravo, J-M., Pale-Grosdemange, C. und Rohmer, M. (1997)**  
Biosynthesis of 2-C-Methyl-D-erythritol, a Putative C<sub>5</sub> Intermediate in the Mevalonate Independent Pathway for Isoprenoid Biosynthesis.  
*Tetrahedron Lett.* **38**, 4769-4772
- Eichacker, L., Edhofer, I. und Wanner, G. (1996)**  
Cryopreservation of chlorophyll synthesis and apoprotein stabilization in barley etioplasts.  
*Plant Physiol.* **112**, 633-639
- Emanuelsson, O., Nielsen, H. und von Heijne, G. (1999)**  
ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites.  
*Protein Sci.* **8**, 978-984
- Frohmann, M. A., Dush, M. K. und Martin, G. R. (1988)**  
Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligo nucleotide primer.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002
- Fujita, Y. (1996)**  
Protochlorophyllide reduction: a key step in the greening of plants.  
*Plant Cell Physiol.*, **37**, 411-421
- Gaubier, P., Wu, H.-J., Laudie, M., Delseny, M. und Grellet, F. (1995)**  
A *Chl Synthetase* gene from *Arabidopsis thaliana*.  
*Mol. Gen. Genet.* **249**, 58-64
- Gavel, Y. und von Heijne, G. (1990)**  
A conserved cleavage-site motif in chloroplast transit peptides.  
*FEBS Lett.* **261**, 455-458
- Gelb, M. H., Scholten, J. D. und Seibolt-Leopold, J. S. (1998)**  
Protein prenylation: from discovery to prospects for cancer treatment.  
*Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 40-48



**Gibson, L. C. D. und Hunter, C. N. (1994)**

The bacteriochlorophyll biosynthesis gene, *bchM*, of *Rhodobacter sphaeroides* encodes S-adenosyl-L-methionine: Mg protoporphyrin IX methyltransferase.  
*FEBS Lett* **352**(2), 127-130

**Gibson, L. C., Willows, R. D., Kannangara, C. G., von Wettstein, D. und Hunter, C. N. (1995)**

Magnesium-protoporphyrin chelatase of *Rhodobacter sphaeroides*: Reconstitution of activity by combining the products of the *bchH*, *-I*, and *-D* genes expressed in *Escherichia coli*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1941-1944

**Gottesman, S., Halpern, E. und Trisler, P. (1981)**

Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by *lon* mutants of *Escherichia coli* K-12.  
*J. Bacteriol.* **148**, 265-273

**Helfrich, M., Schoch, S., Lempert, U., Cmiel, E. und Rüdiger, W. (1994)**

Chlorophyll Synthetase cannot synthesize chlorophyll *a*<sup>2</sup>.  
*Eur. J. Biochem.* **219**, 267-275

**Helfrich, M. (1995)**

Chemische Modifikation von Chlorophyll-Vorstufen und deren Verwendung zur Charakterisierung von Enzymen der Chlorophyll-Biosynthese.  
*Dissertation, Universität München*

**Helfrich, M., Schoch, S., Schäfer, W., Ryberg, M. und Rüdiger, W. (1996)**

Absolute Configuration of Protochlorophyllide *a* and Substrate Specificity of NADPH-Protochlorophyllide Oxidoreductase.  
*J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2606-2611

**Hendry, G. A. F., Houghton, J. D. und Brown S.B. (1987)**

The degradation of chlorophyll - a biological enigma.  
*New Phytol.* **107**, 255-302

**Herz, S., Wungsintaweeikul, J., Schuhr, C. A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M. H., Bacher, A. und Rohdich, F. (2000)**

Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** (6), 2486-2490

**Hofmann, E., Wrench, P. M., Sharples, F. P., Hiller, R. G., Welte, W. und Diederichs, K. (1996)**

Structural basis of light harvesting by carotenoids: peridinin-chlorophyll-protein from *Amphidinium carterae*.  
*Science*, **272**, 1788-1791

**Holt, A. S. und Morley, H. V. (1959)**

A proposed structure for chlorophyll *d*.  
*Canad. J. Chem.*, **37**, 507-514.

- Hori, N., Kumar, A. M., Verkamp, E. und Söll, D. (1996)**  
5-aminolevulinic acid formation in *Arabidopsis thaliana*.  
*Plant Physiol. Biochem.*, **34**, 3-9
- Ishikawa, K., Matera, K. M., Zhou, H., Fujii, H., Sato, M., Yoshimura, T., Ikeda-Saito, M. und Yoshida, T. (1998)**  
Identification of histidine 45 as the axial heme iron ligand of heme oxygenase-2.  
*J. Biol. Chem.* **273(8)**, 4317-22
- Jacobs, J. M., Jacobs, N. J. und De Maggio, A. E. (1982)**  
Protoporphyrinogen oxidation in chloroplasts and plant mitochondria, a step in heme and chlorophyll synthesis.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, **218**, 233-239
- Jacobs, J. M. und Jacobs, N. J. (1984)**  
Protoporphyrinogen oxidase, an enzymatic step in heme and chlorophyll synthesis: partial characterization of the reaction in plant organelles and comparison with mammalian and bacterial systems.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, **229**, 312-319
- Jensen, P. E., Gibson, L.C., Henningsen, K. W. und Hunter, C. N. (1996 (a))**  
Expression of the *chlI*, *chlD*, and *chlH* genes from the *Cyanobacterium synechocystis* PCC6803 in *Escherichia coli* and demonstration that the three cognate proteins are required for magnesium-protoporphyrin chelatase activity.  
*J. Biol. Chem.*, **271(28)**, 16662-16667
- Jensen, P. E., Willows, R. D., Petersen, B. L., Vothknecht, U. C., Stummann, B. M., Kannangara, C. G., von Wettstein, D. und Henningsen K. W. (1996 (b))**  
Structural genes for Mg-chelatase subunits in barley: Xantha-f, -g and -h.  
*Mol. Gen. Genet.*, **250(4)**, 383-394
- Jones, I. D., White, R. C., Gibbs, E. und Butler, L.S. (1977)**  
Estimation of zinc pheophytines, chlorophylls, and pheophytins in mixtures in diethyl ether or 80% acetone by spectrophotometry and fluorometry.  
*Agric. Food Chem.* **25**, 146-149
- Jordan, P., M. (1991)**  
in: *Biosynthesis of Tetrapyrroles*, ed. Jordan, P., M., Elsevier, Amsterdam, Seite 1
- Jordan, P., M. (1994)**  
in: *The Biosynthesis of the Tetrapyrrole Pigments: Ciba Foundation Symposium 180*  
ed. Chadwick, D., J. und Ackrill, K. Wiley, Chichester, Seite 70
- Keegstra, K. und von Heijne, G. (1992)**  
Transport of proteins into chloroplasts. In: *Plant Gene Research: Cell Organelles*, R. G. Herrmann, ed. (Springer Verlag, Berlin), 353-370

**Keller, Y., Bouvier, F. D. und Harlingue, A. (1998)**

Metabolic compartmentation of plastid prenyllipid biosynthesis: evidence for the involvement of a multifunctional CHL P.

*Eur. J. Biochem.* **251**, 413-417

**Khyse-Andersen, J. (1984)**

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

*J. Biochem. Biophys. Methods* **10** (3-4), 203-209

**Klement, H., Helfrich, M., Oster, U., Schoch, S. und Rüdiger, W. (1999)**

Pigment-free NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from *Avena sativa* L. Purification and substrate specificity.

*Eur. J. Biochem.* **265**, 862-874

**Klement, H. (2000)**

NADPH:Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (POR): Untersuchungen zu einem „Schlüsselenzym“ der Chlorophyll-Biosynthese in Angiospermen.

*Dissertation, Universität München*

**Kobayashi, M., Watanabe, T., Nakazato, M., Ikegami, I., Hiyama, T., Matsunaga, T. und Murata, N. (1988)**

Chlorophyll *a*'/P-700 and pheophytin *a*/P-680 stoichiometries in higher plants and cyanobacteria determined by HPLC analysis.

*Biochim Biophys Acta*, **936**, 81-89

**Koepke, J., Hu, X., Muenke, C., Schulten, K. und Michel, H. (1996)**

The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800-850) from *Rhodospirillum rubrum*.

*Structure*, **4(5)**, 581-97

**Koyama, T. und Ogura, K. (1999)**

in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, ed. Cane, D. E. (Pergamon / Elsevier Science, Oxford), Vol. 2, Seiten 69-96

**Kral, A. M., Diehl, R. E., deSolms, S. J., Williams, T. M., Kohl, N. E. und Omer C. A. (1997)**

Mutational analysis of conserved residues of the  $\beta$ -subunit of human farnesyl:protein transferase.

*J. Biol. Chem.* **272**, 27319-27323

**Kühlbrandt, W., Wang, D. N. und Fujiyoshi, Y. (1994)**

Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography.

*Nature*, **367**, 614-621

**Kumar, A., Schaub, U., Söll, D. und Ujwal, M. (1996(a))**

Glutamyl-transfer RNA: at the crossroad between chlorophyll and protein biosynthesis.

*Trends Plant Sci.*, **1**, 371-376

**Kumar, A. M., Csankovszki, G. and Söll, D. (1996(b))**

A second and differentially expressed glutamyl-tRNA reductase gene from *Arabidopsis thaliana*.  
*Plant Mol. Biol.*, **30**, 419-426

**Kuzuyama, T., Takagi, M., Kaneda, K., Dairi, T., und Seto, H. (2000 (a))**

Formation of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol from 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate by 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase, a new enzyme in the nonmevalonate pathway.  
*Tetrahedron Lett.* **41 (5)**, 703-706

**Kuzuyama, T., Takagi, M., Kaneda, K., Watanabe, H., Dairi, T., und Seto, H. (2000 (b))**

Studies on the nonmevalonate pathway: conversion of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol to its 2-phospho derivative by 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase.  
*Tetrahedron Lett.* **41 (16)**, 2925-2928

**Lauterbach, P. (1993)**

Untersuchungen zur Chlorophyll Biosynthese: Anreicherung und Charakterisierung der Chlorophyll Synthetase.  
*Dissertation, Universität München*

**Lichtenthaler, H. K. (1999)**

The 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants.  
*Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 47-65

**Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M. und Schwender, J. (1997)**

Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate (IPP) and isoprenoid biosynthesis in higher plants.  
*Physiol. Plant.* **101**, 643-652

**Lindsten, A., Welch, C. J., Schoch, S., Ryberg, M., Rüdiger, W. und Sundqvist, C. (1990)**

Chlorophyll synthetase is latent in well preserved prolamellar bodies of etiolated wheat.  
*Physiol. Plant.* **80**, 277-285

**Long, S. B., Casey, P. J. und Beese, L. S. (1998)**

Cocrystal structure of protein farnesyltransferase complexed with a farnesyl diphosphate substrate.  
*Biochemistry* **37**, 9612-9618

**Lopez, J. C., Ryan, S., und Blankenship, R. E. (1996)**

Sequence of the *bchG* Gene from *Chloroflexus aurantiacus*: Relationship between Chlorophyll Synthase and Other Polyprenyltransferases.  
*J. Bacteriol.* **178/11**, 3369-3373

**Lüttgen, H., Rohdich, F., Herz, S., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C. A., Fellermeier, M., Sagner, S., Zenk, M. H. Bacher, A. und Eisenreich, W. (2000)**

Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97 (3)**, 1062-1067

- Mac, M., Tang, X. S., Diner, B. A., McCracken, J. und Babcock, G. T. (1996)**  
Identification of histidine as an axial ligand to P-700.  
*Biochem.* **35**,13288-13293
- McDermott, G., Prince, S. M., Freer, A. A., Hawthornthwaite-Lawless, A. M., Papiz, M. Z., Cogdell, R. J. und Isaacs, N. W. (1995)**  
Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria.  
*Nature*, **374**, 517-521
- McFeeters, R. F., Chichester, C. O. und Whitaker, J. R. (1971)**  
Purification and properties of chlorophyllase from *Ailanthus altissima* (tree of heaven).  
*Plant Physiol. (Bethesda)* **47**, 609-618
- Melzer, M. und Heide, L. (1994)**  
Characterization of polyprenyldiphosphate:4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase from *Escherichia coli*.  
*Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 93-102
- Mogi, T., Saiki, K. und Anraku, Y. (1994)**  
Biosynthesis and functional role of haem O and haem A.  
*Molec. Microbiol.* **14** (3), 391-398
- Niedermeier, G., Shiozawa, J. A., Lottspeich, F. und Feick, R. G. (1994)**  
The primary structure of two chlorosome proteins from *Chloroflexus aurantiacus*.  
*FEBS Lett* **342**(1), 61-65
- Ogura, K. und Koyama, T. (1998)**  
Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation.  
*Chem. Rev.* **98** (4), 1263-1276
- Oster, U., Bauer, C. E. und Rüdiger, W. (1997)**  
Characterization of chlorophyll *a* and bacteriochlorophyll *a* synthases by heterologous expression in *Escherichia coli*.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 9671-9676
- Oster, U. und Rüdiger, W. (1997)**  
The G4 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a chlorophyll synthase of etiolated plants.  
*Botan. Acta.* **110**, 420-423
- Oster, U., Tanaka, R., Tanaka, A. und Rüdiger, W. (2000)**  
Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll *b* biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*  
*Plant J.* **21**(3), 305-310
- Ostrovsky, D., Diomina, G., Lysak, E., Matveeva, E., Ogrel, O. und Trutko, S. (1998)**  
Effect of oxidative stress on the biosynthesis of 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclopyrophosphate and isoprenoids by several bacterial strains.  
*Arch. Microbiol.* **171**(1), 69-72

**Owen, D. J., Alexandrov, K., Rostkova, E., Scheidig, A. J., Goody, R. S. und Waldmann, H. (1999)**

Chemo-Enzymatic Synthesis of Fluorescent Rab 7 Proteins: Tools to Study Vesicular Trafficking in Cells.

*Angew. Chem. Int. Ed.* **38** (4), 509-512

**Park, H. W., Bodoluri, S. R., Moonmaw, J. F., Casey, P. J. und Beese, L. S. (1997)**

Crystal structure of protein farnesyltransferase at 2.25 Å resolution.

*Science* **275**, 1800-1804

**Pearson, W.R. und Lipman, D.J. (1988)**

Improved tools for biological sequence comparison.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**(8), 2444-2448

**Pennington, F. C., Strain, H. H., Svec, W. A. und Katz, J. J. (1964)**

Preparation and properties of pyrochlorophyll a, methyl pyrochlorophyllide a, pyropheophytin a. and methyl pyropheophorbide a derived from chlorophyll by decarbomethoxylation.

*J. Am. Chem.Soc.* **86**, 1418-1426

**Porra, R. J. (1991)**

Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures of terrestrial, aquatic and marine organisms, including recalcitrant algae, in: *Chlorophylls* (Scheer, H., Editor) 31-57, CRC-Press, Boca Raton

**Porra, R. J., Schäfer, W., Katheder, I. und Scheer, H. (1995)**

The derivation of the oxygen atoms of the 13(1)-oxo and 3-acetyl groups of bacteriochlorophyll *a* from water in *Rhodobacter sphaeroides* cells adapting from respiratory to photosynthetic conditions: evidence for an anaerobic pathway for the formation of isocyclic ring E.

*FEBS Lett.*, **371**, 21-24

**Porra, R. J., Schäfer, W., Gad'on, N., Katheder, I., Drews, G. und Scheer, H. (1996)**

Origin of the two carbonyl oxygens of bacteriochlorophyll *a*. Demonstration of two different pathways for the formation of ring E in *Rhodobacter sphaeroides* and *Roseobacter denitrificans*, and a common hydratase mechanism for 3-acetyl group formation.

*Eur. J. Biochem.*, **239**, 85-92

**Porra, R. J. (1997)**

Recent progress in porphyrin and chlorophyll biosynthesis.

*Photochem. Photobiol.*, **65**, 492-516

**Poulter, C. D. und Rilling, H. C. (1981)**

Prenyl Transferases and Isomerase. in: *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*; Band 1, Kapitel 4, Porter, J.W., ed.; John Wiley & Sons: New York, 1981, Seiten 162-224.

- Pradier, L., Yee, A. S. und McNamee, M (1989)**  
Use of Chemical Modifications and Site-Directed Mutagenesis To Probe the Functional Role of Thiol Groups on the  $\gamma$  Subunit of *Torpedo californica* Acetylcholin Receptor.  
*Biochemistry* **28**, 6562-6571
- Rashtchian, A., Buchman, G. W., Schuster, D. M. und Berninger, M. S. (1992)**  
Uracil DNA glycosylase-mediated cloning of polymerase chain reaction-amplified DNA: application to genomic and cDNA cloning.  
*Anal. Biochem.* **206**, 91-97
- Reinbothe, S. und Reinbothe, C. (1996)**  
Regulation of Chlorophyll Biosynthesis in Angiosperms.  
*Plant Physiol.*, **111**, 1-7
- Riordan, J. F., Mc Elvany, K. D. und Borders, C. L. Jr. (1977)**  
Arginyl residues: anion recognition sites in enzymes.  
*Science* **195 (4281)**, 884-886
- Rohdich, F., Wungsintaweeikul, J., Eisenreich, W., Richter, G., Schuhr, C. A., Hecht, S., Zenk, M. H. und Bacher, A. (2000)**  
Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97 (12)**, 6451-6456
- Rohdich, F., Wungsintaweeikul, J., Fellermeier, M., Sagner, S., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A. und Zenk, M. H. (1999)**  
Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoids: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96 (21)**, 11758-11763
- Rowe, J. D. und Griffiths, W. T. (1995)**  
Protochlorophyllide reductase in photosynthetic prokaryotes and its role in chlorophyll synthesis.  
*Biochem. J.*, **311**, 417-424
- Rüdiger, W. (1993)**  
in *Pigment-Protein Complexes in Plastids: Synthesis and Assembly*, herausgegeben von Sundqvist, C. und Ryberg, M., Academic Press, San Diego, Seite 219
- Rüdiger, W., Benz, J. und Guthoff, C. (1980)**  
Detection and partial characterization of activity of chlorophyll synthetase in etioplast membranes.  
*Eur. J. Biochem.* **109**, 193-200
- Rüdiger, W., Hedden, P., Köst, H.-P. und Chapman, D. J. (1977)**  
Esterification of chlorophyllide by geranylgeranyl pyrophosphate in a cell-free system from maize shoots.  
*Biochem. biophys. Res. Commun.* **74**, 1268-1272

**Rüdiger, W. und Schoch, S. (1991)**

in: *Chlorophylls*, herausgegeben von Scheer, H., CRC Press, Boca Raton , Seite 451

**Saiki, K., Mogi, T., Hori, H., Tsubaki, M. und Anraku, Y. (1993)**

Identification of the functional domains in heme O synthase. Site-directed mutagenesis studies on the *cyoE* gene of the cytochrome bo operon in *Escherichia coli*.

*J. Biol. Chem.* **268** (36), 26927-26934

**Schulz, R. und Seneger, H. (1993)**

in: *Pigment-Protein Complexes in Plastids: Synthesis and Assembly*, ed. Sundqvist, C. und Ryberg, M. Academic Press, San Diego, Seite 179

**Schwender, J., Lichtenthaler, H. K., Seemann, M. und Rohmer, M. (1995)**

in: *Photosynthesis: From Light to Biosphere* (Mathis, P., ed.) Seiten 1001-1004, Kluwer Academic Publishers, Amsterdam

**Schwender, J., Seemann, M., Lichtenthaler, H. K. und Rohmer, M. (1996)**

Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophyll and plastoquinone) via a novel pyruvate/glycero-aldehyde-3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus*.

*Biochem. J.* **316**, 73-80

**Soll, J., Schultz, G., Rüdiger, W. und Benz, J. (1983)**

Hydrogenation of geranylgeraniol: Two pathways exist in spinach chloroplasts.

*Plant Physiol.* **71**, 849-854

**Spano, A.J., He, Z., Michel, H., Hunt, D.F. und Timko, M.P. (1992)**

Molecular cloning, nuclear gene structure, and developmental expression of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase in pea (*Pisum sativum* L.).

*Plant Mol. Biol.* **18**, 967-972

**Spurgeon, S. L. und Porter, J. W. (1981)**

in: *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*, Vol. 1, Seiten 1-46, Wiley Verlag, New York

**Suzuki, J. Y. und Bauer, C. E. (1995)**

A prokaryotic origin for light-dependent chlorophyll biosynthesis of plants.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3749-3753

**Suzuki, K., Ueda, M., Nakagawa, T., Kawamukai, M. und Matsuda, H. (1994)**

Evidence that *Escherichia coli ubiA* product is a functional homolog of yeast COQ2, and the regulation of *ubiA* gene expression.

*Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1814-1819

**Takagi, M., Kuzuyama, T., Kaneda, K., Watanabe, H., Dairi, T. und Seto, H. (2000)**

Studies on the nonmevalonate pathway: formation of 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate from 2-phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol.

*Tetrahedron Lett.* **41** (18), 3395-3398



- Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, N. K., Yoshida, K. und Okada, K. (1998)**  
Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95(21)**, 12719-23
- Tanaka, R., Oster, U., Kruse, E., Rüdiger, W. und Grimm, B. (1999)**  
Reduced Activity of Geranylgeranyl Reductase Leads to Loss of Chlorophyll and Tocopherol and to Partially Geranylgeranylated Chlorophyll in Transgenic Tobacco Plants Expressing Antisense RNA for Geranylgeranyl Reductase.  
*Plant Phys.* **120**, 695-704
- Tarshis, L. C., Proteau, P. J., Kellogg, B. A., Sacchettini, J. C. und Poulter, C. D. (1996)**  
Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15018-15023
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson T. J. (1994)**  
"CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice."  
*Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680
- Tronrud, D. E., Schmid, M. F. und Matthews, B. W. (1986)**  
Structure and X-ray amino acid sequence of a bacteriochlorophyll *a* protein from *Prosthecochloris aestuarii* refined at 1.9 Å resolution.  
*J. Mol. Biol.*, **188(3)**, 443-454
- Tsuchiya, T., Ohta, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Shimada, H., Masuda, T. und Takamiya, K.-I. (1999)**  
Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96 (26)**, 15362-15367
- Voet, D. und Voet, J. G. (1990)**  
Biochemistry, Wiley & Sons, Inc., 348f
- von Heijne, G. und Nishikawa, K. (1991)**  
Chloroplast transit peptides. The perfect random coil?  
*FEBS Lett.* **278**, 1-3
- von Heijne, G., Steppuhn, J. und Herrmann, R. G. (1989)**  
Domain structure of mitochondrial and chloroplast-targeting peptides.  
*Eur. J. Biochem.* **180**, 535-545
- von Wettstein, D., Gough, S. und Kannangara, C. G. (1995)**  
Chlorophyll Biosynthesis.  
*Plant Cell* **7(7)**, 1039-1057

**Walker, C. J., Mansfield, K. E., Smith, K. M. und Castelfranco, P. A. (1989)**

Incorporation of atmospheric oxygen into the carbonyl functionality of the protochlorophyllide isocyclic ring.

*Biochem. J.*, **257**, 599–602

**Wang, K. und Ohnuma, S. (1999)**

Chain-length determination mechanism of isoprenyl diphosphate synthases and implications for molecular evolution.

*TIBS* **24**, 445-451

**Willows, R. D., Gibson, L., C., D., Kannangara, C. G., Hunter, N. und von Wettstein D. (1996)**

Three separate proteins constitute the magnesium chelatase of *Rhodobacter sphaeroides*.

*Eur. J. Biochem.*, **235**, 438-443

**Willstätter, R. und Stoll, A. (1913)**

Untersuchungen über Chlorophyll. Methoden und Ergebnisse, 206-209 Verlag von Julius Springer, Berlin

**Zeidler, J. G., Schwender, J., Müller, C., Wiesner, J., Weidemeyer, C., Beck, E., Jomaa, H. und Lichtenthaler, H. K. (1998)**

Inhibition of the non-mevalonate 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin.

*Z. Naturforsch.* **53 c**, 980-986

## VII. ANHANG

### VII.1. verwendete Oligonukleotide

HCS 22	5'-TAG GTA CCA TGG CCA CCT CCC ACC T-3'
HCS22BclI-2	5'-CGC GCG TGA TCA ATG GCC ACC TCC CAC CCT-3'
HCS 23	5'-CGC ATA AGC TTC AAG GGG AAA CAA TTT G-3'
HCS 29	5'-CGC ATA AGC TTT CAG TGG CTG GTC GCC AG-3'
HCS 41	5'-CGCTAA GCT TTC AGC TGG TCG CCA GGG C-3'
HCS 44	5'-GAC GAC GAC AAG ATG GCC ACC TCC CAC-3'
HCS 45	5'-GAG GAG AAG CCC GGT TCA TGT CTG CGT GTA TCC-3'
HCS 46	5'-CGC TAA GCT TTC AGT GGG CGG TC-3'
HCS 47	5'-CGC TAA GCT TTC AGG TCG CCA GGG CGG-3'
HCS 50	5'-GTC ACA AAA TCT ATT GTT GCC ATG CTG ATG TCT GG-3'
HCS 51	5'-CCA GAC ATC AGC ATG GCA ACA ATA GAT TTT GTG AC- 3'
HCS 52	5'-GGG GAG TGC TTG CTG GAG CAG CTG CC-3'
HCS 53	5'-GGC AGC TGC TCC AGC AAG CAC TCC CC-3'
HCS 54	5'-CCG CCA AAT GGA TAG CTG TTG GAG CAA TTG ACA TCA CC-3'
HCS 55	5'-GGT GAT GTC AAT TGC TCC AAC AGC TAT CCA TTT GGC GG-3'
HCS 58	5'-GGG ATT GCT ATT GTA AAT GCT TTT AAG AGT ATT GAG GGG G-3'
HCS 59	5'-CCC CCT CAA TAC TCT TAA AAG CAT TTA CAA TAG CAA TCC C-3'
HCS 60	5'-GGG CAG GGG CTG ATT TTC CTA TTA TTT TTT ACC-3'
HCS 61	5'-GGT AAA AAA TAA TAG GAA AAT CAG CCC CTG CCC-3'
HCS 62	5'-GAC TGG TAC GAT GCT GAC ATT GAT GC-3'
HCS 63	5'-GCA TCA ATG TCA GCA TCG TAC CAG TC-3'
HCS 66	5'-GTT ATA TTG GCT TGC CCG CGT GGG CTG GCC AGG C -3'
HCS 67	5'-GCC TGG CCA GCC CAC GCG GGC AAG CCA ATA TAA C-3'
HCS 68	5'-CGG GAT TGC TAT TGT AGC TGA TTT TAA GAG TAT TGA GGG GG-3'

---

HCS 69	5'-CCC CCT CAA TAC TCT TAA AAT CAG CTA CAA TAG CAA TCC CG-3'
HCS 74	5'-GCT ATT AAT GAG CCT TAT GCT CCT ATT CCT TCT GGA GC-3'
HCS 75	5'-GCT CCA GAA GGA ATA GGA GCA TAA GGC TCA TTA ATA GC-3'
HCS 78	5'-GCT ATT GTA AAT GAT TTT GCG AGT ATT GAG GGG GAT AG-3'
HCS 79	5'-CTA TCC CCC TCA ATA CTC GCA AAA TCA TTT ACA ATA GC-3'
HCS 80	5'-GGA AAC CGC CAA AGC GAT ATG TGT TGG AGC-3'
HCS 81	5'-GCT CCA ACA CAT ATC GCT TTG GCG GTT TCC-3'
HCS 84	5'-GCA TGA TTT TCC TAT TAT TTT TTT CCT TGC TCT GGG TGG-3'
HCS 85	5'-CCA CCC AGA GCA AGG AAA AAA ATA ATA GGA AAA TCA TGC-3'
HCS 86	5'-GGA TCC TTA CTT TCT TTC ATA TAT TCA GCA CC-3'
HCS 87	5'-GGT GCT GAA TAT ATG AAA GAA AGT AAG GAT CC-3'
HCS 88	5'-GCT CTT GGT GCG AGT TTT ATT GGC TTG CCC TGG-3'
HCS 89	5'-CCA GGG CAA GCC AAT AAA ACT CGC ACC AAG AGC-3'
HCS 90	5'-GTC CTA ACT TGC TTG TTC AGC ATA GCT GGG C-3'
HCS 91	5'-GCC CAG CTA TGC TGA ACA AGC AAG TTA GGA C-3'
HCS 92	5'-CCT TAC TTT CTT ACA TAT TCT CAG CAC CAC CTC TCA AGC-3'
HCS 93	5'-GCT TGA GAG GTG GTG CTG AGA ATA TGT AAG GGG GTA AGG-3'
HCS 94	5'-GCT GAT GTC TGG TCC AGC TCT TAC AGG ATA CAC G-3'
HCS 95	5'-CGT GTA TCC TGT AAG AGC TGG ACC AGA CAT CAG C-3'
HCS 96	5'-CCT GAT ATT GTT GTC CTA ACT GCC TTG TAC AGC ATA GC-3'
HCS 97	5'-GCT ATG CTG TAC AAG GCA GTT AGG ACA ACA ATA TCA GG-3'
HCS 105	5'-TAG GTA CCA TGG TAT GGA AGA TCC GTC TTC-3'
HCS 106	5'-TAG GTA CCA TGG GGA AGA TCC GTC TTC AAC-3'

---

HCS 107	5'-GGA AGA TCG CGC TTC AAC TTA CTA AGC C-3'
HCS 108	5'-GGC TTA GTA AGT TGA AGC GCG ATC TTC C-3'
HCS 109	5'-GAG TAT TGA GGG GGA TGC AAC TCT GGG ACT TCA GTC- 3'
HCS 110	5'-GAC TGA AGT CCC AGA GTT GCA TCC CCC TCA ATA CTC- 3'
HCS 115	5'-GAG ACC AAT ATA TGG AAG ATC AAG CTT CAA CTT ACT AAG CCA GTG-3'
HCS 116	5'-CAC TGG CTT AGT AAG TTG AAG CTT GAT CTT CCA TAT ATT GGT CTC-3'
HCS 117	5'-GAG ACC AAT ATA TGG AAG ATC CAC CTT CAA CTT ACT AAG CCA GTG-3'
HCS 118	5'-CAC TGG CTT AGT AAG TTG AAG GTG GAT CTT CCA TAT ATT GGT CTC-3'
HCS 119	5'-CAT TGA TGC TAT TAA TGA GCC TTA TAA GCC TTA TAA GCC TAT TCC TTC TGG AGC-3'
HCS 120	5'-GCT CCA GAA GGA ATA GGC TTA TAA GGC TCA TTA ATA GCA TCA ATG-3'
HCS 121	5'-GAT GCT ATT AAT GAG CCT TAT CAT CCT ATT CCT TCT GGA GC-3'
HCS 122	5'-GCT CCA GAA GGA ATA GGA ATA GGA TGA TAA GGC TCA TTA ATA GCA TC-3'
HCS 123	5'-CAG GAT ACA CGC AGA CAA TTG CTG ACT GGT ACG ATC GAT CG-3'
HCS 124	5'-CGA TCG ATC GTA CCA GTC AGC AAT TGT CTG CGT GTA TCC TG-3'
HCS 125	5'-CAG GAT ACA CGC AGA CAA TTA ATG CCT GGT ACG ATC GAT CG-3'
HCS 126	5'-CGA TCG ATC GTA CCA GGC ATT AAT TGT CTG CGT GTA TCC TG-3'
HCS 127	5'-GAC AAT TAA TGA CTG GTA CGC TCG AGA CAT TGA TGC TAT TAA TGA G-3'
HCS 128	5'-CTC ATT AAT AGC ATC AAT GTC TCG AGC GTA CCA GTC ATT AAT TGT C-3'

HCS 129            5'-GGT ACG ATC GAG ACA TTG CTG CTA TTA ATG AGC CTT  
                         ATC G -3'

HCS 130            5'-CGA TAA GGC TCA TTA ATA GCA GCA ATG TCT CGA TCG  
                         TAC C-3'

## VII.2. Sequenzen der in dieser Arbeit erstellten Mutanten

Die Sequenzen wurden bei Toplab bzw. Medigenomix (beide Martinsried) erstellt.

ATG GCC ACC TCC CAC CCT CTC GCC GCC GCC GCC GCC ACA TCG TCC	45			
TCC TCG GCC ACC TTC CGC CCT CCT CTC CGA TTC CTG TCC TCA CCG	90			
CCT TCT TCA CTA ACC CTC AAC CGG CGG CGG TCA TTC CCG GTG GTA	135			
TGC GCG GCC GAC GCG GAC GCT AAA GAA ACA ACG AAG AAG CCA ACG	180			
ATC CCA GAT AAG GCG CCG GCG GCA GGG TCG AGC TTC AAC CAG CTG	225			
CTC GGA ATC AAA GGC GCC AAG CAA GAG ACC AAT ATA TGG AAG ATC	270			
<b>1.</b>				
<u>CGT</u> CTT CAA CTT ACT AAG CCA GTG ACA TGG CCT CCG CTT GTC TGG	315			
<b>2.</b>				
GGA GTG CTT <u>TGT</u> GGA GCA GCT GCC TCC GGA AAT TTC CAC TGG ACA	360			
<b>3.</b>				
GTT GAA GAT GTC ACA AAA TCT ATT GTT <u>TGC</u> ATG CTG ATG TCT GGT	405			
<b>4.</b>	<b>5.</b>	<b>6.</b>	<b>7.</b>	
CCA <u>TGT</u> CTT ACA GGA TAC ACG CAG ACA ATT <u>AAT</u> <u>GAC</u> TGG TAC <u>GAT</u>	450			
<b>8.</b>	<b>9.</b>	<b>10.</b>		
<u>CGA</u> GAC ATT <u>GAT</u> GCT ATT AAT GAG CCT TAT <u>CGT</u> CCT ATT CCT TCT	495			
GGA GCT ATA TCA GAA AAT GAG GTT ATT ACT CAG ATC TGG GTA TTA	540			

TTG TTA GGA GGT CTT GGG TTG GGT GCT TTG TTA GAC ATA TGG GCA	585
<b>11.</b>	<b>12.</b>
GGG <u>CAT</u> GAT TTT CCT ATT ATT TTT <u>TAC</u> CTT GCT CTG GGT GGA TCC	630
<b>13.</b>	<b>14.</b>
TTA CTT TCT <u>TAC</u> ATA <u>TAT</u> TCA GCA CCA CCT CTC AAG CTC AAG CAG	675
	<b>15.</b>
AAT GGA TGG ATA GGA AAT TTT GCT CTT GGT GCG AGT <u>TAT</u> ATT GGC	720
<b>16.</b>	
TTG CCC <u>TGG</u> TGG GCT GGC CAG GCG CTA TTT GGA ACT CTT ACT CCT	765
	<b>17.</b>
	<b>18.</b>
GAT ATT GTT GTC CTA ACT <u>TGC</u> TTG <u>TAC</u> AGC ATA GCT GGG CTC GGG	810
	<b>19.</b>
	<b>20.</b>
	<b>21.</b>
	<b>22.</b>
ATT GCT ATT GTA <u>AAT</u> <u>GAT</u> TTT <u>AAG</u> AGT ATT GAG GGG GAT <u>AGA</u> ACT	855
CTG GGA CTT CAG TCA CTT CCG GTT GCT TTT GGT ATG GAA ACC GCC	900
<b>23.</b>	<b>24.</b>
AAA <u>TGG</u> ATA <u>TGT</u> GTT GGA GCA ATT GAC ATC ACC CAA TTA TCT GTT	945
GCA GCT TAC CTC TTG AGC ACC GGC AAG CTG TAT TAT GCC CTG GCA	990
CTA CTT GGA CTA ACA ATT CCC CAG GTG ATC TTG CAG TTC CAG TAC	1035
TTC CTG AAG GAC CCT GTG AAG TAC GAT GTC AAA TAC CAG GCG AGC	1080
GCG CAA CCG TTC TTC GTC TTC GGC CTG CTG GTT ACC GCC CTG GCG	1125



STOP

ACC AGC CAC TGA

1170

**Mutationen:**

1.	R91A	CGT	→	<b>GCT</b>
	R91K	CGT	→	<b>AAG</b>
	R91H	CGT	→	<b>CAT</b>
2.	C109A	TGT	→	<b>GCT</b>
3.	C130A	TGC	→	<b>GCC</b>
4.	C137A	TGT	→	<b>GCT</b>
5.	N146A	AAT	→	<b>GCT</b>
6.	D147A	GAC	→	<b>GCC</b>
7.	D150A	GAT	→	<b>GCT</b>
8.	R151A	CGA	→	<b>GCT</b>
9.	D154A	GAT	→	<b>GCT</b>
10.	R161A	CGT	→	<b>GCT</b>
	R161K	CGT	→	<b>AAG</b>
	R161H	CGT	→	<b>CAT</b>
11.	H197A	CAT	→	<b>GCT</b>
12.	Y204F	TAC	→	<b>TTC</b>
13.	Y214F	TAC	→	<b>TTC</b>
14.	Y216F	TAT	→	<b>TTC</b>
15.	Y238F	TAT	→	<b>TTT</b>
16.	W243A	TGG	→	<b>GCG</b>
17.	C262A	TGC	→	<b>GCC</b>
18.	Y264F	TAC	→	<b>TTC</b>
19.	N275A	AAT	→	<b>GCT</b>
20.	D276A	GAT	→	<b>GCT</b>
21.	K278A	AAG	→	<b>GCG</b>
22.	R284A	AGA	→	<b>GCA</b>
23.	W302A	TGG	→	<b>GCG</b>
24.	C304A	TGT	→	<b>GCT</b>

**Lebenslauf:**

**Name:** Heidi Schmid

**geboren am** 06.09.1971

**in** München

**1978-1982** Grundschule an der Regina-Ullmann-Str. in München

**1982-1992** St.-Anna-Gymnasium München  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

**1992-1998** Studium der Biologie an der LMU München  
Abschluß: Diplom

**Okt. 1998** Beginn der Promotion im Department für Biologie I -Botanik- der  
LMU München am Lehrstuhl für Phytochemie unter der Leitung von  
Prof. Dr. Dr. h. c. W. Rüdiger