

**Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen  
zur Faltung und Pigmentbindung  
des Lichtsammelproteins LHCII aus Photosystem II**

**Dissertation zur Erlangung des Grades**

**„Doktor der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz**

**Dirk Reinsberg  
geb. in Mayen/Eifel**

**Mainz, 2000**

**Dekan:**

**1. Berichterstatter:**

**2. Berichterstatter:**

**Tag der mündlichen Prüfung: 17.08.2000**

**(t) eins, (t) zwei, (t) drei im Sauseschritt,  
rennt die Zeit,  
wir laufen mit!  
(frei nach W. Busch)**

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Die Thylakoidmembran</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Der Photosystem II-Superkomplex .....	1
1.1.2 Lipide der Thylakoidmembran .....	2
<b>1.2 Der Hauptlichtsammelkomplex des Photosystem II (LHCII)</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 Pigmente des LHCII .....	5
1.2.2 Assembly des LHCII in der Thylakoidmembran .....	7
1.2.3 Energietransfer innerhalb des LHCII .....	8
1.2.4 Rekonstitution des LHCII .....	10
1.2.5 Zeitaufgelöste Messungen der Rekonstitution des LHCII .....	10
<b>1.3 Die Faltung löslicher Proteine und von Membranproteinen</b> .....	<b>11</b>
1.3.1 Faltung von löslichen Proteinen .....	11
1.3.1 Faltung von Membranproteinen .....	12
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>13</b>
1.4.1 Einfluß der Pigmente auf die Rekonstitution .....	14
1.4.2 Einfluß von Lipiden auf die Rekonstitution .....	14
1.4.3 Einfluß von abiotischen Faktoren auf die Rekonstitution .....	14
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>15</b>
2.1.1 Organismen .....	15
2.1.2 Enzyme .....	15
2.1.3 Marker .....	15
2.1.4 Geräte .....	16
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.2.1 Einschlußkörper-Isolierung .....	17
2.2.2 Proteinbestimmung .....	18
2.2.3 Pigmentisolierung .....	19
2.2.3.1 Reinigung der Xanthophylle .....	19
2.2.3.2 Reinigung der Chlorophylle .....	21
2.2.4 Analytische HPLC .....	22
2.2.5 Pigmentbestimmung .....	22
2.2.6 Untersuchung zur Reinheit der verwendeten Pigmente mittels Dünnschicht- Chromatographie .....	23
2.2.7 Lipidisolierung .....	23
2.2.8 Bestimmung der Kritischen Micellaren Konzentration (CMC) .....	25
2.2.9 Manuelle Induktion der Rekonstitution des LHCII durch Herabsetzen der SDS- Konzentration .....	25
2.2.10 Induktion der Rekonstitution durch Herabsetzung der Detergens-Konzentration mit der „Rapid-Mixing“-Methode .....	26
2.2.11 Stabilität der Komplexe .....	28
2.2.12 Rekonstitution nach Destabilisierung durch thermischen Streß .....	29
2.2.13 Nachweis des Komplexes durch schonende Gel-Elektrophorese .....	29
2.2.13.1 Gießen der Gele (5 Stück, 0,75 mm) .....	29
2.2.13.2 Schonende Gel-Elektrophorese .....	30
2.2.14 „Front-Face“-Technik zur Fluoreszenzmessung .....	30
2.2.15 Gleichgewichts-Fluoreszenz-Spektroskopie .....	31
2.2.16 Zeitaufgelöste Fluoreszenz-Spektroskopie .....	31
2.2.17 Bestimmung der kinetischen Parameter der Rekonstitution des LHCII .....	32
2.2.18 Abschätzung der Ausbeute an rekonstituiertem LHCII .....	33
2.2.18.1 Veränderung des Signals (summierte Amplituden) der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung .....	34
2.2.18.2 Gleichgewichts-Fluoreszenzemissions-Spektroskopie .....	34
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1 Beschreibung des Systems</b> .....	<b>35</b>
3.1.1 Energietransfer von Chl <i>b</i> nach Chl <i>a</i> .....	35

3.1.2	Nachweis der Rekonstitution über schwach-denaturierende PAGE	38
<b>3.2</b>	<b>Proteinvariation</b>	<b>39</b>
3.2.1	Rekonstitution mit Klon 35b1 – Kontrollversuch mit nicht-rekonstituierbaren Klon	39
3.2.2	Einfluß einer Prolin-Isomerisierung	39
<b>3.3</b>	<b>Variation der Reaktanten</b>	<b>40</b>
<b>3.4</b>	<b>Pigmentvariation</b>	<b>41</b>
3.4.1	Einfluß der Chl-Konzentration und des Chl <i>a/b</i> -Verhältnisses auf die Rekonstitution des LHCII	41
3.4.1.1	Einfluß der Chl-Konzentration und des Chl <i>a/b</i> -Verhältnisses bei der Rekonstitution auf die thermische Stabilität des LHCII	45
3.4.1.2	Einfluß der Chl-Konzentration und des Chl <i>a/b</i> -Verhältnisses der Rekonstitution auf die Reassoziaton des LHCII nach thermischer Dissoziation	46
3.4.2	Einfluß der Xanthophyll-Konzentration	47
3.4.2.1	Einfluß der Gesamt-Xanthophyll-Konzentration auf die Rekonstitution des LHCII	47
3.4.2.2	Einfluß der Lutein-Konzentration auf die Rekonstitution des LHCII	48
3.4.2.3	Einfluß der Violaxanthin-Konzentration auf die Rekonstitution des LHCII	49
3.4.2.4	Einfluß der Zeaxanthin-Konzentration auf die Rekonstitution des LHCII	50
3.4.2.5	Einfluß der Neoxanthin-Konzentration auf die Rekonstitution des LHCII	51
<b>3.5</b>	<b>Einfluß von Lipiden und Detergentien auf die Rekonstitution des LHCII</b>	<b>51</b>
3.5.1	Beschreibung des Systems hinsichtlich der Lipid-Detergens-Interaktion	52
3.5.2	Einfluß von DPPG und DOPG auf die Rekonstitution des LHCII	54
3.5.3	Einfluß von DGDG und MGDG auf die Rekonstitution des LHCII	55
3.5.3.1	Einfluß von Phospho- und Galactolipiden auf die thermische Stabilität des rekonstituierten LHCII	56
3.5.3.2	Einfluß von Phospho- und Galactolipiden auf die Reassoziaton des thermisch-dissoziierten LHCII	57
3.5.4	Einfluß von Octyl-Glycosid auf die Rekonstitution des LHCII	57
3.5.4.1	Einfluß von Octyl-Glycosid auf die thermische Stabilität des rekonstituierten LHCII	58
3.5.5	Einfluß von Laurylmaltosid (LM) auf die Rekonstitution des LHCII	58
<b>3.6</b>	<b>Einfluß der Temperatur auf die zeitaufgelöste Rekonstitution des LHCII</b>	<b>59</b>
3.6.1	Arrhenius-Diagramm zur Rekonstitution des LHCII	60
3.6.2	Einfluß der Rekonstitutionstemperatur auf die Stabilität des rekonstituierten LHCII	62
3.6.3	Einfluß der Rekonstitutionstemperatur auf die Reassoziaton des dissoziierten LHCII	62
<b>3.7</b>	<b>Einfluß des pH-Wertes auf die zeitaufgelöste Rekonstitution des LHCII</b>	<b>62</b>
3.7.1	Einfluß des pH-Wertes auf die Stabilität des rekonstituierten LHCII	64
3.7.2	Einfluß des pH-Wertes auf die Reassoziaton des dissoziierten LHCII	65
<b>3.8</b>	<b>Einfluß der Viskosität der Rekonstitutionslösung auf die zeitaufgelöste Rekonstitution des LHCII</b>	<b>65</b>
3.8.1	Einfluß der Viskosität auf die Stabilität des rekonstituierten LHCII	67
3.8.2	Einfluß der Viskosität auf die Reassoziaton des dissoziierten LHCII	67
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
<b>4.1</b>	<b>Vergleich der Methoden zur zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung der Rekonstitution des LHCII</b>	<b>68</b>
<b>4.2</b>	<b>Optimierung der Rekonstitutionsbedingungen</b>	<b>68</b>
<b>4.3</b>	<b>Unterschiede der zeitlich aufgelösten Signaländerungen von Chl <i>b</i> und Chl <i>a</i></b>	<b>69</b>
<b>4.4</b>	<b>Prolin-Isomerisierung beeinflusst nicht die Rekonstitution des LHCII</b>	<b>70</b>
<b>4.5</b>	<b>Probleme bei der Berechnung der Ausbeute an rekonstituiertem LHCII</b>	<b>70</b>
<b>4.6</b>	<b>Faltungskinetik des LHCII im Vergleich zu Membranproteinen und löslichen Proteinen</b>	<b>71</b>
<b>4.7</b>	<b>Erhöhung der Reaktanten-Konzentration beschleunigt <math>t_2</math> und <math>t_3</math></b>	<b>73</b>
4.7.1	Reaktanten-Konzentration beeinflusst nicht die Ausbeute der Rekonstitution, aber das Amplituden-Verhältnis der Reaktionszeiten	74

---

4.7.2	Konzentrationsbereich der Reaktanten ist zu gering zur Einschätzung der Gleichgewichtseinstellung der Rekonstitution	75
<b>4.8</b>	<b>Pigmentangebot limitiert die Bildungsgeschwindigkeit von LHCII</b>	<b>75</b>
4.8.1	Limitierung durch Chlorophylle	75
4.8.2	Limitierung durch Xanthophylle	75
<b>4.9</b>	<b>Chl a und Chl b limitieren einzelne Reaktionsphasen der Rekonstitution in unterschiedlichem Maß</b>	<b>76</b>
<b>4.10</b>	<b>Native Lipide zeigen keinen spezifischen Einfluß auf die Rekonstitution des LHCII</b>	<b>79</b>
<b>4.11</b>	<b>Abiotische Faktoren beeinflussen spezifisch die Rekonstitution des LHCII</b>	<b>81</b>
4.11.1	Höhere Temperaturen verkürzen die Reaktionszeit	81
4.11.1.1	Aktivierungsenergie der Rekonstitution des LHCII	82
4.11.2	Niedrige pH-Werte verlängern die Rekonstitutionszeit	83
4.11.3	Hohe Viskosität verlängert die Rekonstitutionszeit	83
<b>4.12</b>	<b>Mögliche Reaktionstypen der Rekonstitution des LHCII</b>	<b>83</b>
<b>4.13</b>	<b>Thermische Stabilität des rekonstituierten LHCII</b>	<b>85</b>
4.13.1	Hohes Chl a/b-Verhältnis verringert die thermische Stabilität	86
4.13.2	Native Lipide erhöhen die thermische Stabilität	86
4.13.3	Abiotische Faktoren beeinflussen spezifisch die thermische Stabilität	87
4.13.4	Native Lipide beeinflussen spezifisch die Reassoziaton des dissoziierten LHCII	88
<b>4.14</b>	<b>Ausblick</b>	<b>89</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>91</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	<b>93</b>

## Abkürzungsverzeichnis:

$A_{280}$	Absorbanz bei 280 nm
$A_2/A_3$	Quotient der Amplituden der Reaktionszeit 2 und Reaktionszeit 3
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BR	Bacteriorhodopsin
Chl	Chlorophyll
CMC	Kritische micellare Konzentration
CP	Chlorophyllbindendes Protein
DC	Dünnschichtchromatographie
DGDG	Digalactosyl-Diacyl-Glycerin
DOPG	Dioleoyl-Phosphatidyl-Glycerin
DPPG	Dipalmitoyl- Phosphatidyl-Glycerin
DTT	1,4-Dithio-Threitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LHCII	Lichtsammelkomplex der PhotosystemII
Lhcb1	Lichtsammel-Chlorophyll- <i>a/b</i> -bindendes Protein 1
LM	Laurylmaltosid
MGDG	Monogalactosyl-Diacyl-Glycerin
OD	Optische Dichte
OG	Octyl-Glycosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PG	Phosphatidyl-Glycerin
pLhcb1	Vorläuferprotein des Lhcb1
PS	Photosystem
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Sulfolipid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
$\tau$	Reaktionszeit
Upm	Umdrehungen pro Minute
w/v	Gewicht pro Volumen

## 1 Einleitung

In den meist grünen Bereichen der autotrophen Organismen findet die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie statt. Der Vorgang dieser Umwandlung wird Photosynthese genannt. In den Zellen dieser grünen Bereiche befinden sich Chloroplasten, die Organellen, in denen die Photosynthese stattfindet. Die Chloroplasten sind mit einem Lipid-Membransystem, den Thylakoiden, durchzogen. In diesen Membranen befinden sich Proteinkomplexe, an denen die photochemischen Primärprozesse ablaufen, die Reduktionsäquivalente und Energie, in Form von  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  und ATP, bereitstellen.  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  und ATP dienen zum Aufbau von organischen Verbindungen. Abb. 1.1 zeigt eine Skizze des Membransystems mit Grana- und Stromathylakoiden und der Verteilung der Proteinkomplexe in diesen Bereichen.

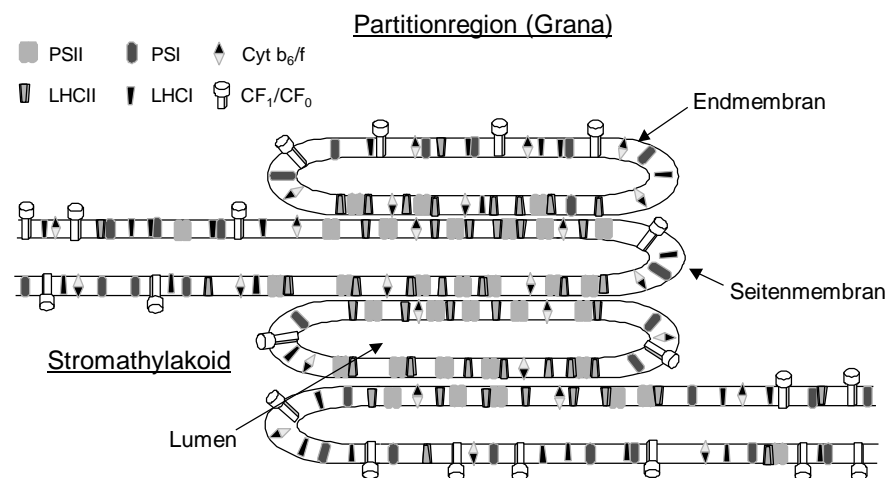


Abb. 1.1: Verteilung der Proteinkomplexe im Stroma- und Granabereich der Thylakoide.

PSII/LHCII befinden sich hauptsächlich im Granabereich; PSI/LHCI im Stroma- und End- und Seitenmembranen, der CF<sub>1</sub>/CF<sub>0</sub>-Komplex nur in diesem Bereich. Cyt b<sub>6</sub>/f-Komplex ist gleichmäßig verteilt.

(nach MÖRSCHER, 1999, verändert)

Das Photosystem II (PSII) mit seinen Antennen befindet sich hauptsächlich im Bereich der Granathylakoide. Die Hauptlichtsammelantenne des PSII (LHCII) kann von den Granabereichen in die Stromabereich wandern und an PSI assoziieren. (ALLEN, 1992; MÖRSCHER, 1999).

### 1.1 Die Thylakoidmembran

Bei den vier Proteinkomplexen handelt es sich um Superkomplexe aus vielen, miteinander assoziierten Proteinen, die als Nicht-Proteinbestandteile hauptsächlich Chlorophyll (Chl) und Xanthophyll gebunden haben. Die Superkomplexe sind in der Thylakoidmembran eingebettet.

#### 1.1.1 Der Photosystem II-Superkomplex

Der in dieser Arbeit untersuchte LHCII, befindet sich als Hauptantenne des Superkomplex (PSII) überwiegend in den Granathylakoiden. Der Superkomplex PSII ist als Dimer isoliert worden und zeigt einen spiegelsymmetrischen Aufbau. Der Aufbau des Superkomplexes wurde von vielen Arbeitsgruppen untersucht und dürfte wahrscheinlich eine Struktur wie in Abb. 1.2 aufweisen (BARBER, 1998; NIELD ET AL., 2000). Es wurden durch schonende Präparationen auch größere Komplexe isoliert (BOEKEMA ET AL., 1999). Der Kernbereich wird von den Reaktionszentren des PSII (Proteine D1 und D2) gebildet. Daran assoziiert befinden sich die inneren Antennen CP47 und CP43. Zwischen LHCII, der Hauptantenne und den inneren Antennen befinden sich die minoren Antennen CP26 und CP29, diese Pigment-Protein-Komplexe sind eng verwandt mit dem LHCII. Eine weitere minore Antenne, CP24,



wurde in den größeren Aggregaten des PSII in der Nähe des LHCII gefunden (BOEKEMA ET AL., 1999). Der LHCII selbst liegt als Trimer am Superkomplex gebunden vor. Zum Superkomplex gehören auch die außerhalb der Membran liegenden Proteine mit dem Molekulargewicht 33, 23 und 17 kDa.

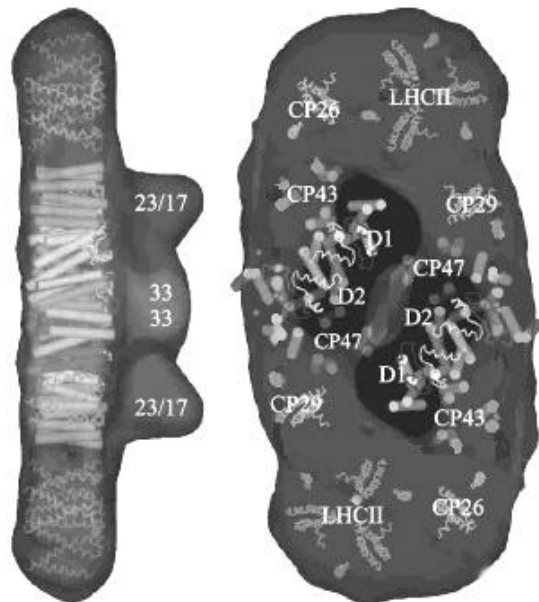


Abb. 1.2: Superkomplex PSII als Dimer.

Links: Seitenansicht des Komplexes. Im Kernbereich sind als Röhren die Membrandurchgangsbereiche der Proteine D1, D2, CP43, CP47, dargestellt. Als Spiralen sind die transmembranen Helices der minoren Antennen CP26, CP29 und die Hauptantenne LHCII, zu sehen. Die Ausdehnung und Orientierung der Thylakoidmembran (vertikal zur Blattebene) wird durch die Helices angedeutet. Die Proteine 33, 23 und 17 kDa befinden sich außerhalb der Membran auf der stromalen Seite der Thylakoidmembran.

Rechts: Aufsicht auf den Komplex (stromale Seite). Orientierung um 90° gegenüber linker Abb. gedreht (Membran in der Blattebene). Der dunkle Bereich zeigt das dimere Reaktionszentrum und die symmetrische Anordnung der Proteine oberhalb und unterhalb davon. Die Proteine 33, 23, 17 kDa sind auf dieser Abb. nicht dargestellt. (nach NIELD ET AL., 2000, verändert)

### 1.1.2 Lipide der Thylakoidmembran

Die Zusammensetzung der Lipide der Thylakoidmembran weist im Vergleich zu andern Membransystemen einige Besonderheiten auf. Sie besteht größtenteils aus Galacto-, Sulfo-, und Phospholipiden, die mit unterschiedlichen Anteilen in der Membran festgestellt werden. Die Lipidzusammensetzung wird u. a. von der Anzuchtstemperatur beeinflusst (TRÉMOLIÈRES ET AL., 1981; CHAPMANN ET AL., 1983; WEBB & GREEN, 1991; MURATA & SIEGENTHALER, 1998). Das Galactolipid Monogalactosyl-Diacyl-Glycerin (MGDG), ist mit über 50% das häufigste Lipid, gefolgt vom verwandten Digalactosyl-Diacyl-Glycerin (DGDG) mit ca. 30%. Das einzige Sulfolipid, Sulfochinovosyl-Diacyl-Glycerin (SL), ist mit 5-12% vertreten. Mit einem ähnlichen Anteil ist Phosphatidyl-Glycerin (PG) in der Membran zu finden (JOYARD ET AL., 1998). Auffällig ist das wahrscheinlich völlige Fehlen von Phosphatidylcholin (PC) in der Thylakoidmembran. Ein Lipid, das in anderen Membranen, u. a. in der äußeren Chloroplastenmembran, sehr häufig anzutreffen ist. Diese Vermutung war lange umstritten, aber die geringen Mengen an PC werden als Kontamination der Aufreinigung angesehen (DORNE ET AL., 1990; JOYARD ET AL., 1998). Die Struktur der in dieser Arbeit verwendeten Lipide, MGDG, DGDG, DPPG (Dipalmitoyl-PG) und DOPG (Dioleoyl-PG), ist auf Abb. 1.3 zu sehen.

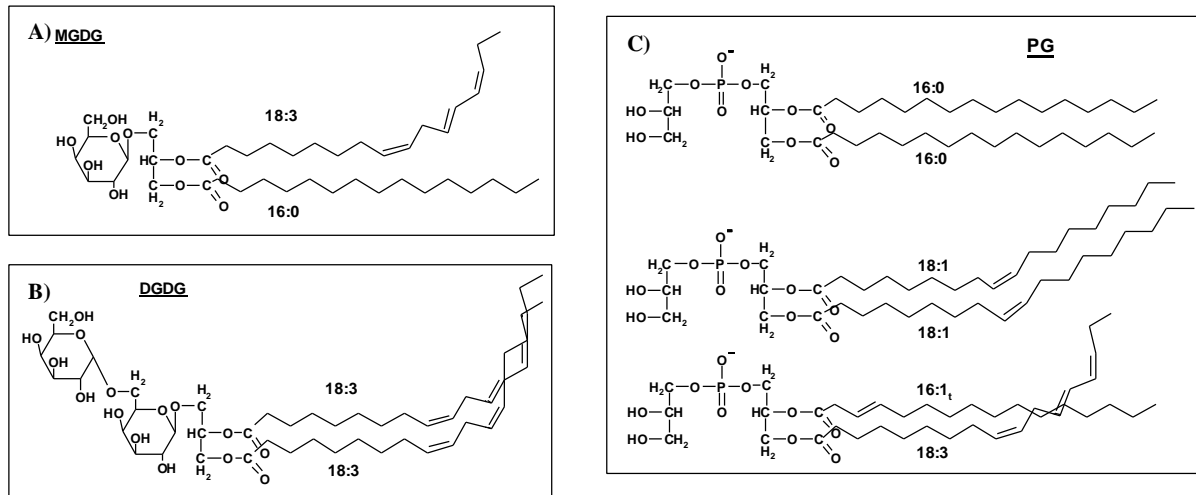


Abb. 1.3: Strukturen von Membranlipiden: A) MGDG, veresterte Fettsäuren: Palmitinsäure (16:0) und dreifach ungesättigte Linolensäure (18:3). B) DGDG, veresterte Fettsäuren: Zwei Linolensäuren. C) PG, veresterte Fettsäuren (von oben): Palmitinsäure, Oleinsäure (18:1),  $\Delta$ -3-trans-Hexadecensäure (16:1<sub>t</sub>) und Linolensäure. MGDG und DGDG wurden mit natürlicher Fettsäurezusammensetzung in dieser Arbeit eingesetzt (Kap. 2.2.7). PG wurde als Dipalmitoyl-PG (DPPG) und Dioleoyl-PG (DOPG) bezogen. PG mit anderen Fettsäuren wurde nicht verwendet.

(nach JOYARD ET AL., 1998, verändert)

Die Fettsäuren der Lipide sind zum großen Teil ungesättigt. Linolensäure, Kettenlänge 18 Kohlenstoffatome und drei Doppelbindungen (18:3) ist die mit Abstand häufigste Fettsäure (bis zu 80%). Ebenfalls zu finden sind die Fettsäuren Palmitinsäure (16:0), Linolsäure (18:2) und Hexadecatriensäure (16:3). Das in Thylakoiden vorkommende PG besitzt eine außergewöhnliche Fettsäure mit einer trans-Doppelbindung am dritten Kohlenstoffatom,  $\Delta$ -3-trans-Hexadecensäure (16:1<sub>t</sub>). PG mit dieser Fettsäure ist besonders mit einem Proteinkomplex des PSII, dem LHCII, assoziiert (TRÉMOLIÈRES ET AL., 1981; CHAPMANN ET AL., 1983; JOYARD ET AL., 1998). Das Lipid/Protein-Verhältnis in den Membranen ist unterschiedlich und von der physiologischen Aufgabe der Membran abhängig. Bei Erbsen wurde ein Lipid/Protein-Verhältnis von 0,6 [w/w] in der Thylakoidmembran gefunden (CHAPMAN ET AL.; 1983).

Da in dieser Arbeit auch der Einfluß der Lipide auf ein Protein untersucht wird, soll ein kurzer Einblick in die biophysikalischen Eigenschaften gegeben werden. Diese sind bei Lipiden recht unterschiedlich, vor allem das Phasenverhalten in wässrigen Lösungen. Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke des Systems beeinflussen auch die Phasen der Lipide (WEBB & GREEN, 1991; WILLIAMS, 1998). Die physiologisch wichtigen Phasen sind a) die lamellare Phase ( $L_{\beta}$ ), b) die flüssig-kristalline, lamellare Phase ( $L_{\alpha}$ ) und c) die Hex<sub>II</sub>-Phase, eine Phase mit zylindrisch, inversen Micellen in einem hexagonalem Gitter. Diese Phase bildet keine Lipiddoppelschichten. Die Lipide DGDG und PG, mit natürlicher Fettsäurezusammensetzung, befinden sich bei Raumtemperatur in der  $L_{\alpha}$ -Phase. PG mit zwei Palmitinsäureresten (DPPG) verestert, befindet sich in der  $L_{\beta}$ -Phase und tritt bei einer Temperatur von 40 °C in die  $L_{\alpha}$ -Phase über. Dies ist der einzige temperaturinduzierte Phasenübergang, der im physiologischen Temperaturbereich erfolgen kann. MGDG ist das einzige hier besprochene Lipid, das in der Hex<sub>II</sub>-Phase vorliegt. Wenn MGDG mit anderen Lipiden gemischt wird, so bilden sich aber nicht die inversen Micellen aus, sondern die lamellaren Phasen, wie sie auch in der Thylakoidmembran gegeben sind (BRUCE, 1998; WILLIAMS, 1998). Wenig bekannt ist aber das Phasenverhalten von Detergens-Lipid-Micellen. Jedoch werden häufig Experimente gerade in diesen Systemen durchgeführt, eine Versuchsbedingung, der, laut den Autoren WEBB & GREEN (1991), zu wenig Beachtung geschenkt wird. Eine Aufgabe der Lipide soll die Veränderung der Fluidität der Membran durch Änderung der Fettsäurezu-

sammensetzung der Lipide, aufgrund von Kältestreß sein (CHAPMAN ET AL., 1983; XU & SIEGENTHALER, 1996).

Die genaue Aufgabe der Hex<sub>II</sub>-Phasen-Lipide in der photosynthetischen Membran ist bis heute unklar. Die Annahme, daß Lipide wie MGDG, Proteine der Membran „versiegeln“, muß noch bestätigt werden (WILLIAMS, 1998). Nichtspezifische Lipid-Protein-Interaktionen wurden häufig beobachtet, ohne daß genaueres über die physiologische Bedeutung erfahren werden konnte (MOURITSEN, 1998; WILLIAMS, 1998).

Der direkte Einfluß von Lipiden der Thylakoidmembran auf Proteine konnte nur für wenige Beispiele gezeigt werden. Die am besten beschriebene Interaktion ist die des LHCII mit PG. TRÉMOLIÈRES ET AL. (1981) beobachteten die Wechselwirkung zwischen PG mit  $\Delta$ -3-trans-Hexadecensäure und LHCII bei der Isolation von Pigment-Protein-Komplexen der Thylakoidmembran. NUßBERGER ET AL. (1993) konnten PG mit Detergentien nicht vom LHCII entfernen. Erst eine Behandlung mit Phospholipase oder die Entfernung des N-Terminus des LHCII durch Verdau mit Trypsin, lösten die enge Bindung. Ohne PG verlor der LHCII aber auch seine Fähigkeit zur Trimerisierung. Hier ist eine direkte Wechselwirkung zwischen den Monomeren und Lipid gegeben, bei der der N-Terminus ebenfalls eine wichtige Rolle einnimmt. Die Fähigkeit zur Trimerisierung erhält der LHCII wieder nach Zugabe von PG mit  $\Delta$ -3-trans-Hexadecensäure oder auch synthetischem DPPG (HOBE ET AL., 1994). Bei spektroskopischen Untersuchungen von Monomeren des LHCII wurden Unterschiede zwischen LHCII mit und ohne PG gefunden. Eine Interpretation dieses Signals auf molekularer Ebene war jedoch nicht möglich (NUßBERGER ET AL., 1994). PG mit  $\Delta$ -3-trans-Hexadecensäure wurde bei *in vivo* Untersuchungen an *Chlamydomonas reinhardtii* als wesentliche Voraussetzung zur Bildung von oligomeren LHCII und somit der Entwicklung von Granathylakoiden beschrieben. Der Effekt dieser Lipide wurde mit der Verhinderung von Degradationsprozessen erklärt (DUBERET ET AL., 1994). Erst kürzlich wurde die Bedeutung von PG mit  $\Delta$ -3-trans-Hexadecensäure auch bei der Dimerisierung des PSII-Core festgestellt (KRUSE ET AL., 2000).

Zur Kristallbildung, d.h. zur Ausbildung einer hochgeordneten, viele Moleküle umfassenden, Struktur des LHCII, wird DGDG benötigt. Diese Wechselwirkung von Lipid und Monomeren spricht für mehrere periphere Bindungsstellen von DGDG am LHCII (NUßBERGER ET AL., 1993). DGDG wird jedoch nicht zur Trimerisierung des LHCII benötigt. (NUßBERGER ET AL., 1993; HOBE ET AL., 1994). In Isolationen von Pigment-Protein-Komplexen wurde DGDG mit den minoren Antennen CP24, CP26, CP29 sowie mit dem Reaktionszentrum des PSII assoziiert, gefunden und machte einen Lipidanteil von bis zu 30% aus (TRÉMOLIÈRES ET AL., 1994). Eine weitere für DGDG spezifische Aufgabe wurde mit Hilfe von Mutanten gefunden, deren Fähigkeit zur Synthese von DGDG unterbunden wurde. Aufgrund der Abwesenheit von DGDG konnten diese Mutanten keine kernkodierte Proteine in die Chloroplasten importieren (CHEN & LI, 1998). MGDG wurde eng assoziiert mit CP43 und CP47 gefunden, dabei wurde aber keine spezifische Wechselwirkung beschrieben (TRÉMOLIÈRES ET AL., 1994).

## 1.2 Der Hauptlichtsammelkomplex des Photosystem II (LHCII)

Der LHCII ist das wohl am häufigsten vorkommende Membranprotein der Erde. Seine Funktion als Antenne für das PSII erhöht die Quantenausbeute des Reaktionszentrums um den Faktor 100. Der Pigment-Protein-Komplex hält auch mehr als die Hälfte des Chls der photosynthetischen Membranen. Nativ ist der LHCII als Trimer organisiert und Teil des PSII Superkomplex (Abb. 1.2).

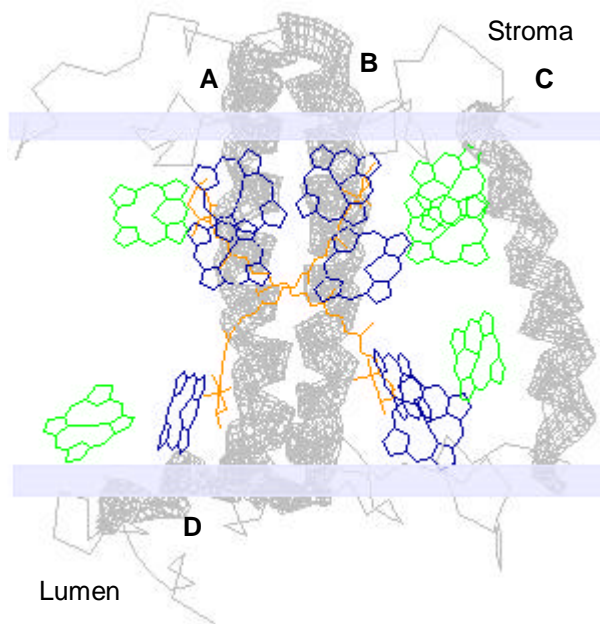


Abb. 1.4: Struktur des LHCII:

Die  $\alpha$ -Helices sind alphabetisch benannt und als graue Bänder dargestellt. Xanthophylle in orange. Porphyrinringe des Chl *a* dunkelblau, von Chl *b* hellgrün (zugeordnet nach KÜHLBRANDT ET AL., 1994). Hellblaue Bänder deuten die Grenzen der Thylakoidmembran an. Der N-Terminus befindet sich auf der stromalen Seite der Membran (erstellt mit Swiss pdb-Viewer Vers. 3.51, GlaxoWellcome, Genf, Schweiz; Gitterkoordinaten nach KÜHLBRANDT ET AL., 1994).

Es wurden aber auch schon Heptamere der LHCII-Trimere beschrieben, jedoch ist eine biologische Erklärung dieses Aggregates noch nicht gefunden worden (DEKKER ET AL., 1999). Die Struktur des LHCII wurde bis 3,4 Å aufgelöst. Der Pigment-Protein-Komplex ist in Abb. 1.4 dargestellt (KÜHLBRANDT ET AL., 1994). Der Komplex ist selbstorganisierend und kann unter geeigneten Bedingungen *in vitro* rekonstituiert werden (PLUMLEY & SCHMIDT, 1987; PAULSEN ET AL., 1990).

Der monomere LHCII besitzt drei Transmembran- $\alpha$ -Helices und eine, in der Membran eingebettete, amphipathische Helix auf der lumenalen Seite. Der N-Terminus des Komplexes befindet sich auf der stromalen Seite der Thylakoidmembran. Die  $\alpha$ -Helices A und B liegen 30° zur Membranebene geneigt und bilden einen linkshändigen „Supercoil“. Eine enge Verbindung der beiden Helices ist über zwei Glutamat-Arginin-Salzbrücken gegeben. Der „Supercoil“ zusammen mit den beiden zentralen Xanthophyllen wird als strukturgebende und stabilisierende Komponente des LHCII angesehen. Helix C ist von den beiden zentralen Helices abgesetzt und um 9° zur Membranebene gedreht. Die Längen der Helices sind 51 Å, 31 Å und 29 Å, für Helix A, B und C, damit ragt lediglich Helix C nicht über die Membrangrenzen hinaus (KÜHLBRANDT ET AL., 1994). Aber auch die Helices verbindenden Schleifen sind für die Stabilität des Komplexes notwendig. Durch Punktmutationen in diesen Regionen wurde der LHCII destabilisiert (HEINEMANN & PAULSEN, 1999).

### 1.2.1 Pigmente des LHCII

Die elektronenkristallographische Untersuchung konnte 12 Chle und zwei Xanthophylle in einem Monomer lokalisieren (KÜHLBRANDT ET AL., 1994). Aus biochemischen und spektroskopischen Experimenten ist eine Stöchiometrie von 12 - 15 Chle pro Apoprotein (Lhcb1), mit einem Chl *a/b*-Verhältnis zwischen 1,0 und 1,5, ermittelt worden (DAINESE & BASSI, 1991; HEMELRIJK ET AL., 1992; KÜHLBRANDT ET AL., 1994; REMELLI ET AL., 1999). Xanthophylle befinden sich in einem Verhältnis von zwei Luteine, einem Neoxanthin und 0,2 Violaxanthin pro Lhcb1, im Komplex (KÜHLBRANDT ET AL., 1994; LEE & THORNER, 1995; RUBAN ET AL., 1999). Bei sehr schonender Isolierung des nativen LHCII wurde aber auch ein Violaxanthin pro Monomer und somit insgesamt vier Xanthophylle im Komplex entdeckt (RUBAN ET AL., 1999).

Abb. 1.4 zeigt die Pigmente, die aus dem nativen LHCII isoliert werden können und in dieser Arbeit eingesetzt wurden.

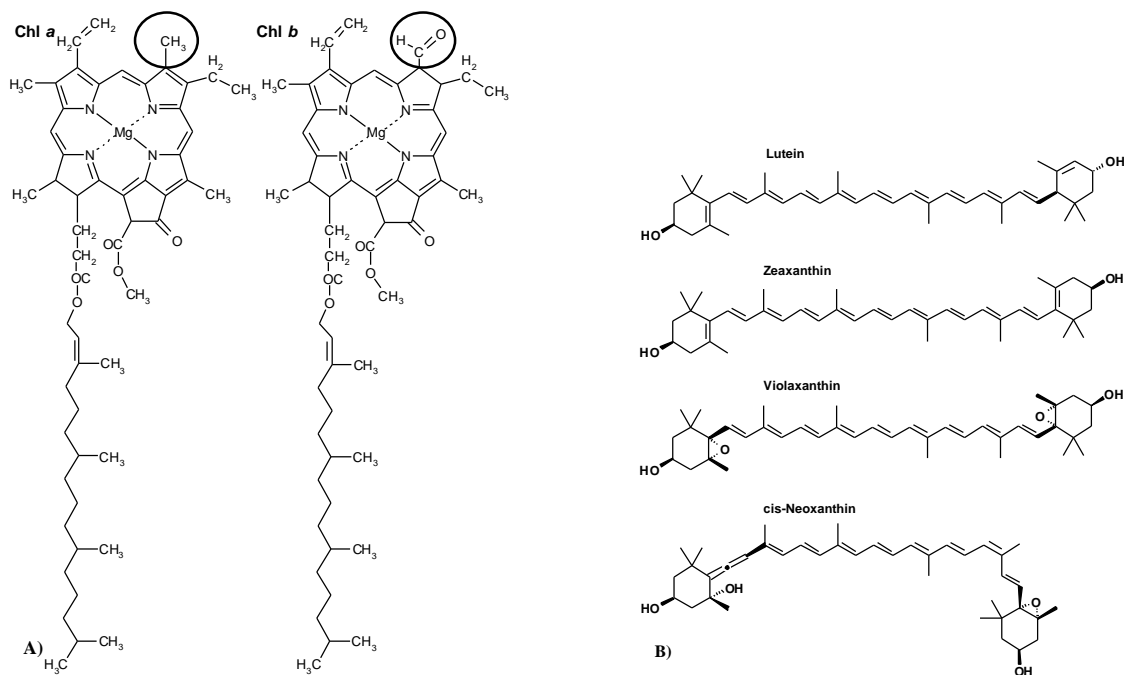


Abb. 1.4: Pigmente des LHCII. A) Chl a und Chl b mit Porphyrinringsystem durch konjugierte Doppelbindungen, die ein mesomeres System ergeben. Langkettiger, hydrophober Phytylrest an Kohlenstoffatom 17. Chl a mit Methylrest als funktionelle Gruppe am Kohlenstoffatom 7 (eingekreist); Chl b mit Formylrest (eingekreist). B) Native Xanthophylle des LHCII. Konjugierte Doppelbindungen zum Teil bis in den Jononring.

Chle absorbieren Licht im blauen und roten Bereich des sichtbaren Spektrums. Möglich wird dies durch das ausgedehnte System konjugierter Doppelbindungen des Porphyrinrings. Die Aufgabe dieser Pigmente ist die Absorption von Lichtquanten und die Weiterleitung der aufgenommenen Energie. Chl a und Chl b unterscheiden sich in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften, bedingt durch die verschiedenen funktionellen Gruppen am Kohlenstoffatom 7 des Porphyrinringes (Abb. 1.4). Xanthophylle sind Sauerstoffderivate des Carotins. Sie absorbieren im blauen bis blaugrünen Bereich des Spektrums. Diese Pigmente fungieren als Antennenpigmente und schützen darüber hinaus den Photosynthese-Apparat vor Schäden durch zu hohe Lichtintensitäten. Lichtenergie, die nicht weitergeleitet werden kann, führt zu unerwünschten Anregungszuständen der Chle (Tripletanregung, Kap. 1.2.4). Xanthophylle können die Energie von Triplet-Chl und Singulett-Sauerstoff übernehmen und über Wärme abgeben (KNOX & DODGE, 1985; DEMMING-ADAMS & ADAMS, 1996; RICHTER, 1997; SCHEER, 1999).

Die Pigmente sind nichtkovalent am LHCII gebunden. Die Bindung der Chle erfolgt überwiegend über Aminosäurereste als Liganden. Aus den elektronenkristallographischen Untersuchungen und durch Experimente mit Mutanten wurden folgende Aminosäuren des Lhcb1 als Bindungspartner festgestellt. Asparagin (N183), Glutamin (Q131, Q197), Glycin (G78) und Histidin (H68, H212). Für drei Chle wurden Arginin-Glutamat-Salzbrücken als Bindungsstellen erkannt (E180/R70, E65/R185 und E139/R142). Für die restlichen vier Chle werden Chle als Liganden angenommen (KÜHLBRANDT ET AL., 1994; CROCE ET AL., 1999b; REMELLI ET AL., 1999; ROGL & KÜHLBRANDT, 1999; YANG ET AL., 1999). Die beiden zentralen Xanthophylle werden über ihre Jononringe und vier konservierte Bereiche des Lhcb1 positioniert, dabei handelt es sich vermutlich um Lutein (PICHESKY & JANSSON, 1996; CROCE ET AL., 1999, HOBE ET AL., 2000). Zumindest ein Xanthophyll besitzt ebenfalls ein Chl als Liganden

(CROCE ET AL., 1999b; REMELLI ET AL., 1999). Die fehlenden Pigmente, die aufgrund der biochemischen und spektroskopischen Untersuchungen vorhanden sein müßten, werden vermutlich über Pigment-Pigment-Wechselwirkungen am Lhcb1 gebunden. Lediglich für die Bindung von Neoxanthin konnte mit Hilfe spektroskopischer Untersuchungen an Mutanten von Lhcb1, die Lage von Neoxanthin im Komplex festgestellt werden. Das Xanthophyll bindet am Komplex zwischen dem „Supercoil“ und der Helix C in einem Winkel von 57° zur Membranebene (CROCE ET AL., 1999; CROCE ET AL., 1999b).

Die Bindungsstellen der Pigmente sind nicht ausschließlich entweder Chl *a* oder Chl *b* bzw. einem bestimmten Xanthophyll zugeordnet. Die Pigmente werden vielmehr mit unterschiedlichen Affinitäten in die Bindungsstellen eingebaut. Für Xanthophylle konnte dies schon genauer untersucht werden. Die beiden zentralen Bindungsstellen für Xanthophylle im „Supercoil“ des LHCII, haben eine sehr hohe Affinität zu Lutein (CROCE ET AL., 1999b; HOBE ET AL., 2000). Zeaxanthin kann mit leicht geringerer Affinität an diesen Stellen gebunden werden, Neoxanthin und Violaxanthin fallen dagegen in Kompetitionsversuchen deutlich dagegen ab. Eine dritte Bindungsstelle diskriminiert stark Lutein und Zeaxanthin und bindet mit einer höheren Affinität Neoxanthin gefolgt von Violaxanthin (HOBE ET AL., 2000). Eine nur vage Aussage ist zu einer vierten Bindungsstelle möglich, da für Violaxanthin als einzigem Pigment weder eine mögliche Bindungsstelle noch eine sehr hohe Affinität für eine solche ermittelbar ist. Violaxanthin ist aber trotzdem mit bis zu einem Molekül im Komplex isolierbar, so kann angenommen werden, daß es sich bei der vierten um die Violaxanthinbindungsstelle handelt (RUBAN ET AL., 1999).

Für Chl können ebenfalls unterschiedliche Affinitäten festgestellt werden. Bei Punktmutationen am LHCII wurden drei Chl-Bindungsstellen mit Chl *a* oder Chl *b* gefunden (REMELLI ET AL., 1999). Auch unterscheiden sich die aufgrund theoretischer Überlegungen festgelegten Bindungsstellen für Chl *a* (Schutz durch Xanthophylle vor Triplett-Chl, Kap. 1.2.3) von spektroskopischen Untersuchungen dieser Positionen. Zwei Chl *a*-Bindungsstellen werden als Chl *b* spektroskopisch beschrieben (KÜHLBRANDT ET AL., 1994; TRINKUNAS ET AL., 1997; CONNELLY ET AL., 1997). Kompetitionsversuche zeigen auch eine Differenzierung in den Affinitäten für die Chle. Eine Abhängigkeit der Stöchiometrie der Chle im Komplex vom Chl *a/b*-Verhältnis, das in der Rekonstitution angeboten wird, ist ebenfalls beschrieben. Es gibt einige Bindungsstellen, die entweder nur von Chl *a* oder Chl *b* besetzt werden, weitere Stellen besitzen eine Abstufung in ihrer Affinität und eine dritten Gruppe von Chl-Positionen unterscheidet nicht zwischen Chl *a* oder Chl *b* (HOBE, FEY, PAULSEN, unveröffentlicht).

### 1.2.2 Assembly des LHCII in der Thylakoidmembran

Das Assembly ist am besten für Lhcb1 untersucht. Im Kern der Pflanzenzelle befindet sich das Gen für Lhcb1. Das Protein wird an Ribosomen des Cytoplasma transkribiert und in die Chloroplasten importiert und in die Thylakoidmembran inseriert. Dazu trägt das Vorläuferprotein (pLhcb1) eine N-terminalen Signalsequenz (stromal targeting domain) für den Transport über die Chloroplastenmembran. Das Vorläuferprotein passiert die äußere und innere Chloroplastenmembran über den Toc/Tic-Komplex (Translocon at the outer/inner chloroplast envelope), dabei wird ATP und GTP benötigt (SCHNELL & BLOBEL, 1993; THEG & SCOTT, 1993). Im Stroma wird die Signalsequenz von einer stromalen Peptidase (SPP) abgetrennt. cpSRP (chloroplast signal recognition particle) bindet am Lhcb1 und bildet mit dem Protein einen löslichen Transitkomplex (CLINE ET AL., 1989; LI ET AL., 1995; PAYAN & CLINE, 1991; KLIMYUK ET AL., 1999). cpSRP ist ein Trimer aus zwei cpSRP43 und einem cpSRP54. Der cpSRP43 bindet zwischen der zweiten und dritten Transmembranhelix an einem 18 Aminosäuren langen Bereich (L18) am Lhcb1 (TU ET AL., 1999; TU ET AL., 2000). Der Transit-

komplex bindet an cpFtsY (chloroplast signal recognition particle receptor protein) und GTP und kann somit Lhcb1 in die Membran inserieren, cpFtsY und cpSRP werden dabei vom Lhcb1 unter GTP-Hydrolyse freigesetzt (KOGATA ET AL., 1999; TU ET AL., 1999). Zur Insertion wird noch ein weiteres membranständiges Protein (Alb3) benötigt (MOORE ET AL., 2000).

Die Pigmente können auch mit dem Vorläuferprotein einen stabilen Komplex mit nativen Eigenschaften bilden. Eine Faltung ohne Pigmente findet zumindest *in vitro* nicht statt (PLUMLEY & SCHMIDT, 1987; PAULSEN & HOBE, 1992; PAULSEN ET AL., 1993). *In vivo* Experimente zeigten, daß durch das Fehlen von Chl *b*, der Komplex instabil ist und leichter über Thylakoidproteasen abgebaut werden kann (HARRISON ET AL., 1993; PREISS & THORNBER, 1995). Die Monomere des LHCII sind Vorläufer des nativ vorkommenden Trimers und können auch *in vivo* als natürliche Intermediate der Oligomere isoliert werden (DREYFUSS & THORNBER, 1994). Die Trimerisierung kann auch *in vitro* mit rekonstituierten Monomeren durchgeführt werden, dabei zeigen die rekonstituierten Trimere dem nativen Trimeren sehr ähnliche spektroskopische und biochemische Eigenschaften (HOBE ET AL., 1994, HOBE ET AL., 1995; KUTTKAT ET AL., 1996).

### 1.2.3 Energietransfer innerhalb des LHCII

Als Antenne hat der LHCII die Funktion der Sammlung von Energie und die Weiterleitung über die minoren und inneren Antennen zum Reaktionszentrum des PSII. Dabei kann man sich das Antennensystem und den LHCII als flachen Trichter vorstellen, in dem die eingefangene Energie mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Reaktionszentrum geführt wird. Die Aufnahme der Energie übernehmen die Pigmente des LHCII.

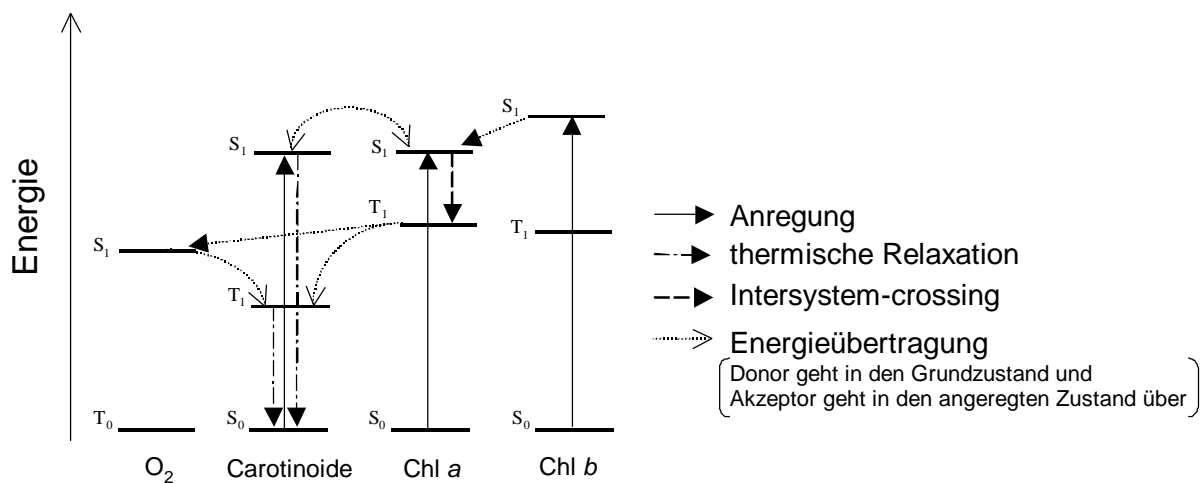


Abb. 1.5: Energieübertragung im LHCII zwischen Chl, Carotinoiden und Sauerstoff. Dargestellt sind nur die vibronisch relaxierten Zustände. Photochemie, Fluoreszenz, thermische Relaxation und Phosphoreszenz des Chls sind, der Übersichtlichkeit halber, nicht gezeigt (verändert nach POLIVKA ET AL., 1999; SCHEER, 1999).

Die Energieübertragung zwischen Pigmenten innerhalb der Antenne und auf Sauerstoff kann dem Jablonski-Diagramm (Abb. 1.5) entnommen werden. Chl *b* überträgt seine Energie aus dem angeregten Zustand (S<sub>1</sub>) im Regelfall auf Chl *a* im Grundzustand (S<sub>0</sub>). Violaxanthin und Lutein geben ihre angeregten Zustände ebenfalls an Chl *a* weiter. Chl *a* kann seine Energie aus dem angeregten Zustand auch auf ein Carotinoid, Zeaxanthin, übertragen. Dieser Mechanismus wird auch als nichtphotochemisches Quenchen der Chl *a*-Anregung bezeichnet. Chl kann, über einen Vorgang der „Intersystem crossing“ genannt wird, vom angeregten Singulett-Zustand in den Triplett-Zustand (T<sub>1</sub>) übergehen. Chl im angeregten Triplett-Zustand kann den, im Grundzustand befindlichen, Triplett-Sauerstoff in den angeregten, reaktiven Singulett-Zustand überführen. Singulett-Sauerstoff reagiert mit Molekülen, die eine hohe

Elektronendichte besitzen (wie die Doppelbindungen der Fettsäuren der Lipide in der Membran) und verursacht dadurch photooxidative Schäden. Dieser ungewünschte Zustand wird durch die Möglichkeit der Energieübernahme von Triplett-Chl oder von Singulett-Sauerstoff durch Lutein ermöglicht. Carotinoide können aus jedem Zustand ( $S_1$  oder  $T_1$ ) durch thermische Relaxation in den Grundzustand übergehen. Nicht dargestellt sind die Möglichkeiten der Chle, die aufgenommene Energie über die, im großen Maßen stattfindende Photochemie und die geringere Fluoreszenz, thermische Relaxation oder Phosphoreszenz, abzugeben (RICHTER, 1997; POGSON ET AL., 1998; POLIVKA ET AL., 1999; SCHEER, 1999).

Wie oben dargestellt können Lichtquanten von Chl *b* oder Xanthophyllen absorbiert und an Chl *a* weitergegeben sowie von Chl *a* selbst absorbiert werden. Wird Chl *b* angeregt, so gibt dieses Molekül mit einer Reaktionszeit von 0,5 ps die Energie an Chl *a* weiter (KWA ET AL., 1992; DU ET AL., 1994; VAN GRONDELLE ET AL., 1994). Dieser Energietransfer findet über eine excitonische Kopplung der Molekülorbitale der Chromophore statt, die sich im angeregten Zustand überlappen. Die Energieübertragung über den Förster-Energietransfer ist nicht, wie früher angenommen, auch innerhalb der Antenne zu finden, da die Energietransferraten für einen solchen Mechanismus zu schnell sind. Er ist zwischen den Pigment-Protein-Komplexen und zum Reaktionszentrum hin vorhanden (VAN GRONDELLE ET AL., 1994; SCHEER, 1999). Violaxanthin und Lutein können ebenfalls ihre aufgenommene Energie auf Chl *a* übertragen. Dabei scheint der Dexter-Energietransfer verwirklicht zu sein, der einen sehr engen Kontakt der Pigmente erfordert, da schon im nichtangeregten Zustand die Molekülorbitale überlappen (POGSON ET AL., 1998; SCHEER, 1999). Die Lebensdauer des angeregten Chl *b* reicht nicht aus, um das Pigment vom Singulett-Zustand in den Triplett-Zustand zu überführen. Das ist nur bei Chl *a* möglich, aus diesem Grund wurden die Chl *a*-Moleküle auch in der Struktur des LHCII um die zentralen Xanthophylle angeordnet, die den Triplett-Zustand effektiv auch über den Dexter-Energietransfer übernehmen und über Wärmeenergie abgeben können (KÜHLBRANDT ET AL., 1994; SCHEER, 1999). Ein Chl *a* gibt die vom LHCII aufgenommene Energie an die minoren Antennen weiter. Bei fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurde das Chl an der Position  $a_2$  (Abb. 4.1) als dieses spezielle Chl *a* angesehen. Jedoch wurde gerade diese Position in anderen spektroskopischen Untersuchungen als Chl *b* vermutet und nicht als das zentrale Pigment des LHCII angesehen (TRINKUNAS ET AL., 1997; REMELLI ET AL., 1999).

Chl *b* gibt seine Energie über eine Fluoreszenzemission bei 660 nm ab, wenn es seine Anregungsenergie nicht auf Chl *a* übertragen kann (z.B. durch zu großen Abstand zum nächsten Chl *a*). Ebenso kann Chl *a* fluoreszieren, die Wellenlänge der Emission liegt bei 680 nm. Diese Chl *a*-Emission ist eine typische Eigenschaft des isolierten LHCII, da die benachbarten Pigment-Protein-Komplexe fehlen, auf die die Energie übertragen werden könnte. Die Chl *a*-Fluoreszenz tritt auch auf, wenn der LHCII bei einer Wellenlänge angeregt wurde, bei der fast ausschließlich Chl *b* angeregt wird (470 nm). Diese Fluoreszenz zeigt die Energieübertragung von Chl *b* auf Chl *a*. Ein Fluoreszenzemissionsspektrum zwischen 600 nm und 750 nm des bei 470 nm angeregten LHCII, zeigt diese Eigenschaft (Abb. 3.1). Die Fluoreszenzemission ist somit ein hervorragender Indikator des Energietransfers von Chl *b* auf Chl *a* im LHCII (HOLZWARTH, 1986). Je intakter der isolierte oder rekonstituierte Komplex, desto stärker die Chl *b*-induzierte Fluoreszenz bei 680 nm. Ist der LHCII jedoch geschädigt, so steigt die Fluoreszenz bei 660 auf Kosten der Fluoreszenz bei 680 nm, aufgrund des freien Chl *b*, an.



#### 1.2.4 Rekonstitution des LHCII

Der LHCII kann entweder mit aus Thylakoiden gereinigtem Lhcb1,2 oder aus in *Escherichia coli* (*E. coli*) überexprimierten Lhcb1 und Pigmenten, rekonstituiert werden (PLUMLEY & SCHMIDT, 1987; PAULSEN ET AL., 1990). Der Vorteil der Rekonstitution aus dem überexprimierten Lhcb1 liegt in der Möglichkeit zur Untersuchung eines einzelnen Proteins aus der Proteinfamilie, ebenso können Mutationen am Protein eingeführt werden.

Die Rekonstitution des LHCII kann über Gefrier-Tau-Zyklen oder über einen Detergens-Wechsel erreicht werden (PAULSEN ET AL., 1990; PAULSEN ET AL., 1993). Bei letzterer Methode werden Pigmente (in Octyl-Glykosid (OG) gelöst) und das Apoprotein (in Natriumdodecylsulfat (SDS) gelöst) gemischt und anschließend wird Dodecylsulfat mit Hilfe von Kalium bei 4 °C ausgefällt. Das Apoprotein bindet die Pigmente und bildet in OG-Micellen einen, der nativen Struktur des LHCII ähnlichen, Pigment-Protein-Komplex. Bei einer Variation der Rekonstitutionsmethode mit Detergens-Wechsel, wird SDS durch Verdünnung unter die rekonstitutionsverhindernde Konzentration von 0,2% [w/v] gebracht (BOOTH & PAULSEN, 1996). Die beiden Methoden sind deutlich weniger stringent als die Gefrier-Tau-Methode und lassen eine Rekonstitution des LHCII zu, der in seiner Pigmentbindungsaffinität verändert wurde. Die Rekonstitution erscheint als hochkooperative Reaktion, die keine Komplexe zulässt, bei der Pigmente nicht in ausreichender Menge angeboten werden. Zur Induktion der Faltung des LHCII sind Pigmente eine zwingende Voraussetzung (PAULSEN ET AL., 1993). Lhcb1 mit unterschiedlich langen Deletionen des N- oder C-Terminus ließen sich bis zu einer bestimmten, maximalen Deletion rekonstituieren, bei der Deletion einer weiteren Aminosäure war keine Rekonstitution mehr möglich (PAULSEN & HOBE, 1992).

Der Pigment-Protein-Komplex kann mittels schwach-denaturierender PAGE (PLUMLEY & SCHMIDT, 1987; PAULSEN ET AL., 1990; BOOTH & PAULSEN, 1996) oder Saccharose-Dichtezentrifugation (HOBE ET AL., 1994) aufgereinigt werden. Dabei werden freie Pigmente und freies Protein vom Komplex getrennt. Die weitestgehende Übereinstimmung des rekonstituierten Komplexes mit dem nativen LHCII kann über CD- und Fluoreszenzspektroskopie (PLUMLEY & SCHMIDT, 1987; PAULSEN ET AL., 1990; PAULSEN ET AL., 1993), Insertion in Thylakoide (KUTTKAT ET AL., 1996), Protease-Verdau (PAULSEN ET AL., 1993) und Elektronen-Kristallographie (HOBE ET AL., 1994; ROGL & KÜHLBRANDT, 1999), nachgewiesen werden. Untersuchungen am rekonstituierten LHCII lassen somit Rückschlüsse auf den nativen LHCII zu.

#### 1.2.5 Zeitaufgelöste Messungen der Rekonstitution des LHCII

Hinweise auf Eigenschaften des LHCII hinsichtlich seiner Assemblierung können durch zeitaufgelöste Messungen der Faltungskinetiken gewonnen werden. Dazu wurde ein System etabliert, in dem die Rückfaltung in Detergens-Lipid-Mischmicellen, stattfinden kann (BOOTH & PAULSEN, 1996). Bei diesem Ansatz liegt das Apoprotein in 0,2% SDS vor. Die Pigmente werden in OG bzw. Lipid und OG gelöst. Das Zusammenführen der Lösungen mit identischem Volumen induziert die Rekonstitution des LHCII durch Verdünnen der SDS-Konzentration. Die Faltung kann anhand der Proteinfluoreszenz oder der Pigmentfluoreszenz verfolgt werden. Der sich etablierende Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a*, wird über eine Abnahme der Chl *b*-induzierten Chl *b*-Fluoreszenz bzw. der Zunahme der Chl *b*-induzierten Chl *a*-Fluoreszenz dargestellt und ist ein sehr gutes Indiz für die native Struktur des LHCII (BOOTH & PAULSEN, 1996). Bei den Messungen zur Faltung des LHCII wurde eine Komponente im Bereich von Millisekunden, eine zweite Komponente ( $\tau_1$ ) im Bereich von einer halben Minuten und eine dritte Komponente ( $\tau_2$ ) im Bereich von mehreren Minuten,

aufgelöst. Die erste Komponente ist als das Mischen der Micellen anzusehen.  $\tau_1$  wurde als pigmentbindender Schritt angenommen und  $\tau_2$  als Ausrichten der Pigmente und Etablieren des Energietransfers (BOOTH & PAULSEN, 1996).

### 1.3 Die Faltung löslicher Proteine und von Membranproteinen

Schon frühzeitig in der Forschung der Proteinbiochemie wurde vermutet, daß die dreidimensionale Struktur der Proteine schon in der eindimensionalen Aminosäuresequenz der Polypeptidkette festgelegt sein muß. Die zufällige Suche der richtigen Position jeder Aminosäure eines 100 Aminosäure langen Proteins wäre nicht in biologischen relevanten Zeiträumen beendet. Werden nur drei mögliche Positionen für die Aminosäuren angenommen, so wäre das Protein selbst bei einer Rate von  $10^{13}$  Konfigurationen pro Sekunde,  $10^{27}$  Jahre mit der zufälligen Suche beschäftigt, *in vivo* ist dieser Prozeß aber in Sekunden oder Minuten abgeschlossen. Dieses Phänomen wird als Levinthals Paradoxon bezeichnet (LEVINTHAL, 1969). Über Untersuchungen der Aminosäuresequenzen können, z.B. durch Hydrophathieplots der Aminosäurekette, Vorhersagen über die Sekundärstruktur des Proteins, wie z.B.  $\alpha$ -Helices, gemacht werden (VOETH & VOETH, 1994). Mit Hilfe von mathematischen Modellen konnte gezeigt werden, daß mit nur geringen angenommen energetischen Nachteilen der Konformation der einzelnen Aminosäuren bei der „zufälligen“ Suche nach der korrekten Konformation, die Faltungszeiten in biologisch relevante Zeiträume von Sekunden bis Minuten stattfinden (ZWANZIG ET AL., 1992).

#### 1.3.1 Faltung von löslichen Proteinen

Die spontane Proteinfaltung wird durch eine entropiegetriebene Reaktion und eine hydrophobe Komponente hervorgerufen. Energetisch ist eine Orientierung bevorzugt, bei der die hydrophoben Aminosäurereste ins Innere eines Proteins und die hydrophilen Aminosäurereste zur wäßrigen Phase angeordnet sind. Die Entropieerhöhung des Wasser aufgrund des Ausschlusses bei der Faltung des Proteins, ist größer als der Verlust der Entropie durch die dann hochgeordnete Struktur der Aminosäuren und ergibt somit in der Summe die entropiegetriebene Faltung des Proteins (GLASER, 1996). Zu Beginn der Faltung eines größeren Proteins wurde ein schneller Kettenkollaps, Kollaps von Subdomänen oder hydrophober Kernkollaps vor Ausbildung der nativen Struktur beobachtet oder in Modellen angenommen (CHAN ET AL., 1996; JÄNICKE, 1998; SEGEL ET AL., 1999). Die schnellsten bisher *in vitro* beobachtete Vorgänge, sind Seitenkettenkontakte der Aminosäuren, die innerhalb eines Zeitraumes von 20 ns stattfinden (BIERI ET AL., 1999). Die anschließende Ausbildung der nativen Struktur der Proteine kann bei *in vitro* Experimenten im Bereich von Minuten bis Tagen stattfinden (JÄNICKE, 1993).

Über einen allgemeinen Mechanismus der Faltung der Proteine ist noch keine übereinstimmende Theorie entwickelt worden (Abb. 1.6). Die ältere Ansicht des definierten Faltungsweges, mit notwendigen Intermediaten („molten globules“), konkurriert mit der „neuen Sicht“ des Faltungstrichters, bei dem von vielen denaturierten Zuständen aus, über eine Vielzahl von Wegen, das globale Energieminimum und somit die native Struktur des Proteins erreicht wird (JÄNICKE, 1993; DILL ET AL., 1995; ONUCHIC ET AL., 1995; CREIGHTON ET AL., 1996; MATAGNE ET AL., 1998; BALDWIN & ROSE, 1999, 1999b). Dazwischen gibt es Abstufungen, bei denen zu Beginn ein definierter Faltungsweg angenommen wird, der nicht-native hydrophobe Wechselwirkungen unterbindet, um anschließend in die Form des Faltungstrichters überzugehen (FERSHT, 1995).

Eine der Hauptfragen ist, ob sich die beobachteten Intermediate der Proteine auf dem Weg zur nativen Faltung befinden, also obligatorisch sind oder ob diese Zwischenstufen Nebenwege der Faltung sind, energetische Fallen darstellen und damit mit der nativen Faltung konkurrieren (BALDWIN 1996; WILDEGGER & KIEFHABER, 1997; PRIVALOV, 1996; JÄNICKE, 1998). Die energetischen gefangenen Intermediate würden dabei von Chaperones erkannt und wieder auf den „richtigen“ Weg geführt, indem sie eine Korrektur der Faltung des Proteins ermöglichen, bis die native Struktur erreicht ist (CHAN & DILL, 1996; FINK, 1999). Es wird aber ebenfalls diskutiert, daß gerade strukturell wichtige Intermediate nicht zu isolieren sind, da sie sofort, aufgrund ihrer optimalen Struktur, entlang des Faltungsweges weiter die native Struktur annehmen und sogar den Faltungprozeß beschleunigen können (CREIGHTON ET AL., 1996; WAGNER & KIEFHABER, 1999; PRIVALOV, 1996).

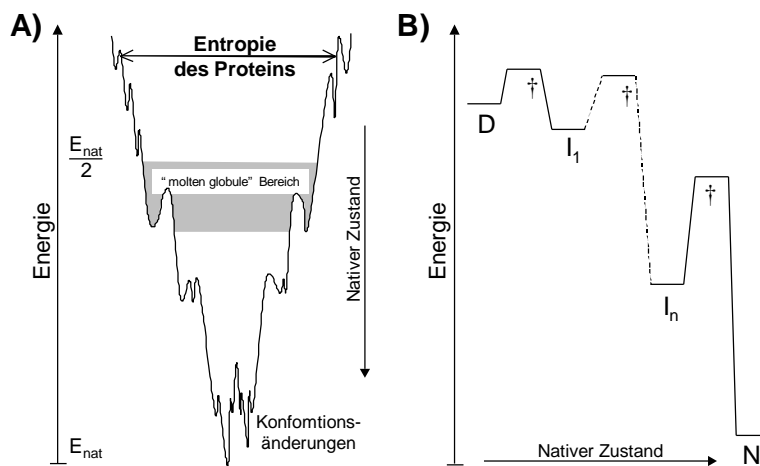


Abb. 1.6: A) Darstellung eines Modells für einen „rauen“ Faltungstrichter.  $E_{nat}$  ist das globale Energieminimum des nativen Proteins. Ein „molten globule“ Bereich befindet sich bei ca. der Hälfte der nativen Energie bezogen auf den Zufallsknäuel. Im nativen Zustand sind auch Konformationsänderungen des Proteins noch gegeben. Die Entropie des Gesamtsystems nimmt durch den Wasserausschluß der Proteinfaltung zu. B) Faltungsweg über Intermediate (I). D ist das denaturierte Protein; N nativer Zustand;  $\ddagger$  Übergangszustand; n Variable für die Anzahl Intermediate. (verändert nach ONUCHIC ET AL., 1995 und SABELKO ET AL., 1999)

Die Faltungszeit eines Proteins *in vivo* wird von weiteren Faktoren beeinflusst und kann auch deutlich schneller als *in vitro* abschließen. Die naszierende Polypeptidkette faltet sich zum Teil schon co-translational im Gegensatz zu *in vitro* Experimenten, bei denen eine Rückfaltung stets vom kompletten Protein ausgeht (JÄNICKE, 1993). Einen weiteren Einfluß haben die Bindung von Disulfidbrücken, die Konfiguration des Prolins (cis- bzw. trans-Isomer), ob Chaperones die Faltung unterstützen und weitere, nicht im genetischen Code festgelegte Faktoren. Beschleunigend auf die Faltung wirken dabei Chaperones, Peptidyl- oder Prolin-cis/trans-Isomerasen oder Disulfid-Isomerasen (JÄNICKE, 1993). Jedoch zeigen sich die Unterschiede hinsichtlich der Proteinselbstorganisation zwischen *in vivo* und *in vitro*, für das Endprodukt „natives Protein“ als nicht elementar (JÄNICKE, 1998).

### 1.3.1 Faltung von Membranproteinen

Erst lange nachdem das erste lösliche Protein von Anfinsen Anfang der Sechziger Jahre *in vitro* rekonstituiert wurde (ANFINSSEN ET AL., 1961), gelang es auch Membranproteine rückzufalten. Bakteriorhodopsin (bR) wurde als erstes Membranprotein zu Beginn der Achtziger Jahre rekonstituiert (HUANG ET AL., 1981; LONDON & KHORANA, 1982). Auch in den folgenden Jahren konnten nur wenige Membranproteine rekonstituiert werden. Dazu gehören der LHCII, die „Outer-Membrane“ Proteine (Omp) von *E. coli* und Porine (PLUMLEY & SCHMIDT, 1987; DORNMAIR ET AL., 1990; EISELE & ROSENBUSCH, 1990; SURREY & JÄHNIG, 1995). Die Rekonstitution der Membranproteine ist deutlich schwieriger, da die Faltung nicht einfach in einem wässrigen Milieu und durch Entfernung des Detergens, wie bei löslichen Proteinen, induziert werden kann. Es ist eine Umgebung ähnlich wie in biologischen Membranen zur Rückfaltung erforderlich.

Das am besten untersuchte Membranprotein ist bR. Dabei zeigte sich, daß sogar überexprimierte Fragmente des Proteins sich ordnungsgemäß falten. Bei diesen Fragmenten handelt es sich um die Transmembranhelices des Proteins, die Linker zwischen den Helices scheinen keine große Bedeutung für die korrekte Faltung zu haben (MARTI, 1998). Dem gegenüber stehen Ergebnisse zur Rekonstitution des LHCII mit Punktmutationen im Schleifenbereich zwischen den Helices. Dabei kann schon der Austausch einer Aminosäure dazu führen, daß keine Rekonstitution mehr möglich ist (HEINEMANN & PAULSEN, 1999). Kinetische Experimente zur Faltung von bR wurden durchgeführt und legen einen sequentiellen Faltungsmechanismus nahe. Es konnten einzelne Intermediate isoliert werden (BOOTH ET AL., 1995; RILEY ET AL., 1996). Zeitaufgelöst wurden auch OmpA und OmpF untersucht und schließlich auch der LHCII (SURREY & JÄHNIG, 1995; BOOTH & PAULSEN, 1996).

Es wurde ein prinzipieller Faltungsablauf der Membranproteine von POPOT UND ENGELMANN (1990) vorgeschlagen. Bei diesem Zwei-Schritt-Modell bilden sich zunächst die  $\alpha$ -helicalen Bereiche des Proteins innerhalb der Membran aus, um sich anschließend im zweiten Schritt zur nativen Struktur zu ordnen. Dieses Modell wurde erweitert. Dabei werden vier thermodynamisch unterscheidbare Schritte der Membranproteinfaltung und Insertion beschrieben. Die unterschiedlichen Schritte werden angenommen als a) der Übergang des Proteins von der wäßrigen Phase in den polaren Bereich der Lipiddoppelschicht (Partitioning), b) die Faltung der Helices, c) die Insertion in die Membran und d) die native Assoziierung der Helices. Dabei ist das Partitioning des Proteins zu jedem Zeitpunkt, außer als natives Protein, wahrscheinlich (WHITE & WIMLEY, 1999).

Ein komplettes Bild der Faltungsmechanismen von Proteinen und insbesondere ein sogenannter Faltungscode, der in der Aminosäurekette enthalten ist, sind jedoch trotz intensiver Forschung über die letzten Jahrzehnte noch nicht entschlüsselt worden.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Eine große Menge an Daten und Informationen sind über den LHCII gewonnen worden. Die Struktur des Pigment-Protein-Komplexes ist aufgelöst, das Protein kann in größeren Mengen in *E. coli* überexprimiert werden und eine Rekonstitution des Proteins in eine, dem nativen Zustand sehr ähnliche Form, ist ebenfalls möglich. Diese Informationen bieten einen idealen Ausgangspunkt, um weitere Untersuchungen über prinzipielle Faltungsmechanismen des LHCII durchzuführen. Einblicke über den Ablauf der Faltung dieses Proteins können Rückschlüsse auf die Mechanismen der Faltung anderer Membranproteine zulassen.

Nach den Vorarbeiten von BOOTH & PAULSEN (1996) zur zeitlich aufgelösten Rekonstitution des LHCII, sollen in dieser Arbeit verschiedene Einflüsse auf die Rückfaltung des Pigment-Protein-Komplexes untersucht und abgeschätzt werden. Die beiden physiologischen Komponenten der Faltung,  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , sollen weiter beschrieben und Ereignissen zugeordnet werden. Die Fluoreszenzspektroskopie, die den Energietransfer innerhalb des Komplexes nachweisen kann (Kap 1.2), ist eine indirekte Methode zur Bestimmung der Rückfaltung des LHCII in den nativen Zustand. Diese Beschreibung des nativen Zustandes ist zur Untersuchung der Faltung des LHCII sehr gut geeignet. Die Arbeit soll einen Überblick über die für die Rekonstitution limitierenden Komponenten des Komplexes oder Rekonstitutionsbedingungen verschaffen. Falls es bei der Rückfaltung des LHCII einzelne Faltungsschritte gibt, so sollen diese durch geschickte Wahl der für die Faltung relevanten Parameter aufgelöst werden.

Die Signalveränderungen der zeitaufgelösten Rekonstitution waren größeren Schwankungen unterworfen (BOOTH & PAULSEN, 1996). Es soll zunächst der Grund dieser Schwankungen ermittelt und die Rekonstitutionsbedingungen des LHCII verbessert werden, um ein optimales und reproduzierbares Signal für die weiteren Untersuchungen zu erhalten. Ebenfalls als Grundlage für weitere Untersuchungen wird das verwendete *in vitro*-System hinsichtlich eines möglichen Effektes der *in vivo* vorkommenden Prolin-Isomerase abgeschätzt.

#### 1.4.1 Einfluß der Pigmente auf die Rekonstitution

Ein Schwerpunkt der Arbeit liegt auf der Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Pigmente, die der LHCII nichtkovalent bindet. Die Faltung des Lhcb1 wird erst in Anwesenheit der Pigmente eingeleitet (PAULSEN ET AL., 1993). Durch verschiedene Kombinationen von Chl *a*, Chl *b* und den Xanthophyllen soll gezeigt werden, ob die o. a. Voraussetzung der Rekonstitution, auch in einer möglichen Reihenfolge der Bindung der Pigmente mündet und im Extremfall zu transienten Zwischenstufen führt. Weiterhin soll ein Effekt der Chle auf die thermische Stabilität des rekonstituierten LHCII charakterisiert werden.

#### 1.4.2 Einfluß von Lipiden auf die Rekonstitution

LHCII ist *in vivo* in der Thylakoidmembran eingebettet. Es gibt vielfältige Wechselwirkungen von Proteinen und Lipiden (Kap. 1.1.2). Dieser Teil der Arbeit soll den Effekt der Wechselwirkung der Lipide auf die Rekonstitution des Proteins *in vitro* untersuchen. Dabei soll der Einfluß der Lipide auf die Reaktionszeit und auf die thermische Stabilität des rekonstituierten Pigment-Protein-Komplexes beschrieben werden. Um den spezifischen Effekt der Galactolipide zu charakterisieren, wird mit MGDG ein Lipid eingesetzt, das im Gegensatz zu DGDG nur eine geringe nachgewiesene Interaktion besitzt. Der spezifische Effekt der mit PG veresterten Fettsäurereste, wird durch die Verwendung von Fettsäuren mit unterschiedlichen Kettenlängen untersucht. Als Kontrolle des Effektes der Lipide, wird der Einfluß der ebenfalls amphiphilen Detergentien beschrieben.

#### 1.4.3 Einfluß von abiotischen Faktoren auf die Rekonstitution

Variationen der abiotischen Faktoren sollen auch einen Hinweis auf die Selbstorganisation des LHCII geben. Durch Untersuchungen der Faltungszeiten bei unterschiedlichen Temperaturen ist ein Rückschluß auf die Aktivierungsenergie der Rekonstitution möglich. Der pH-Wert ist eine abiotische Größe, die auf den Protonierungsgrad der Aminosäurereste des Proteins schließen läßt. Durch unterschiedliche Viskositäten der Reaktionslösungen kann im Idealfall zwischen Abhängigkeiten der Rekonstitution von der Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens der Reaktionspartner und der Assoziierung des Proteins, unterschieden werden.

Der Versuch der Identifizierung der Faltungsmechanismen des LHCII und somit die Beschreibung des Weges von der Polypeptidkette hin zur endgültigen Struktur, bietet auch die Möglichkeit diese Mechanismen auf andere Polypeptidketten anzuwenden. Ist das Prinzip der Faltung verstanden könnten Proteine dahin gehend modifiziert werden, daß eine technische Anwendung möglich ist. Ein optimiertes Protein oder ein synthetisiertes Polypeptid kann vielfältige Anwendung finden. Beim LHCII ist am ehesten denkbar, eine Modifikation hinsichtlich einer verbesserten Stabilität und einer Anpassung des Pigmentsortiments zur optimierten Weiterleitung der, durch Sonnenlicht induzierten, Energie auf Halbleiter einer Photovoltaikzelle.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Alle Lösungen und Chemikalien wurden in p. a. Qualität verwendet. Lediglich Aceton in der Qualität „technisch“ wurde vor dem Gebrauch destilliert.

#### 2.1.1 Organismen

Erbse *Pisum sativum* var. *Golf*

Bakterienstamm *E. coli* JM 101: [*F'* *traD36 lac<sup>R</sup>*, *ZDM15*, *pro A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>*] *supE thi-1 D(lac-proAB)* (Stratagene, Heidelberg)

*E. coli*-Klon 42g1 pDS/RBSII (pLhcb1); *E. coli* Klon 35b1 pDS/RBSII (Lhcb1 mit Deletion, nicht rekonstituierbar)

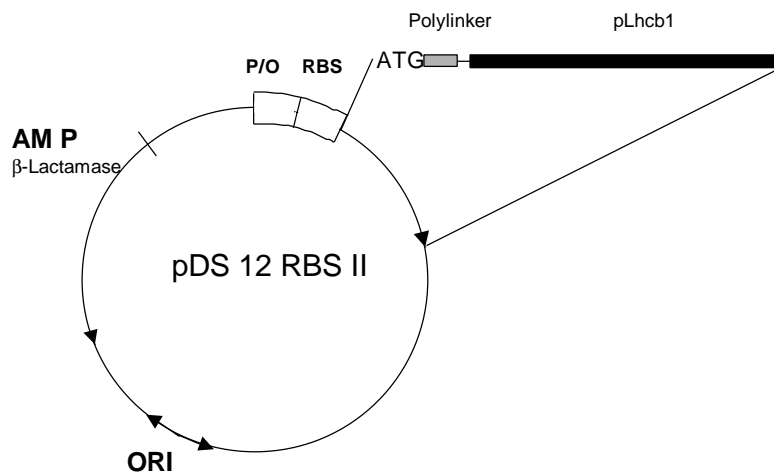


Abb. 2.1: pDS RBS II mit pLhcb1-Gen (schwarzer Kasten); Polylinker (grauer Kasten); ATG = Startcodon; P/O = Promoter und Operator Region; Promoter = Phage T<sub>5</sub> / P<sub>N25</sub>; Operator = *E. coli* Lac-Operator; RBS = Ribosomen-Bindungsstelle; ORI = Origin of replication von *E. coli*.

#### 2.1.2 Enzyme

Dnase I, Serva, Darmstadt  
Lysozym, Serva, Darmstadt

#### 2.1.3 Marker

SDS 7, Sigma, Darmstadt:

Rinderserumalbumin :	66,0 kDa
Ovalbumin :	45,0 kDa
NAPDH :	36,0 kDa
Carboanhydrase :	29,0 kDa
Trypsinogen :	24,0 kDa
Trypsin-Inhibitor :	20,1 kDa
α-Lactalbumin :	14,2 kDa

#### 2.1.4 Geräte

- Analytische Gel-Elektrophorese
  - Midget-Gelsystem, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- Analytische HPLC
  - Gradientenmischer Model 250B, Pumpe Model 300C, Gynkotek, Germering
  - Interphase 900 Series, Nelson Analytical
  - Photometer SPD-6AV, Shimadzu bezogen über Gynkotek, Germering
  - Intersil C8 Säule, 5  $\mu\text{m}$ , 150x4,6 mm, LiChrospher RP-8 Vorsäule, 5  $\mu\text{m}$ , 20x4,6mm, Mainzer Analysentechnik, Mainz
  - Anwendungsprogramm PE Nelson 2100 Version 5.0, Perkin Elmer Nelson Systems, Cupertino, USA
  - Gradientenmischer Model 425, Pumpe Model 420, Dioden-Array-Detektor 440, Kontron
  - Photometer SPD-6AV, Shimadzu bezogen über Kontron Instruments, Neufahrn
  - Intersil C8 Säule, 5  $\mu\text{m}$ , 150x4,6 mm, LiChrospher RP-8 Vorsäule, 5  $\mu\text{m}$ , 20x4,6 mm, Mainzer Analysentechnik, Mainz
  - Anwendungsprogramm Kroma System 2000, Kontron Instruments, Neufahrn
- Fluoreszenzspektroskop
  - Fluoromax 2, Anwendungsprogramm Grams 32/Datamax Version 2.24, Jobin Yvon, Grasbrunn
  - temperiert durch Digital Thermostat cc, Huber, Offenburg
- Gel-Trockner
  - Slab Gel Dryer, LKB, Bromma, Schweden
  - verbunden mit Vacuum Concentrator, Bachhofer, Reutlingen
- Photometer
  - Spectrometer MPS 2000, Shimadzu Deutschland, Hamburg
  - Spectrometer UV-2101 PC, Anwendungsprogramm UVPC, Version 3.51, Shimadzu Deutschland, Hamburg
- Präparative HPLC
  - Pumpen Model, 501 und 510, Bondapak C 18 Säule, 10  $\mu\text{m}$ , 30x300 mm, Waters Millipore, Eschborn
  - GAT LCD 500 Absorptions-Spektrometer, Gamma Analysen Technik, Bremerhaven
  - RF 535 Fluoreszenz-Spektrometer, Shimadzu Deutschland, Hamburg
  - Anwendungsprogramm Maxima 820, Waters Millipore, Eschborn
- Rapid Kinetics Spectrometer Assesory RX 2000, Applied Photophysics, Leatherhead, Großbritannien
- Scanner
  - ScanJet 4c, Hewlett Packard Instruments, Oregon, USA
- Ultraschallbad
  - Sonorex Super RK 102H, Bandelin, Berlin

- Zentrifugen
- Universal 30 RF, Rotor 1414, Hettich, Tuttlingen
- Tischzentrifuge Microliter, Hettich, Tuttlingen
- Kühlzentrifuge JS HS, Rotor JLA 10500, Beckmann, München

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Einschlußkörper-Isolierung

#### Prinzip

Die verwendeten Proteine pLhcb1 (Klon 42g1) bzw. nichtrekonstituierendes Derivat des Lhcb1 (Klon 35b1) werden in *E. coli* Stämmen überexprimiert. Die entsprechenden Gene (cab AB 80 aus Erbse, CASHMORE, 1984) sind in einen Expressionsvektor (pDS RBS II-2, BUJARD ET AL., 1987) kloniert worden. Die Gene stehen unter der Kontrolle des Phagen Promotors  $P_{N25}$  aus dem Phagen T5 und des lac-Operators (Abb. 2.1). Die Induktion der Proteinbiosynthese erfolgt durch die Zugabe des Galaktose-Analogons Isopropylthiogalaktosid (IPTG). *E. coli* wird nach ausreichender Produktion des gewünschten Proteins mit Hilfe von Lysozym enzymatisch und mit Hilfe von schwachen Detergentien auf gebrochen. Da die Proteine in *E. coli* als Einschlußkörper abgeschieden werden und sie gegenüber schwachen Detergentien (TritonX-100, Desoxycholat) stabil sind, können sie abzentrifugiert und über mehrere Waschschrte von Membranresten, DNA und löslichen Proteinen, gereinigt werden. Auf diese Weise wird das Lhcb1 mit einer Reinheit von 90% gewonnen. Hauptverunreinigung ist das zugefügte Lysozym.

Mit Hilfe einer french-press kann auf das Aufbrechen von *E. coli* durch Lysozym verzichtet werden. Durch hohen Druck werden die Bakterienzellen mechanisch zum Platzen gebracht. Nach der Zerstörung der Zellwand sind alle weiteren Reinigungsschritte zur Gewinnung der Einschlußkörper identisch. Die Reinheit der Einschlußkörper liegt bei über 95%.

#### Durchführung

Die einzelnen Klone werden in Vorkulturen in fünf ml Luria-Bertani-(LB)-Amp-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7,5, 100 µg/ml Amp) über Nacht angezogen. Mit 4 ml der Vorkultur (1 ml als Reserve) werden 100 ml LB-Amp-Medium angeimpft. Die Kultur wird bis zu einer optischen Dichte von 0,5 angezogen (ca. eine Stunde bei 37 °C). Danach wird mit 100 µl 1 M IPTG die Proteinbiosynthese induziert und für vier Stunden bei 37°C fortgeführt.

- Kulturen zentrifugieren, drei Minuten bei 8000 Umdrehungen pro Minuten (Upm)
- in 800 µl Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, (pH 8,0), 25% [w/v] Saccharose, 1 mM EDTA (pH 8,0) resuspendieren,
- wenn *E. coli* Bakterien mit der french-press aufgeschlossen werden, dann werden die Kulturen nach der Zentrifugation in 60 ml Lysispuffer aufgenommen und mit Hilfe des stetig ansteigenden Drucks der french-press die Zellwände zerstört. Der Verdau mit Lysozym wird übersprungen.
- Zugabe von 200 µl Lysozym (frisch angesetzt, 20 mg/ml in Lysispuffer), mischen, 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) stehen lassen.
- Zugabe von 10 µl 1 M  $MgCl_2$ , 1 µl 1 M  $MnCl_2$ , 10 µl DNase 1 (1mg/ml in 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 50 mM NaCl, 1 mM Dithioerythriol (DTT), BSA (0,1 mg/ml), 50% Glycerin), mischen, 15 Minuten bei RT stehen lassen.



- Zugabe von 2 ml Detergenspuffer (200 mM NaCl, 1% Desoxycholsäure [w/v], 1% Nonidet P40 [w/v], 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol), sehr gut mischen, ggf. im Ultraschallbad bis die Lösung keine schleimig Konsistenz mehr hat.
- Fünf Minuten bei 4 °C und 8000 Upm zentrifugieren.
- Das Pellet in 2 ml Tritonpuffer (0,5% Triton X-100 [w/v], 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) resuspendieren und ebenfalls sehr gut mischen (Ultraschallbad) und ggf. über Nacht bei RT stehen lassen.
- Fünf Minuten bei RT und 8000 Upm zentrifugieren.
- Triton-Waschung wiederholen bis das Pellet rein weiß und resuspendierbar ist (ein- bis zweimal).
- Pellet in 2 ml Trispuffer (50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) resuspendieren.
- Fünf Minuten bei RT und 8000 Upm zentrifugieren.
- Pellet in 500  $\mu$ l Trispuffer resuspendieren.
- Proteinsuspension bei -20 °C lagern.

### 2.2.2 Proteinbestimmung

#### Prinzip

Proteine absorbieren aufgrund der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin im ultravioletten Bereich des Spektrums bei 280 nm. Um konstante Ausgangsbedingungen zu erhalten, werden die Proteine denaturiert vermessen. Die Aminosäuren der Proteine besitzen keine allgemeinen molaren Extinktionskoeffizienten. Dafür ist die Umgebung der Aminosäuren der einzelnen Proteine zu inhomogen. Deswegen wird die Abschätzung mit Hilfe einer Eichgerade durchgeführt, für die jedoch wiegbare Mengen des Proteins notwendig sind. Mit Hilfe dieser Eichgerade ist eine gute Abschätzung der Proteinkonzentration möglich. Die Eichgerade für den pLhcb1 in  $A_{280}$ -Puffer hat folgenden Umrechnungsfaktor (HOBE, 1995):

$$0,1 \text{ OD}_{280\text{nm}, 1\text{cm}} = 61 \mu\text{g/ml}$$

$$0,1 \text{ OD}_{280\text{nm}, 1\text{cm}} = 53 \mu\text{g/ml}$$

Es empfiehlt sich ein Spektrum von 200 nm bis 300 nm aufzunehmen, um Verunreinigungen mit DNA zu erkennen. Diese Verunreinigungen zeigen sich in einer Blauverschiebung des Maximums von 280 nm zu 260 nm hin (DNA-Absorption).

#### Durchführung

Die zu vermessende Proteinlösung sowie die Kontrollösung werden identisch behandelt. Die Proteinlösung (10  $\mu$ l) wird dem  $A_{280}$ -Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) zugegeben. Handelt es sich um eine Proteinsuspension, so muß diese zuvor sehr gut gemischt werden. Als Kontrolle dient das entsprechende Volumen des Lösungsmittels des Proteins. Die Lösungen werden zwei Minuten gekocht und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und vermessen. Der Meßwert sollte nach ca. 10 Sekunden abgelesen werden (aufsteigende Luftbläschen abwarten).

### 2.2.3 Pigmentisolierung

#### Prinzip

Die Pflanzen werden 5 cm oberhalb der Wurzel abschnitten und zerkleinert. In einem Mixer werden die Pflanzenzellen durch osmotischen Schock in einem dafür geeigneten Puffersystem aufgeschlossen und gefiltert. Die wasserlöslichen Bestandteile werden durch Zentrifugation abgetrennt. Danach wird das pigmententhaltende Pellet in Aceton aufgenommen und die Pigmente somit von den restlichen, in organischen Lösungsmitteln unlöslichen, Bestandteilen der Pflanzenzelle, getrennt. Nach der Zentrifugation verbleiben vor allem Stärke und Zellfragmente im Pellet. Eine grobe Fraktionierung der Pigmente in Chl<sub>a</sub> und Xanthophylle erfolgt durch eine Fällung der schwerer löslichen Chl<sub>a</sub> aus einem Aceton-Dioxan-Wassergemisch. Aufgrund der Empfindlichkeit der Pigmente müssen alle Tätigkeiten schnell, in abgedunkelten Räumen und auf Eis durchgeführt werden.

#### Durchführung:

- Zirka zwei Wochen alte Erbsen (angezogen auf Vermiculit, 16/8 h Belichtung-/Dunkelperiode, 22 °C, mind. 150  $\mu\text{E/s} \times \text{cm}^2$ ) mit einer Schere ernten und in ausreichender Menge Aufschlußpuffer (25 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT, 330 mM Sorbitol, kalt, ca. 1 L pro Schale) mit einem Mixer in ca. 2 bis 4 mm<sup>2</sup> kleine Stücke zerkleinern.
- Homogenat durch Gaze direkt in Zentrifugenbecher filtrieren.
- Drei Minuten bei 8000 Upm und 4 °C zentrifugieren.
- Pellet in 300 ml Aceton aufnehmen und mit 100 ml Aceton nachwaschen.
- 10 Minuten bei 8000 Upm und 4 °C zentrifugieren.
- Überstände in einem Becherglas auf Eis sammeln und auf 400 ml Aceton einstellen.
- 60 ml Dioxan unter Rühren zugeben.
- 127 ml H<sub>2</sub>O unter Rühren zugeben, dabei die letzten 30 ml tropfenweise. Sobald Chl<sub>a</sub> ausfällt, Zugabe stoppen und eine Stunde die Fällung abwarten.
- 10 Minuten bei 10.000 Upm und 4 °C zentrifugieren.
- Xanthophyll-Überstand in Ether überführen (Ausschütteln mit 50 ml Ether, 20 ml H<sub>2</sub>O und 5 ml 4 M NaCl, Volumina variieren) und im Rotationsverdampfer eintrocknen.
- Chl<sub>a</sub>-Pellet in Ether aufnehmen, mit H<sub>2</sub>O (zweimal 50 ml) ausschütteln und Restwasser bei -20 °C über Nacht ausfrieren.

Die Pigmente können zu diesem Zeitpunkt am besten von verbliebenen nativen Lipiden getrennt werden.

#### 2.2.3.1 Reinigung der Xanthophylle

Die Xanthophylle werden in einem ersten Schritt durch eine Verseifung von den restlichen Chl<sub>a</sub> abgetrennt. Dabei wird die Esterbindung zwischen hydrophobem Phytol-Rest und Porphyrin-Ring des Chl<sub>a</sub> geöffnet und die Ringstruktur somit wasserlöslich.

#### Durchführung

- Eintrocknete Xanthophylle in 100 ml Ethanol (p. A.!) aufnehmen.
- Langsam unter Rühren 10 ml KOH-Lösung (80%ig) hinzufügen.
- Über Nacht bei 30 °C und unter einem Dunkelsturz inkubieren lassen.
- Xanthophylle in Ether überführen (200 ml Ether, 200 ml H<sub>2</sub>O) und ausschütteln.
- Nachextrahieren der Ethanol-Phase mit zweimal 50 ml Ether (bis Ethanol-Phase farblos)

- Etherphasen vereinigen und mit 400 ml H<sub>2</sub>O waschen, bis Wasserphase farblos und Ether-Phase rein gelb sind.
- Restwasser der Ether-Phase über Nacht bei -20 °C in einem Rundkolben ausfrieren.
- Gefrorenes Restwasser über eine vorgekühlte Fritte und Filterpapier von der flüssigen Ether-Phase trennen.
- Ether über einen Rotationsverdampfer entfernen und Xanthophylle zur Charakterisierung in Aceton (5 ml) aufnehmen und portionieren.
- Pigmente mit N<sub>2</sub>-Luftstrom trocknen und bei -20 °C lagern.

Diese Fraktion der Pigmente wird im folgenden Gesamt-Xanthophylle genannt und wird über eine analytische HPLC charakterisiert (Kap. 2.2.4). Gesamt-Xanthophylle können für Rekonstitutionsversuche eingesetzt werden.

Die typische Zusammensetzung der eingesetzten Gesamt-Xanthophylle ist: ~57% Lutein, ~19% Violaxanthin, ~19% Neoxanthin und ~2% β-Carotin.

Für die Untersuchungen zum Einfluß von Lipiden auf die Rekonstitution des LHCII, werden die Xanthophylle von verbliebenen nativen Lipiden gereinigt. Dieser Reinigungsschritt kann vor der Verseifung (s. o.) stattfinden.

- Breite und niedrige Säule (Laufzeit maximal 10 Minuten!) mit 10 g Kieselsäure (SIL-R, 200-300 Mesh, Sigma), gemischt mit zwei Spatelspitzen Ascorbinsäure als Oxidationsschutz, beschicken.
- Säule mit jeweils einfachem Volumen Ether, Chloroform und Methanol waschen und mit zweifachem Volumen Hexan als mobile Phase equilibrieren.
- Pigmente in 6 ml Chloroform aufnehmen und vorsichtig auf die Säule auftragen.
- Pigmente anschließend in Ether überführen, Restwasser ausfrieren und Pigmente im Rotationsverdampfer trocknen.
- Kontrolle der Reinheit der Pigmente über Dünnschicht-Chromatographie (Kap. 2.2.6).

Diese Fraktion wird im folgenden lipidfremde Gesamt-Xanthophylle genannt.

Für Wettbewerbsversuche zur Rekonstitution des LHCII mit verschiedenen Xanthophyllen, müssen die Gesamt-Xanthophylle in Fraktionen Lutein, Violaxanthin, Neoxanthin und β-Carotin aufgetrennt werden. Die verschiedenen Löslichkeiten der Xanthophylle in einem Aceton-Wasser-Gemisch werden ausgenutzt, um sie über eine „Reversed-Phase“-Chromatographie-Säule zu trennen. Lediglich Zeaxanthin wurde bezogen (Roth, Karlsruhe).

- Säule mit Material (C<sub>18</sub>, Waters, Eschborn) beschicken und mit zweifachem Volumen 84%igem Aceton equilibrieren.
- Gesamt-Xanthophylle (max. 30 mg) in Aceton lösen und mit H<sub>2</sub>O langsam auf 84% verdünnen, bei 10.000 Upm für fünf Minuten zentrifugieren.
- Pigmente vorsichtig auf Säule auftragen.
- Elution zu Beginn mit 84%igem Aceton, nachdem Neoxanthin die Mitte der Säule erreicht hat, Erhöhung auf 86% Aceton. Nachdem Lutein aufgefangen wurde, weiter mit 100% Aceton eluieren und anschließend die Säule spülen.
- Einzelne Xanthophyll-Fraktionen werden in Rundkolben auf Eis aufgefangen, in Ether überführt und im Rotationsverdampfer eingetrocknet (s. o.).

### 2.2.3.2 Reinigung der Chlorophylle

Sollen die Pigmente zur Untersuchung des Einflusses von Lipiden auf die Rekonstitution des LHCII genutzt werden, so sollte eine Aufreinigung vor der präparativen HPLC erfolgen, da die Reinigung in einem oxidativem Milieu stattfindet, das die Derivatisierung der Chle begünstigt.

- Breite und niedrige Säule (Laufzeit maximal 10 Minuten!) mit 10 g Kieselsäure (SIL-R, 200-300 Mesh, Sigma) beschicken, gemischt mit zwei Spatelspitzen Ascorbinsäure als Oxidationsschutz.
- Säule mit jeweils einfachem Volumen Ether, Chloroform und Methanol waschen und mit zweifachem Volumen Hexan als mobile Phase equilibrieren.
- Pigmente in sechs ml Chloroform aufnehmen und vorsichtig auf die Säule auftragen.
- Pigmente anschließend in Ether überführen, Restwasser ausfrieren und Pigmente im Rotationsverdampfer trocknen.
- Kontrolle der Reinheit der Pigmente über Dünnschicht-Chromatographie (Kap. 2.2.6).

Die unterschiedliche Löslichkeit von Chl *a* und Chl *b* in einem Aceton-Wasser-Gemisch ermöglicht die Aufreinigung beider Pigmente sowie deren Abtrennung von noch verbliebenen  $\beta$ -Carotin über eine präparative HPLC. Photometer und Fluoreszenz-Detektor charakterisieren kontinuierlich das Eluat und lassen das kontrollierte Auffangen der zu isolierenden Pigmente zu. Aufgrund der Empfindlichkeit der Pigmente ist es erforderlich  $\text{H}_2\text{O}$  zu puffern (0,2 mM Hepes, pH 7). Das Programm „Chlgrad“ bestimmt einen Gradienten bei einer Flußrate von 5 ml/min wie folgt:

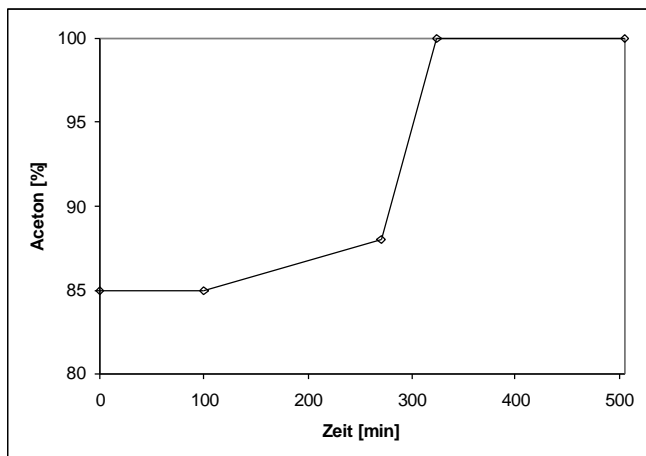


Abb. 2.2: Gradientenprofil der präparativen HPLC über 510 min. Equilibriert bei 85% Aceton.

- Aceton filtern und entgasen,  $\text{H}_2\text{O}$  (Millipore-Filter) entgasen (0,2 mM Hepes, pH 7).
- Säule über Nacht auf 85% Aceton equilibrieren (Flußrate 0,6 ml/min).
- Einstellung:       Photometer:                       440 nm  
                          Fluoreszenzspektrometer:   Excitation 425 nm, Emission 680 nm.
- Pigmente in 100% Aceton aufnehmen und langsam mit gepuffertem  $\text{H}_2\text{O}$  (0,2 mM Hepes, pH 7) auf 85% verdünnen und anschließend zentrifugieren (8000 Upm, RT, 10 Minuten).
- Überstand in 50 ml-Portionen in die Auftragsschleife geben (Anleitung beachten).
- Programmstart.
- Einzelne Fraktionen in Rundkolben auf Eis auffangen (20 ml Ether vorlegen).
- Chl in Ether überführen, ausschütteln (zweimal 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) und im Rotationsverdampfer eintrocknen (s. o.).

- Pigmente über analytische HPLC charakterisieren (Kap. 2.2.4) und quantifizieren (Kap. 2.2.4 oder 2.2.5).

### 2.2.4 Analytische HPLC

Mit dem Kontron- oder Gynkotek-HPLC-System können Pigmente charakterisiert, auf ihre Reinheit untersucht und quantifiziert werden. Mit dem Dioden-Array-Detektor der Kontron-Anlage können zu den einzelnen Peaks des Chromatogramms die entsprechenden Spektren erfaßt werden. Diese Spektren ermöglichen die Charakterisierung der Pigmente und deren Derivate. Die Berechnung des Flächeninhalts eines Peaks (Dioden-Array oder Photometer) ermöglicht die Bestimmung der Menge des jeweiligen Pigments. Da Pigmente verschiedene molare Extinktionskoeffizienten bei einer Wellenlänge besitzen, müssen Eichgeraden für die jeweiligen Pigmente bestimmt und daraus folgend Umrechnungsfaktoren erzeugt werden. Aufgrund der Empfindlichkeit der Pigmente ist es erforderlich  $H_2O$  zu puffern (0,2 mM Hepes, pH 7). Der Gradient zur Analyse der Pigmente sieht wie folgt aus:

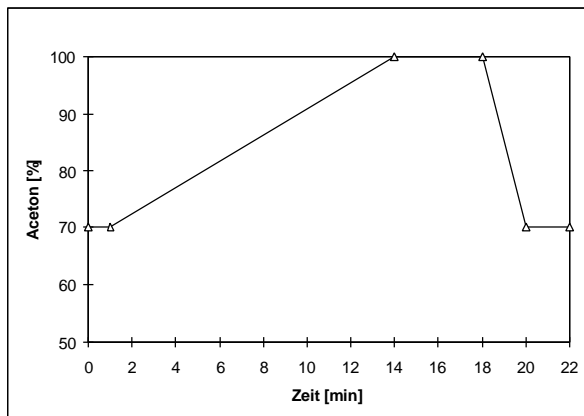


Abb. 2.3: Gradientenprofil der analytischen HPLC über 22 min. Equilibriert bei 70% Aceton.

- Einstellung Photometer: Wellenlänge: 440 nm (Kontron), 422nm und 458nm (Gynkotek), Empfindlichkeit: 0,04.  
Dioden-Array-Detektor: Wellenlängen: 410nm, 430nm, 440nm, 450nm, 663nm, 646 nm und „Spektrum“.
- Pigmente in definiertem Volumen Aceton lösen und definiertes Volumen mit 80%igem Aceton verdünnen (ca. 1:500).
- Mit Hamiltonspritze in die Auftragschleife geben.
- Programmstart.
- Auswerten des Chromatogramms mit Hilfe der Umrechnungsfaktoren.

### 2.2.5 Pigmentbestimmung

Eine Konzentrationsbestimmung der Pigmente kann auch über Absorptionsspektrometrie durchgeführt werden. Dazu werden Pigmente in 80%igem Aceton vermessen. Mit Hilfe von empirisch hergeleiteten Formeln (s.u.) kann die Konzentration bestimmt werden.

- Pigmente in definiertem Volumen Aceton lösen, in 80%igem Aceton verdünnen.
- Photometer: Spaltbreite 0,5 nm.
- Absorption bei 663,6 nm, 646,4 nm und 750 nm (Chle) sowie 440 nm und 750nm (Xanthophylle) bestimmen.
- Wert bei 750 nm gilt als Korrektur und wird abgezogen.

Mit Hilfe der Formeln von PORRA ET AL. (1989) kann die Konzentration an Chl *a* und Chl *b* bestimmt werden und über das Volumen wird die Menge an Chl erhalten.

$$\text{Chl } a: 12,3 \times A_{663,6 \text{ nm}} - 2,55 \times A_{646,6 \text{ nm}} \text{ } [\mu\text{g/ml}]$$

$$\text{Chl } b: 20,3 \times A_{646,6 \text{ nm}} - 4,9 \times A_{663,6 \text{ nm}} \text{ } [\mu\text{g/ml}]$$

Carotinoide können nach der Formel von DAVIES (1976) bestimmt werden:

Carotinoid-Konzentration:  $0,24 E_{440 \text{ nm}} = 1 \mu\text{g/ml}$

### 2.2.6 Untersuchung zur Reinheit der verwendeten Pigmente mittels Dünnschicht-Chromatographie

Es werden die unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten der Lipide und Pigmente in der mobilen Phase zur Auftrennung genutzt und mit Referenz-Lipiden verglichen. Die Lipide wurden mit verschiedenen Methoden von KATES (1986) analysiert

#### Durchführung

- Auskleiden der Probenkammer mit Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel) und bis zu einen cm Höhe Laufpuffer einfüllen:  
Laufmittel basisch (für polare Lipide): Chloroform/Methanol/ $\text{NH}_3$  (25%ig), (65:30:4)  
Laufmittel sauer (für polare Lipide): Chloroform/Methanol/Essigsäure/ $\text{H}_2\text{O}$ , (85:15:10:3,5).
- Vorbereiten der Kieselgelplatten (Kieselgel 60, Merck, Darmstadt) durch Markieren der Auftragspunkte.
- Auftragen der Pigmente (je 300 $\mu\text{g}$ ) und der Referenz-Lipide MGDG und DGDG (je 50 $\mu\text{g}$ ).
- Platte in Kammer geben.
- Nach Erreichen der Oberkante der Platte durch die Laufmittelfront, Lauf abbrechen.
- Nachweis der ungesättigten Fettsäuren durch Jodanlagerung; Applikation über elementares, sublimiertes Jod in einer Kammer.
- Nachweis von Galacto-Lipiden durch Naphtol/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  und Erwärmen auf einer Wärmeplatte.

### 2.2.7 Lipidisolierung

Die Lipide DPPG und DOPG wurden bezogen (Sigma, München). Die nativen Lipide MGDG und DGDG wurden aus Tomatenthylakoiden isoliert und von P. BEUTELMANN zur Verfügung gestellt. Pflanzliche Lipide können aus einem acetonischen Thylakoid-Extrakt über Silica-Säulen und präparativer Dünnschicht-Chromatographie getrennt werden. Dabei werden die einzelnen Fraktionen durch ihre unterschiedliche Löslichkeit im organisch-wässrigen Milieu isoliert. Die Lipide wurden mit modifizierten Methoden von ANDERSON und Mitarbeiter (1974) sowie GELLERMAN und Mitarbeiter (1975) isoliert.

Trennung über Silica-Säule:

- Acetonischen Thylakoid-Extrakt einengen und in 12 ml Chloroform überführen.
- Säule (3 g Sil, Sigma, München, in Glassäule, Durchmesser 1 cm, mit Watte) in Chloroform einschlänmen.
- Chloroformextrakt aufgeben.
- Chloroform solange als Eluent nutzen, bis Chle entfernt wurden,  $\rightarrow$  1. Fraktion.
- Mit 24 ml Aceton/Chloroform (2:1) eluieren,  $\rightarrow$  2. Fraktion (enthält MGDG).

- 3. Fraktion (enthält DGDG/PG/SL) zuerst mit 60 ml Aceton eluieren, anschließend mit 24 ml Aceton/MeOH (19:1) und 24 ml Aceton/MeOH (2:1) Elution fortsetzen.
- Mit 60 ml Methanol eluieren → 4. Fraktion (enthält Phospholipid, vor allem PC).
- Fraktionen 2-4 einengen und in Chloroform aufnehmen.

#### Präparative Dünnschicht-Chromatographie (DC) für MGDG, Fraktion 2

- Fraktion 2 auf Platte (20 × 20 × 0,5 mm Kieselgel) auftragen.
- Laufmittel Vorlauf: Aceton/Hexan/Essigsäure/H<sub>2</sub>O (30:20:1:0,5) (4 cm).
- Laufmittel: Aceton/Essigsäure/H<sub>2</sub>O (100:4:1), trennt vor allem MGDG von Pigmenten.
- Lipide mit Jod markieren und MGDG-Zonen abkratzen, auf Säule geben und mit Methanol eluieren.
- Erneut auf Kieselgelplatte auftragen, Laufmittel für zweite DC: Aceton/Hexan/Essigsäure/H<sub>2</sub>O, (30:20:1:0,5).
- MGDG Zonen zur dritten DC wie oben vorbereiten.
- Dritte DC Platte vorkonditionieren, eine Stunde über festem KOH.
- Vorlauf Aceton (2-3 cm).
- Dritte DC, Laufmittel: Chloroform/Methanol/NH<sub>3</sub> (25%ig) (65:30:4).
- Zonen mit Methanol über Säule eluieren, in Chloroform aufnehmen und charakterisieren (Kap. 2.2.6).
- Lagerung der Lipide erfolgt in Chloroform bei –20°C.

#### Präparative DC für DGDG, Fraktion 3

- Fraktion 3 auf Platte (20 × 20 × 0,5 mm Kieselgel) auftragen.
- Laufmittel Vorlauf: Aceton/Hexan/Essigsäure/H<sub>2</sub>O (30:20:1:0,5) (4 cm laufen lassen).
- Laufmittel: Chloroform/Methanol/Essigsäure/H<sub>2</sub>O (85:15:10:3,5) trennt DGDG von MGDG/PG/SL.
- Lipide mit Jod markieren und DGDG-Zonen abkratzen, auf Säule geben und mit Methanol eluieren.
- Erneut auf Kieselgelplatte auftragen, Laufmittel für zweite DC: Chloroform/Methanol/NH<sub>3</sub> (25%ig) (65:30:4).
- Mit Methanol über Säule eluieren und in Chloroform überführen.
- Dritte DC Platte vorkonditionieren, eine Stunde über festem KOH.
- Vorlauf Aceton (2-3 cm).
- Dritte DC, Laufmittel: Chloroform/Methanol/NH<sub>3</sub> (25%ig) (65:30:4).
- Zonen mit Methanol über Säule eluieren, in Chloroform aufnehmen und charakterisieren.
- Lagerung der Lipide erfolgt in Chloroform bei –20°C.

MGDG weist nach der Reinigung noch Spuren von DGDG auf, DGDG enthält Sulpholipide und Spuren von PG. Die Fettsäurezusammensetzung von DGDG und MGDG wurde über Gas-Chromatographie analysiert (Angaben durch P. BEUTELMANN).

Tabelle 2.1: Verteilung der häufigsten vorkommenden Fettsäuren bei MGDG und DGDG aus Tomate

Lipid	Palmitinsäure (16:0)	Hexadecatriensäure (16:3)	Linolsäure (18:2)	Linolensäure (18:3)
MGDG	2,6%	40%	1,4%	52%
DGDG	18%	4,5%	2,2%	72%

Zu Rekonstitutionsversuchen wurden die Lipide in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in OG (10%ig) gelöst und als Lipid-Detergens-Stammlösung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.2.8 Bestimmung der Kritischen Micellaren Konzentration (CMC)

### Prinzip

Die Kritische Micellare Konzentration (CMC), die Konzentration eines Detergens oder Lipids bei der die Bildung von Micellen induziert wird, kann fluoreszenzspektroskopisch oder absorptionsspektroskopisch bestimmt werden. Dazu wird ein wasserunlöslicher Stoff mit unterschiedlichen Eigenschaften bezüglich seiner Fluoreszenz bzw. seiner Absorption, in einem lipophilen oder lipophoben Milieu eingesetzt. Bei zunehmender Konzentration des zu untersuchenden Detergens in  $\text{H}_2\text{O}$ , wird der Wert erreicht, an dem sich die Eigenschaft des Farbstoffes schlagartig ändert und somit das Lösen des Farbstoffes in den Micellen anzeigt. Im folgenden System wird die Absorptionsänderung von elementarem Jod bei einem Übergang von einem wässrigen Milieu in Micellen genutzt. Jod absorbiert maximal bei 460nm und in einem Nebenmaximum bei 355nm. Nur das Maximum bei 355nm rückt stark zu und verschiebt sich zu 360 nm, falls Jod in einem micellaren System gelöst wird. So kann anhand der sprunghaften Absorptionzunahme bei 360nm die CMC festgestellt werden. DPPG wurde in der Standardkonzentration und der fünffachen Menge zugegeben. Dies entsprach einer theoretischen Anzahl von 4,1 bzw. 20 PG-Molekülen pro Micelle, bezogen auf die Literaturwerte für die CMC von OG von 0,7% [w/v] (HELENIUS ET AL., 1979).

Durchführung (modifiziert nach ROSS ET AL., 1959)

- 30 mg elementares Jod ( $\text{J}_2$ ) in 4 ml Ethanol lösen und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Volumen von 30 ml bringen, gut mischen und nicht altern lassen.
- Konzentrationsreihe des Detergens mit einem Volumen von 1,8 ml erstellen.
- 200  $\mu\text{l}$  der Jodlösung zufügen und Absorption bei 360nm bestimmen.

## 2.2.9 Manuelle Induktion der Rekonstitution des LHCII durch Herabsetzen der SDS-Konzentration

### Prinzip

Die Rekonstitution des LHCII wird durch Mischen des (p)Lhcb1, gelöst in 0,2% SDS, mit dem gleichen Volumen an Pigmentlösung, in 2% [w/v] OG, sowie ggf. Lipide, induziert. Durch diesen Schritt werden (Lipid-) OG-SDS-Mischmicellen gebildet. (p)Lhcb1 und die Pigmente werden, wegen des lipophoben Milieus des Reaktionsmediums außerhalb der Micellen, in diesen konzentriert und so in ausreichender Nähe zueinander gebracht. Dabei wird die SDS-Konzentration so stark herabgesetzt, daß das Apoprotein nicht mehr destabilisiert wird. Die Pigmente liegen unter Standardbedingungen im 1,6-fachen Chl- bzw. 4-fachen Xanthophyll-Überschuß (Überschuß ist die Vielfache Menge an Pigment, die notwendig ist, um alle angenommenen Pigmentbindungsstellen zu des gesamten Proteins zu besetzen) zum (p)Lhcb1 vor und sind somit in ausreichender Anzahl in den Micellen vorhanden, um an den (p)Lhcb1 zu binden und den LHCII-Monomere zu bilden.

Durchführung für das Standardprotokoll mit 0,04% [w/v] PG in der Rekonstitutionslösung

- 116  $\mu\text{l}$  OG-Lösung (2% [w/v] OG, 0,08% [w/v] PG, 100 mM  $\text{Li}_2\text{BO}_3$  (pH 9), 12,5% [w/v] Saccharose, 5 mM DTT) 15 Minuten im Ultraschallbad sonifizieren.
- 116  $\mu\text{l}$  Proteinlösung (6,2  $\mu\text{M}$  pLhcb1, 0,2% SDS, 100 mM  $\text{Li}_2\text{BO}_3$  (pH 9), 12,5% [w/v] Saccharose, 5 mM DTT) zwei Minuten kochen und abkühlen lassen.



- Pigmente (6  $\mu\text{g}$  Chl *a*, 6  $\mu\text{g}$  Chl *b*, 5  $\mu\text{g}$  Xanthophylle, gelagert in Eppendorf-Reaktionsgefäß unter  $\text{N}_2$  und bei  $-20^\circ\text{C}$ ) werden in 3  $\mu\text{l}$  Ethanol (p.a.) aufgenommen und durch kurzes Zentrifugieren am Boden des Gefäßes gesammelt.
- Zugabe der 116  $\mu\text{l}$  OG-Lösung auf die Pigmente und sofortiges Mischen auf einem Tischrührgerät (MS Minishaker, IKA-Works, Wilmington, USA), um ein Ausfallen der Pigmente zu vermeiden. Konzentration der Pigmente: 57  $\mu\text{M}$  Chl *a*, 57  $\mu\text{M}$  Chl *b* und 76  $\mu\text{M}$  Xanthophylle.
- Beide Reaktionslösungen fünf Minuten in der Tischzentrifuge zentrifugieren um Luftblasen zu entfernen.
- Vorlegen der OG-Lösung in Reaktionsgefäß oder Fluoreszenz-Küvette.
- Zugabe der Proteinlösung mittels Hamiltonspritze mit Peaknadel (vermindert den Druck und somit Schaumbildung).
- Sofortiges Mischen der Lösung für mindestens sechs Sekunden.
- Messung starten (Kap. 2.2.16) und anschließend Probe bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern oder Analyse durch schonende Gel-Elektrophorese (Kap. 2.2.13.2).

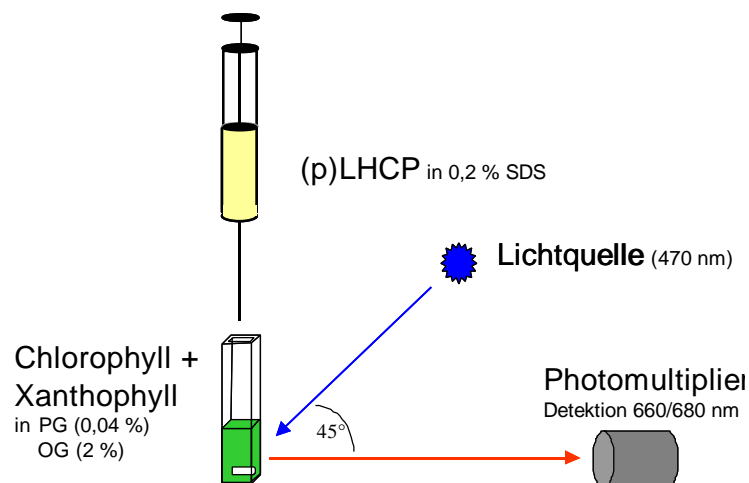


Abb. 2.4: Skizze des Versuchsaufbaus des Fluoreszenz-Spektroskops zur manuellen Mischmethode. Die Proteinlösung wird mit einer Hamiltonspritzen in die Quarzküvette gegeben. Die Quarzküvette befindet sich im Küvettenhaus des Fluoreszenz-Spektroskops. In der Küvette liegt bereits die Pigmentlösung vor. Die Mischung erfolgt mit einem „Ministirrer“. Das Anregungslicht ist blau, die Fluoreszenz-Emission rot dargestellt. Die Emission wird in einem Winkel von  $45^\circ$  zur Anregungswellenlänge aufgenommen. Konzentrationen der Detergetien und Lipide gemäß Standardbedingungen (s. o.).

## 2.2.10 Induktion der Rekonstitution durch Herabsetzung der Detergens-Konzentration mit der „Rapid-Mixing“-Methode

### Prinzip

Das zugrunde liegende Prinzip zur Induktion der Rekonstitution des LHCII ist dasselbe wie bei der manuellen Methode (Kap. 2.2.9): Das Halbieren der SDS-Konzentration und Zugabe der benötigten Pigmente. Es werden jedoch die beiden Volumina gleichzeitig in eine Meßküvette injiziert und gemischt. Die beiden zuleitenden und eine ableitende Kapillarschläuche sind in einem gekühlten Verbindungsschlauch untergebracht. Die Lösungen werden in der Vorrichtung in wassergekühlten Spritzen vorgehalten und die Kolben entweder mit Druckluft oder per Hand bedient. Das benötigte Volumen für einen Versuch, muß das Spülen der Küvette und das Volumen der zuleitenden Kapillare beinhalten. Falls hochviskose Medien verwendet werden, muß das Volumen entsprechend vergrößert werden. Mit diesem System können bis zu sechs Experimente mit einem Ansatz

durchgeführt werden. Die Versuche sollten insgesamt jedoch nicht länger als eine Stunde für einen Ansatz dauern, da sonst die Alterung der OG-Lösung die Messungen beeinflusst.

Durchführung für das Standardprotokoll mit 0,04% [w/v] PG in der Rekonstitutionslösung

- 1500 µl OG-Lösung\* (2% [w/v] OG, 0,08% [w/v] PG, 100 mM Li<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (pH 9), 12,5% [w/v] Saccharose, 5 mM DTT) 15 Minuten im Ultraschallbad sonifizieren (mindestens 5 ml Volumengefäß verwenden, am besten 12 ml).
- 1500 µl Proteinlösung\* (6,2 µM pLhcb1, 0,2% SDS, 100 mM Li<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (pH 9), 12,5% [w/v] Saccharose, 5 mM DTT) zwei Minuten kochen und abkühlen lassen.
- Pigmente (77,5 µg Chl *a*, 77,5 µg Chl *b*, 64,5 µg Xanthophylle, gelagert in Eppendorf-Reaktionsgefäß unter N<sub>2</sub> und bei -20 °C) werden in 30 µl Ethanol (p.a.) aufgenommen und durch kurzes Zentrifugieren am Boden des Gefäßes gesammelt.
- Pigmente mit Pipette aufnehmen und direkt oberhalb der OG-Lösung in das Reaktionsgefäß geben, dabei sofort mit dem Tischmischgerät mischen. Konzentration der Pigmente: 57 µM Chl *a*, 57 µM Chl *b* und 76 µM Xanthophylle.
- Wichtig beim Bedienen der Vorrichtung: die Ventilpositionen beachten und gemäß Anleitung positionieren.
- Jeweils 400 µl OG- und Proteinlösung in die beiden Vorratsspritzen geben, die Präzisionsspritzen beladen (Luftblasen vermeiden) und das System spülen.
- Stop-Spritze auf das benötigte Volumen einstellen (mindestens 300 µl, bei hoher Viskosität 400 µl).
- Restliches Volumen in die Vorratsspritzen geben und Präzisionsspritzen beladen (Luftblasen vermeiden).
- Solange die verwendete Software keinen "Hardware-Start" im "Multigroup-Modus" (Kap. 2.2.16) zulässt, muß zuerst die zeitaufgelöste Messung gestartet werden und nach drei Sekunden werden die Proben injiziert. Der dabei entstehende Signalsprung läßt sehr gut eine Auswertung zu, da er das Signalniveau der letzten Messung zeigt.
- Ist der "Hardware-Start" möglich, so wird die zeitaufgelöste Messung durch die Injektion gestartet.
- Entleeren der Stop-Spritze.
- Nach Aufnahme der zeitaufgelösten Messung (Kap. 2.2.16) und Gleichgewichtsmessung (Kap. 2.2.15), nächstes Experiment des Ansatzes starten.
- Nach drei Experimenten die Abfallspritze entleeren und Probe des vierten Experiments in der Abfallspritze auffangen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß geben und bei -20°C lagern (Probe für die Analyse durch schonende Gel-Elektrophorese).
- Thermische Stabilität des LHClI messen (Kap. 2.2.11).
- Nach der letzten Messung des Ansatzes System mit mindestens 40 ml H<sub>2</sub>O (zweimal zweifaches Volumen der Vorratsspritzen) spülen.
- Mindestens einmal pro Woche das System mit jeweils zwei ml Ethanol spülen.

---

\* Bei pH-Werten < 8 wurden die Lösungen mit 100 mM Na<sub>2</sub>(HPO<sub>4</sub>) statt Boratpuffer auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

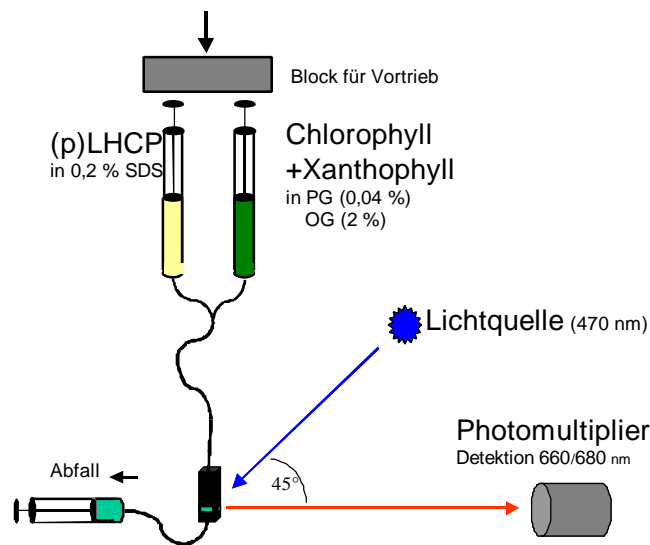


Abb. 2.5: Skizze des Versuchsaufbaus des Fluoreszenz-Spektroskops zur „Rapid-Mixing“-Methode. Protein- und Pigmentlösungen befinden sich in den Vorratsspritzen der „Rapid-Mixing“-Apparatur. Mit einem Block werden beide Spritzen gleichzeitig bedient. Die Lösungen werden über temperierte Kapillarschläuche in die Küvette gespritzt und dabei sofort gemischt. Das Volumen der Lösungen wird so gewählt, daß die Menge zum Spülen der Küvetten ausreicht. Vorher verwendete Lösungen werden dadurch in die Abfallspritze verdrängt. Das Anregungslicht ist blau, die Fluoreszenz-Emission rot dargestellt. Die Emission wird in einem Winkel von 45° zur Anregungswellenlänge aufgenommen. Konzentrationen der Detergetien und Lipide gemäß Standardbedingungen (s. o.).

## 2.2.11 Stabilität der Komplexe

### Manuelle Methode

#### Prinzip

Die Stabilität des LHCII kann durch thermischen Streß dieser Pigment-Protein-Komplexe untersucht werden. Die Komplexe zerfallen, unter nicht zu hoch gewählter Temperatur, langsam. Dabei kann man zeitaufgelöst die Fluoreszenzsignale der dissoziierenden Komplexe (Verlust der Energieübertragung von Chl *b* zu Chl *a*) messen.

Durchführung für gelagerte Proben:

Der nach Rekonstitution (Kap. 2.2.9) bei  $-20\text{ °C}$  gelagerte LHCII wird zuerst aufgetaut ( $24\text{ °C}$ ) und anschließend bei  $47\text{ °C}$  thermisch destabilisiert.

- Wasserbad des Fluoromax auf  $47\text{ °C}$  temperieren.
- Eppendorf-Reaktionsgefäß mit LHCII im Wasserbad bei  $24\text{ °C}$  auftauen.
- Reaktionslösung entnehmen, in Fluoreszenzküvette geben, mit  $N_2$  überschichten (bei Versuchen zur Lipidvariation) und sofort in Fluoromax stellen.
- Zeitaufgelöste Messung starten (Kap. 2.2.16) im Anschluß daran Gleichgewichtsmessung (Kap. 2.2.15) vornehmen.
- Reassoziationsmessung (Kap. 2.2.12).

Durchführung für Proben mit der „Rapid-Mixing“-Methode:

- Nachdem die letzte Rekonstitutionsmessung aus (Kap. 2.2.10) durchgeführt wurde, Wasserzulauf der „Rapid Kinetics Spectrometer Assesory“ mit Schraubklemmen

sperrern und Verbindungsschlauch mit Küvette aus dem Fluoromax nehmen und dunkel stellen.

- Wasserbad des Fluoromax auf 47 °C temperieren.
- Verbindungsschlauch mit Küvette wieder einsetzen und Messung starten (Kap. 2.2.16).
- Gleichgewichtsmessung (Kap. 2.2.15) durchführen.

## 2.2.12 Rekonstitution nach Destabilisierung durch thermischen Streß

### Prinzip

Nachdem der LHCII thermisch destabilisiert wurde, kann durch Senken der Temperatur wieder eine Bedingung geschaffen werden, bei der die Komplexe reassoziieren. Dabei muß beachtet werden, daß durch den thermischen Streß die Pigmente geschädigt werden und somit die effektive Pigmentkonzentration erniedrigt wird.

### Durchführung

- Probe verbleibt nach Destabilisierung (Kap. 2.2.11) im Fluoromax.
- Wasserbad auf 24 °C einstellen.
- Messung (Kap. 2.2.16) starten und anschließend Gleichgewichtsmessung (Kap. 2.2.15) durchführen.

## 2.2.13 Nachweis des Komplexes durch schonende Gel-Elektrophorese

### Prinzip

Mittels einer Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) können die freien Pigmente und das freie Protein vom LHCII getrennt werden. Das Dodecylsulfat des Laufpuffers versetzt Proteine gleichmäßig mit negativen Ladungen, die Proteine verhalten sich dadurch im elektrischen Feld unabhängig von ihrer nativen Ladung. Wird eine Spannung angelegt, so werden die Proteine im Sammelgel zunächst konzentriert, um anschließend im Trenngel annähernd nach ihrer Größe aufgetrennt zu werden (LAEMMLI, 1970). Die Verwendung von 10%igen Glyceringelen zeigt sich dabei als optimal für eine Isolierung des pLHCII in einem Lipid-Detergens-System. Das Midget-Gel-System wird während des Laufs bei 4 °C gekühlt und unter einem Dunkelsturz gehalten. Die Kühlung, das in dem System enthaltene Glycerin und der Schutz vor Lichteinstrahlung ermöglichen es unter diesen „sanften“ Bedingungen, den Protein-Pigment-Komplex zu isolieren und dient als Nachweis für die erfolgreich Rekonstitution.

### 2.2.13.1 Gießen der Gele (5 Stück, 0,75 mm)

Midget-Gel-System gemäß Vorschrift für fünf Gele zusammenbauen. Zuerst Trenngel, anschließend Sammelgel in die Gießapparatur füllen. Polymerisationsdauer jeweils eine Stunde.

Tabelle: 2.2: Vorschrift zum Gießen fünf 10%ige Polyacrylamidgele

	Trenngel (~10%)	Sammelgel (4,5%)
30% Acrylamid/1% Bisacrylamid	9 ml	3 ml
1 M Tris HCl (pH 8,8)	11,3 ml	-
1 M Tris HCl (pH 6)	-	2,6 ml
H <sub>2</sub> O (entionisiert)	5,6 ml	14,2 ml
Glycerin (80%)	1,7 ml	-
Radikalbilder APS (10%)	200 µl	100 µl
Katalysator TEMED	13 µl	10 µl

### 2.2.13.2 Schonende Gel-Elektrophorese

- Aufbau der Gel-Kammer gemäß Vorschrift, Kühlung 4°C.
- Einfüllen des LDS-Laufpuffers (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% LDS, 0,5 mM EDTA) in das System.
- 20 µl des Rekonstitutionsansatzes in die Geltaschen geben, aufgrund der hohen Dichte durch den Saccharose-Anteil im Ansatz schnelles Absinken der Probe.
- Spannungsgerät anschließen und Dunkelsturz über Kammer stellen.
- Spannung auf 40 V einstellen, bis Proben ins Trenngel eingelaufen sind.
- Erhöhung der Spannung auf 100 V.
- Dokumentation des „grünen“ Gels durch "Scannen".
- Gel in Coomassie-Lösung (175 mg Serva Blau (für 1 l), 50% Ethanol, 7% Essigsäure) geben, 15 Minuten schwenken.
- Coomassie-Lösung abschütten und Gel mit erstem Entfärber (10% Ethanol, 7% Essigsäure) überschichten und solange schwenken bis blaue Banden erscheinen.
- Ersten Entfärber abschütten und Gel mit zweitem Entfärber (10% Essigsäure) überschichten, über Nacht stehen lassen.
- Zweiten Entfärber abschütten, Gel 30 Minuten wässern, auf Scanner dokumentieren und anschließend auf einem Gelrockner unter Vakuum und Erwärmung innerhalb von 30 Minuten trocknen.

### 2.2.14 „Front-Face“-Technik zur Fluoreszenzmessung

#### Prinzip

Bei einer Standardanordnung zur Fluoreszenzmessung wird eine Probe bestrahlt und im rechten Winkel die Emission des Fluorophors vermessen, um den Effekt des Anregungsstrahls zu minimieren. Dabei entscheidende Einflußgrößen sind die Pfadlänge des Anregungsstrahls durch die Küvette und die Konzentration der Lösung. Fluoreszenzsignale können leicht unterdrückt und somit verfälscht werden, wenn es zu Reabsorption des emittierten Lichtes durch benachbarte Moleküle kommt. Im extremen Fall kann das zur Löschung des Signals führen. Deswegen muß bei Fluoreszenzmessungen die Pfadlänge möglichst kurz oder die Konzentration der Probe sehr gering sein. Die Absorption der in dieser Arbeit verwendeten Rekonstitutionslösung liegt unter Standardbedingungen (Kap. 2.2.9, 2.2.10), bei 2,58 bei einer Wellenlänge von 660 nm. Diese hohe Konzentration der Lösung ist erforderlich um eine Assemblierung des LHCII zu induzieren; sie ist aber somit deutlich zu hoch, um in einer konventionellen Fluoreszenzmessung eingesetzt zu werden. Es kommt zum Auslöschen („Quenchen“) der Fluoreszenzemissionen durch benachbarte Chl.

Bei der „Front-Face“-Technik handelt es sich um eine Möglichkeit unter den gewählten Bedingungen (s. o.) die Rekonstitution des LHCII fluoreszenzspektroskopisch zu untersuchen. Dabei wird das gestreute und emittierte Licht der Probe in einem 45° Winkel zum Anregungsstrahl an einem konkaven Spiegel gesammelt und über einen weiteren Spiegel auf den Photomultiplier gelenkt. Auf diese Weise bleibt die Pfadlänge des emittierten Lichts hinreichend gering und Reabsorptionseffekte der konzentrierten Probe werden minimiert (Abb. 2.6).

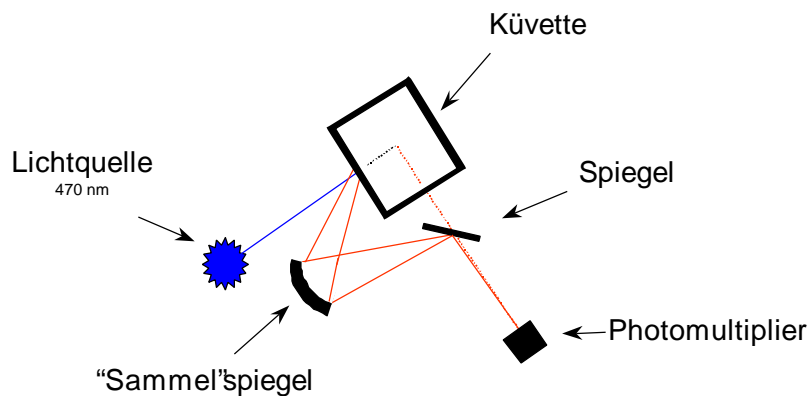


Abb. 2.6: Aufbau des Küvettenhauses des Fluoreszenz-Spektroskops mit „Front-Face“-Adapter (45°). Anregungslicht blau, Fluoreszenzlicht rot dargestellt. Gestrichelt: konventioneller Strahlengang (90°).

### 2.2.15 Gleichgewichts-Fluoreszenz-Spektroskopie

#### Prinzip

Der LHCII kann nach erfolgter Rekonstitution über seine fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften charakterisiert werden (Kap. 2.2.9, 2.2.10). Der Komplex hat unter Standardbedingungen nach ca. 15 Minuten sein Gleichgewicht erreicht. Eine sehr gute Möglichkeit den Pigment-Protein Komplex zu untersuchen ist, die Energieübertragung von Chl *b* auf Chl *a* im Gleichgewicht, also nach erfolgter Rekonstitution, zu messen. Hierbei wird bei einer Wellenlänge von 470 nm angeregt, bei der hauptsächlich Chl *b* angeregt wird. Gemessen wird ein Fluoreszenzemissionsspektrum von 600 nm bis 750 nm. In diesem Bereich befinden sich die Maxima der Fluoreszenzemission von Chl *b* und Chl *a*. Zur Abschätzung der Ausbeute der Rekonstitution können die Emissionsspektren eines LHCII mit einem Kontrollprotein, das nicht mehr rekonstitutionsfähig ist (Protein mit starker Deletion (Kap. 2.1.1, 3.2.2)), miteinander verglichen werden. Die Fluoreszenzspektren werden mit Hilfe der Datamax-Software dekonvolviert, d. h., in die einzelnen Flächen, die das Gesamtspektrum ausmachen, zerlegt. Anschließend kann die prozentuale Abnahme der Fläche der Chl *b*-Emission des LHCII von der Fläche der simulierten Rekonstitution, als Maß für die Ausbeute angegeben werden (Kap. 2.2.18.2).

#### Durchführung

Die Messung wird mit einem „Front-Face“-Adapter mit Fluoromax 2 durchgeführt (Kap. 2.2.14). Da der „Front-Face“-Adapter zwei Raman-Maxima im zu messenden Bereich zeigt, wird eine Kontrollmessung nur mit Küvette durchgeführt, als Leerkontrolle gespeichert und von jeder Messung automatisch abgezogen.

Experimenttyp: „Emission“:

Anregungswellenlänge: 470 nm. Spaltbreite: 2 nm.

Emissionsspektrum: 600 nm bis 750 nm, Spaltbreite: 2 nm, Schrittweite: 0,5 nm.

Integrationszeit: 0,2 s.

Dekonvolvieren der Spektren über Datamax-Software, Programmteil „Curve Fit“.

### 2.2.16 Zeitaufgelöste Fluoreszenz-Spektroskopie

#### Prinzip

Die Veränderung der Fluoreszenz-Eigenschaften vom denaturierten Protein mit freien Pigmenten hin zum rekonstituierten LHCII können zeitaufgelöst verfolgt werden. Dabei wird

die Abnahme der Chl**b**-Fluoreszenzemission und die Zunahme der Chl**a**-Emission, bedingt durch die Energieübertragung von Chl**b** auf Chl**a**, verfolgt (Abb. 3.2). Die Messungen werden im Fluoromax mit „Front-Face“-Adapter durchgeführt. Die Fluoreszenzänderungen werden in zwei Kanälen, getrennt für die Chl**a**- und Chl**b**-Emission, aufgezeichnet. Beide Kanäle werden, um mögliche Lampenschwankungen auszugleichen, durch den Referenzwert der Lampe ausgeglichen.

#### Durchführung

Experimenttyp: „Multigroup“:

Kanal 1: Anregung 470 nm, Emission 660 nm, Einstellung „S/R“ = Signal dividiert durch Referenz.

Kanal 2: Anregung 470 nm, Emission 680 nm, Einstellung: „S/R“.

Spaltbreite: Anregung 0,5 nm.

Spaltbreite: Emission 6 nm.

Integrationszeit: 0,1 s, Increment: 0,5 s.

Die Messung wird gestartet. Das Programm erwartet die Freigabe über die Tastatur.

Besonderheiten zur manuelle Methode:

Bei der manuellen Methode (Kap. 2.2.9) wird eine Küvette mit der Kantenlänge von 5 mm verwendet. Das Mischen der beiden Lösungen, bedingt eine Verzögerung des Meßbeginns.

- Die Pigmentlösung wird vorsichtig in die Küvette gegeben. Eventuell entstandene Luftblasen werden mit einer langen Nadel entfernt und der Magnetrührstab (2 × 3 mm) vorsichtig in die Küvette gegeben.
- Eingebauten Magnetrührer am Fluoromax 2 auf höchste Geschwindigkeit stellen.
- Injektion der Proteinelösung mit Hamiltonspritze (Peeknadel) und für weitere sechs Sekunden mischen.
- Magnetrührer abstellen und sofort Programmstart über Tastatur freigeben.

Besonderheiten zur „Rapid-Mixing“-Methode:

Optional kann mit der „Rapid-Mixing“-Apparatur der Start der Messung über einen "Hardware-Schalter" erfolgen. Dies ist jedoch nur im Experimenttyp „Timebase“ möglich. Mit Typ „Timebase“ ist die Messung bisher jedoch nur mit einem Kanal möglich, deswegen wurde auf den Start mit dem "Hardware-Schalter" verzichtet.

- Anlage wie unter (Kap. 2.2.10) vorbereiten.
- Messung über Tastatur starten.
- Zählvorgang der Software verfolgen und nach drei Sekunden Lösungen injizieren.

#### 2.2.17 Bestimmung der kinetischen Parameter der Rekonstitution des LHCII

Die Ratenkonstanten werden mit Hilfe der Software „Table Curve 2D“ (SPSS, Chicago, USA) bestimmt. Mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate werden die Funktionen an den Datensatz angepaßt. Die Summe der quadratischen Abweichungen („Residuals“) der zu berechneten Funktion wird dabei minimiert. Es werden dabei eine biexponentielle Funktion und eine gaussische Normalverteilung der Abweichungen von dieser Funktion angenommen. Das verwendete Verfahren zur iterativen Berechnung der nicht-linearen Funktionen ist ein Levenburg-Marquardt-Algorithmus. Als Abschätzung der Güte der angepaßten Funktionen dient Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ), Standardabweichung ( $s$ ) und die statistische Verteilung der

„residuals“. Bei nicht-linearen Funktionen muß beachtet werden, daß der Algorithmus nicht immer das globale Minimum erkennt, sondern schon bei einem lokalen Minimum die Berechnung beenden kann. Um dies zu vermeiden, müssen geeignete Ausgangsparameter der Koeffizienten der Funktionen für die Berechnung gewählt werden. Dies ist durch nutzerdefinierte Funktionen und die manuelle Anpassung der Koeffizienten der nutzerdefinierten Funktionen möglich.

Die Rekonstitution des LHCII unterliegt vermutlich einer kooperativen und mit höherer Ordnung ablaufende Kinetik (BOOTH & PAULSEN, 1996). Dieser Vorgang kann modellhaft beschrieben werden. Dabei muß bewußt bleiben, daß mit einem Modell jeglicher Art, nur eine Annäherung erreicht werden kann. Es wird ein möglichst einfaches Modell verwendet, um eine Interpretation zu erleichtern. Das verwendete Modell geht von zwei voneinander unabhängigen, gleichzeitig stattfindenden Reaktionen jeweils erster Ordnung „(1+1)“, aus. Bei der „Rapid-Mixing“-Methode (Kap. 2.2.10) wird das beobachtbare Zeitfenster vergrößert, da die Mischzeit von sechs Sekunden entfällt. Hier zeigte sich das Einfügen einer dritten Komponente „(1+1+1)“ in den nutzerdefinierten Funktionen als hilfreich. Die Funktionen setzen sich folgendermaßen zusammen:

$$y(x) = A_0 + A_2 \times e^{-(x/\tau_2)} + A_3 \times e^{-(x/\tau_3)} \quad \text{für Chl } b\text{-Abnahme}$$

$$y(x) = A_0 + A_2 \times (1 - e^{-(x/\tau_2)}) + A_3 \times (1 - e^{-(x/\tau_3)}) \quad \text{für Chl } a\text{-Zunahme}$$

Der Koeffizient „ $A_0$ “ ergibt den Achsenabschnitt, „ $A_2$ “ und „ $A_3$ “ sind die berechneten Amplituden und  $\tau_2$  und  $\tau_3$  sind die reziproken Werte der Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen Exponentiellen und geben die Reaktionszeit an.

Die Verwendung der Funktion „(1+1+1)“ erfordert die Erweiterung der Funktion um den Summanden

$$A_1 \times e^{-(x/\tau_1)}$$

Die Komponente  $\tau_1$  ist bei BOOTH & PAULSEN (1996) beschrieben, kann aber zumeist nur mit einer „Stopped-Flow“-Apparatur aufgelöst werden und wird nur selten mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden erfaßt.

Eine Steigerung der Komplexität durch Einbringen einer weiteren Komponenten ist möglich, es zeigt sich jedoch, daß die Komponenten sich gegenseitig aufheben oder zeitgleich mit halbiertes oder bei höher Komponentenzahl entsprechend reduzierter Amplitude ablaufen. Jede rechnerische Anpassung an einen Datensatz läuft automatisch mit diversen Funktionen ab. Die oben angegebenen Funktionen werden grundsätzlich am besten angepaßt.

#### Durchführung

- Datensätze in Datamax zu ASCII Datensätzen konvertieren.
- Datensätze in TableCurve importieren.
- Bei der „Rapid-Mixing“-Methode die ersten vier Sekunden von der Anpassung ausschließen, da der Meßstart drei Sekunden vor der Injektion liegt und zusammen mit dem Injektionssignal die Berechnung nicht ermöglicht.

#### 2.2.18 Abschätzung der Ausbeute an rekonstituiertem LHCII

Um die Ausbeute der Rekonstitution abzuschätzen, können verschiedene Verfahren angewendet werden.



### 2.2.18.1 Veränderung des Signals (summierte Amplituden) der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung

#### Prinzip

Die Fluoreszenz des angeregten Chl *b* nimmt während der Rekonstitution bis zum Erreichen des Gleichgewichtes kontinuierlich ab, gleichzeitig die Fluoreszenz des Chl *a* durch Energieübertragung zu. Die Endfluoreszenz von Chl *b* sowie die durch Berechnung der multi-exponentiellen Funktion erhaltenden Amplituden der Kinetik (Kap. 2.2.17), lassen sich addieren und somit das Ausgangssignal vor Rekonstitution bestimmen. Analog kann die Endfluoreszenz des Chl *a* als Bezugswert verwendet und die berechneten Amplituden der Kinetik darauf bezogen werden. Das prozentuale Verhältnis der Amplitude im Vergleich zum Ausgangssignal wird als Annäherung für die Ausbeute der Rekonstitution gewertet und als apparente Ausbeute bezeichnet.

#### Durchführung

Signalveränderung von Chl *b* als Annäherung für die Ausbeute der Rekonstitution (apparente Ausbeute)

- Berechnung der biexponentiellen Kinetik (Kap. 2.2.17) des Datensatzes aus Kanal 1 der zeitaufgelösten Messung (Kap. 2.2.16)
- Apparente Ausbeute [%] = (Amplituden/Ausgangssignal (Endsignal + Amplituden)) × 100

oder als Koeffizienten:

$$\text{Apparente Ausbeute [\%] vom Ausgangssignal} = ((A_2 + A_3 + \text{ggf. } A_1) / (A_0 + A_2 + A_3 + \text{ggf. } A_1)) \times 100$$

Signalveränderung von Chl *a* als Abschätzung der Rekonstitution (apparente Ausbeute)

- Berechnung der biexponentiellen Kinetik (Kap. 2.2.17) des Datensatzes aus Kanal 2 der zeitaufgelösten Messung (Kap. 2.2.16)
- Signalveränderung [%] = (Amplituden/Endsignal (Ausgangssignal + Amplituden)) × 100

oder als Koeffizienten:

$$\text{Signalveränderung [\%] vom Ausgangssignal} = ((A_2 + A_3) / (A_0 + A_2 + A_3)) \times 100$$

### 2.2.18.2 Gleichgewichts-Fluoreszenz-emissions-Spektroskopie

#### Prinzip und Durchführung

Das Emissionsspektrum des LHCII (Kap. 2.2.15), verglichen mit einem Spektrum des nicht-rekonstituierenden Lhcb1 (Klon 35b1) mit Pigmenten, läßt einen Rückschluß auf die Ausbeute der Rekonstitution zu. Die Spektren werden mit Hilfe der Software Datamax dekonvolviert. Somit erhält man die Flächeninhalte der beteiligten Pigmente, die sich zum Gesamtspektrum addieren. Die Differenz des Flächeninhaltes des Chl *b*-Emissionsspektrums des LHCII zum entsprechenden Flächeninhalt des nicht-rekonstituierenden Ansatzes, bezogen auf diesen letzteren Flächeninhalt, gibt eine prozentuale Ausbeute der Rekonstitution an.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Beschreibung des Systems

#### 3.1.1 Energietransfer von Chl *b* nach Chl *a*

Der native LHCII wirkt wie ein flacher Trichter, der die Lichtenergie über einen größeren Querschnitt sammelt und dann die Energie der Lichtquanten an das Reaktionszentrum des PSII weiterleitet. Die Pigmentausstattung des LHCII ermöglicht die Aufnahme von Lichtquanten über ein weites Spektrum und die Weitergabe der aufgenommenen Energie an die ebenfalls assoziierten minoren Antennen. Die Weiterleitung der Energie an die benachbarten Pigment-Protein-Komplexe erfolgt in Form von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (Förster-Energietransfer). Der isolierte oder rekonstituierte LHCII kann die Anregungsenergie nicht strahlungslos weitergeben, wie es in der Thylakoidmembran der Fall wäre und fluoresziert statt dessen (Kap. 1.2.3).

Die Rekonstitution des (p)LHCII, wird durch Zugabe von Pigmenten induziert und gleichzeitig wird die SDS-Konzentration unter die für den Komplex destabilisierende Konzentration erniedrigt (Kap. 1.2.4, 2.2.9 u. 2.2.10). Das Vorläuferprotein benötigt für die Rückfaltung länger als der mature Lhcb1 und ist wegen den längeren Mischzeiten besser zur Untersuchung geeignet (BOOTH & PAULSEN, 1996). In dieser Arbeit wurde die Rückfaltung des pLhcb1 untersucht, auf das Vorläuferprotein aber nur explizit genannt, wenn die Molekularmasse wichtig war.

Die Rekonstitution des Pigment-Protein-Komplexes kann mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie charakterisiert werden. Werden freies Pigment und Protein (Versuch mit der nicht rekonstituierenden Mutante 35b1, die die Situation vor Rekonstitution simuliert) mit Licht einer Wellenlänge von 470 nm angeregt, so ist eine Fluoreszenz bei 660 nm zu beobachten. Bei 470 nm wird vornehmlich Chl *b* angeregt, die Emission bei 660 nm wird ebenfalls durch Chl *b* hervorgerufen. Der gereinigte, rekonstituierte LHCII besitzt bei einer Excitation von 470 nm eine Fluoreszenzemission bei 680 nm. Diese Chl *a*-Emission wird durch die Übertragung der Anregungsenergie von Chl *b* auf Chl *a* hervorgerufen. Der Klon 35b1 („vor der Rekonstitution“) zeigt eine Emission wie bei Abb. 3.1, schwarze Linie. Die Emission bei 660 nm ist auf freies Chl *b*, die kleine Schulter bei 680 nm auf freies Chl *a* zurückzuführen, welches auch ohne Energieübertragung von Chl *b* zu einem geringen Anteil durch Licht der Wellenlänge 470 nm angeregt werden kann. Die grüne Linie der Abb. 3.1 zeigt das Spektrum des LHCII nach Rekonstitution, aber ohne Aufreinigung, d.h. freie Pigmente sind neben den am Lhcb1 gebundenen Chl vorhanden. Die Emission bei 680nm resultiert vor allem aus der Energieübertragung von Chl *b* auf Chl *a*. Die deutliche Schulter bei 660 nm ist auf freies Chl *b* zurückzuführen. Die fortschreitende Rekonstitution des LHCII kann durch die Veränderung der Chl *b*- bzw. Chl *a*-Emission (nach der Anregung bei 470 nm) durch Ausbildung des Energietransfers verfolgt werden. Durch den Energietransfer nimmt das Signal der Chl *b*-Emission (Donor) ab und Chl *a* (Akzeptor) fluoresziert stärker. Die Signalabnahme des Chl *b* ist in Abb. 3.1 durch einen roten Pfeil, die Signalzunahme der Chl *a*-Emission durch Energieübertragung von Chl *b* mit einem blauen Pfeil dargestellt.

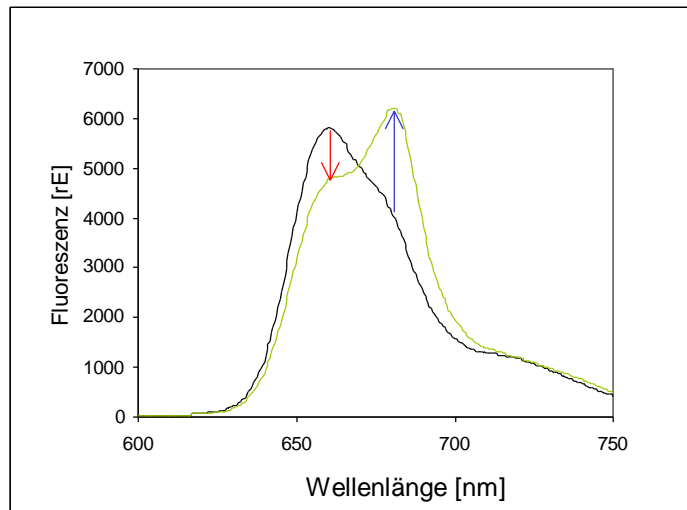


Abb. 3.1: Fluoreszenzemissionsspektrum „vor“ (Mutante 35b1/schwarze Linie) und nach (grüne Linie) der Rekonstitution des LHCII. Anregungswellenlänge bei 470 nm (hauptsächlich Chl *b*). Fluoreszenz-Emission bei 660 nm erfolgt durch freies Chl *b*. Fluoreszenz-Emission bei 680 nm Chl *a* wird hauptsächlich hervorgerufen durch Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a*. Die Pfeile geben die Richtung der Signalveränderung der Emission von Chl *b* (660 nm/rot) und Chl *a* (680 nm/blau) durch die Ausbildung des Energietransfers an.

In früheren Untersuchungen wurde mit einer „Stopped-Flow“-Methode und dadurch mit einer deutlich kürzeren Totzeit des Systems und einer höheren zeitlichen Auflösung als mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden gearbeitet (BOOTH & PAULSEN, 1996). Dabei zeigte sich eine sehr schnelle Reaktionszeit im Millisekundenbereich, eine schnelle Reaktionszeit ( $\tau_1$ ) im Bereich von bis zu einer Minute und eine langsame Komponente ( $\tau_2$ ) im Bereich von mehreren Minuten (BOOTH & PAULSEN, 1996). Bei der „Stopped-Flow“ und den in dieser Arbeit verwendeten Methoden (Kap. 2.2.9 und 2.2.10), konnten Verbesserungen im Pigment/Protein-Verhältnis und die Verwendung ausschließlich neu angesetzter Lösungen die Reaktionszeiten verkürzen, die Reproduzierbarkeit der Experimente verbessern und die langsame Reaktionszeit ( $\tau_2$ ) in zwei einzelne Komponenten (jetzt  $\tau_2$  und  $\tau_3$ ) auflösen. Die beiden Komponenten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  wurden in dieser Arbeit untersucht. Ein Vorteil der in dieser Arbeit verwendeten Methoden im Vergleich zur „Stopped-Flow“-Methode, ist die Verhinderung des Rückflusses von Lösungen aus der Mischkammer.

Die Abnahme der Chl *b*-Emission und die Zunahme der Chl *a*-Emission können mit einer bi-exponentiellen Funktion am besten beschrieben werden (Abb. 3.2). Diese Funktion ist eine modellhafte Annäherung an den komplexen Vorgang der Rekonstitution des LHCII. Vergleiche mit anderen nicht-linearen Funktionen ergaben als beste Anpassung an die Signalveränderungen die Kombination von zwei Reaktionen erster Ordnung, die unabhängig voneinander sind (Abb. 3.2; Kap 2.2.17).

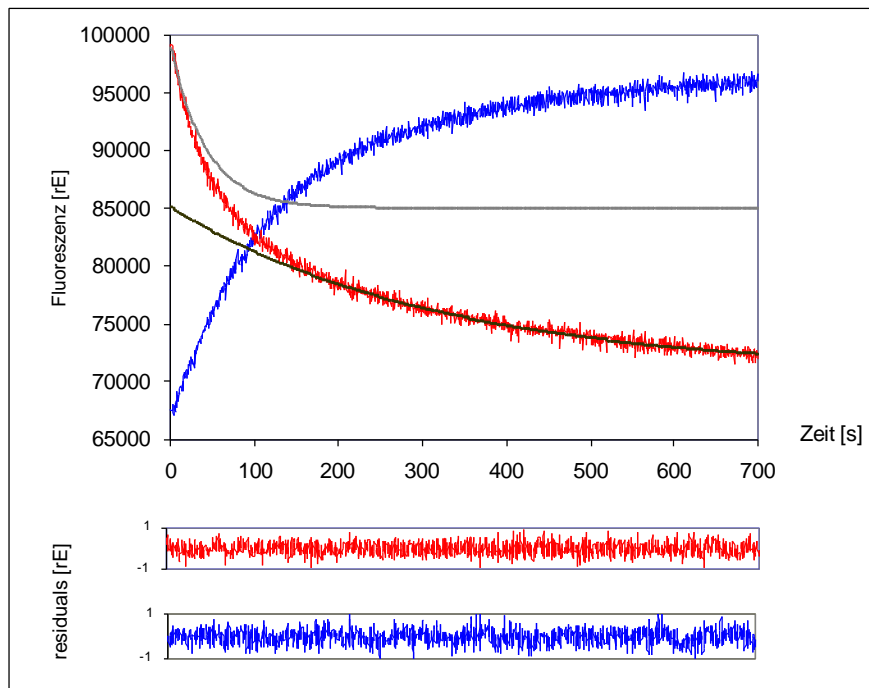


Abb. 3.2: Änderung der Chl *b* (660 nm/rot) und Chl *a* (680 nm/blau) Fluoreszenz-Emission während der Rekonstitution durch die manuellen Methode und nach Anregung bei 470nm (Chl *b*). Die hellgraue Linie stellt den Anteil der schnellen Reaktionszeit ( $\tau_2$ ), die schwarze Linie die langsame Reaktionszeit ( $\tau_3$ ) der Chl *b*-Fluoreszenz-Abnahme dar. Die Summe der Reaktionszeiten ergibt eine ideale Anpassung an die Emissionsänderung von Chl *b*. Unten dargestellt sind als Maß für die Güte der Anpassung die „Residuals“, d.h. die Abweichungen der anzupassenden Daten von der Funktion. Rot, „Residuals“ des Chl *b*-Datensatzes; blau „Residuals“ des Chl *a*-Datensatzes.

Die in dieser Arbeit ermittelten und beurteilten Parameter der Signaländerungen sind neben den Reaktionszeiten ( $\tau_2$  und  $\tau_3$ ) die Amplituden der jeweiligen Reaktionszeit ( $A_2$  und  $A_3$ ) und der Achsenabschnitt ( $A_0$ ) der berechneten Funktion (Kap. 2.2.17). Abgeleitet davon sind das Verhältnis der Reaktionszeiten und das Verhältnis der Amplituden der Reaktionszeiten. Die Gesamtsignalveränderung kann bei der Chl *b*-Emission als apparente Ausbeute der Rekonstitution betrachtet werden, wenn sie auf das rechnerische Anfangssignal der Messung bezogen wird (Kap. 2.2.18.1). Die Signalveränderung des Chl *a* kann ebenfalls einen Eindruck über den Erfolg der Rekonstitution verschaffen, jedoch sollte der Begriff der apparenten Ausbeute nicht verwendet werden, da die Quantenausbeute von Chl *a* unter diesen Bedingungen nicht bekannt ist.

Die Abschätzung der Ausbeute der Rekonstitution über dekonvolvierte Emissionsspektren war zu ungenau und zeigte eine sehr hohe Streuung der Ergebnisse. Ein Problem dieser Methode lag in einem Nebenmaximum bei ca. 700nm bis 705 nm. Diese Gaußbande des Gesamtspektrums ließ sich nur schwer berechnen und zeigte bei der Dekonvolution eine zu große Schwankungsbreite des Flächeninhaltes sowie der Halbmaximalbreite und des Maximums. Entsprechend variabel war der Einfluß dieser Fläche auf die der Chl-Gaußbanden, die dadurch in der Halbmaximalbreite variierten.

Das überexprimierte Lhcb1 wird durch enzymatischen Aufschluß von *E. coli* mittels Lysozym und anschließender Reinigung gewonnen (Kap. 2.2.1). Der Lysozymanteil verschiedener Einschlußkörper-Präparationen unterliegt großen Schwankungen. Die Proteinbestimmung besitzt somit aufgrund des wechselnden Lysozymanteils einen systematischen Fehler. Bei Verwendung unterschiedlicher Proteinstammlösungen sind also verschiedene Pig-

ment/Protein-Verhältnisse zu erwarten. Bei den Versuchen dieser Arbeit war es von großer Bedeutung, daß immer einzelne Meßreihen mit derselben Proteincharge durchgeführt und miteinander verglichen wurden, da der Einfluß des Pigment/Protein-Verhältnisses auf die Rekonstitutionszeiten sehr groß ist (Kap. 3.4.1). Innerhalb einer Meßreihe mit gleicher Pigmentzusammensetzung und Proteinstammlösung zeigt sich das System reproduzierbar. Eine deutliche Verbesserung brachte die Verwendung der „French-Press“ zur Gewinnung des Proteins, da bei dieser Methode kein Lysozym verwendet wurde (Kap. 2.2.1).

Für die einzelnen Variationen wurden mindestens drei Ansätze gemessen und deren Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

### 3.1.2 Nachweis der Rekonstitution über schwach-denaturierende PAGE

Der LHCII kann über ein schwach-denaturierendes Gelsystem nachgewiesen werden. Dabei wird der Komplex von freiem Pigment und freiem Protein getrennt und ist als grüne Bande sichtbar. Nach einer Coomassie-Färbung kann man die einzelnen Proteinbanden erkennen. Das sind einerseits Lhcb1 und LHCII und im Falle der Protein-Isolierung aus *E. coli* über Lysozym, eine Lysozymbande (Abb. 3.4, PAULSEN ET AL., 1990).

Verwendet wurde ein 10%iges Polyacrylamidgel mit Glycerin. Bei einer Rekonstitution mit Lipiden zeigte sich diese Konzentration den anderen Acrylamid-Konzentrationen überlegen, da hier die Banden am schärfsten voneinander getrennt wurden.

Abb. 3.3 A) zeigt das „grüne“ Gel bei einer Chl-Variation (Kap. 3.4.1). Die Komplexbanden waren deutlich von den freien Pigmentbanden zu unterscheiden. Es waren nur graduelle Unterschiede in der Komplexbildung zu erkennen. Auf Abb. 3.3 B) ist das Coomassie-gefärbte Gel abgebildet. Die grüne Komplexbande in Abb. 3.3 A) zeigte sich als blaugrün gefärbte Proteinbande. Oberhalb der Komplexbande befand sich das als rein blaue Bande erkennbare freie Protein. Auch bei dieser proteinspezifischen Färbung waren keine starken Variationen im Verhältnis von freiem Protein zu LHCII zu erkennen.

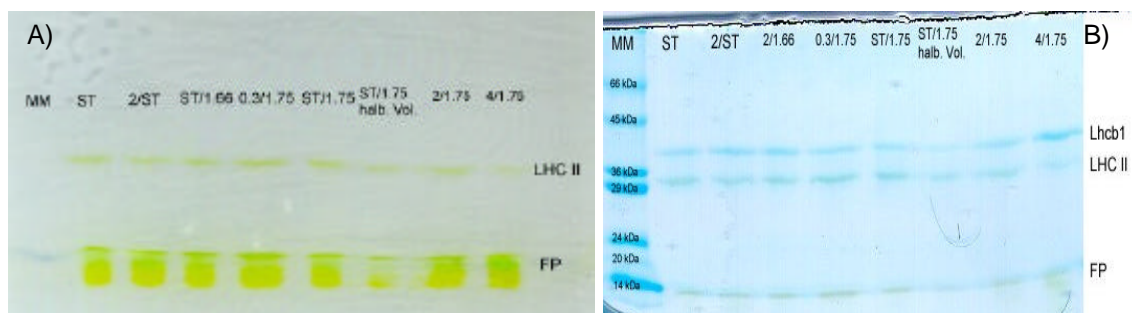


Abb. 3.3 A) Schwach-denaturierendes Gel der Pigmentvariation aus Kap. 3.4.1 (grünes Gel). B) Schwach-denaturierendes Gel aus Abb. 3.3 A), das Coomassie-gefärbt wurde. FP = freies Pigment; aufgetragene Proteinmenge 2 µg.

Auftragsreihenfolge von links: I) MM = Molekularmassenmarker, bei B) ist die apparente Molekularmasse der Markerbanden angegeben; II) ST = Standardansatz (Chl a/b-Verhältnis = 1; 1,6-facher Überschuß, (Überschuß ist die vielfache Menge Chl, die benötigt wird, um alle Bindungsstellen des gesamten pLhcb1 zu besetzen); III) 2/ST = Chl a/b = 2; 1,6-facher Überschuß; IV) ST/1.66 = Chl a/b = 1, 1,66-facher Überschuß; V) 0.3/1.75 = Chl a/b = 0,3; 1,75-facher Überschuß; VI) ST/1.75 = Chl a/b = 1, 1,75-facher Überschuß; VII) wie VI, Auftragsmenge 1 µg; VIII) 2/1.75 = Chl a/b = 2, 1,75-facher Überschuß; IX) 4/1.75 = Chl a/b = 4, 1,75-facher Überschuß.

## 3.2 Proteinvariation

### 3.2.1 Rekonstitution mit Klon 35b1 – Kontrollversuch mit nicht-rekonstituierbarem Klon

Die Signaländerung der Pigmente bei einer simulierten Rekonstitution mit einem Lhcb1-Derivat ohne Rekonstitutionsfähigkeit, sollte Aufschluß darüber geben, ob artifizielle Signaländerungen durch die Rekonstitutionbedingungen vorhanden sind. Die Versuche wurden mit manueller Methode und „Rapid-Mixing“-Methode durchgeführt (Kap. 2.2.9 und 2.2.10).

Der Klon 35b1 besitzt eine Deletion zwischen den membranspannenden Bereichen 2 und 3, es fehlt die Schleife zwischen den beiden  $\alpha$ -Helices. Die Signaländerungen für Chl *a* und Chl *b* und das Gleichgewichts-Fluoreszenzspektrum zeigten keine Hinweise auf eine Rekonstitution. Es war keine Zunahme der Chl *a*-Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 3.4 A). Lediglich eine lineare Signalabnahme war bei beiden Chl-Fluoreszenzen in der zeitaufgelösten Fluoreszenz-Spektroskopie zu erkennen. Auch das Fluoreszenz-Emissionsspektrum wies, bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm (Chl *b*), keine ausgeprägte Schulter bei 680 nm und somit keinen Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* auf (Abb. 3.4 B). Die Auftrennung durch PAGE zeigte keine Bildung von Pigment-Protein-Komplexen (nicht dargestellt).

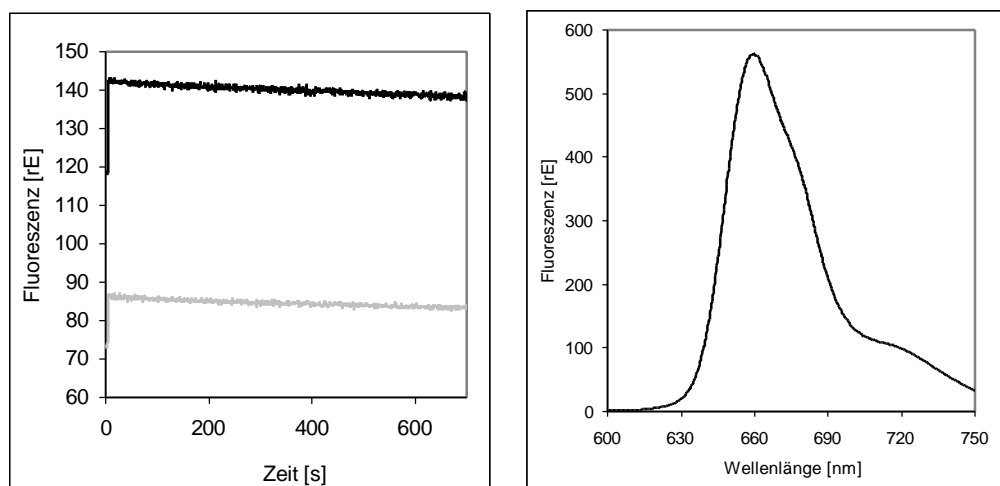


Abb. 3.4 A) Zeitaufgelöste Fluoreszenz-Spektroskopie des Klons 35b1. Chl *b*-Emission (660 nm) = schwarz; Chl *a* (680 nm) = grau; Anregungswellenlänge 470 nm. Injektionssignal zu Beginn der Messung durch „Rapid-Mixing“-Methode. B) Fluoreszenz-Spektrum des Klons 35b1 im Gleichgewicht nach Anregung bei 470 nm. Chl *b*-Emissionen bei 660 nm, Chl *a*-Emissionen bei 680 nm. Pigmente und pLhcb1 in Standardkonzentrationen (Kap. 2.2.10).

### 3.2.2 Einfluß einer Prolin-Isomerisierung

Nach Denaturierung eines Proteins stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den *cis*- und *trans*-Isomeren der Aminosäure Prolin im Protein ein. Bis zu 30% kann das *cis*-Isomer des Prolins in denaturierten Proteinen vorliegen. Die Gleichgewichtseinstellung ist zeitabhängig (SCHMIDT, 1993). Der Einfluß einer möglichen Isomerisierung des Prolins auf die Rekonstitution von LHCII kann somit mit unterschiedlich lang gelagerten Proteinansätzen ermittelt werden. Die Versuche wurden mit der manuellen Methode durchgeführt. Die Pigmente wurden als Standardpigmentlösung vorbereitet (Kap. 2.2.9). Die Proteinlösungen wurden ebenso wie dort beschrieben hergestellt, jedoch erst nach unterschiedlich langen Wartezeiten verwendet. Tab. 3.1 zeigt die Reaktionszeiten der Chl *b*-Abnahme bei unterschiedlich

langer Wartezeit. Es war bei den beiden Reaktionszeiten kein signifikanter Effekt feststellbar. Auch die weiteren Parameter zeigten keine signifikante Veränderung.

Tabelle 3.1: Parameter der zeitlich aufgelösten Chl *b*-Emissionsveränderung

Wartezeit [min]	$\tau_2$ [s]	$\tau_3$ [s]	$\tau_2 / \tau_3$	$A_2 / A_3$	Apparente Ausbeute (Chl <i>b</i> ) [%]
15	$43 \pm 7$	$331 \pm 17$	$0,13 \pm 0,02$	$0,87 \pm 0,2$	$15,0 \pm 1,7$
60	$46 \pm 1$	$355 \pm 6$	$0,13 \pm 0,01$	$1,11 \pm 0,04$	$15,7 \pm 0,1$
210	$51 \pm 4$	$376 \pm 30$	$0,14 \pm 0,01$	$0,97 \pm 0,01$	$16,1 \pm 0,4$
360	$50 \pm 9$	$456 \pm 122$	$0,12 \pm 0,05$	$0,96 \pm 0,25$	$14,0 \pm 0,9$

\* Stichprobenzahl mindestens 3, auch bei allen folgenden Experimenten.

Die Datensätze zur Chl *a*-Emission waren aufgrund der Mischdauer der Probe von sechs Sekunden und des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses nicht auswertbar.

### 3.3 Variation der Reaktanten

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, ob es eine Abhängigkeit der einzelnen Reaktionszeiten der Rekonstitution des LHCII von der Reaktantenkonzentration gibt. In den vorhergehenden Versuchen wurde angenommen, daß die langsamste bei der Rekonstitution auftretende Komponente durch die Ausrichtung der am LHCII gebundenen Pigmente bedingt ist, die zum optimalen Energietransfer führt (BOOTH & PAULSEN, 1996). Bei dieser Annahme ist eine Unabhängigkeit von den Reaktantenkonzentration zu fordern.

Die Versuche wurden mit der manuellen Methode durchgeführt (Kap. 2.2.9). Die Konzentration der Reaktanten, Pigmente bzw. Protein, wurden bei gleicher Stöchiometrie erhöht. Der molare Überschuß der Pigmente wurde gemäß Standardansatz (Kap. 2.2.9) gewählt. Es war bei allen Ansätzen eine erfolgreiche Rekonstitution zu beobachten. Wie bei Kap. 3.2.2 war aufgrund der langen Mischzeit und des ungünstigen Signal/Rausch-Verhältnisses der Chl *a*-Emissionsänderung nur eine Auswertung über die Signalveränderung von Chl *b* möglich. Bei einer dreifachen Reaktanten-Konzentration im Vergleich zum Standard war gegen Ende der Rekonstitution eine Chl *b*-Emissionsänderung mit einer positiven Amplitude zu beobachten. Dieses Signal erwies sich, nach Anpassung dieser Datenpunkte an eine kinetische Funktion mit drei Exponentiellen, als ein lineares Element mit einer Reaktionszeit  $> 1000$  s (Kap. 2.2.17). Die Rekonstitution war vor Einsetzen der linearen Komponente abgeschlossen. Eine Erhöhung der Konzentrationen über das Dreifache der Standardkonzentration war aufgrund von Pigmentaggregationen nicht möglich. Die Reaktionszeit  $\tau_2$  der Dreifachen Standardkonzentration ist nur unter Vorbehalt zu betrachten, da diese Zeit so kurz ist, daß lediglich wenig Datenpunkte aufgenommen werden können und somit eine kinetische Auswertung erschwert ist (Abb. 3.5). Der Zeitraum ( $< 10$ s) kann jedoch als richtig angenommen werden und wird auch durch die Reaktionszeit  $\tau_3$  bestätigt, die ausreichend Datenpunkte zur Auswertung besitzt und dieselbe Tendenz zeigt.

Die Reaktionszeit  $\tau_2$  wird mit zunehmender Reaktantenkonzentration kürzer (Abb. 3.5 A). Die Reaktanten-Konzentration 1 gibt dabei die Standardkonzentration (Kap. 2.2.9) auf der Abszisse an. Die langsamere Reaktionszeit ( $\tau_3$ ) verkürzte sich im Verhältnis zu  $\tau_2$  stärker (Abb. 3.5 B). Dies Verhalten spiegelte sich auch in einer Zunahme des Quotienten  $\tau_2/\tau_3$  von 0,15 auf 0,21 wider. Der Quotient aus  $A_2$  und  $A_3$  nahm mit steigender Reaktanten-Konzentration um den Faktor 5 ab (Abb. 3.5 D, E). Bei Standardbedingungen war der Anteil beider Amplituden an der Gesamtamplitude gleich. Bei der maximal eingesetzten Konzentration hatte die Amplitude der ersten Reaktionszeit nur noch einen Anteil von 25%. Die

apparente Ausbeute der Rekonstitution lag um 25% und zeigte eine geringe Änderung über den beobachteten Reaktantenbereich (Abb. 3.5 C).

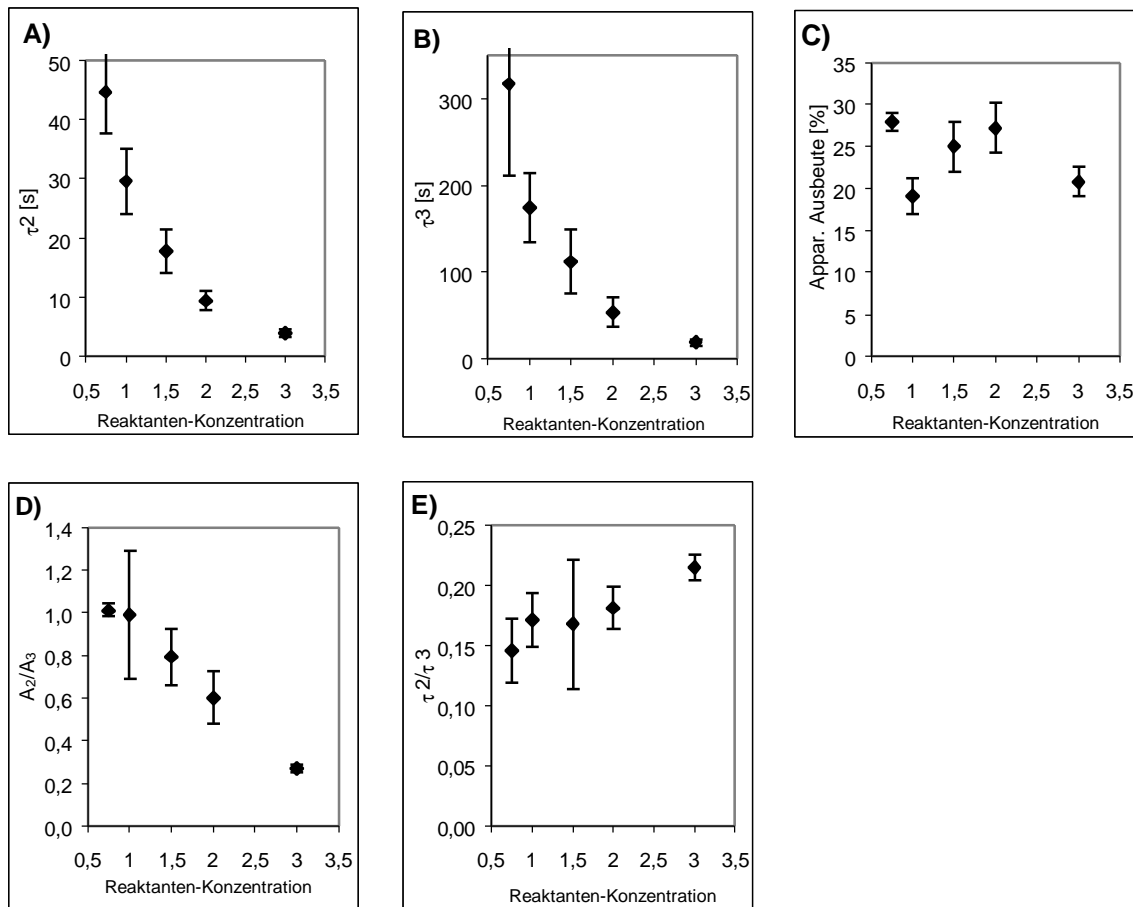


Abb. 3.5 Abhängigkeit von A)  $\tau_2$  und B)  $\tau_3$  der Rekonstitution des LHCII von der Reaktanten-Konzentration. C) Abhängigkeit der apparenten Ausbeute, bezogen auf die Chl $b$ -Emission (Kap. 2.2.18.1), von der Reaktanten-Konzentration. D) Einfluß der Reaktanten-Konzentration auf das Verhältnis der Amplituden der beiden Reaktionszeiten. E) Einfluß der Reaktanten-Konzentration auf das Verhältnis der beiden Reaktionszeiten. Reaktanten-Konzentration 1 gemäß Standard-Konzentrationen (Kap. 2.2.9).

### 3.4 Pigmentvariation

Pigmente induzieren die Rekonstitution des LHCII und stabilisieren diesen (PAULSEN ET AL., 1993). In den folgenden Experimenten sollte der Einfluß einzelner Pigmente auf den zeitlichen Ablauf der Faltung und die Stabilität des Komplexes untersucht werden. Dabei wurde in einer Versuchsreihe das Hauptaugenmerk auf die Chl-Menge und das Chl $a/b$ -Verhältnis gelegt. In einem weiteren Ansatz wurde der Einfluß der Xanthophyll-Menge und einzelner Xanthophylle untersucht. Die Versuche wurden mit der „Rapid-Mixing“-Methode durchgeführt.

#### 3.4.1 Einfluß der Chl-Konzentration und des Chl $a/b$ -Verhältnisses auf die Rekonstitution des LHCII

Im LHCII werden in biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen 12-15 Chle gefunden. Dabei wird ein Chl  $a/b$ -Verhältnis von 1,0 bis 1,5 beschrieben (Kap. 1.2.1). In den folgenden Untersuchungen wurden 12 Chle im Komplex angenommen. In den Experimenten wird ein Vielfaches an Chl zugegeben, das für die Rekonstitution des gesamten Proteins



notwendig wäre (Überschuß). Die Standardkonzentration an Chl, 1,6-facher Überschuß, entspricht also der 1,6-fachen Menge Chl, die notwendig ist, um sämtliches pLhcb1 des Ansatzes mit 12 Pigmenten zu besetzen. Die Xanthophylle wurden in der Standard-Konzentration verwendet (Kap. 2.2.9).

Eine Rekonstitution war bis zu einem 1,1-fachen Überschuß der Chle pro pLhcb1 möglich. Der rekonstituierte LHCII wurde über eine schwach-denaturierende PAGE nachgewiesen (Abb. 3.3). Jedoch werden bei allen Versuchen weniger als 50% des Proteins im Komplex gebunden, dies zeigte die Abschätzung der freien Proteinbande des Gels (Abb. 3.3).

Bei Chl-Konzentrationen im Bereich der Standardpigmentmenge (1,6-facher Überschuß) war die Chl *a*-Signaländerung, im Gegensatz zu den Versuchen mit der manuellen Methode (Kap. 3.2 u. 3.3), auswertbar. Chl-Konzentrationen über einem zweifachen Überschuß pro pLhcb1, führten zu einem sehr hohen Hintergrundsignal. Ebenso war bei sehr niedrigen Chl-Konzentrationen die Signalamplitude der Chl<sub>a</sub>-Fluoreszenz sehr gering. Das Rauschen, d.h. die statistische Schwankung, des Signals stieg somit im Verhältnis zum eigentlichen Signal an und ließ eine zuverlässige Auswertung der Signalveränderungen nicht zu. Die Berechnung einer Kinetik war nicht mehr möglich, wenn das Rauschen 20% der Signaländerung übersteigt. Ein schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis trat ebenfalls bei extremen Chl<sub>a</sub>/*b*-Verhältnissen auf. Somit war nur bei wenigen Experimenten der Meßreihe eine Auswertung der Chl *a*-Fluoreszenz und somit ein Vergleich der Ergebnisse für Chl<sub>a</sub>, möglich. Im folgenden werden daher nur die Chl *b*-Emissionsänderungen verglichen.

#### Chl/Protein-Verhältnis

Abbildung 3.6 A, B) zeigen die Abnahme von  $\tau_2$  bzw.  $\tau_3$  mit zunehmender Chl-Konzentration. Im Standardansatz ( $\blacklozenge$  Chl *a/b* = 1) war bei der schnellen Reaktionszeit eine Verkürzung der Zeit von ca. 65%, bei der langsamen Reaktionszeit eine Verkürzung von knapp unter 60%, zu beobachten. Die Meßreihen zur Chl-Protein-Abhängigkeit wurden mit verschiedenen Chl-Verhältnissen durchgeführt und bestätigten die Verkürzung der Reaktionszeiten durch die Chl-Konzentrationserhöhung ( $\square$  Chl *a/b* = 0,3,  $\triangle$  Chl *a/b* = 2,  $\times$  Chl *a/b* = 4). Darüber hinaus zeigen diese Meßreihen, daß bei gleicher Gesamt-Chl-Konzentration,  $\tau_2$  und  $\tau_3$  mit hohem Chl<sub>a</sub>-Anteil kürzer kürzer sind als mit hohem Chl<sub>b</sub>-Anteil. Bemerkenswert ist, daß wenn die Chle nicht in annähernd gleicher Stöchiometrie vorlagen, wurden die Reaktionszeiten mit zunehmender Chl-Konzentration wieder leicht verlängert. Abb. 3.6 C) zeigt die apparente Ausbeute der Rekonstitution des LHCII, bezogen auf die Signaländerung von Chl<sub>b</sub>. Die apparente Ausbeute lag bei ca. 45%. Lediglich bei einem hohen Chl<sub>b</sub>-Anteil sowie bei den beiden Randpunkten in der Konzentrationsreihe wurden Werte um 30% ermittelt.

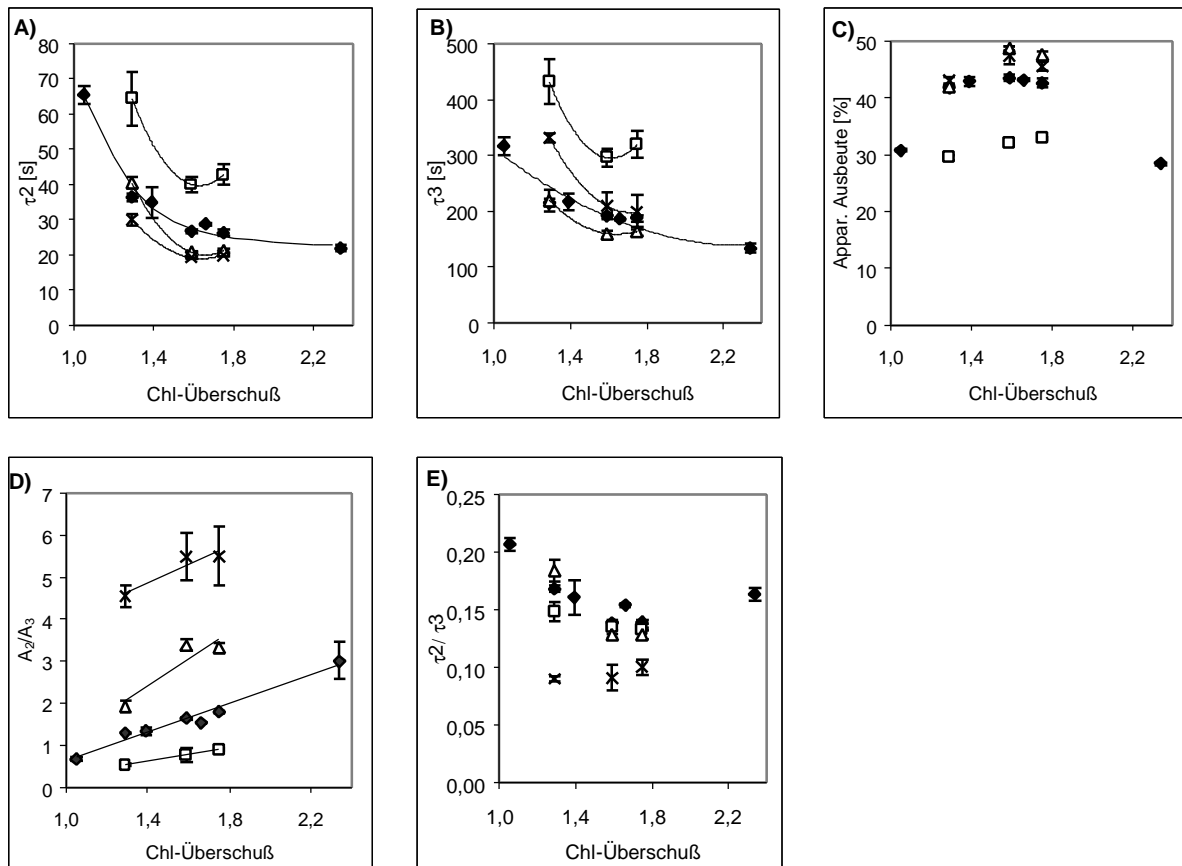


Abb. 3.6 Chl-Konzentrationsabhängigkeit von A)  $\tau_2$  und B)  $\tau_3$  bei verschiedenen Chl *a/b*-Verhältnissen. Datenreihe durch Regressionskurve verbunden. C) Chl-Konzentrationsabhängigkeit der apparenten Ausbeute des rekonstituierten LHCII bei verschiedenen Chl *a/b*-Verhältnissen. Apparente Ausbeute bezogen auf Chl*b*-Emissionsänderung (Kap. 2.2.18.1). D) Chl-Konzentrationsabhängigkeit des Quotienten aus den Amplituden von  $\tau_2$  und  $\tau_3$  bei verschiedenen Chl *a/b*-Verhältnissen. Datenreihe durch Regressionskurve verbunden. E) Chl-Konzentrationsabhängigkeit des Quotienten aus den Reaktionszeiten. Chl-Überschuß = Vielfaches der Menge an Chl, die zur Rekonstitution des gesamten pLhcb1 benötigt werden (12 Chl*e*/pLhcb1 angenommen).

◆ Chl *a/b* = 1; □ Chl *a/b* = 0,3; △ Chl *a/b* = 2; × Chl *a/b* = 4.

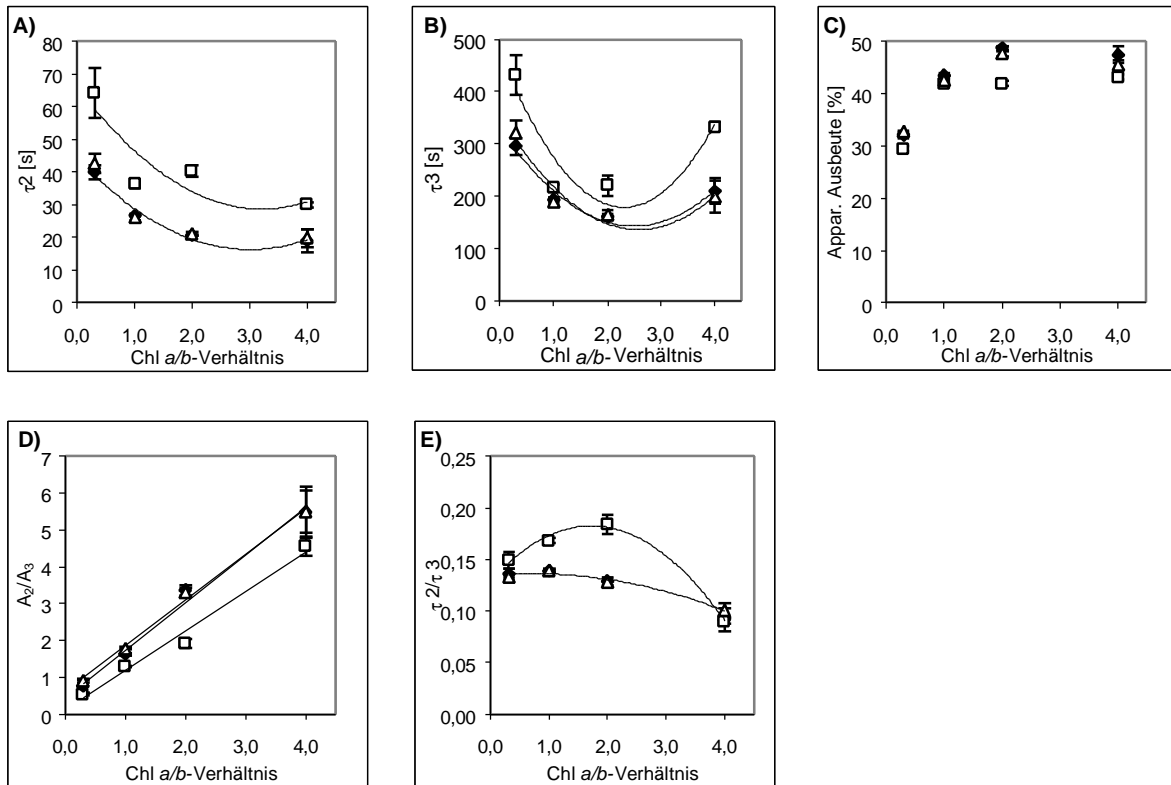
Der Quotient aus den Amplituden der beiden Reaktionszeiten stieg mit zunehmender Chl-Konzentration an (Abb. 3.6 D). Dabei wurde  $A_2/A_3$  mit zunehmendem Chl*a*-Anteil größer. Bei hohem Chl*b*-Anteil lag der Quotient durchgehend unter 1, die langsamere Reaktionszeit hatte somit einen höheren Anteil an der Rekonstitution. Bei einem hohen Chl*a*-Anteil zeigte sich das gegenteilige Bild. Die Amplitude der Reaktionszeit 2 hatte einen fünffach höheren Anteil an der Gesamtreaktion als Ansätze mit ausgeglichenem Chl-Verhältnis. Für das Verhältnis der beiden Reaktionszeiten war nur eine geringe Variationsbreite feststellbar (Abb. 3.6 E). Die Quotienten lagen um 0,15. Eine Ausnahme bildete die Meßreihe mit hohem Chl *a*-Gehalt. Dort war durchgängig ein Wert unter 0,1 zu beobachten.

### Chl *a/b*-Verhältnis

Eine andere Form der Darstellung der Daten aus Abb. 3.6 verdeutlicht den Einfluß des Chl *a/b*-Verhältnisses auf die Rekonstitutionszeiten. Abb. 3.7 A,B) zeigen die Abhängigkeit der beiden Reaktionszeiten vom Chl *a/b*-Verhältnis. Dabei wurden weiterhin drei verschiedene Chl-Konzentrationen dargestellt (◆ = Standard-Konzentration (Chl-Überschuß = 1,6); □ Chl-Überschuß = 1,3; △ Chl-Überschuß = 1,75). Bei allen eingesetzten Chl-Konzentrationen war eine kontinuierliche Abnahme von  $\tau_2$  mit zunehmendem Chl*b*-Anteil zu erkennen. Die Abnahme lag bei ca. 50%.  $\tau_3$  zeigte eine andere Tendenz als Reaktionszeit

$\tau_2$ ,  $\tau_3$  tendierte zu einem Optimum bei annähernd ausgeglichenem Chl *a/b*-Verhältnis. Am deutlichsten war dieser Trend bei einer niedrigen Chl-Konzentration ( $\square$ ). Hier nahm  $\tau_3$  wieder um 50% zu (von Chl *a/b* = 1 oder 2 auf Chl *a/b* = 4). Bei höheren Chl-Konzentrationen verlängerte sich die Reaktionszeit  $\tau_3$  maximal um 20%. Abb. 3.7 C) zeigt die apparente Ausbeute an rekonstituiertem LHCII von ca. 45%. Lediglich bei hohem Chl *b*-Anteil lag die apparente Ausbeute bei allen drei eingesetzten Konzentrationen knapp über 30%.

Abb. 3.7 Abhängigkeit von A)  $\tau_2$  und B)  $\tau_3$  vom Chl *a/b*-Verhältnis bei verschiedenen Chl-Konzentrationen.



Datenreihe durch Regressionskurve verbunden. C) Abhängigkeit der apparenten Ausbeute des rekonstituierten LHCII vom Chl *a/b*-Verhältnis bei unterschiedlichen Chl-Konzentrationen. Apparente Ausbeute bezogen auf Chl *b*-Emissionsänderung (Kap. 2.2.18.1). D) Zunahme der Amplitudenquotienten der Reaktionszeiten in Abhängigkeit vom Chl *a/b*-Verhältnis bei verschiedenen Chl-Konzentrationen. E) Abhängigkeit der Quotienten der Reaktionszeiten vom Chl *a/b*-Verhältnis bei verschiedenen Chl-Konzentrationen. Datenreihe durch Regressionskurve verbunden. Chl-Überschuß = Vielfaches der Menge an Chl, die zur Rekonstitution des gesamten pLhcb1 benötigt werden (12 Chl/pLhcb1 angenommen).  $\blacklozenge$  = Standard-Konzentration (Chl-Überschuß = 1,6);  $\square$  Chl-Überschuß = 1,3;  $\blacktriangle$  Chl-Überschuß = 1,75.

Der Quotient der Amplituden der beiden Reaktionszeiten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  vergrößerte sich mit zunehmendem Chl *a*-Anteil bis zum maximal sechsfachen Wert (Abb. 3.7 D). Der Anteil der ersten Reaktionszeit an der Gesamtsignaländerung war bei hohem Chl *a*-Anteil ca. 85%. Dabei hatten die Quotienten des Datensatzes mit der geringsten Chl-Konzentration durchgängig einen niedrigeren Wert als die Meßreihen mit höherem Chl-Überschuß. Der Quotient der Reaktionszeiten fiel bei höherem Chl *a/b*-Verhältnis auf einen Wert unter 0,1 ab, was konsistent mit der Beobachtung der längeren Reaktionszeit 3 mit abnehmenden Chl *b*-Anteil ist (Abb. 3.7 E; s. auch Abb. 3.7 A,B). Bei der niedrigsten Chl-Konzentration war ein Optimum bei einem Chl *a/b*-Verhältnis von 2 zu erkennen.

### 3.4.1.1 Einfluß der Chl-Konzentration und des Chl*a/b*-Verhältnisses bei der Rekonstitution auf die thermische Stabilität des LHCII

Der LHCII kann durch Detergens-Zugabe oder durch Temperaturerhöhung destabilisiert werden. Der Energietransfer von Chl *b* zu Chl *a* bricht dabei zusammen. Dieser Zusammenbruch kann anhand der Abnahme der Chl*a*-Fluoreszenz und der Zunahme der Chl*b*-Fluoreszenz beobachtet werden. Die Dissoziationsraten lassen einen Rückschluß auf die Stabilität des Pigment-Protein-Komplexes zu.

Die Dissoziation des LHCII wurde durch einen Temperatursprung von RT auf 47°C induziert, um seine thermische Stabilität zu bestimmen. Der Temperatursprung führt zunächst zu einer Abnahme der Fluoreszenz beider Chle mit einer Dauer von ca. 30s, die unabhängig von der Anwesenheit des Proteins ist (nicht dargestellt). Diese artifizielle Abnahme der Chl*a*-Fluoreszenz zu Beginn des Versuchs überlagerte die Abnahme der Chl*a*-Fluoreszenz, die durch das Zusammenbrechen des Energietransfers hervorgerufen wurde. Eine Auswertung war deshalb für die Chl *a*-Signaländerung nicht möglich. Die Chl *b*-Fluoreszenzänderung lies sich auswerten, da das Zusammenbrechen des Energietransfers in einer positiven Signaländerung der Chl*b*-Fluoreszenz resultierte und sich damit im Vorzeichen von der artifiziellen Signaländerung durch den Temperatursprung unterschied. Durch den Vorzeichenwechsel konnten beide Signale getrennt und somit die Reaktionszeiten berechnet werden. Die Anpassung der Signaländerung der Dissoziation ergab im Gegensatz zu der biexponentiellen Rekonstitutionskinetik eine annähernd monoexponentielle Kinetik.

Da diese Messungen im Anschluß an die Reihenmessungen zur Rekonstitution in der „Rapid-Mixing“-Apparatur erfolgt sind, wurden nur Stichproben zu den jeweiligen Experimenten erhoben. Die Stabilität des LHCII war nicht von der Chl-Konzentration abhängig. Lediglich bei sehr niedrigen Konzentrationen an Chl war eine um 10% schwächere Stabilität im Vergleich zu den anderen Chl-Konzentrationen vorhanden (nicht dargestellt).

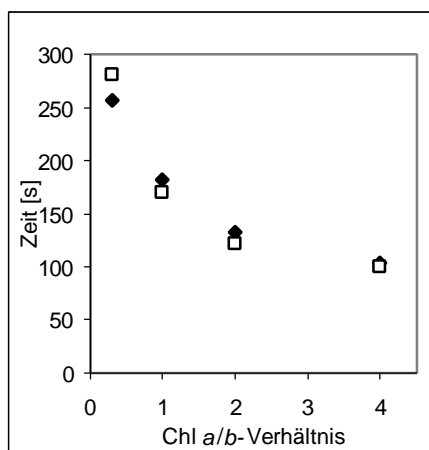


Abb. 3.8 Dissoziationszeit des LHCII bei einem Temperatursprung auf 47 °C bei verschiedenen Chl *a/b*-Verhältnissen, basierend auf Chl *b*-Emissionszunahme. Einzelmessungen, abgesichert durch Wiederholung mit weiterer Chl-Konzentration.

◆ = Standard-Konzentration von Chl *a* und *b*  
□ = 1,5fache Standard-Konzentration

Die unterschiedlichen Chl *a/b*-Verhältnisse hatten einen deutlichen Einfluß auf die thermische Stabilität des LHCII. Abb. 3.8 zeigt die erhöhte Stabilität des LHCII mit zunehmendem Chl *b*-Anteil der in der Rekonstitution angebotenen Chl. Die Stabilität des Komplexes mit dem höchsten Chl*a*-Anteil nimmt um den Faktor 3 gegenüber der Stabilität mit dem höchsten Chl *b*-Anteil ab.

Die geringere Stabilität des LHCII bei einem hohen Chl *a/b*-Verhältnis in der Rekonstitutionslösung ließ sich auch über die Auftrennung der rekonstituierten Komplexe mittels schwach-denaturierender PAGE bestätigen. Die grüne Komplexbande wurde mit steigendem

Chl *a/b*-Verhältnis bei identischer Gesamt-Chl-Konzentration schwächer (Vgl. Abb. 3.3 A, Meßreihe mit 1,75-fachen Überschuß an Chl). Ebenso verschob sich das Verhältnis von freiem zu komplexiertem Protein zugunsten des freien Lhcb1 (Abb. 3.3 B).

### 3.4.1.2 Einfluß der Chl-Konzentration und des Chl*a/b*-Verhältnisses der Rekonstitution auf die Reassoziaton des LHCII nach thermischer Dissoziation

Nach thermischen Zerfall des LHCII war eine Reassoziaton der Komplexe durch Temperatursenkung auf 24 °C möglich. Es war lediglich eine qualitative Auswertung der Kinetiken durchführbar, da durch die langsame und unterschiedlich schnelle Temperatursenkung (Wasserbad mit großem Volumen) kein definierter Startpunkt für die jeweilige Messung gegeben war. Die Temperatursenkung auf 24 °C dauerte durchschnittlich 800 s und ließ eine Gleichgewichtseinstellung in den verbliebenen 600 s der Meßperiode zu (Abb. 3.9 A).

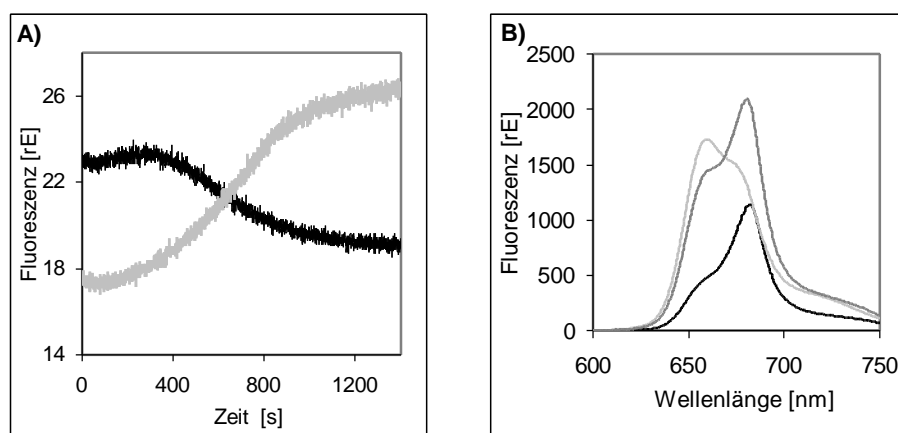


Abb. 3.9 A). Typische Änderung der Chl-Fluoreszenz durch Abkühlen von 47°C auf 24 °C (nach ca. 800 s erreicht). Abnahme der Chl *b*-Fluoreszenz (schwarz) und Zunahme der Chl *a*-Fluoreszenz (grau). B) Emissionsspektren nach Rekonstitution (24 °C, pigmentinduziert/schwarz), Dissoziation (47 °C/hellgrau) sowie Reassoziaton (24 °C/dunkelgrau). Chl-Konzentration: Standard; Chl*a/b*-Verhältnis 4. Die Zunahme der Gesamt-Fluoreszenz des Reassoziatonsspektrums ist auf den thermischen Streß der Pigmente, den Defekten und damit verbundenden geringeren Reabsorption der Fluoreszenz zurückzuführen.

Die thermische Dissoziation mit anschließender Reassoziaton läßt nicht wieder eine Komplexbildung im selben Ausmaß wie bei der pigmentinduzierten Rekonstitution zu (Abb. 3.9 B). Die schwächere Komplexbildung der Reassoziaton im Vergleich zur Rekonstitution, war am gestiegenen Verhältnis der Chl *b* (660 nm) zu Chl *a* (680 nm) Emission zu erkennen. Dabei reassozierten die Ansätze mit einem hohen Chl-Überschuß besser als die mit einem niedrigen. Die stärkere Signaländerung war ebenfalls bei Experimenten mit hohem Chl*a/b*-Verhältnis zu beobachten. Abb. 3.9 B) zeigt ebenfalls eine Zunahme der Gesamtfluoreszenz im Gleichgewichtsspektrum, von Rekonstitution über Dissoziation bis hin zur Reassoziaton. Die deutlich niedrigere Gesamtfluoreszenz der Rekonstitution ist auf den thermischen Streß der Pigmente mit der Folge von Defekten zurückzuführen. Die defekten Pigmente reabsorbieren nicht mehr die emittierte Fluoreszenz und eine höhere Gesamt-Fluoreszenz der verbliebenen intakten Pigmente ist die Folge. Die Pigmente waren für ca. 800 s einer Temperatur von 47 °C ausgesetzt, die Temperaturniedrigung auf RT benötigte ebenfalls noch weitere 800 s. Diese lange Dauer des thermischen Streßes erklärt auch, daß insgesamt nur bis zu fünf Reassoziationszyklen möglich waren. Darüber hinaus war keine Reassoziaton mehr erkennbar.

### 3.4.2 Einfluß der Xanthophyll-Konzentration<sup>\*</sup>

Durch biochemische Untersuchungen wurden zwei bis vier Xanthophylle für den nativen monomeren LHCII ermittelt (Kap. 1.2.1). Für die Rekonstitution des LHCII ist die Anwesenheit von Xanthophyllen notwendig. In diesem Abschnitt der Arbeit wurde der Einfluß der Gesamt-Xanthophyll-Konzentration und einzelner Xanthophylle untersucht. Bei den Einzelpigmentversuchen wurde der eingesetzte Xanthophyll-Überschuß beibehalten. Die Versuche wurden mit der manuellen Methode durchgeführt (Kap. 2.2.9).

#### 3.4.2.1 Einfluß der Gesamt-Xanthophyll-Konzentration auf die Rekonstitution des LHCII

Bei diesen Versuchen wurde ein Gesamt-Xanthophyll-Extrakt eingesetzt (Kap. 2.2.3.1). Die typische Zusammensetzung der Pigmente war ~57% Lutein, ~19% Violaxanthin, ~19% Neoxanthin und ~2%  $\beta$ -Carotin. Es konnten nur die Fluoreszenzänderungen von Chl *b* ausgewertet werden. Die Chl *a*-Emission stieg zwar an und bildete somit den sich etablierenden Energietransfer ab, jedoch, wie auch bei Kap. 3.3, war die Mischzeit durch die manuelle Methode zu lang. Da das Signal/Rausch-Verhältnis ebenfalls zu schlecht war, konnte keine Berechnung der kinetischen Parameter durchgeführt werden. Es wurden drei Xanthophylle pro pLhcb1 angenommen. Die eingesetzte Pigmentmenge wurde, analog zu den Versuchen der Chl-Meßreihe (Kap. 3.4.1), als vielfacher Überschuß für die Besetzung der drei angenommenen Xanthophyllbindungsstellen des pLhcb1 bezeichnet. Der einfache Überschuß besetzt alle Lhcb1-Apoproteine mit drei Xanthophyllen. Eine Rekonstitution war bis unter den einfachen Xanthophyll-Überschuß möglich und konnte auch mittels schwach-densitrierender PAGE nachgewiesen werden (OTTMANN, 1999).

Mit zunehmender Xanthophyll-Konzentration verkürzte sich  $\tau_2$  von 85 s auf 32 s (Abb. 3.10 A). Dabei wurde eine Sättigung ab einem Xanthophyll-Überschuß von 4, welcher der Standardkonzentration entspricht, erreicht. Ähnlich verhielt sich die Reaktionszeit  $\tau_3$ , bei der ab demselben Xanthophyll-Überschuß wie bei  $\tau_2$  keine Verkürzung mehr möglich war (Abb. 3.10 A,B). Die apparente Ausbeute der Rekonstitution, bezogen auf die Chl *b*-Emission, erreichte Werte um 20%. Jedoch war bei einem Xanthophyll-Unterschuß eine bis zu 15% geringere apparente Ausbeute vorhanden (Abb. 3.10 C).

Der Quotient aus den Amplituden beider Reaktionszeiten stieg bis zu einem Überschuß von acht Xanthophyllen pro pLhcb1 an und war unterhalb der Standardkonzentration deutlich unter einem Wert von eins (Abb. 3.10 D). Bei geringen Xanthophyll-Konzentrationen hat die langsamere Reaktionszeit einen ca. doppelt so hohen Anteil an der Gesamtreaktion. Der Quotient der Reaktionszeiten variierte aufgrund der Konzentrationsänderungen nicht und lag bei 0,17 (Abb. 3.10 E).

---

<sup>\*</sup>Die Versuche wurden von Katja Ottmann im Rahmen ihrer von mir mitbetreuten Diplomarbeit durchgeführt

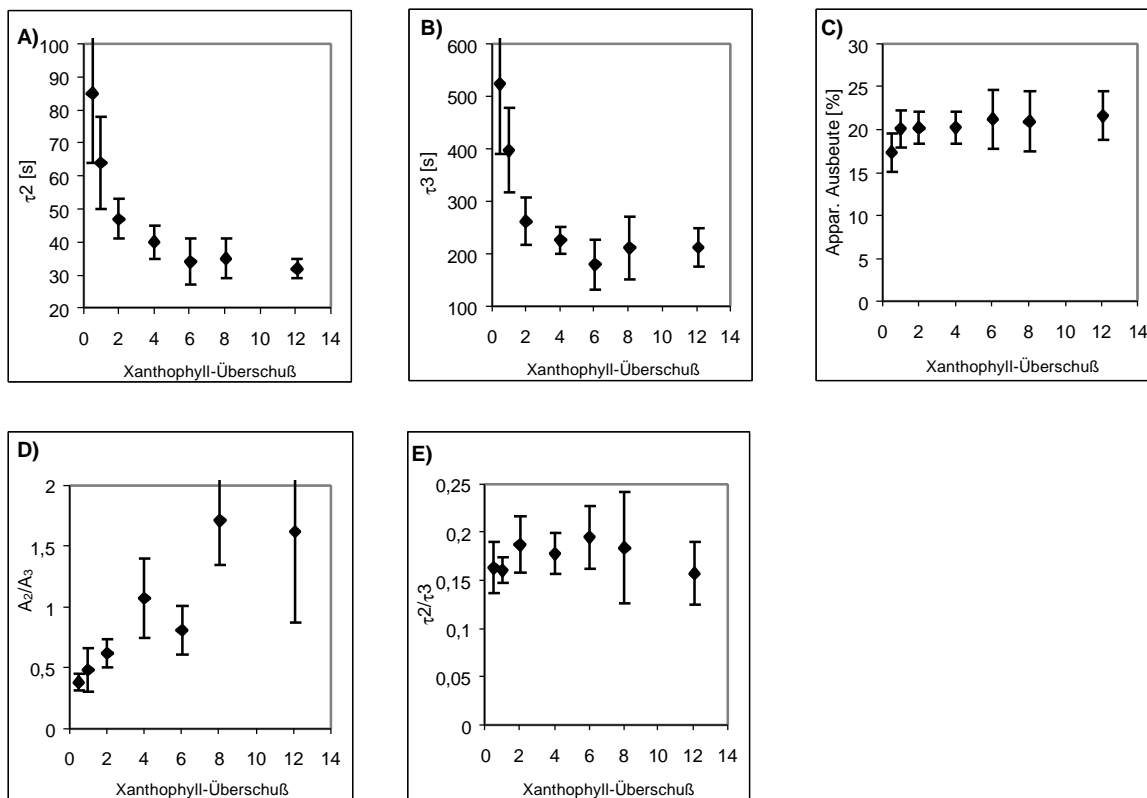


Abb. 3.10 Abhängigkeit von A)  $\tau_2$  und B)  $\tau_3$  der Rekonstitution des LHCII von der Gesamt-Xanthophyll-Konzentration. C) Abhängigkeit der apparenten Ausbeute der Rekonstitution von der Gesamt-Xanthophyll-Konzentration. Apparente Ausbeute bezogen auf Chl*b*-Emissionsänderung (Kap. 2.2.18.1). D) Abhängigkeit des Quotienten aus den  $\tau_2$  und  $\tau_3$  der Rekonstitution von der Gesamt-Xanthophyll-Konzentration. E) Einfluß der Gesamt-Xanthophyll-Konzentration auf den Quotienten der Reaktionszeiten. Xanthophyll-Überschuß ist ein Vielfaches der notwendigen Menge, um sämtliches pLhcb1 mit jeweils drei Xanthophyllen zu besetzen. Chl und Protein nach Standard (Kap. 2.2.9)

### 3.4.2.2 Einfluß der Lutein-Konzentration auf die Rekonstitution des LHCII

Lutein findet sich als häufigstes Xanthophyll bei der Extraktion aus Thylakoiden. Lutein wird ebenfalls als das Xanthophyll angesehen, das die Position der beiden zentralen Xanthophylle einnimmt (KÜHLBRANDT ET AL, 1994). Der folgende Abschnitt beschreibt vergleichend die Unterschiede der zeitaufgelösten Rekonstitution des LHCII zwischen Komplexen, deren Rückfaltung durch Gesamt-Xanthophylle und Chl*e* oder nur durch Lutein und Chl*e* induziert wurde.

Die Reaktionszeit 2 war mit Lutein bis zur Standard-Konzentration um bis zu 30s kürzer als  $\tau_2$  der Gesamt-Xanthophyll-Rekonstitution (Abb. 3.11 A). Ab der Standardkonzentration waren die schnellen Reaktionszeiten der Lutein-Reihe leicht verlängert im Vergleich zur Gesamt-Xanthophyll-Reihe. Sie befanden sich aber ebenfalls in einer Sättigung. Bei einem Xanthophyll-Überschuß von 12 war die Reaktionszeit der Gesamt-Xanthophyll-Konzentration um ca. 10 s gegenüber dem Lutein-Ansatz verkürzt. Dieses Ergebnis wurde durch mehrere Meßreihen bestätigt. Die Reaktionszeit 3 zeigte ein ähnliches Bild (Abb. 3.11 B). Hier war die Lutein-Versuchsreihe bei niedrigen Konzentrationen bis 30% kürzer. Bei der höchsten Xanthophyll-Konzentration verlängerte sich die  $\tau_3$  der Lutein-Reihe um 25%. Jedoch waren die Meßwerte der Lutein-Reihe nicht außerhalb der Standardabweichung der Gesamt-Xanthophylle. Die apparente Ausbeute bei der Lutein-Rekonstitution war wie bei den Gesamt-Xanthophyll-Experimenten konstant. Die Lutein-Meßreihe erreichte mit ca. 25% eine

etwas geringfügig höhere apparente Ausbeute als die Gesamt-Xanthophyll-Konzentrationsreihe mit 20% (nicht dargestellt).

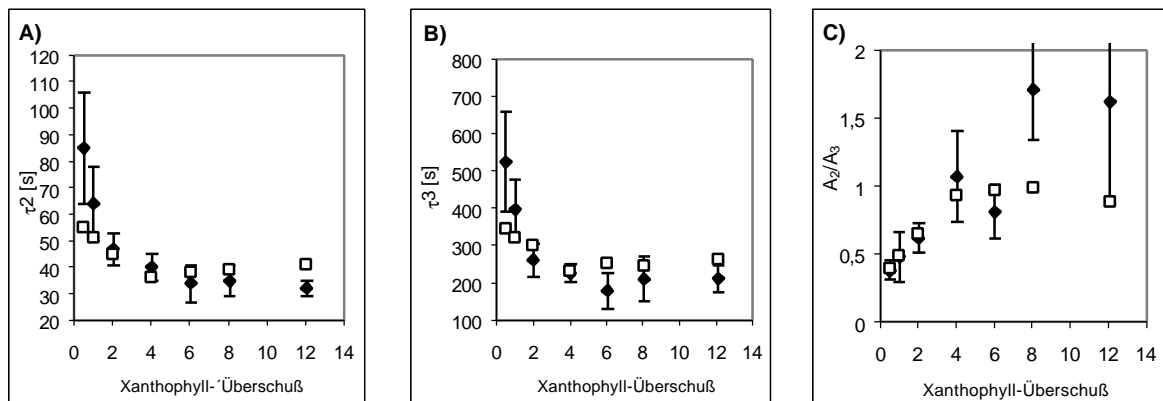


Abb. 3.11 Abhängigkeit von  $\tau_2$  A) und B)  $\tau_3$  der Rekonstitution des LHCII von der Gesamt-Xanthophyll- bzw. Lutein-Konzentration. C) Konzentrationsabhängigkeit des Quotienten der beiden Reaktionszeiten der Rekonstitution des LHCII. Xanthophyll-Überschuß ist ein Vielfaches der notwendigen Menge, um sämtliches pLhcb1 mit jeweils drei Xanthophyllen zu besetzen. Chl und Protein nach Standard (Kap. 2.2.9). ♦ = Gesamt-Xanthophyll; □ = Lutein. Standardabweichung der Lutein-Meßreihe im selben Bereich wie die der Gesamt-Xanthophyll-Variation.

Der Quotient der Amplituden aus beiden Reaktionszeiten war bis zur Standard-Xanthophyll-Konzentration für beide Xanthophyll-Variationen gleich (Abb. 3.11 C). Die Lutein-Meßreihe ging jedoch nicht über einen Wert von 1 hinaus. Die schnellere Reaktion konnte nicht wie bei der Gesamt-Xanthophyll Variation ein Übergewicht erreichen. Der Quotient aus den Reaktionszeiten war bei den Lutein-Experimenten ebenso konstant und lag im selben Bereich, wie der Quotient aus der Xanthophyll-Vergleichsreihe (nicht dargestellt).

### 3.4.2.3 Einfluß der Violaxanthin-Konzentration auf die Rekonstitution des LHCII

Violaxanthin liegt in substöchiometrischer Konzentration im LHCII vor. Dieses Xanthophyll ist zwingend erforderlich bei der Trimerisierung des LHCII und wird vermutlich peripher gebunden (NUßBERGER ET AL., 1993). Der Einfluß von Violaxanthin auf die Rekonstitutionskinetik wird im folgenden mit den Einflüssen der Gesamt-Xanthophyllen verglichen.

Reaktionszeit 2 der Violaxanthin-Meßreihe unterschied sich deutlich von der Referenz-Meßreihe mit Gesamt-Xanthophyllen (Abb. 3.12 A). Die Reaktionszeiten lagen bis auf die der niedrigsten Konzentration konstant bei ca. 75 s. Lediglich bei dem Versuch mit einem stöchiometrischen Unterschuß an Pigmenten, trat eine verlängerte Reaktionszeit von 88 s auf. Die Reaktionszeiten der Violaxanthin-Meßreihe waren ebenfalls bis auf die beiden niedrigsten Konzentrationen um mindestens 20s verlängert im Vergleich zur Gesamt-Xanthophyll Versuchsreihe. Eine ähnliche Charakteristik zeigte sich bei den langsameren Reaktionszeiten (Abb. 3.12 B). Dabei waren die Rekonstitutionen, die ausschließlich mit Violaxanthin als Xanthophyll induziert wurden, stets langsamer als die der Gesamt-Xanthophyll-Reihe und lagen bei mindestens 430 s. Die apparente Ausbeute war konstant und lag mit 25% leicht über der der Gesamt-Xanthophyll Variation (nicht dargestellt).



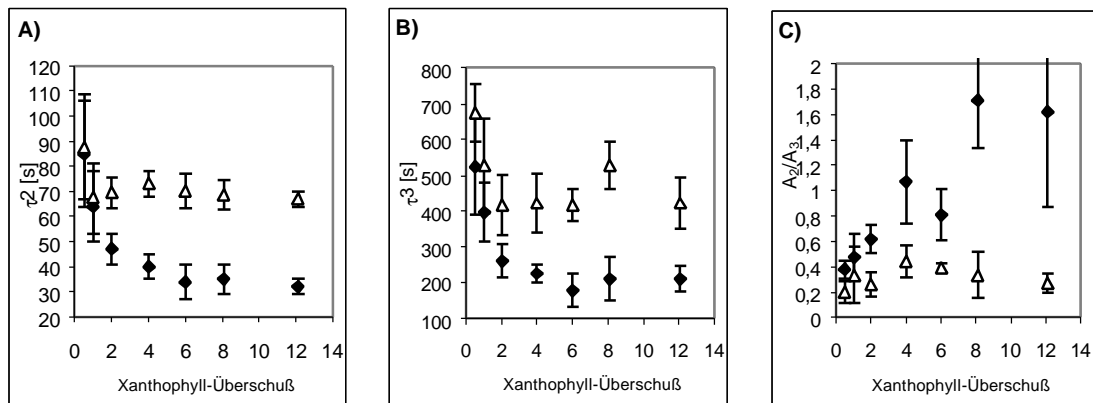


Abb. 3.12 Abhängigkeit von A)  $\tau_2$  und B)  $\tau_3$  der Rekonstitution des LHCII von der Gesamt-Xanthophyll- bzw. Violaxanthin-Konzentration. C) Konzentrationsabhängigkeit des Quotienten der Reaktionszeiten der Rekonstitution. Xanthophyll-Überschuß ist ein Vielfaches der notwendigen Menge, um sämtliches pLhcb1 mit jeweils drei Xanthophyllen zu besetzen. Chl und Protein nach Standard (Kap. 2.2.9). ♦ = Gesamt-Xanthophyll; Δ = Violaxanthin.

Der Quotient aus beiden Amplituden der Reaktionszeiten lag bei der Bildung von Violaxanthin-Komplexen durchgehend unter den für der Gesamt-Xanthophyll-Komplexen ermittelten. Dabei war die Amplitude von  $\tau_3$  mindestens um den Faktor 2 stärker an der Gesamtsignaländerung beteiligt (Abb. 3.12 C). Der Quotient aus den Reaktionszeiten änderte sich über den untersuchten Konzentrationsbereich nicht und lag mit ca. 0,16 geringfügig unter dem Quotienten der Gesamt-Xanthophyll Variation (nicht dargestellt).

#### 3.4.2.4 Einfluß der Zeaxanthin-Konzentration auf die Rekonstitution des LHCII

Zeaxanthin ist strukturell mit Lutein verwandt. Es unterscheidet sich in der Lage einer Doppelbindung und der sterischen Anordnung einer Hydroxygruppe am Jononring (Abb. 1.4). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Anzuchtbedingungen für Erbsen, wird das Xanthophyll nicht als typischer Bestandteil der extrahierten Xanthophylle gefunden. Zeaxanthin kann jedoch mit einer etwas geringeren Affinität als Lutein zur Rekonstitution des LHCII eingesetzt werden (OTTMANN, 1999; HOBE ET AL., 2000). Die zeitaufgelöste Rekonstitution mit Zeaxanthin soll im folgenden mit der Rekonstitution mit Gesamt-Xanthophyllen verglichen werden.

Bei niedrigen Konzentrationen war die Reaktionszeit 2 der Zeaxanthin-Variation kürzer als bei der Gesamt-Xanthophyll Meßreihe. Ab der Standard-Konzentration verlängerte sich diese Zeit im Vergleich zur Referenz-Meßreihe jedoch (Abb. 3.13 A). Bei der höchsten Xanthophyll-Konzentration war die Reaktionszeit 2 sogar 40% länger als bei den Gesamt-Xanthophyllen. Beim niedrigsten Zeaxanthin-Überschuß war  $\tau_2$  um ein Drittel verkürzt. Insgesamt zeigte die Zeaxanthin-Meßreihe bei der schnelleren Reaktionszeit keine ausgeprägte Tendenz. Die Zeiten lagen alle bei 52 s. Die langsamere Reaktionszeit zeigte einen Effekt. Bezogen auf die niedrigste Konzentration verkürzte sich  $\tau_3$  bei höheren Zeaxanthin-Konzentrationen um 20% (Abb. 3.13 B). Der Vergleich mit Gesamt-Xanthophyll ergab eine maximal 30% kürzere Reaktionszeit bei niedriger Pigmentkonzentration. Bei hohem Überschuß war  $\tau_3$  des Zeaxanthin-Ansatzes ein Viertel länger als beim Gesamt-Xanthophyll-Ansatz. Als apparente Ausbeute der Chl-Zeaxanthin-Komplexe wurden durchgängig Werte unter 20% ermittelt. Bei niedriger Xanthophyll-Konzentration fiel die apparente Ausbeute bis auf unter 15% (nicht dargestellt).

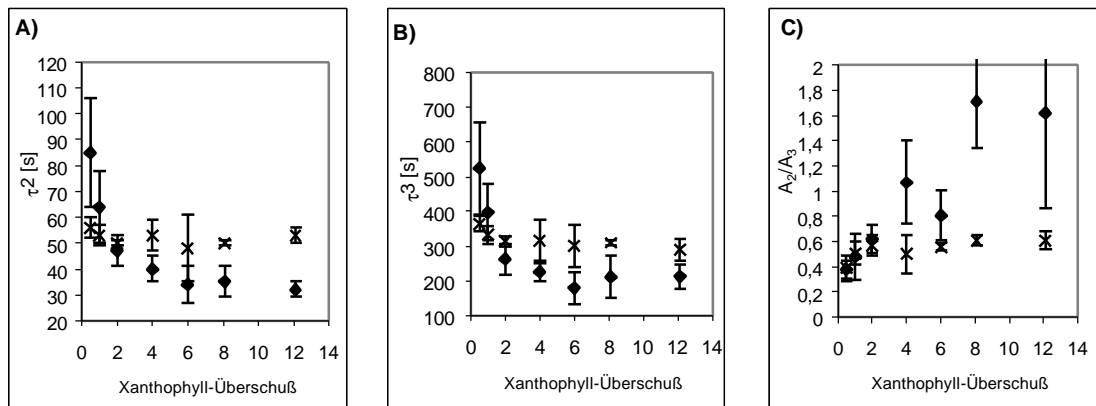


Abb. 3.13 Abhängigkeit von A)  $\tau_2$  und B)  $\tau_3$  der Rekonstitution des LHCII von der Gesamt-Xanthophyll- bzw. Zeaxanthin-Konzentration. C) Konzentrationsabhängigkeit des Quotienten der Reaktionszeiten der Rekonstitution. Xanthophyll-Überschuß ist ein Vielfaches der notwendigen Menge, um sämtliches pLhcb1 mit jeweils drei Xanthophyllen zu besetzen. Chl und Protein nach Standard (Kap. 2.2.9).  $\blacklozenge$  = Gesamt-Xanthophyll;  $\times$  = Zeaxanthin.

Der Quotient der Amplituden der Reaktionszeiten blieb konstant unter eins. Er lag bei 0,4 – 0,6 und variierte somit kaum (Abb. 3.13 C). Im Vergleich mit der Gesamt-Xanthophyll-Variation war der Quotient der Amplituden der Zeaxanthin-Rekonstitution nur bei den drei niedrigen Pigment-Überschüssen gleich. Der Quotient aus den Reaktionszeiten änderte sich kaum und lag um den Wert 0,15 und somit stets unter dem jeweiligen Wert der Gesamt-Xanthophyll (nicht dargestellt).

### 3.4.2.5 Einfluß der Neoxanthin-Konzentration auf die Rekonstitution des LHCII

Neoxanthin bindet an den LHCII und wird als das dritte Xanthophyll im Komplex angenommen (Kap. 1.2.2). Es wurde versucht den Einfluß des Neoxanthins auf die Rekonstitutionskinetik zu bestimmen. Die Amplitude des Signals war jedoch zu gering, um auswertbar zu sein. Auf schwach-denaturierender PAGE wurde ebenfalls nur eine schwache Komplexbande gefunden (OTTMANN, 1999).

In der Zusammenschau der Einzel-Xanthophyll-Versuche erschien Lutein als das Xanthophyll mit dem größten Einzeleffekt. Dies war besonders in der Verkürzung der Reaktionszeiten bei geringen Pigment-Konzentrationen zu beobachten. Die geringste Variation bei  $\tau_2$  und  $\tau_3$  zeigten Violaxanthin-Rekonstitutionen, welche bei beiden Reaktionszeiten eine geringe Bandbreite in der Zeitänderung zur Folge hatten. Zeaxanthin nahm eine Position zwischen Violaxanthin und Lutein ein. Die Variationsbreite war, verglichen mit der von Lutein, eingeschränkt. Jedoch waren die Reaktionszeiten der Zeaxanthin-Meßreihe durchgängig kürzer als die der Violaxanthin-Meßreihe.

## 3.5 Einfluß von Lipiden und Detergentien auf die Rekonstitution des LHCII

Lipide der Biomembranen haben nicht nur die Aufgabe als "Lösungsmittel" der membranständigen Proteinen zu dienen. (WEBB & GREEN, 1991; MOURITSEN, 1998; WILLIAMS, 1998). So ist z.B. PG zwingend notwendig, um eine Trimerisierung von LHCII zu ermöglichen (NUßBERGER ET AL., 1993; HOBE ET AL., 1994). DGDG ist essentiell für die Kristallisation des Komplexes und interagiert somit ebenfalls mit dem LHCII (NUßBERGER ET AL., 1993). Im folgenden wurde der Einfluß dieser Stoffklasse auf die zeitlich aufgelöste Rekonstitution von LHCII untersucht. Die Versuche wurden mit der manuellen Methode durchgeführt (Kap. 2.2.9).

Zuerst mußten die Reaktanten von Lipidverunreinigungen befreit werden. Dies war vor allem bei den Pigmenten notwendig und wurde wie bei Kap. 2.2.3.2 beschrieben durchgeführt. Die pLhcb1-Einschlußkörper wurden schon in vorhergehenden Untersuchungen als lipidfrei charakterisiert (H. PAULSEN, persönliche Mitteilung). Die DC in Abb. 3.14 zeigt, daß die Reinigung der Pigmente erfolgreich war und somit ein Effekt auf zugegebene Lipide zurückzuführen ist.

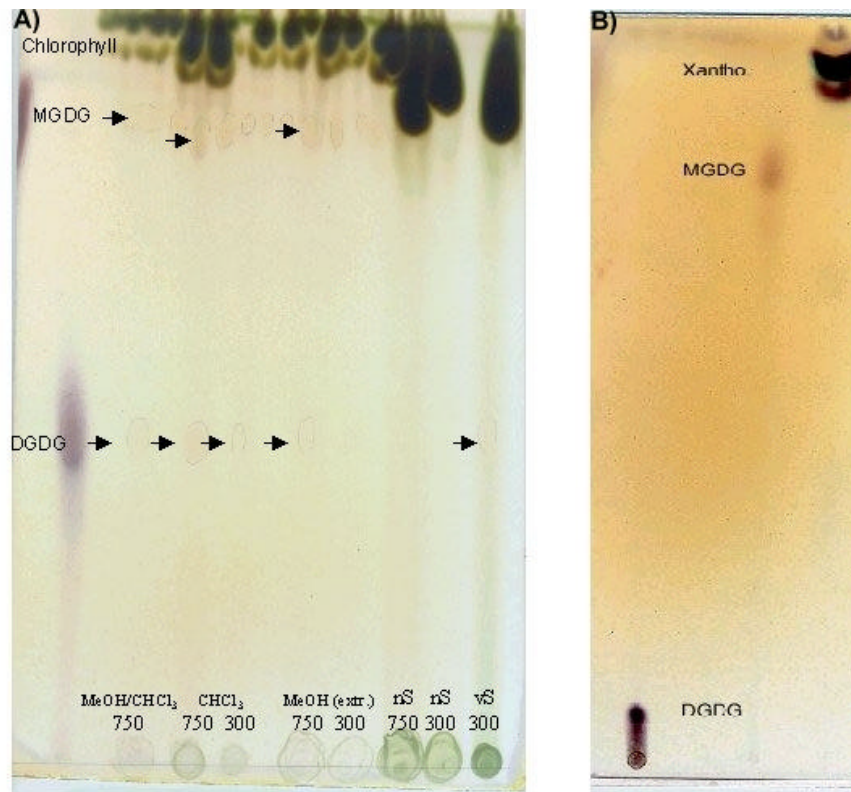


Abb. 3.14 A) DC zur Chl-Reinigung. Auftrag von links: Markerlipide DGDG und MGDG (jeweils 50 µg), Chl (Auftragsmenge in µg) mit verschiedenen Reinigungsversuchen I) Methanol (MeOH)/Chloroform (CHCl<sub>3</sub>), II) nur CHCl<sub>3</sub>, III) nur MeOH-Extraktion, IV) nach Kieselgelsäule (nS) und vor Kieselgelsäule (vS). Pfeile geben Nachweis mit Naphtol an. B) DC zur Xanthophyll-Reinigung. Auftrag von links. Markerlipide DGDG, MGDG und Xanthophyllen nach Kieselgelsäule. Laufmittel und Laufbedingungen: siehe Kap. 2.2.6.

### 3.5.1 Beschreibung des Systems hinsichtlich der Lipid-Detergens-Interaktion

Bestimmung der Kritischen Micellaren Konzentration (CMC).

Lipide und Detergentien interagieren miteinander. Zur Abschätzung der Konsequenzen dieser Interaktion hinsichtlich der Eigenschaften der Micellen und somit des eingesetzten Systems, wurde die CMC des Detergens und von Detergens-Lipid-Mischungen bestimmt.

Die Bestimmung der CMC für OG ergab mit 0,6% [w/v] einen leicht niedrigeren Wert als den in der Literatur angegebenen Wert von 0,7% [w/v] (HELENIUS ET AL., 1979). Die Bestimmung der CMC des Standardlipid-Detergens-Verhältnisses (0,04% PG / 1% OG [w/v]) ließ die CMC unverändert, jedoch war der Anstieg des Signals flacher als ohne Lipid. Bei fünffacher Konzentration von PG wurde dieser Trend fortgeführt (Abb. 3.15).

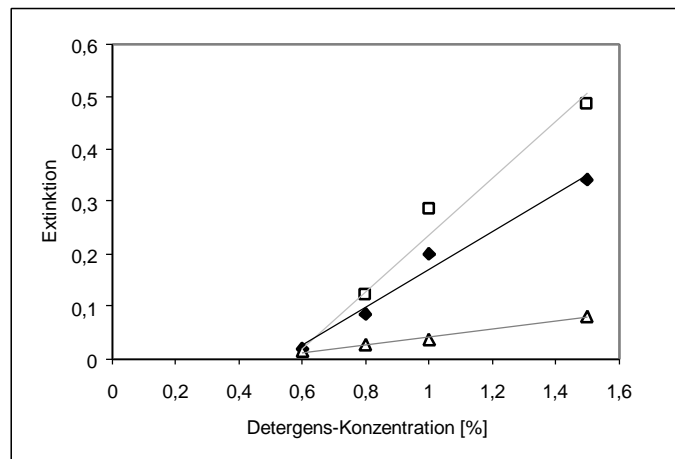


Abb. 3.15: Bestimmung der CMC von OG und OG-DPPG Mischmicellen. Elementares Jod in Detergens gelöst. Die Absorbanz wurde bei 360 nm gemessen (Kap. 2.2.8). Die Werte unterhalb der CMC liegen bei einer Extinktion von null und sind der Übersicht halber nicht aufgetragen.

□ = reines OG; ◆ = Standardansatz 4,1 PG-Moleküle pro OG-Micelle (bei angenommener CMC von 0,7% [w/v] und 84 Monomeren/Micelle), △ = 20 PG-Moleküle pro OG-Micelle (bei einem Literaturwert der CMC von 0,7% [w/v] OG und 84 Monomeren/Micelle).

Die theoretische Zusammensetzung der Micellen ergibt sich wie folgt:

Tabelle 3.2: Standardmengen und Konzentrationen der manuellen Methode (Kap. 2.2.9). Volumen 232 µL

	[µg]	Konzentration [µM]	Micellen [µM]
OG ( $M_r = 292,4$ )	2320	34190	122 <sup>1</sup>
DPPG ( $M_r = 745$ )	87	504	
Chlorophyll ( $M_r = \sim 900$ )	12	57,3	
Xanthophyll ( $M_r = \sim 570$ )	5	37,8	
pLhcb1 ( $M_r = 29,6 \text{ kDa}$ ) <sup>2</sup>	21 ± 2	3,1 ± 0,3	

<sup>1)</sup> CMC von OG bei 0,7% (Anteil der freien Moleküle) wird abgezogen, Aggregationszahl 84 Moleküle OG pro Micelle.

<sup>2)</sup> Schwankungen in der Proteinkonzentration durch schwankenden Lysozymanteil (Kap. 2.1.1).

Tabelle 3.3 zeigt die Reaktantenanzahl der Micelle im Standardansatz. Im Standardansatz lagen die Chle mit einem Überschuß von 1,6 pro pLhcb1, die Xanthophylle mit einem Überschuß von 4,1 pro pLhcb1 vor. Dabei wurden 12 Chle und 3 Xanthophylle pro pLhcb1 angenommen.

Tabelle 3.3: Theoretische Anzahl der Moleküle pro OG-Micelle im Standard-Rekonstitutionsansatz

	DPPG	Chl	Xanthophylle	pLhcb1
Moleküle pro Micelle	4,1	0,47	0,31	0,025

Bei der Variation der Lipidklassen wurde jeweils die gleiche Masse eingesetzt. Aufgrund der verschiedenen Molekulargewichte der Lipide wurden also leicht voneinander abweichende molare Konzentrationen eingesetzt, die jedoch nicht in einer Abweichung der Micellenzahl mündeten (Tab. 3.4. und 3.5).

Tabelle 3.4: Konzentration der verschiedenen Lipide bezogen auf die Standardmenge an Lipid

	[ $\mu\text{g}$ ]	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Micellen [ $\mu\text{M}$ ]
OG ( $M_r = 292,4$ )	2320	34190	122 <sup>1</sup>
DPPG ( $M_r = 745$ )	87	504	-
DOPG ( $M_r = 794$ )	87	474	-
MGDG ( $M_r = 740$ )	87	508	-
DGDG ( $M_r = 890$ )	87	422	-

<sup>1</sup> CMC von OG bei 0,7% (Anteil der freien Moleküle) wird abgezogen, Aggregationszahl 84 Moleküle pro Micelle

Die Konzentrationsänderung der Lipide schlägt sich in der theoretischen Anzahl der Lipidmoleküle pro Micelle nieder.

Tabelle 3.5: Theoretische Anzahl der Lipidmoleküle pro Micelle im Rekonstitutionansatz

Konz. Lipid [w/v] [%]	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,15	0,2
DPPG/Micelle	0	2,1	4,1	6,2	8,3	16,5	20,5
DOPG/Micelle:	0	n.B. <sup>1</sup>	3,9	5,8	7,8	15,6	19,5
MGDG/Micelle	0	n.B.	4,2	6,3	8,3	n.B.	n.B.
DGDG/Micelle	0	n.B.	3,5	5,2	6,9	n.B.	n.B.

<sup>1</sup>) n.B.: nicht bestimmt und eingesetzt.

MGDG und DGDG wurden, bedingt durch ihre aufwendige Isolation, nicht im selben Umfang eingesetzt wie die synthetischen Lipide, DPPG und DOPG.

### 3.5.2 Einfluß von DPPG und DOPG auf die Rekonstitution des LHCII

PG bindet selbst unter Einfluß von Detergentien stabil an den LHCII (NUßBERGER ET AL., 1993). Das Lipid hat vermutlich eine Bindungsstelle am N-Terminus des Proteins und wird zur Trimerisierung der LHCII-Monomere benötigt. Die folgenden Versuche sollten einen Effekt des Lipids auf die Rekonstitutionsdauer, bzw. Effizienz, untersuchen. DPPG und DOPG unterscheiden sich in ihren Fettsäure-Resten voneinander. Palmitinsäure (16:0) ist eine gesättigte Fettsäure mit 16 Kohlenstoffatomen im Grundgerüst. Oleinsäure (18:1) ist eine ungesättigte Fettsäure mit 18 Kohlenstoffatomen und der Doppelbindung in cis-Stellung am Kohlenstoffatom 9.

Aufgrund der Mischzeit von 6s bei der manuellen Methode und des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses war eine Auswertung des Chl a-Fluoreszenz-Anstiegs nicht möglich. Die Ergebnisse beziehen sich nur auf die Chl b-Emissionsabnahme, die durch die Energieübertragung von Chl b auf Chl a hervorgerufen wird.

Eine Rekonstitution war ohne Zugabe von Lipiden in einer reinen Detergens-Umgebung möglich und mit schwach-denaturierender PAGE nachweisbar (nicht dargestellt). Mit zunehmender PG-Konzentration verlängerten sich die Rekonstitutionszeiten des LHCII. Dabei zeigte sich bei DPPG und DOPG nach Konzentrationserhöhung eine ähnliche Charakteristik in den Effekten (Abb. 3.16). Die Reaktionszeit 2 verlängert sich von ca. 23 s (ohne Lipid) auf ca. 160 s bei einer PG-Konzentration von 0,2% [w/v].  $\tau_3$  vervielfacht sich beim Einsatz von 0,2% PG im Vergleich zu Rekonstitutionen ohne Lipid (Abb. 3.16 A,B). Bei hohen Lipid-Konzentrationen traten höhere Standardabweichungen bei den Reaktionszeiten auf. Mit zunehmender Lipid-Konzentration nahm die apparente Ausbeute an LHCII auf ca. 20% ab. Bei niedrigen DPPG-Konzentrationen konnte eine Tendenz zu einer höheren apparenten Ausbeute im Vergleich zu Experimenten ohne Lipid beobachtet werden. DOPG erreichte in Bezug auf die apparente Ausbeute nicht die Ansätze ohne Lipid oder Rekonstitutionen mit

DPPG (Abb. 3.16 C). Der Quotient aus den Amplituden der beiden Reaktionszeiten fiel mit erhöhter Lipid-Konzentration von über 1,6 bis auf 0,24. Der Anteil der langsameren Reaktion stieg somit von 40% auf 80% an. Der Quotient der Reaktionszeiten blieb stabil bei Werten um 0,15 (Abb. 3.16 D,E).

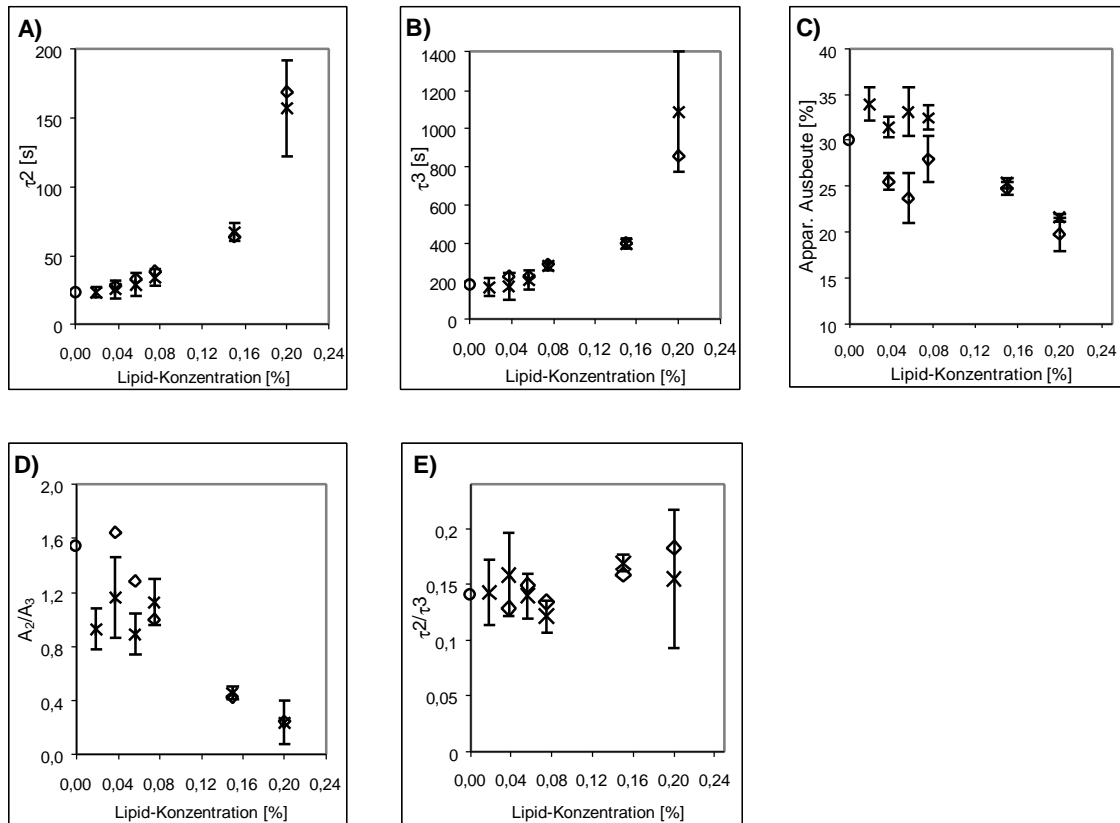


Abb. 3.16 Abhängigkeit von A)  $\tau^2$  und B)  $\tau^3$  Reaktionszeit der Rekonstitution des LHCII von der Phospholipid-Konzentration. C) Abhängigkeit der apparenten Ausbeute der Rekonstitution, bezogen auf die Chl*b*-Emission, von der Phospholipid-Konzentration. D) Abhängigkeit des Quotienten der Amplituden der Reaktionszeiten von der Phospholipid-Konzentration. E) Abhängigkeit des Quotienten der Reaktionszeiten von der Phospholipid-Konzentration. Pigmente und Protein nach Standard (Kap. 2.2.9). Standard-Lipid-Konzentration = 0,04% DPPG. ○ = ohne Lipid; × = DPPG; ◇ = DOPG.

### 3.5.3 Einfluß von DGDG und MGDG auf die Rekonstitution des LHCII

Bei Versuchen zur Kristallisation von LHCII muß DGDG in den Ansätzen zwingend vorhanden sein (NUßBERGER ET AL., 1993). DGDG bindet dabei vermutlich peripher am LHCII. Der Einfluß dieser Bindung auf die Dauer der Rekonstitution sollte in der folgenden Versuchsreihe geklärt werden. Die Spezifität dieses Effektes sollte mit Hilfe von MGDG, als natives Membranlipid ohne direkte Bindung an den LHCII, kontrolliert werden. Die Galactolipide MGDG und DGDG unterscheiden sich in ihrem Zuckeranteil. DGDG hat ein Galactose-Rest mehr gebunden. Da die beiden Lipide aus pflanzlichem Material gewonnen wurden, entspricht die Fettsäurezusammensetzung den natürlich in der Tomate vorkommenden Fettsäuren (Kap. 2.2.7).

Wie auch bei PG-Variationen verlängerten sich beide Reaktionszeiten mit zunehmender Lipid-Konzentration. Dabei verdoppelte sich  $\tau^2$  bei DGDG mit Verdopplung der Lipidmoleküle in den Micellen.  $\tau^3$  verlängerte sich im selben Rahmen. Die MGDG-Konzentrationsabhängigkeit der Rückfaltung bewegte sich im vergleichbaren Umfang (Abb. 3.17 A,B). Die apparente Ausbeute der Rekonstitution, bezogen auf die Signaländerung von Chl*b*, ten-

dierte in keine Richtung und lag zwischen 26% und 32% bei beiden Lipiden. Dabei zeigte MGDG eine leicht höhere apparente Ausbeute im Vergleich zu DGDG (Abb. 3.17 C). Der Quotient der Amplituden der beiden Reaktionszeiten sank auf 0,5 mit erhöhter Lipid-Konzentration. Der Quotient der Reaktionszeiten verblieb bei Werten um 0,16 (Abb. 3.17 D,E). Beide Lipide unterschieden sich nur marginal in ihren Effekten.

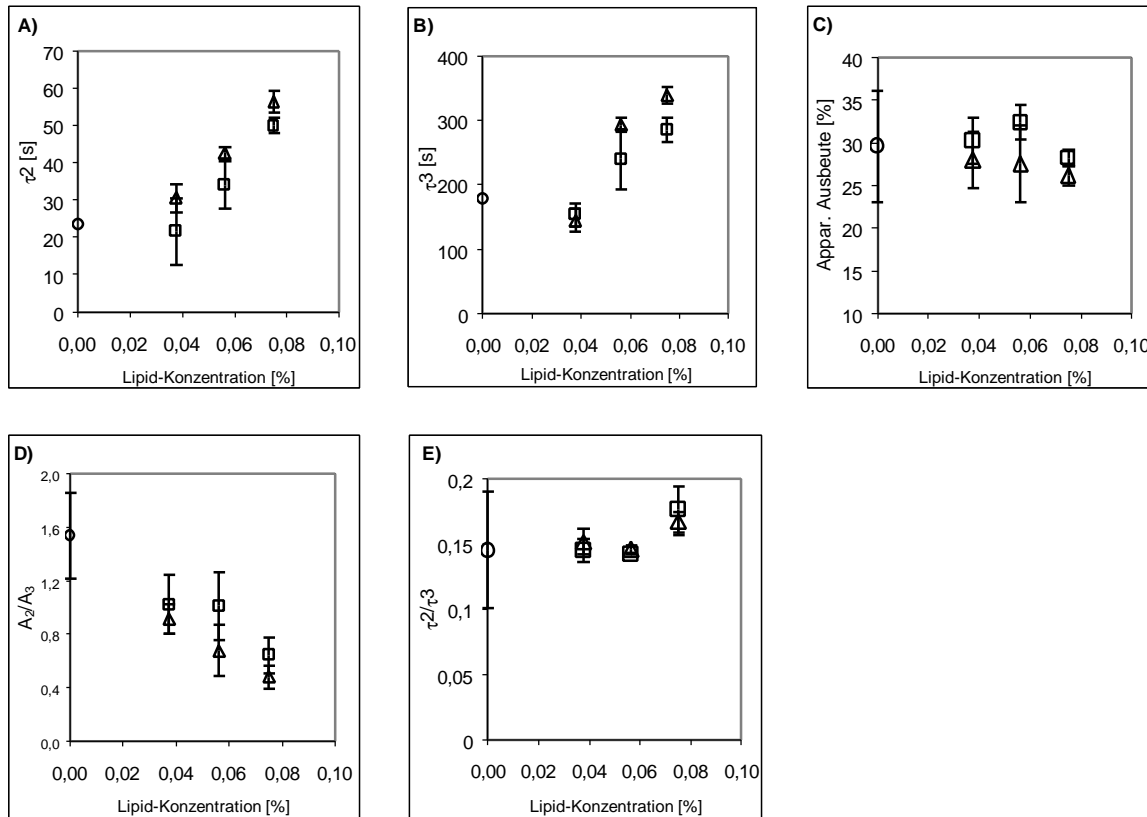


Abb. 3.17 Abhängigkeit von A)  $\tau_2$  und B)  $\tau_3$  der Rekonstitution des LHCII von der Galactolipid-Konzentration. C) Abhängigkeit der apparenten Ausbeute der Rekonstitution, bezogen auf die Chl $b$ -Emission, von der Galactolipid-Konzentration. D) Abhängigkeit des Quotienten der Amplituden der Reaktionszeiten von der Galactolipid-Konzentration. E) Abhängigkeit des Quotienten der Reaktionszeiten von der Galactolipid-Konzentration. Pigmente und Protein nach Standard (Kap. 2.2.9).  $\circ$  = ohne Lipid;  $\Delta$  = DGDG;  $\square$  = MGDG.

Die hier untersuchten Lipide (DPPG, DOPG, DGDG, MGDG) unterschieden sich also kaum in ihrem Einfluß auf die untersuchten Parameter der Rekonstitutionskinetik, wie  $\tau_2$ ,  $\tau_3$ , das Verhältnis der dazugehörigen Amplituden und der Ausbeute der Rekonstitution.

### 3.5.3.1 Einfluß von Phospho- und Galactolipiden auf die thermische Stabilität des rekonstituierten LHCII

Die thermische Stabilität des rekonstituierten LHCII wurde wie bei Kap. 3.4.1.1 ermittelt. Es waren auch nur die Änderungen der Chl $b$ -Emission auswertbar und die Kinetik war annähernd monoexponentiell. Alle mit Lipiden rekonstituierten LHCII zeigten eine erhöhte thermische Stabilität gegenüber rekonstituiertem LHCII ohne Lipid. Dabei stieg die Zerfallszeit mit zunehmender Lipid-Konzentration an. Bei einer DPPG-Konzentration von 0,2 % [w/v] konnte ein thermisch vierfach stabilerer Komplex rekonstituiert werden (Abb. 3.18).

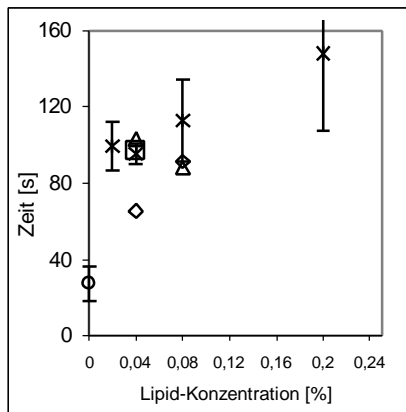


Abb. 3.18. Dissoziationszeit des LHCII bei einem Temperatursprung auf 47 °C abhängig von der Lipid-Konzentration. Berechnung Kap. 3.4.1.1. O = ohne Lipid; x = DPPG;  $\diamond$  = DOPG;  $\Delta$  = DGDG;  $\square$  = MGDG.

### 3.5.3.2 Einfluß von Phospho- und Galactolipiden auf die Reassoziierung des thermisch-dissoziierten LHCII

Eine Reassoziierung war nicht mit allen Lipiden erfolgreich. Wie auch bei Kap. 3.4.1.2 ist nur eine qualitative Aussage zur erneuten Komplexbildung möglich. Ohne Lipid sowie mit DPPG und DOPG konnte der LHCII gut rückgefaltet werden. Dabei war die Qualität der Rückfaltung konzentrationsunabhängig. MGDG ließ eine gute Rückfaltung nur bei niedriger Lipid-Konzentration (0,04% [w/v]) zu. Bei höherer MGDG-Konzentration war nur noch eine minimale Signalveränderung zu erkennen, die die Zunahme des Energietransfers von Chl *b* zu Chl *a* andeutete. DGDG bewirkte schon in geringer Konzentration eine sehr schwache Reassoziierung. Diese war im selben Ausmaß wie bei hoher MGDG-Konzentration. Bei hoher DGDG-Konzentration war keine Chl *a*-Fluoreszenz-Zunahme mehr zu beobachten und somit keine Rückfaltung gegeben.

Entgegen dem bei Kap. 3.5.3 beschriebenen, unspezifischen Effekt der Lipide bei der zeitaufgelösten Rekonstitution und der thermischen Stabilität, zeigte sich ein spezifischer Effekt von DGDG und MGDG bei der erneuten Rückfaltung des LHCII. Beide behinderten die Reassoziierung bei höheren Konzentrationen (0,08% [w/v]). Dieser Effekt war mit DGDG größer noch als mit MGDG. DGDG behinderte die Reassoziierung schon bei der am niedrigsten eingesetzten Konzentration (0,04% [w/v]).

### 3.5.4 Einfluß von Octyl-Glycosid auf die Rekonstitution des LHCII

Die Rekonstitution des LHCII findet in Detergens-Micellen statt. Der Einfluß der Detergens-Konzentration wurde in der folgenden Versuchsreihe untersucht. Diese Experimente sollen ebenfalls helfen, einen spezifischen Einfluß der Lipide auf die Rekonstitutionskinetik abzuschätzen.

Eine Rekonstitution fand nur in einem Konzentrationsbereich zwischen 1-2% [w/v] OG statt. Außerhalb dieses Bereichs war keine stabile Rekonstitution zu beobachten. Durch Erhöhung der OG-Konzentration, innerhalb des möglichen Konzentrationsbereichs von 1-2% [w/v] OG, wurden beide Reaktionszeiten verlangsamt (Abb. 3.19 A,B). Die Zunahme von  $\tau_2$  erfolgte zwischen der minimal und maximal eingesetzten Konzentration um den Faktor 10. Die langsamere Reaktionszeit  $\tau_3$ , verlängerte sich ebenfalls um den Faktor 10. Dementsprechend war keine Tendenz im Quotienten von  $\tau_2$  und  $\tau_3$  zu erkennen (Abb. 3.19 E). Der Amplitudenquotient zeigte bei hohen OG-Konzentrationen eine deutliche Zunahme des Anteils der langsameren Reaktionszeit am Gesamtsignal (Abb. 3.19 D). Die apparente



Ausbeute, bezogen auf die Chl*b*-Signalveränderung, war durch die OG-Konzentrationsvariation unbeeinflusst (3.19 C).

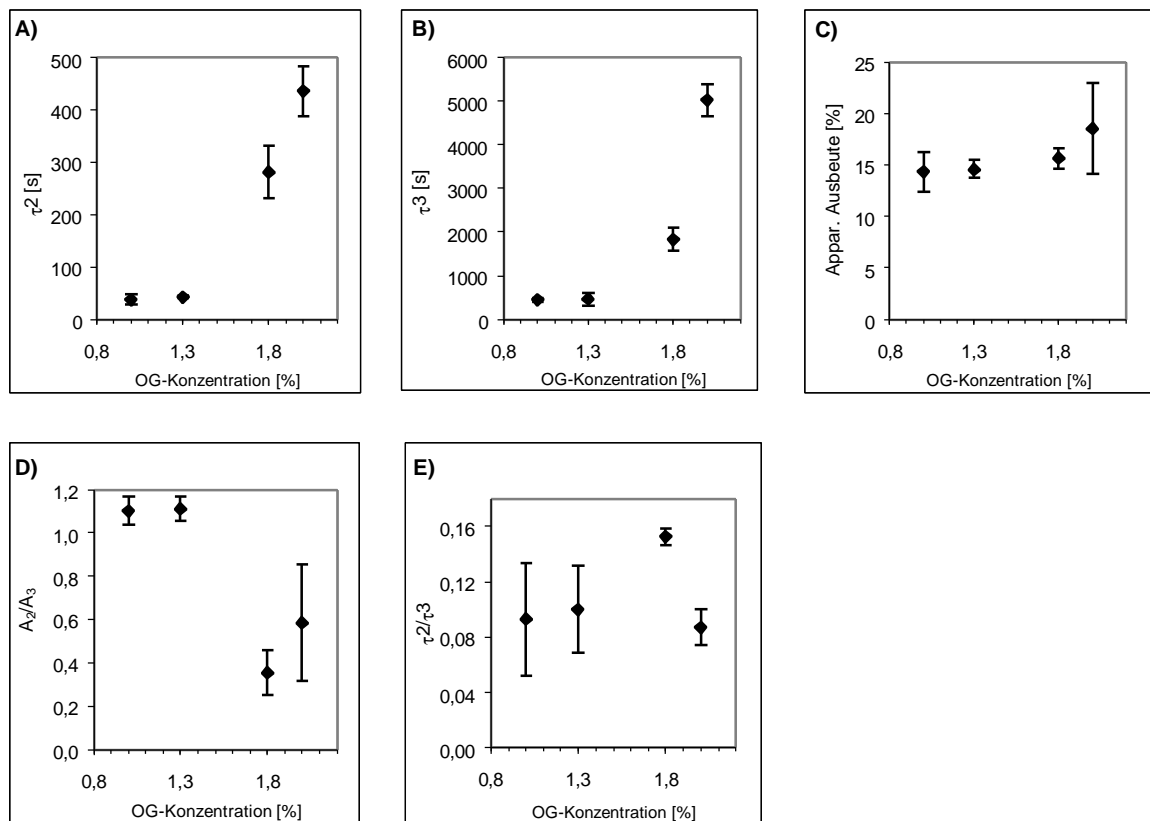


Abb. 3.19 Abhängigkeit von A)  $\tau^2$  und B)  $\tau^3$  der Rekonstitution des LHCII von der OG-Konzentration. C) Abhängigkeit der apparenten Ausbeute der Rekonstitution, bezogen auf die Chl*b*-Emission, von der OG-Konzentration. D) Abhängigkeit des Quotienten der Amplituden der Reaktionszeiten von der OG-Konzentration. E) Abhängigkeit des Quotienten der Reaktionszeiten von der OG-Konzentration [w/v]. Pigmente und Protein nach Standard (Kap. 2.2.9). Standard-OG-Konzentration lag bei 1% OG [w/v] (Kap. 2.2.9).

### 3.5.4.1 Einfluß von Octyl-Glycosid auf die thermische Stabilität des rekonstituierten LHCII

Ein stabilisierender Effekt durch erhöhte Konzentrationen an OG trat nicht auf. Vielmehr war bei 47 °C keine Fluoreszenz-Signal-Veränderung zu beobachten, die auf noch vorhandene intakte Komplexe schließen ließ. Dabei wurden die Proben bei -20 °C gelagert und vor der Messung auf RT gebracht. Ein Vergleich von Gleichgewichtsspektren nach abgeschlossener Rekonstitution und nach Auftauen zeigte, daß eine Dissoziation schon vor dem thermischen Streß stattgefunden hatte. Eine Reassoziierung war ebenfalls nicht möglich (beides nicht dargestellt).

### 3.5.5 Einfluß von Laurylmaltosid (LM) auf die Rekonstitution des LHCII

In einer Vorversuchsreihe ergab sich bei Zugabe von verschiedenen LM-Konzentrationen zu Ansätzen mit der Standardkonzentration an OG ebenfalls eine Rekonstitution. Dabei bestätigte sich die Tendenz der Verzögerung der Kinetik mit Erhöhung der Detergens-Konzentration (Tab. 3.6). Jedoch bei weitem nicht im selben Maße wie bei den vergleichbaren Ansätzen von OG (Kap. 3.5.4).

Tabelle 3.6: Einfluß der LM-Konzentration auf die Faltungskinetik des LHCII

LM [%] [w/v]	$\tau_2$ [s]	$\tau_3$ [s]	$\tau_2/\tau_3$	$A_2/A_3$	Appar. Ausbeute bez. a. Chl <i>b</i> [%]
0,04	19	158	0,12	2,1	16,1
0,08	21	242	0,09	1,9	14,6
0,2	22	352	0,06	1,1	13,8

LM zeigte, wie auch OG (Kap. 3.5.4.1) keine Signaländerung bei den Untersuchungen zur thermischen Stabilität des LHCII. Die Komplexe waren ebenfalls schon vor Versuchsbeginn dissoziiert.

### 3.6 Einfluß der Temperatur auf die zeitaufgelöste Rekonstitution des LHCII

Die Temperatur eines Systems hat Einfluß auf die Geschwindigkeit der darin ablaufenden Reaktionen. Eine Temperatursteigerung erhöht die Geschwindigkeit der Reaktionspartner und damit die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens der Reaktanten.

Die Versuche wurden mit der „Rapid-Mixing“-Methode durchgeführt (Kap. 2.2.10). Aufgrund dieses experimentellen Aufbaus sowie der Verwendung der Standardbedingungen der Rekonstitution, war eine Auswertung beider Fluoreszenz-Signale (Chl *b* und Chl *a*) möglich. Die maximal untersuchte Temperatur war 30°C, da bei noch höheren Temperaturen die Stabilität des LHCII nicht mehr gewährleistet war und der Zerfall des Komplexes vor Ende des Beobachtungszeitraums von 700 s eintrat.

#### Chl *b*-Emissionsänderung

Die längste Reaktionszeit wurde mit 27 s bzw. 182 s bei 8 °C beobachtet (Abb. 3.20 A,B, ♦).  $\tau_2$  und  $\tau_3$  zeigten mit 18 s bzw. 160 s ein Optimum bei 25 °C. Das Optimum ist jedoch nicht sehr deutlich ausgeprägt. Die apparente Ausbeute, bezogen auf die Chl *b*-Emissionsänderung, lag über den gesamten Temperaturbereich konstant zwischen 45% und 49% (Abb. 3.20 C). Der Quotient  $\tau_2/\tau_3$  blieb über den gesamten Bereich unverändert, der Quotient  $A_2/A_3$  stieg kontinuierlich an. Somit nahm der Anteil der schnelleren Reaktion von 60% auf ca. 70% an der Gesamtsignaländerung zu (Abb. 3.20 D,E).

#### Chl *a*-Emissionsänderung

$\tau_2$  der Chl *a*-Datenreihe verkürzte sich zwischen 8 °C auf 30 °C kontinuierlich um ca. 40%.  $\tau_3$  zeigte im Gegensatz dazu ein Optimum bei 19°C (Abb. 3.20 A,B, □). Die Chl *a*-Emissionsänderung hat bei  $\tau_3$  bei hohen Temperaturen (24 °C und 30 °C) eine sehr hohe Standardabweichung. Von 19 °C nach 8 °C nimmt  $\tau_3$  um 90% zu. Dies war eine deutlich größere Abnahme im Vergleich zur Verkürzung von  $\tau_3$  der Chl *b*-Emission von lediglich 16% (Abb. 3.20 B). Die Gesamt-Signaländerung der Chl *a*-Emission fiel ab einer Temperatur von 19 °C von ursprünglich 50% bis auf 32% ab (Abb. 3.20 C). Der Quotient  $A_2/A_3$  stieg deutlich an und zeigte den Anstieg des Anteils der schnelleren Reaktion an der Gesamtsignaländerung von 30% auf 70%. Dieser Effekt war damit deutlich stärker als bei der Chl *b*-Datenreihe. Der Quotient  $\tau_2/\tau_3$  zeigte, aufgrund des Optimums von  $\tau_3$  bei 19 °C bei einem kontinuierlich verkürzten  $\tau_2$ , bei 19 °C ein Maximum (Abb. 3.10 D,E).

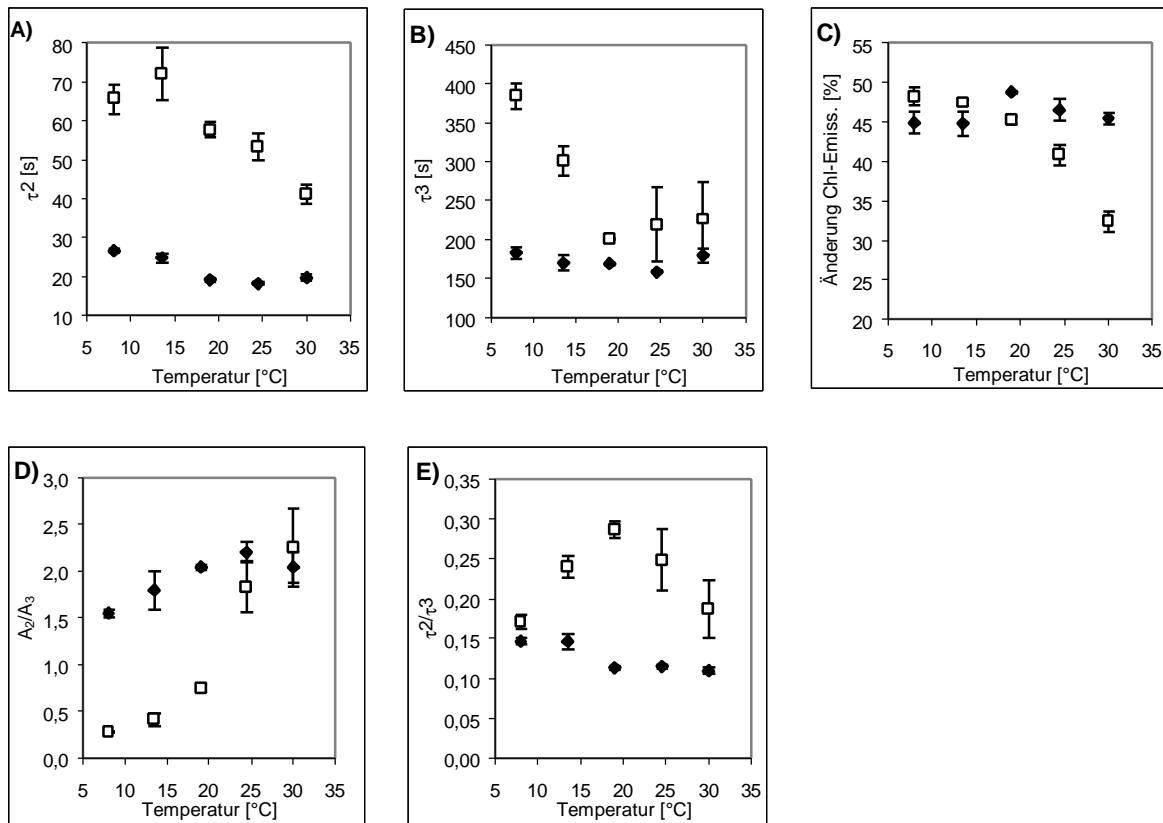


Abb. 3.20 Temperaturabhängigkeit von A)  $\tau^2$  und B)  $\tau^3$  der Rekonstitution des LHCII, basierend auf Chl *b*- und Chl *a*-Emissionsänderungen. C) Temperaturabhängigkeit der Gesamt-Signaländerung der Chl- und Chl-*a*-Fluoreszenz der Rekonstitution des LHCII. D) Temperaturabhängigkeit des Quotienten der Amplituden der Reaktionszeiten. E) Temperaturabhängigkeit des Quotienten der Reaktionszeiten. Standardtemperatur 24°C. Pigmente und Protein nach Standard (Kap. 2.2.10).  $\blacklozenge$  = Chl *b*-Emission;  $\square$  = Chl *a*-Emission.

### 3.6.1 Arrhenius-Diagramm zur Rekonstitution des LHCII

Die Rekonstitution des LHCII erwies sich als temperaturabhängig. Mit dieser Eigenschaft lässt sich als weitere Information über die Komplexbildung die Aktivierungsenergie für die Faltung berechnen. Aus der Gleichung von ARRHENIUS

$$k = A \times e^{-E_a/(R \times T)}$$

lässt sich diese Energie herleiten. Dabei sind *k* die Geschwindigkeitskonstante, *R* die allgemeine Gaskonstante, *T* die Temperatur in Kelvin, *A* ein Proportionalitätsfaktor und  $E_a$  die Aktivierungsenergie. Die Funktion  $\ln k$  von  $1/T$  gibt mit  $E_a/R$  die Steigung der Gleichung an, aus der nun  $E_a$  hergeleitet werden kann.

Der natürliche Logarithmus aus der oben aufgeführten Gleichung wird gebildet:

$$\ln k = \ln A - E_a / (R \times T)$$

Wir erhalten eine lineare Funktion der Reaktionskonstanten in Abhängigkeit von  $1/T$ , bei der  $\ln A$  eine Konstante ist. Bei unterschiedlichen Temperaturen ( $T_1$  und  $T_2$ ) erhält man zwei Gleichungen mit verschiedenen Reaktionskonstanten ( $k_1$  und  $k_2$ ), diese Gleichungen werden voneinander subtrahiert. Bei dieser Subtraktion fällt  $\ln A$  weg und es kann wie folgt vereinfacht werden:

$$\ln k_1 - \ln k_2 = - E_a/R \times (1/T_1 - 1/T_2)$$

oder

$$\ln (k_1/k_2) = E_a/R \times (1/T_2 - 1/T_1)$$

Nach  $E_a$  aufgelöst ergibt sich:

$$E_a = \ln (k_1/k_2) \times R \times T_1 \times T_2 / (T_2 - T_1)$$

Für die temperaturabhängige Rekonstitution des LHCII ergab sich folgendes Arrhenius-Diagramm (Abb. 3.21). Da schon Abb. 3.20 B und 3.20 C zeigten, daß bei einer Temperatur von 30 °C eine verlangsamte Rekonstitution, einhergehend mit einer deutlich verringerten Gesamtsignaländerung, gegeben war, wurde dieser Wert nicht zur Berechnung der Aktivierungsenergie herangezogen. Dies bestätigte sich auch in der Darstellung im Arrhenius-Diagramm.

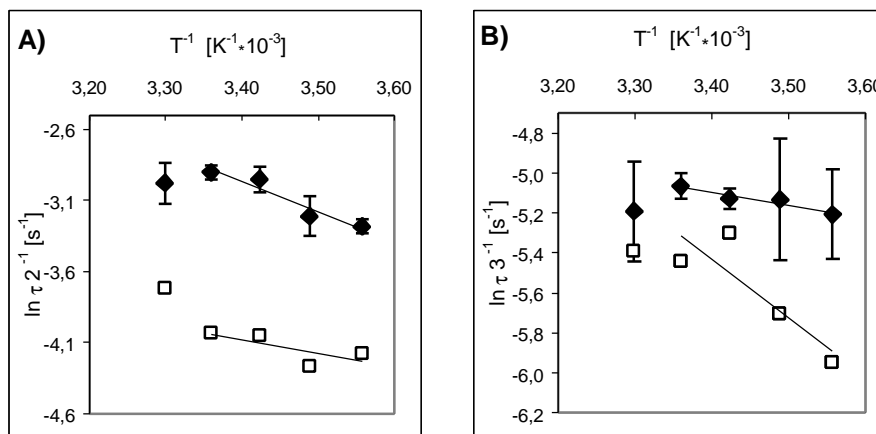


Abb. 3.21 Arrhenius-Diagramm für die Rekonstitution des LHCII. A) Berechnung für Reaktionszeit $\tau_2$  und B) Berechnung für die Reaktionszeit $\tau_3$ . Regressionsgerade ohne Datenpunkt für 30°C berechnet. Standardabweichungen des Mittelwertes für  $Chl b$  angegeben. Abweichungen für  $Chl a$  im selben Bereich.  $3,3 \times 10^{-3} [K^{-1} \times 10^{-3}]$  entspricht 30°C;  $3,56 \times 10^{-3} [K^{-1} \times 10^{-3}]$  entspricht 8°C.  $\blacklozenge = Chl b$ ;  $\square = Chl a$ .

Daraus ergaben sich nach oben aufgeführter Arrhenius-Gleichung folgende Werte für die Aktivierungsenergien der beiden Reaktionskonstanten der  $Chl b$ - und  $Chl a$ -Emissionsänderung.

Tabelle 3.7: Aktivierungsenergie der Rekonstitution des LHCII

	Schnelle Komponente $kJ \times mol^{-1}$	Langsame Komponente $kJ \times mol^{-1}$
Chl <i>b</i> -Emission	18,7	5,0
Chl <i>a</i> -Emission	5,8	24,1

Kontrollversuche mit dem Klon 35b1 zur Temperaturabhängigkeit zeigten wie auch bei Abb. 3.4 A) nur eine lineare Signalabnahme von unter 3%. Diese Abnahme wurde bei höheren Temperaturen leicht stärker (5%), jedoch war ein größerer Einfluß nicht gegeben (nicht dargestellt).

### 3.6.2 Einfluß der Rekonstitutionstemperatur auf die Stabilität des rekonstituierten LHCII

Aufgrund des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der thermischen Stabilität durch Temperatursprung war nur die Veränderung der Chl $b$ -Fluoreszenz betrachtet worden (Kap. 3.4.1.1). Bei der thermischen Stabilität zeigten sich keine Abhängigkeiten der Reaktionszeiten von der Rekonstitutionstemperatur. Die Zerfallszeiten schwankten zwischen 160 s und 350 s und wiesen keine Tendenz auf.

### 3.6.3 Einfluß der Rekonstitutionstemperatur auf die Reassoziaton des dissoziierten LHCII

Die Reassoziaton war ebenfalls nicht abhängig von der ursprünglichen Rekonstitutions-temperatur und war bei allen Ansätzen gut durchführbar.

## 3.7 Einfluß des pH-Wertes auf die zeitaufgelöste Rekonstitution des LHCII \*

Der pH-Wert des Mediums in dem sich Proteine befinden, beeinflusst den Protonierungsgrad der Amino- und Carboxygruppen der Peptidkette sowie der Aminosäureste. Ein Protein wird u.a. durch Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken stabilisiert. Der LHCII hat zwei Chl $a$ , die über eine Wechselwirkung mit Histidin gebunden werden. Histidin wechselt seinen Protonierungsgrad im physiologischen pH-Wert-Bereich.

Im folgenden Abschnitt wurde der Einfluß des pH-Wertes auf die zeitaufgelöste Rekonstitution des LHCII untersucht. Die Versuche wurden mit der „Rapid-Mixing“-Methode durchgeführt (Kap. 2.2.10). Das Puffersystem der Rekonstitutionslösungen mußte aufgrund des sehr breiten Untersuchungsbereiches gewechselt werden. Oberhalb eines pH-Wertes von 8 wurde der Lithiumboratpuffer des Standardansatzes verwendet, darunter wurde ein Natriumphosphatpuffer verwendet.

#### Chl $b$ -Emissionsänderung

Innerhalb der Phosphat-Puffermeßreihe war eine eindeutige Tendenz festzustellen. Mit fallendem pH-Wert verlängern sich  $\tau_2$  und  $\tau_3$  drastisch (Abb. 3.22 A,B). Die apparente Ausbeute sank um mehr als 50% und es war ein Anstieg des Anteils der schnelleren Reaktionszeit an der Gesamtsignaländerung von ca. 30% auf 70% zu beobachten (Abb. 3.22 C,D).  $\tau_2$  verlängerte sich dabei stärker bei einem pH-Wert von 5 als  $\tau_3$ , dies zeigte der Quotient beider Reaktionszeiten (Abb. 3.22 E).

Durch den Pufferwechsel war es nicht möglich, die weitere Tendenz bei steigendem pH-Wert zu verfolgen. Deutlich ist der Versatz aller Werte bei pH-Werten  $> 8$  zu erkennen. Die Reaktionszeiten bei pH-Werten  $> 8$  waren aber trotzdem unter den Werten für den pH-Werts 5. Die apparenten Ausbeuten befanden sich ebenfalls deutlich über dem Niveau des niedrigsten pH-Wertes. Die Quotienten der Amplituden der Reaktionszeiten und die Quotienten der Reaktionszeiten dieser hohen pH-Werte zeigten kaum eine Veränderung und erreichten Werte zwischen denen pH-Wert 6 und 7 ( $A_2/A_3$ ) bzw. auf Höhe von pH-Wert 6 ( $\tau_2/\tau_3$ ).

---

\*Die Versuche wurden von Ruth Horn im Rahmen ihrer von mir mitbetreuten Diplomarbeit durchgeführt.

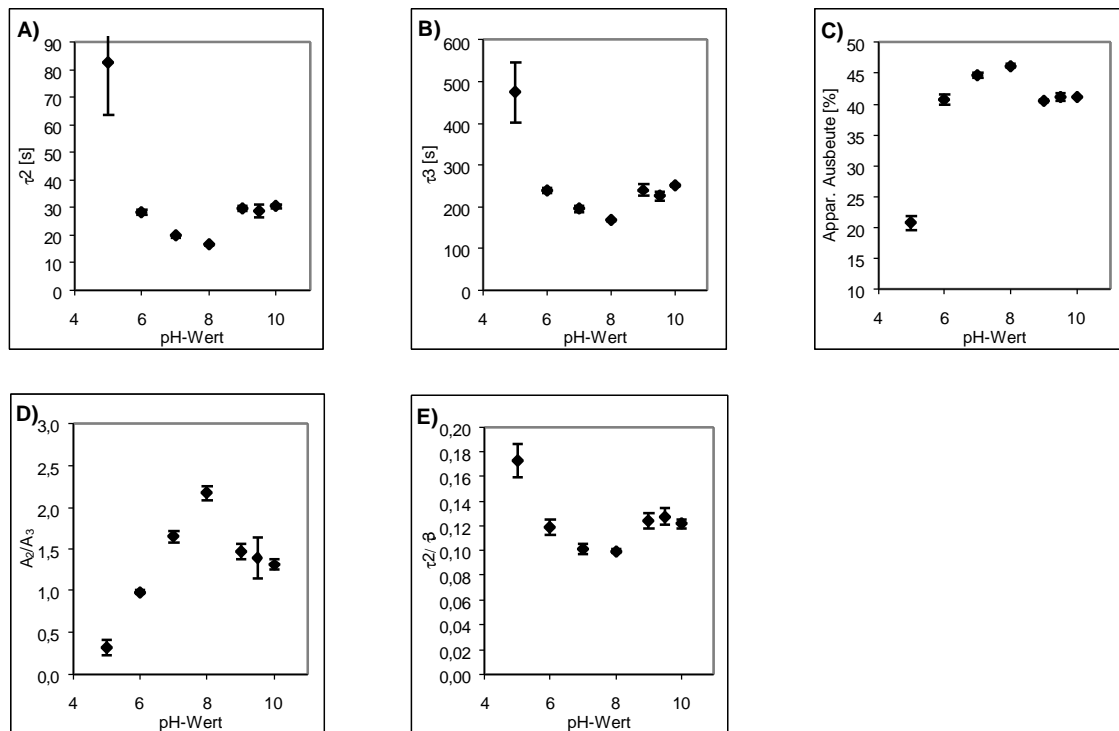


Abb. 3.22: pH-Wert-Abhängigkeit von A)  $\tau_2$  und B)  $\tau_3$  der Rekonstitution des LHCII bezogen auf die Chl *b*-Signaländerung. C) pH-Wert-Abhängigkeit der apparenten Ausbeute der Rekonstitution, bezogen auf die Chl *b*-Emission. D) pH-Wert-Abhängigkeit des Quotienten der Amplituden von  $\tau_2$  und  $\tau_3$ . E) pH-Wert-Abhängigkeit des Quotienten von  $\tau_2$  und  $\tau_3$ . Pufferwechsel bei pH-Wert 8. Pigmente und Protein nach Standard (Kap. 2.2.10).

### Chl *a*-Emissionsänderung

Die Chl *a*-Emissionsänderungen zeigten dieselbe Tendenz wie auch die Chl *b*-Emissionsänderungen (Abb. 3.23). Der Versatz der Ergebnisse bei pH-Wert 8 war ebenfalls zu beobachten. Die Standardabweichungen vor allem für  $\tau_3$  waren deutlich höher als bei den entsprechenden Werten für Chl *b*. Deswegen lassen sich die Quotienten der Amplituden der Reaktionszeiten bzw. der Reaktionszeiten nur sehr bedingt auswerten, da diese Schwankungen übertragen werden. Bei pH-Wert 5 war keine biexponentielle Kinetik mehr zu beobachten. Die Signaländerung war gering und sank auf 10% und nur eine monoexponentielle Kinetik ließ sich anpassen (Abb. 3.23 A,C).

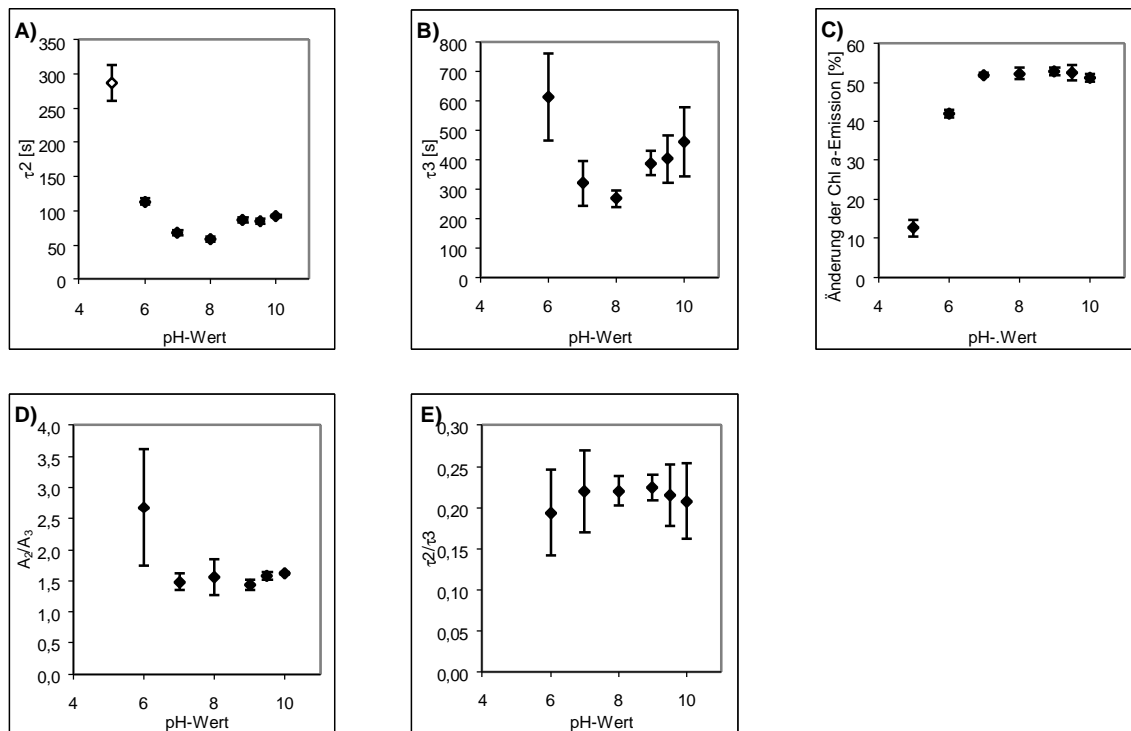


Abb. 3.23: : pH-Wert-Abhängigkeit von A)  $\tau_2$  und B)  $\tau_3$  der Rekonstitution des LHCII bezogen auf die Chl *a*-Signaländerung. C) pH-Wert-Abhängigkeit der Signaländerung der Chl *a*-Emission der Rekonstitution. D) pH-Wert-Abhängigkeit des Quotienten der Amplituden von  $\tau_2$  und  $\tau_3$ . E) pH-Wert-Abhängigkeit des Quotienten von  $\tau_2$  und  $\tau_3$ . Pufferwechsel bei pH-Wert 8. Bei pH-Wert 5 war nur eine monoexponentielle Signalveränderung zu beobachten (◇ Abb. A), deswegen konnte lediglich noch die Gesamt-Signaländerung für pH-Wert 5 angegeben werden (Abb. C). Pigmente und Protein nach Standard (Kap. 2.2.10).

### 3.7.1 Einfluß des pH-Wertes auf die Stabilität des rekonstituierten LHCII

Die thermische Stabilität wurde wie in Kap. 3.4.1.1 beschrieben, untersucht. Mit fallendem pH-Wert sank auch die thermische Stabilität des LHCII bei 47 °C (Abb. 3.24). Die zur Stabilitätsabschätzung durchgeführten Experimente waren, aufgrund der Versuchsanordnung, nur als Einzelmessungen möglich. Bei einer Auftrennung der Pigment-Protein-Komplexe mittels schwach-denaturierender PAGE, war bei den niedrigen pH-Werten 5 und 6 ein höherer Anteil an freiem Protein und somit eine geringere Ausbeute oder auch Stabilität zu erkennen (nicht dargestellt).

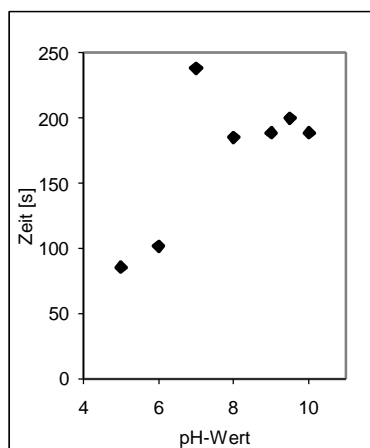


Abb. 3.24: Dissoziationszeit des LHCII bei einem Temperatursprung auf 47 °C abhängig vom pH-Wert, basierend auf Chl *b*-Emissionszunahme.

### 3.7.2 Einfluß des pH-Wertes auf die Reassoziaton des dissoziierten LHCII

Die Reassoziaton war bei allen pH-Werten möglich, der LHCII konnte bei fast allen Ansätzen im gleichen Ausmaß reassoziert werden. Lediglich bei pH-Wert 5 war eine deutlich schlechtere Reassoziaton gegeben. Eine Tendenz zu einer leicht geringeren Reassoziaton war auch bei pH-Wert 9 und 10 zu erkennen.

### 3.8 Einfluß der Viskosität der Rekonstitutionslösung auf die zeitaufgelöste Rekonstitution des LHCII

Ein viskoses Medium kann die Geschwindigkeit von Reaktionen herabsetzen. Die Beweglichkeit der Reaktanten nimmt ab und damit die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens der Reaktionspartner.

Im folgenden Abschnitt wurde, unter Verwendung von Glycerin in der Rekonstitutionslösung, der Einfluß der Viskosität auf die Rekonstitution untersucht. Die Versuche wurden mit der „Rapid-Mixing“-Methode durchgeführt (Kap. 2.2.10). Saccharose lag in einer Konzentration von 1,25% [w/v] vor. Glycerin erhöhte in einer Konzentrationsreihe (0%, 10%, 20%, 25%, 30% [w/v]) die Viskosität im Rekonstitutionsansatz. Die Viskosität des Systems wurde anhand der Glycerin-Konzentration bestimmt, reines Wasser besitzt eine Viskosität von ca. 1 mPa s (CRC HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS, 1980). Die weiteren Viskositäten sind in Tab. 3.8 dargestellt.

Tab. 3.8: Viskosität eines wässrigen Systems, abhängig von der Glycerin-Konzentration

Glycerin-Konzentration [%] [w/v]	0	10	20	25	30
Viskosität [mPa s] <sup>1)</sup>	1	4	9	12	18

<sup>1)</sup> gerundete Werte nach CRC HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS, 1980

#### Chl *b*-Emissionsänderung

Beide Reaktionszeiten der Chl *b*-Emission verlängerten sich mit zunehmender Viskosität.  $\tau_2$  verlängerte sich um den Faktor 4, die langsamere Komponente änderte sich minimal stärker, von 130 s auf 660 s (Abb. 3.25 A,B). Die apparente Ausbeute fiel bei steigender Viskosität kontinuierlich von Werten um 40% auf 15% ab (Abb. 3.25 C).

Der Quotient der Amplituden beider Reaktionszeiten nahm mit zunehmender Viskosität stark ab. Ohne Glycerin hatte die schnellere Reaktionszeit 66% Anteil an der Gesamtsignaländerung der Rekonstitution. Bei 30% [w/v] Glycerin Endkonzentration hatte die langsame Reaktionszeit einen 60%igen Anteil an der Gesamtsignaländerung (Abb. 3.25 D). Der Quotient beider Reaktionszeiten variierte mit Glycerin im Medium kaum und lag bei 0,13. Lediglich für den Ansatz ohne Glycerin konnte mit 0,16 ein höherer Wert ermittelt werden (Abb. 3.25 E).



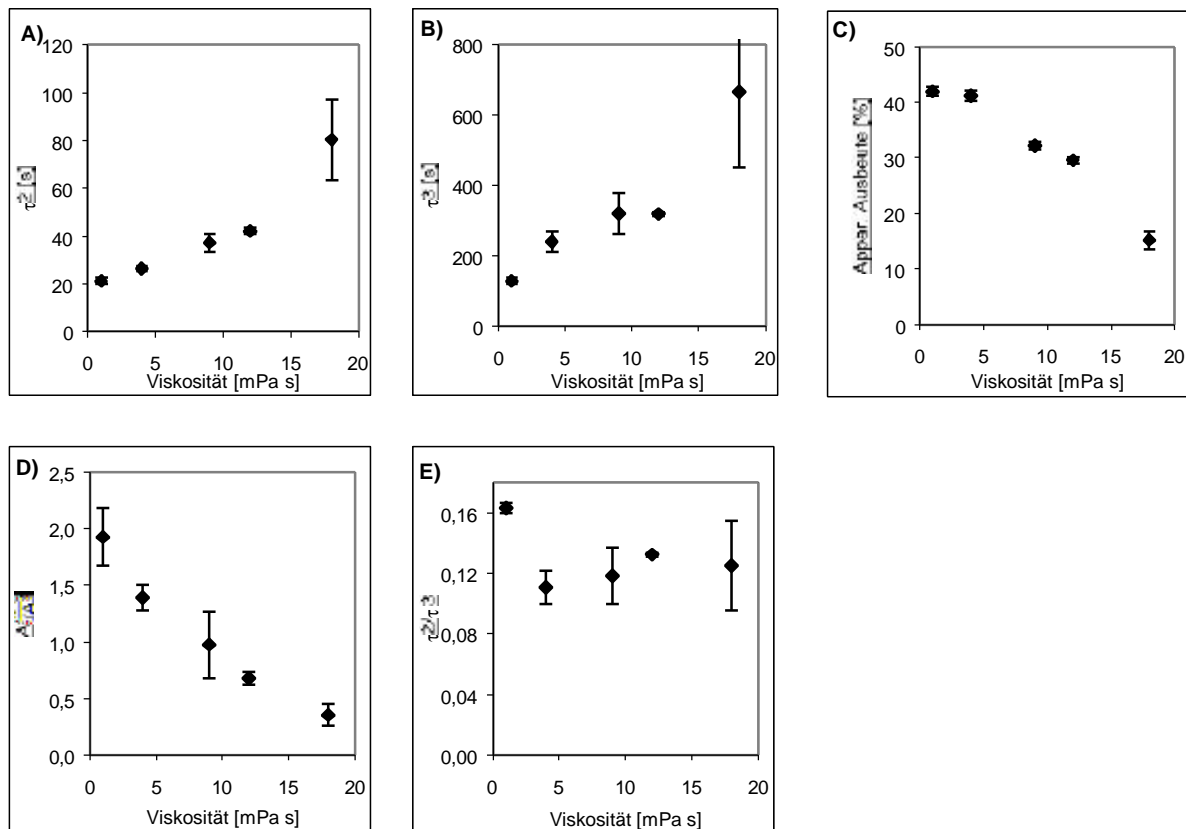


Abb. 3.25 Abhängigkeit von A)  $\tau_2$  und B)  $\tau_3$  der Rekonstitution des LHCII von der Viskosität bezogen auf die Chl *b*-Emission. C) Abhängigkeit der apparenten Ausbeute der Rekonstitution, bezogen auf die Chl *b*-Signaländerung, von der Viskosität. D) Abhängigkeit des Quotienten beider Amplituden der Reaktionszeiten von der Viskosität. E) Abhängigkeit des Quotienten der Reaktionszeiten von der Viskosität. Viskositätserhöhung durch Erhöhung der Glycerin-Konzentration (0%, 10%, 20%, 25%, 30%) [w/v]. Pigmente und Protein nach Standard (Kap. 2.2.10).

### Chl *a*-Emissionsänderung

Die schnellere Reaktionszeit verlängerte sich mit zunehmender Viskosität. Die langsamere Reaktionszeit entwickelte sich nicht mit einer deutlichen Tendenz (Abb. 3.26 A,B). Die Signaländerung der Chl *a*-Fluoreszenz, bezogen auf das Endsignal, blieb bis zu einer Glycerin-Konzentration von 25% [w/v], mit über 30%, gleich. Die höchste Glycerin-Konzentration verursachte jedoch eine Verkleinerung der Änderung auf knapp über 10% (Abb. 3.26 C). Ohne Glycerin war der Anteil der schnelleren Reaktionszeit 2,5-fach höher als der Anteil der langsamen Komponente und fiel kontinuierlich bis auf einen Wert von 0,7. Der Quotient aus den Reaktionszeiten lag ohne Glycerin bei 0,19, mit Glycerin im Medium wurden mindestens 0,24 erreicht. Bei der höchsten Konzentration waren beide Reaktionszeiten gleich und zeigten somit eine monoexponentielle Kinetik (Abb. 3.26 D,E).

Zur Kontrolle der Fluoreszenz-Signaländerungen dieser extremen Rekonstitutionsbedingungen, wurden simulierte Rekonstitutionen mit dem Klon 35b1 durchgeführt (vgl. Abb. 3.4 A). Die Versuche zeigten eine starke Steigerung der linearen Signalabnahme der Chl *b*- und Chl *a*-Emission ab einer Glycerin-Konzentration von 25% [w/v] (nicht dargestellt). Die Versuche mit einer sehr hohen Glycerin-Konzentration unterliegen somit einer starken artifiziellen Fluoreszenz-Abnahme.

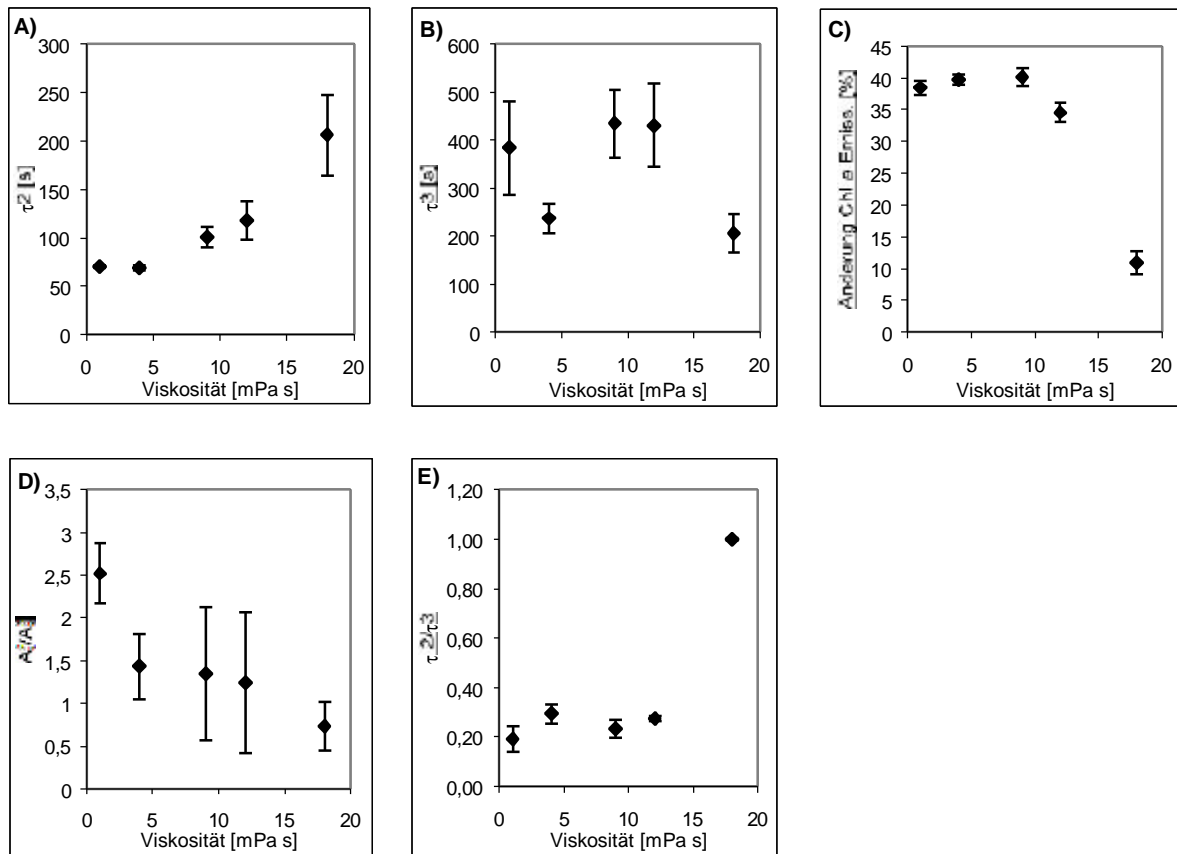


Abb. 3.26 Abhängigkeit von A)  $\tau_2$  und B)  $\tau_3$  der Rekonstitution des LHCII von der Viskosität bezogen auf die Chl *a*-Emission. C) Abhängigkeit der Chl *a*-Signaländerung der Rekonstitution von der Viskosität. D) Abhängigkeit des Quotienten der Amplituden beider Reaktionszeiten von der Viskosität. E) Abhängigkeit des Quotienten der Reaktionszeiten von der Viskosität. Viskositätserhöhung durch Erhöhung der Glycerin-Konzentration (0%, 10%, 20%, 25%, 30%) [w/v]. Pigmente und Protein nach Standard (Kap. 2.2.10).

### 3.8.1 Einfluß der Viskosität auf die Stabilität des rekonstituierten LHCII

Die Reaktionszeiten der Dissoziation bei 47 °C lagen zwischen 330 s und 418 s. Wobei die höhere Signaländerung des Chl *b*-Signals und eine höhere Stabilität bei Experimenten ohne Glycerin auftrat. Bei einer Konzentration von 20% [w/v] Glycerin war mit 6% nur noch eine geringe und schnelle Signaländerung zu beobachten und auswertbar. Darüber hinaus war sogar eine Chl *b*-Fluoreszenzabnahme gegeben und somit eine Bestimmung der Stabilität der Komplexe nicht mehr möglich.

### 3.8.2 Einfluß der Viskosität auf die Reassoziaton des dissoziierten LHCII

Eine Reassoziaton des LHCII nach thermischer Dissoziaton war nur bis zu einer Konzentration von 20% [w/v] Glycerin möglich. Bei dieser Konzentration war die Reassoziaton aber auch nicht mehr so effektiv wie bei niedrigeren Konzentrationen. Bei 25% [w/v] Glycerin war noch eine Signaländerung zu erkennen, jedoch war diese Rückfaltung minimal. Bei der höchsten Glycerin-Konzentration war keine Verschiebung der Chl *a/b*-Maxima zu beobachten und somit keine Reassoziaton erfolgt.

## 4 Diskussion

Die zeitaufgelöste Rekonstitution des LHCII soll einen tieferen Einblick in den Faltungsablauf und den Faltungsmechanismus dieses Pigment-Protein-Komplexes geben. Zur Erreichung dieses Zieles wurden die Komponenten des LHCII, Protein und die verschiedenen Pigmente sowie die Rekonstitutionsbedingungen, variiert. Die Rekonstitution des LHCII wurde anhand eines indirekten Nachweises der korrekten Struktur, des Energietransfers von Chl<sub>b</sub> zu Chl<sub>a</sub>, zeitaufgelöst verfolgt.

### 4.1 Vergleich der Methoden zur zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung der Rekonstitution des LHCII

Durch die kontrollierte Zugabe der Pigmente kann der Startpunkt der LHCII-Rekonstitution bestimmt werden; das ermöglicht die Messung von Kinetiken zur Proteinfaltung. Der Startpunkt wird durch die Mischzeiten der verwendeten Methoden, manuelles Mischen, „Rapid-Mixing“ oder „Stopped-Flow“, bestimmt. Eine „Stopped-Flow“-Anlage besitzt eine geringe Totzeit und ermöglicht so eine Auflösung sehr früher Ereignisse der Rekonstitution. Die manuelle Methode mit der Mischzeit von sechs Sekunden hat den Nachteil, daß Signaländerungen und somit Ereignisse der Proteinfaltung innerhalb dieser Zeit nicht erfaßt werden können. Die „Rapid-Mixing“-Methode liegt deutlich unter der Mischzeit der manuellen Methode, reicht aber nicht an die Mischzeiten im Millisekundenbereich der „Stopped-Flow“-Methode heran. Ein Vorteil der beiden in dieser Arbeit verwendeten Methoden liegt in der Verhinderung von möglichen Lösungsrückflüssen, die in einem „Stopped-Flow“-Versuchsaufbau über längere Versuchszeiträume möglich sind (P. J. BOOTH, persönliche Mitteilung). Ein großer Vorteil des manuellen Mischens ist die kurzfristige Probenvorbereitung. Somit können gealterte Lösungen vermieden werden, die stark die Ergebnisse beeinflussen (JEGERSCHÖLD ET AL., 1999). Die Reaktionskinetik des pLhcb1 ist im Vergleich zum murenen Apoprotein etwas verlängert (BOOTH & PAULSEN, 1996). pLhcb1 eignet sich deswegen besser für Versuchsanordnungen, die eine längere Mischzeit als eine „Stopped-Flow“-Apparatur haben und die in dieser Arbeit verwendet wurden.

### 4.2 Optimierung der Rekonstitutionsbedingungen

Als wichtige Komponente zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnis zur Berechnung der Kinetiken, erweist sich das Chl/Protein-Verhältnis (Abb. 3.7). Eine optimale Chl-Konzentration wurde mit einem 1,6-fachen molaren Überschuß in Bezug auf pLhcb1 gefunden (12 Pigmente pro pLhcb1 angenommen) und als Standardkonzentration festgelegt (Kap. 2.2.9). Die Xanthophyll-Konzentration wurde so gewählt, daß diese nicht limitierend auf die Rekonstitution wirkte. Das war bei einem vierfachen molaren Überschuß gegeben (drei Xanthophylle pro pLhcb1 angenommen) (Abb. 3.11). Eine Proteinpräparation mit einer Reinheit von deutlich über 90%, hat sich als notwendig für die Einstellung der Pigment-Protein-Stöchiometrie erwiesen. Bei der „Stopped-Flow“- oder „Rapid-Mixing“-Methode werden mit einem Versuchsansatz die Vorratsbehälter befüllt und mehrere Messungen nacheinander durchgeführt. Das Alter der Lösungen hat ebenfalls einen Einfluß auf die Signaländerungen. Präparationen sollten deswegen nicht länger als eine Stunde in den Vorratsspritzen gelagert werden.

Durch diese Veränderungen konnten, im Vergleich zu den ersten Versuchen zur zeitlich aufgelösten Rekonstitution des LHCII (BOOTH & PAULSEN, 1996), die Schwankungen von bis zu 55% der Amplituden der Reaktionszeiten, auf unter 5% verringert werden. Die Reaktionszeiten selbst wurden um den Faktor 3-4 kürzer. Weiterhin konnte die Reaktionszeit<sup>2</sup> der

früheren Versuche in zwei Reaktionszeiten ( $\tau_2$  und  $\tau_3$ ) aufgelöst werden (BOOTH & PAULSEN, 1996). Es sind somit vier Komponenten der Rekonstitution auflösbar, davon sind zwei Komponenten zu schnell, um mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden erfaßt werden zu können. Hierzu ist eine „Stopped-Flow“-Apparatur notwendig. Die schnellste Komponente ist im Bereich von 10 ms und wird als das Mischen der SDS/OG/PG-Micellen angesehen (BOOTH & PAULSEN, 1996). Die folgende Komponente  $\tau_1$ , zeigt eine Signalabnahme für Chl *a* und *b* und liegt nach der oben genannten Optimierung im Bereich von ca. 3. Die beiden folgenden Komponenten  $\tau_2$  und  $\tau_3$ , sind ausreichend langsam um selbst mit der manuellen Methode erfaßt werden zu können. Die Werte liegen bei Standardbedingungen für  $\tau_2$  bei einer halben Minute und für  $\tau_3$  bei 200 Sekunden. Die Standardabweichungen innerhalb einer Präparation liegen unter 5% (Kap. 3.3, 3.4, 3.5).

#### 4.3 Unterschiede der zeitlich aufgelösten Signaländerungen von Chl *b* und Chl *a*

Der Rekonstitution des LHCII ist über den sich etablierenden Energietransfer von Chl *b* zu Chl *a* zu beobachten. Das sollte bedeuten, daß in dem Maße und der Geschwindigkeit mit der die Chl *b*-Emission abnimmt, die Emission des Chl *a* zunehmen sollte. Die Änderungen der Fluoreszenzintensität von Chl *b* und Chl *a* unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Kinetik. Die Reaktionszeiten der Chl *a*-Signaländerung sind im Vergleich zu Chl *b* verlängert und scheinen im Widerspruch mit früheren Ergebnissen zu stehen, bei denen angenommen wurde, daß es sich bei diesen Signalen um das Etablieren des Energietransfers von Chl *b* nach Chl *a* handelt (BOOTH & PAULSEN, 1996). Dieses Phänomen wurde erst durch das gleichzeitige Aufzeichnen beider Signale mit der in dieser Arbeit verwendeten Datenaufnahme entdeckt. Die unabhängigen Messungen für Chl *a*-, Chl *b*- und Proteinfluoreszenz einerseits und die große Variationsbreite der Signale durch verschieden gealterte Versuchsansätze andererseits, verbargen diesen Effekt (BOOTH & PAULSEN, 1996; JEGERSCHÖLD ET AL., 1999). Eine Erklärung bietet die Betrachtung der schnellen Reaktionszeit  $\tau_1$ , aufgelöst durch die „Stopped-Flow“-Methode. Im Bereich von wenigen Sekunden nach Induktion der Rekonstitution unterscheiden sich die Amplituden der Signaländerungen von Chl *a* und *b* nicht in ihrem Vorzeichen. Erst im weiteren Verlauf bekommt die Signaländerung von Chl *a* ein positives Vorzeichen (BOOTH & PAULSEN, 1996). Diese Signalumkehr kann durch Wahl von extremen Rekonstitutionsbedingungen, wie z.B. hohem Glyceringehalt, verzögert werden und ist dann auch bei der „Rapid-Mixing“-Methode erkennbar. Die gleichförmige Abnahme des Chl *b*-Signals und der Wechsel des Amplitudenvorzeichens des Chl *a*-Signals haben, trotz ihres geringen Anteils am gesamten beobachteten Zeitraum der Rekonstitution, einen Einfluß auf die Berechnung der Kinetiken. Dieser Einfluß ist vor allem bei der schnelleren Reaktionszeit  $\tau_2$ , zu beobachten und verringert sich bei der langsameren Reaktionszeit  $\tau_3$ , bis auf vergleichbare Reaktionszeiten für  $\tau_3$  für die Chl *a*- und Chl *b*-Emission bei Standardbedingungen für die Rekonstitution (Abb. 3.20).

Gegenüber extremen Rekonstitutionsbedingungen ist ein Unterschied zwischen der Chl *a*- und der Chl *b*-Signaländerung in der Empfindlichkeit zu beobachten (Kap. 3.6 und 3.8). Die Änderung der Chl *a*-Emission ist bei Temperaturen oberhalb von 24°C und bei sehr hohen Glycerin-Konzentrationen geringer als die Chl *b*-Emissionsänderung. Dieselbe Tendenz ist auch bei gealterten Rekonstitutionslösungen zu beobachten (C. JEGERSCHÖLD, persönliche Mitteilung). Möglich wäre ein selektiver Effekt auf die freien Chl *e* im Rekonstitutionsansatz. Bei allen Negativ-Kontrollen zur Rekonstitution ist eine lineare Signalabnahme der Chl-Emissionen zu beobachten (Abb. 3.5). Diese lineare Signaländerung wirkt sich hauptsächlich gegen Ende des Faltungsprozesses aus, in der nur noch eine geringe Signaländerung des sich etablierenden Energietransfers zu beobachten ist.  $\tau_3$  ist somit deutlich empfindlicher

gegenüber diesem Meßartefakt als  $\tau_2$ . Hinzu kommen die unterschiedlichen Vorzeichen der Amplituden der Chl-Signaländerungen. Die lineare Komponente besitzt dasselbe Vorzeichen wie die Chl*b*-Emissionsänderung, die Chl*a*-Emission jedoch das umgekehrte. Somit hebt die lineare Komponente die Signaländerung von Chl*a* teilweise auf, während die Signaländerung der Chl*b*-Emission leicht unterstützt wird. Dies führt zu unterschiedlichen Reaktionszeiten für die beiden Pigmente. Die lineare Komponente hat ihren Ursprung in der Schädigung der Chle bei hohen Temperaturen und im unterschiedlichen Löslichkeitsverhalten von Chl*a* und Chl*b*. Das im wäßrigen Milieu schlechter lösliche Chl*a* könnte selektiv durch die hohe Glycerin-Konzentration oder die gealterte Pigmentlösung aggregieren.

#### 4.4 Prolin-Isomerisierung beeinflusst nicht die Rekonstitution des LHCII

Bei einem denaturierten Protein stellt sich zeitabhängig automatisch ein Gleichgewicht zwischen der, in nativen Proteinen häufig vorkommenden, trans-Stellung des Prolins und der cis-Stellung ein. Bei manchen Proteinen kann in diesem Zustand bis zu 40% des Prolins in der seltenen cis-Konformation vorliegen. Damit das Protein zügig in die native Konformation gelangt, werden die cis-Konformationen des Prolins von der Prolin-Isomerase in trans-Stellungen geändert (SCHMIDT, 1993). Die Untersuchung zum Einfluß einer Isomerisierung des Prolins und einer daraus folgenden Verzögerung der Rückfaltung, ergab vorläufig keinen Hinweis auf das beschriebene Phänomen. Der LHCII zeigt trotz der 13 Proline in seiner Rückfaltung keine Abhängigkeit von der Dauer des denaturierten Zustandes. Dies ist ein indirekter Hinweis auf eine Rekonstitution auch ohne Hilfe der Prolin-Isomerase (Tab. 3.3). Eine direkte Untersuchung ist durch schnelle Doppelsprungexperimente oder durch den Nachweis der Beschleunigung der Rekonstitution durch Prolin-Isomerase möglich (SCHMIDT, 1993, SU ET AL., 1996), wurde in dieser Arbeit aber nicht durchgeführt.

#### 4.5 Probleme bei der Berechnung der Ausbeute an rekonstituiertem LHCII

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur Rekonstitution wurde das Pigment/Protein-Verhältnis hinsichtlich der Signalveränderung der Chle optimiert und nicht eine maximale Ausbeute an rekonstituiertem LHCII angestrebt (Kap 4.2). Die verwendete Methode führt zu einer geringen Ausbeute an LHCII von maximal 50% bezogen auf das Protein (Abb. 3.4). Dies wurde auch mit Hilfe der CD-Spektroskopie bestätigt, die einen  $\alpha$ -helicalen Anteil zeigten, der 50% rückgefaltetem Protein entsprach (BOOTH & PAULSEN, 1996). Eine hohe Pigmentkonzentration und Gefrier-Tau-Zyklen oder das Aussalzen des SDS als Rekonstitutionsmethoden, ermöglichen Ausbeuten der Rekonstitution, die an eine quantitative Umsetzung des Apoproteins heranreichen (PAULSEN ET AL., 1990).

Die Berechnung der Ausbeute erweist sich bei dem hier verwendeten System als schwierig. Es wurden verschiedene Ansätze gewählt, um eine Annäherung an den tatsächlichen Rekonstitutionserfolg zu erreichen. Basis für eine Abschätzung ist ein Vergleich der Gleichgewichtsspektren einer Negativkontrolle mit einer erfolgreichen Rekonstitution. Die Spektren werden dekonvolviert und somit in die spektralen Bestandteile zerlegt. Der Flächeninhalt der Chl*b*-Gaußbande des LHCII nimmt aufgrund des Energietransfers ab. Diese Abnahme, bezogen auf den ursprünglichen Flächeninhalt „vor“ Rekonstitution, d.h. des Klons 35b1 der Negativkontrolle, ergibt die Ausbeute der Rekonstitution. Aus dem Gesamtspektrum werden jeweils drei Komponenten aufgelöst. Die Gaußbanden des dekonvolvierten Spektrums schwanken durch die, von Versuch zu Versuch, variable Fläche und Halbmaximalbreite der Komponente bei 705 nm und der Ausdehnung dieser Fläche bis in den hellroten Bereich bei 660 nm. Dadurch ist eine genaue Abschätzung der Ausbeute über diese Methode nicht möglich.

Als eine weitere Möglichkeit bot sich die Auswertung von Coomassie-gefärbten Gelen an. Das Apoprotein und der Pigment-Protein-Komplex lassen sich über eine schwach-denaturierende PAGE trennen. Eine Eichgerade des Apoproteins und die durchgeführten Rekonstitutionen und einem Kontrollansatz ohne Pigmente werden schonend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinfärbung des Gels läßt eine Abschätzung der aufgetragenen Proteinmenge zu. Die Menge des Proteins im Kontrollansatz, abzüglich des freien Proteins, ergibt die Menge des Proteins im Komplex. Die Schwierigkeit dieser Methode besteht in der ungenauen Auswertung der Proteinbanden durch Hintergrundeffekte des Gels und in den nur leichten Unterschieden im Proteinmuster auf dem Gels (Abb. 3.4). Weiterhin wirkt auch die schonende Gelelektrophorese leicht denaturierend, so daß die Komplexausbeute, die in der Küvette vorliegt auf diese Weise unterschätzt wird.

Wegen oben aufgeführter Schwierigkeiten wurde zur Abschätzung der Rekonstitution des LHCII, die Veränderung des Chl $b$  Signals im Laufe der Rekonstitution auf das Ausgangssignal von Chl $b$  bezogen. Auch hierbei handelt es sich nur um eine Annäherung an die tatsächliche Ausbeute. Da nicht die komplette Amplitude der Rekonstitution aufgrund der Mischmethoden erfaßt werden kann, wird der Rekonstitutionserfolg unterschätzt. Bei der Berechnung der Amplitude muß auf Artefakte durch Fehlberechnungen bei extremen Rekonstitutionsbedingungen, die lange Reaktionszeiten hervorrufen, geachtet werden. Weiterhin hat die Menge an freiem Chl $b$  einen Einfluß auf die Signaländerung und läßt deswegen einen Vergleich bei Versuchsreihen, bei der die Menge des eingesetzten Chl $b$  variiert wird, nicht zu. Diese Methode zeigte sich jedoch als die beste im Vergleich mit den oben beschriebenen. Um den Schwierigkeiten dieser Methode Rechnung zu tragen wurde der Erfolg der Rekonstitution in dieser Arbeit mit *apparenter* Ausbeute bezeichnet.

#### **4.6 Faltungskinetik des LHCII im Vergleich zu Membranproteinen und löslichen Proteinen**

Bei der Rekonstitution des LHCII können unter Standardbedingungen 4 Komponenten aufgelöst werden. Dabei ergeben sich Zeiten im Bereich von Millisekunden, bis 10<sup>3</sup>, ca. 30 s sowie ca. 200 s.

LHCII liegt mit seinen Reaktionszeiten im üblichen Bereich der Rückfaltungszeiten von anderen Membranproteinen, deren Faltung zeitaufgelöst untersucht wurde. Das diesbezüglich am besten untersuchte Protein ist Bakteriorhodopsin (bR). Jedoch müssen bei dem nun folgenden Versuch eines Vergleichs dieser Proteine, die Heterogenität der Versuchsbedingungen, die Unterschiede der Proteine selbst und der verschiedenen Faltungsmechanismen, mit in Betracht gezogen werden. Ein Merkmal unterscheidet den LHCII von allen anderen Proteinen. Er besitzt mindestens 15 Nichtproteinmoleküle und es werden alle Komponenten des nativen Pigment-Protein-Komplexes zur Rekonstitution benötigt. bR kann auch ohne Retinal die Sekundärstruktur der sieben Transmembranhelices ausbilden und stabil isoliert werden.

bR besitzt eine Reaktionszeit von unter einer Sekunde für ein Intermediat, gefolgt von einer Zeit von 15-90 s für Intermediat 2. Diese Faltung wird ohne Pigmentinduktion erreicht. Das zweite Intermediat bindet Retinal nichtkovalent erst zu diesem Zeitpunkt in einer sehr schnellen Reaktion (< 1 s). Das vollständig rückgefaltete Protein ist nach weiteren 150<sup>3</sup> erreicht. (BOOTH ET AL., 1995, BOOTH, 1997). Erstaunlich im Vergleich zu löslichen Proteinen ist eine langsame Helixformation im Bereich von 83-129s. Die Zeitspanne von ca. 50 s wird durch unterschiedliche pH-Werte hervorgerufen (RILEY ET AL., 1997). bR rekonstituiert trotz

seiner sieben Helices schneller als LHCII. Jedoch ist auch nur ein Pigment, im Gegensatz zu mindestens 15 beim LHCII, bei der Rückfaltung involviert. Eine weitere Besonderheit des bR ist die Eigenschaft, daß selbst im Linkerbereich unterbrochene, einzelne Helices von bR eine native Struktur annehmen können (MARTI, 1998). Im Gegensatz dazu, sind auch die interhelicalen Bereiche des LHCII für eine native Struktur von Bedeutung und Mutationen in sensitiven Abschnitten führen zum Verlust der Rekonstitutionsfähigkeit (HEINEMANN & PAULSEN, 1999).

Das  $\beta$ -Barrel Protein Omp A, wird in drei Schritten rückgefaltet; unter einer Sekunde ins Intermediat 1, im Bereich von Minuten zum Zwischenprodukt 2 und im Zeitraum von einer Stunde zur nativen Struktur. Die Autoren vermuten, daß trotz des langen Zeitraums keine Prolin-Isomerisierung eine Rolle spielt (SURREY & JÄHNIG, 1995). Damit benötigt dieses Protein auch ohne weitere bindende Faktoren länger als der LHCII. Das verwandte, trimere  $\beta$ -Barrel Protein Omp F, wurde vom selben Arbeitskreis untersucht. Es treten ebenfalls lange Reaktionszeiten auf, mit einem ersten Reaktionsschritt von 5 Minuten und dem Auftreten eines dimeren Intermediates und einer weiteren kinetischen Komponente von ca. 50 Minuten (SURREY ET AL., 1996). Hier erweist sich ein Vergleich mit dem LHCII als schwierig, da keine kinetische Untersuchung der Trimerbildung des LHCII durchgeführt wurde.

Lactose-Permease, ein Membranprotein mit 12 Helices, faltet sich im Vergleich zum LHCII mit seinen vier Helices, im Bereich von ca. 10 Minuten schnell zurück (HE & KABACK, 1998). Aber auch hier muß die große Anzahl der zu bindenden Cholesterole und Xanthophylle des LHCII mit in den Vergleich einbezogen werden. Diese nicht-kovalenten Bindungen tragen anscheinend stark zu einer langsamen Kinetik bei. Auch die, nur beim LHCII hervorgerufene Induktion der Faltung durch die Pigmente, unterstreicht die wichtige Rolle der Pigmente bei der Assemblierung des LHCII (PAULSEN ET AL., 1993).

Lösliche Proteine ließen sich schon deutlich vor Membranproteinen rekonstituieren (ANFINSEN ET AL., 1961). Es wurden eine Vielzahl von ihnen untersucht und im folgenden Abschnitt soll lediglich eine Auswahl davon, die Unterschiede zu Membranproteinen und deren Faltungskinetiken, aufzeigen. Lösliche Proteine können innerhalb von Millisekunden *in vitro* rekonstituiert werden und erreichen somit sehr viel schneller als die oben beschriebenen Membranproteine in ihrem nativen Zustand. Es wurden aber auch langsame Faltungsvorgänge beschrieben.

Ein Vertreter der schneller rückgefalteten Proteine ist Apomyoglobin. Es faltet über ein, als „molten globule“ angenommenes Intermediat, mit einem  $\alpha$ -Helix Anteil von 35%, in weniger als 5 ms. Die weitere Bildung der Helices verläuft im Bereich von Sekunden. Die Autoren interpretieren diese Kinetiken als einen sequentiellen Faltungsweg (JENNINGS & WRIGHT, 1993). Strukturell ähnlich, jedoch mit deutlich langsamerer Reaktionszeit rekonstituiert Cyanometmyoglobin. Mit seinen drei Reaktionszeiten von 10 ms, 100 – 200 ms, 200 – 500 ms liegt es sogar in dem Zeitraum, in dem sich der LHCII rekonstituiert (OHIBA ET AL., 1994).

Die schnellsten sich rückfaltenden Proteine gehören zu den „cold-shock“ Proteinen. CspB ist innerhalb weniger Millisekunden komplett gefaltet (SCHINDLER ET AL., 1995). CspA faltet sich innerhalb von maximal 600  $\mu$ s Reaktionszeit bei Temperatursprungexperimenten. Abhängig von den Ausgangsbedingungen können auch noch schnellere Kinetiken beobachtet werden. (LEESON ET AL., 1999). Phosphoglycerat-Synthase und Ubiquitin falten ebenfalls sehr schnell mit Reaktionszeiten im Bereich von 2-25  $\mu$ s und 0,2-5 ms (SABELKO ET AL., 1999). Diese Zeiträume werden bei den Untersuchungen des LHCII nicht aufgelöst. Maximal konnte im Bereich von Millisekunden die Mischung der Micellen beobachtet werden. In dieser Zeit-

spanne ablaufende Vorgänge können nicht erfaßt werden, da dieses artifizielle Signal diese Ereignisse überdeckt (BOOTH & PAULSEN, 1996).

Eine Erklärung für die, auch bei löslichen Proteinen längeren Reaktionszeiten, ist das Modell des Zwischenproduktes als kinetischen Falle auf dem Faltungsweg zum funktionstüchtigen Protein. Diese stabilen Intermediate werden auch von dem alternativen Faltungsmodell, dem Trichtermodell oder Modell des „energy landscape“ aufgegriffen (Kap. 1.3.1). Bei Lysozym z.B., werden zwei Faltungswege postuliert, einen schnelleren (50 ms), über den sich 14% des Proteins rückfalten und einen langsameren mit 420 ms. Dieser Weg wird mit einem stabilen Intermediat in Verbindung gebracht und als eine kinetische Falle vermutet (KIEFHABER, 1995). Mikrobielle Endonuclease zeigt Kinetiken mit Intermediaten im Bereich von 2 ms bis 500s (SU ET AL., 1996). Intermediate scheinen aber zum Teil durch nicht native Strukturen hervorgerufen zu werden, da eine Erhöhung der Temperatur, diese Intermediate, zumindest bei Lysozym, verschwinden läßt (MATAGNE ET AL., 1998).

Die  $\alpha$ -Untereinheit der Tryptophan-Synthase ist ein  $\alpha$ , $\beta$ -Barrel Protein. Es faltet mit mehreren kinetischen Phasen im Bereich von unter einer Millisekunde bis über 100s, dabei bilden sich stabile sowie instabile Intermediate. Zu Beginn bildet sich innerhalb 5ms ein Intermediat, mit einer detektierbaren Sekundärstruktur. Dieses Zwischenprodukt wird aber auf einen Nebenweg der Faltungssequenz vermutet und muß deswegen wieder teilweise entfaltet werden und kann sich dann anschließend über vier verschiedene, parallele Wege und Intermediate zur korrekten Struktur falten. Aber ein Teil des Proteins wählt nicht den Nebenweg und faltet sich innerhalb einer Sekunde komplett (BILSEL ET AL., 1999).

Beim LHCII konnten bisher keine stabilen Intermediate angereichert oder auch instabile Zwischenprodukte beobachtet werden. Die langsame Reaktionszeit bietet deswegen auch keinen Anhaltspunkt für einen Faltungsweg, obwohl FERSHT (1995) davon ausgeht, daß Intermediate bei Proteinen mit mehr als 150 Aminosäuren auftreten müßten. Jedoch müssen die wichtigsten Zwischenprodukte gar nicht detektierbar sein, weil gerade diese instabil sind (CREIGHTON ET AL., 1996). Die Rekonstitution des LHCII wird als hochkooperativ angesehen. Dadurch wären auch keine Intermediate zu erwarten, da die pigmentinduzierte Rekonstitution sofort zur kompletten Komplexbildung führen würde. Auf mögliche Faltungsmodelle für den LHCII wird in Kap. 4.12 eingegangen. Intermediate von Proteinen werden auch als Artefakte von *in vitro* Rekonstitutionen angesehen, die im biologischen Systemen nicht vorkommen würden, da dort eine Faltung nicht mit einem kompletten Protein erfolgt, sondern an der naszierenden Aminosäurenkette, bzw. Helferproteine die Faltung eines Proteins unterstützen. In der Zelle würde somit nicht limitierende Schritte auftauchen (FEDOROV & BALDWIN, 1999). *In vivo* unterstützen die zelleigenen Hilfsmechanismen, wie Prolin-Isomerase oder Chaperones die Proteinfaltung (SECKLER & JÄNICKE, 1992; FEDOROV & BALDWIN, 1997).

#### 4.7 Erhöhung der Reaktanten-Konzentration beschleunigt $t_2$ und $t_3$

Die Rekonstitution des LHCII ist bei beiden beobachteten Reaktionszeiten ( $t_2$  und  $t_3$ ) konzentrationsabhängig. Dies zeigt sich bei gleichzeitiger Erhöhung der Konzentrationen von Protein und Pigmenten (Abb. 3.5) aber auch umgekehrt durch Erniedrigung der Reaktanten-Konzentrationen durch Erhöhung der Detergens-Micellenzahl (Abb. 3.19). Wird die Konzentration nur der Chle oder Xanthophylle, bei gleichbleibender Proteinkonzentration, verändert, so ist ebenfalls die Konzentrationsabhängigkeit von beiden Reaktionszeiten zu beobachten (Abb. 3.6, 3.10-13). Dabei ändern sich bei allen Meßreihen beide Reaktionszeiten im gleichem Maße. Durch eine Erhöhung der Konzentration aller Reaktanten oder nur der Pigmente wird, bei gleicher Detergens-Konzentration, die Anzahl der Reaktionspartner in



den Detergens-Micellen erhöht und führt zu einer schnelleren Rückfaltung des Komplexes. Folglich werden die schnellsten Reaktionszeiten auch bei gleichzeitiger Erhöhung der Protein- und Pigmentkonzentration erreicht. Die einseitige Erhöhung der Pigmentkonzentration verkürzt die Reaktionszeiten nicht im selben Maße. Die Erhöhung der Detergenskonzentration hat erst bei Vervielfachung der Micellenzahl der Standardbedingungen denselben Effekt wie die Erhöhung der Reaktanzahl bei gleichbleibender Micellenzahl. Bei Verdopplung der Micellenzahl ist keine signifikante Änderung der Rekonstitutionszeiten zu beobachten, die Halbierung der Reaktanten-Konzentration hingegen verlängert  $\tau_2$  und  $\tau_3$  um den Faktor 3. Dieser geringere Einfluß bei Verdopplung der Micellen-Konzentration kann durch eine geringere effektive Erhöhung der Micellenzahl hervorgerufen werden. Möglich wäre dies durch einer Bindung von Monomeren an den Reaktanten (vor allem Protein) und somit weniger freiem, zur Micellenbildung zur Verfügung stehendem, Detergens.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionszeiten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  läßt auf eine Bindung der Pigmente auch bei diesen Reaktionszeiten schließen. Dies ist ein neuer Aspekt, da bei BOOTH & PAULSEN (1996)  $\tau_1$  als pigmentbindende Phase der Rekonstitution angenommen wurde und bei der damaligen Reaktionszeit  $\tau_2$  (jetzt in  $\tau_2$  und  $\tau_3$  aufgelöst), eine zusätzliche Pigmentbindung nicht abschließend geklärt werden konnte. Bei diesem letzten Schritt sollten die schon gebundenen Pigmente und das Protein optimal für den Energietransfer ausgerichtet werden und dadurch unabhängig von einer Konzentrationsänderung der Reaktanten sein (BOOTH & PAULSEN, 1996).

#### 4.7.1 Reaktanten-Konzentration beeinflusst nicht die Ausbeute der Rekonstitution, aber das Amplituden-Verhältnis der Reaktionszeiten

Die Konzentrationsabhängigkeit der Rekonstitutionszeiten mündet nicht in einer Konzentrationsabhängigkeit der Ausbeute der Rekonstitution. Die Ausbeute bleibt bei allen Konzentrationsänderungen ohne Tendenz für eine Steigerung oder Senkung der Ausbeute. Nur bei kritischen Konzentrationen unterhalb oder knapp oberhalb der notwendigen Anzahl der Pigmente zur Besetzung aller Pigmentbindungsstellen des gesamten Proteins, sind geringere Ausbeuten der Rekonstitution zu beobachten. Dies ist auf die zu geringe Konzentrationen an Pigmenten in den Micellen zurückzuführen. Da die kooperative Faltung des LHCII eine partielle Besetzung und Rückfaltung nicht ermöglicht, werden weniger Pigment-Protein-Komplexe insgesamt gebildet. Bei anderen Rekonstitutionssystemen (Gefrier-Tau-Zyklus oder Detergenswechsel durch Aussalzen) wird durch eine Pigmentmengenerhöhung eine höhere Ausbeute an rekonstituierten LHCII erhalten (S. HOBE, persönliche Mitteilung).

Mit zunehmender Pigmentkonzentration nimmt  $\Delta A_3$  zu. Somit steigt der Anteil der schnelleren Reaktionszeit an der Gesamtsignaländerung an. Auch bei einer Detergens-Abnahme ist dieser Effekt zu beobachten. Lediglich bei der gleichzeitigen Erhöhung von Protein- und Pigmentkonzentration ist eine Abnahme des Quotienten der Amplituden der Reaktionszeiten gegeben. Dieser Unterschied ist zumindest bei den höheren Reaktanten-Konzentrationen auf die sehr schnelle Rekonstitution bei manueller Mischung der Reaktanten zurückzuführen. Ein großer Teil der Signaländerung dürfte schon in der Mischzeit stattfinden und verschiebt so artifiziell den Quotienten. Die Abschätzung der Ausbeute ist dadurch ebenfalls fehlerbehaftet.

Die Tendenz, daß sich die Reaktionszeiten gleichmäßig bei der Änderung der Versuchsbedingungen entwickeln sowie die stete Zunahme des Anteils von  $\tau_2$  und der Gesamtsignaländerung (somit das „schnellere“ Ablaufen der gesamten Rekonstitution), geben einen Hinweis

auf eine Rekonstitution mit sehr hoher Ordnung. Die Aufspaltung in zwei Reaktionszeiten wäre somit nur eine Beschreibung dieser hochgeordneten Kinetik.

#### 4.7.2 Konzentrationsbereich der Reaktanten ist zu gering zur Einschätzung der Gleichgewichtseinstellung der Rekonstitution

Für eine genaue Beschreibung des möglichen Gleichgewichts der Rekonstitution ist der beobachtbare Konzentrationsbereich zu gering. Dazu müßte ein Konzentrationsunterschied von mindestens einer Größenordnung experimentell auswertbar sein (P. J. BOOTH, persönliche Mitteilung). Konzentrationen über dem zweifachen Standardansatz (Kap. 2.2.9) führen zu einer Aggregation der Pigmente und/oder des Proteins. Hier sind einer Untersuchung des Konzentrationseffektes nach oben hin Grenzen gesetzt. Zu geringe Konzentrationen führen zum Fehlschlagen der Rekonstitution, weil aufgrund des als kooperativ angenommen Mechanismus der Rekonstitution, keine Komplexe mit der halben Pigmentausstattung gebildet werden können (PAULSEN ET AL., 1993). Diese Einschränkung in der Variation aller oder einzelner Reaktanten der Rekonstitution erschwert dadurch ebenfalls eine Aussage zum Reaktionstyp der Rekonstitution (P. J. BOOTH, persönliche Mitteilung).

### 4.8 Pigmentangebot limitiert die Bildungsgeschwindigkeit von LHCII

Pigmente induzieren die Rückfaltung des LHCII (PAULSEN ET AL., 1993). Ihnen kommt daher eine wichtigere Rolle im Faltungsprozeß des Proteins zu als bei bR, das sich auch ohne Pigmente bis zu einem stabilen Intermediat, dem lediglich Retinal fehlt, faltet (BOOTH ET AL., 1995).

#### 4.8.1 Limitierung durch Chlorophylle

Bei ausgeglichenem Chl-Verhältnis ist keine Sättigung durch die Chl-Konzentration im untersuchbaren Bereich zu beobachten. Chl-Verhältnisse mit einem hohen Überschuß an Chl b oder Chl a, deuten eine Sättigung für  $\tau_2$  an.  $\tau_3$  läßt zusätzlich eine leichte Verlängerung der Reaktionszeit bei höheren Chl-Konzentrationen und extremen Chl-Verhältnissen annehmen (Abb. 3.7). Diese extremen Chl-Verhältnisse scheinen eine optimale Rekonstitutionszeit bei hohen Chl-Konzentrationen nicht zuzulassen. Für Chl-Bindungsstellen sind unterschiedliche Affinitäten festgestellt worden (REMELLI ET AL., 1999; S. HOBE, H. FEY, H. PAULSEN, unveröffentlicht). Eine Behinderung durch die nicht optimal passenden Chle bei der Besetzung der Bindungsstellen im LHCII, ist eine Erklärung für die langsamere Kinetik trotz hoher Chl-Konzentration bei extremen Chl-Verhältnissen.

#### 4.8.2 Limitierung durch Xanthophylle

Ein hoher molarer Überschuß an Xanthophyll verkürzt die Rekonstitution des LHCII. Ab einem molaren Überschuß von vier bzw. sechs, wird die Sättigung der Verkürzung der Reaktionszeiten erreicht. Eine Rekonstitution war selbst bei einem molaren Unterschluß möglich. Die Rekonstitution des LHCII mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode, führt zu einer maximal 50%igen Ausbeute. Es ist immer freies Pigment und Protein im Rekonstitutionsansatz vorhanden, das nicht in ausreichender Nähe zueinander war, um zu rekonstituieren. Lokal niedrigere Konzentrationen des Proteins können nun dazu führen, daß selbst bei einer für das gesamte Protein nicht ausreichender Menge an Pigmenten, noch eine Rekonstitution stattfinden kann.

Eine Lutein-Konzentrationserhöhung führt, wie bei Gesamt-Xanthophyllen, bei beiden Reaktionszeiten zu einer Sättigung ab einem molaren Überschuß von vier (Abb. 3.12). Bei

und  $\tau_3$  wird demnach Lutein gebunden. Die Rekonstitution mit nur Zeaxanthin oder nur Violaxanthin zeigt kaum eine Konzentrationsabhängigkeit. Lediglich bei Zeaxanthin ist bei geringen Konzentrationen eine leichte Verlängerung zu beobachten. Zeaxanthin besitzt eine nur leicht geringere Affinität als Lutein zu den beiden Luteinbindungsstellen im Komplex (HOBE ET AL., 2000), zeigt jedoch einen deutlich geringeren Effekt auf die Reaktionszeiten als Lutein. Violaxanthin besitzt eine sehr geringere Affinität zu den beiden Luteinbindungsstellen und eine hohe Affinität zu der dritten Bindungsstelle im Komplex (HOBE ET AL., 2000).

Lutein verkürzt bei niedrigen Konzentrationen die Reaktionszeiten im Vergleich zu den Gesamt-Xanthophyllen. Zeaxanthin besitzt einen ähnlichen Effekt, aber nicht im selben Ausmaß wie Lutein. Violaxanthin-Rekonstitutionen liegen mit ihrer Reaktionszeit stets über den Zeiten der Gesamt-Xanthophylle. Die Gesamt-Xanthophyll-Rekonstitution ist bei hohen Konzentrationen an Xanthophyll stets schneller als die Einzelpigmentvariationen. Die durchgehend langsameren Rekonstitutionszeiten von Lutein sind jedoch nicht völlig abgesichert, da bei diesen hohen Konzentrationen z.T. Pigmentaggregationen stattfanden und so artifizielle Effekte die Ergebnisse beeinflussen.

Der unterschiedliche Effekt von Lutein und Gesamt-Xanthophyllen bei niedrigeren Konzentrationen, kann durch die Affinitäten der Luteinbindungsstellen hervorgerufen werden. Dabei wird von einer hohen Luteinaffinität von zwei Bindungsstellen ausgegangen (CROCE ET AL., 1999; RUBAN ET AL., 1999; HOBE ET AL., 2000). Bei niedrigen Konzentrationen an Gesamt-Xanthophyllen kommt die niedrigere Bindungsaffinität des ebenfalls zu 40% eingesetzten Violaxanthin und Neoxanthin, für diese Bindungsstellen zu tragen. Luteine liegen in einer geringeren effektiven Konzentration vor. Wenn dies der alleinige Effekt wäre, dann müßte im unteren Konzentrationsbereich bei einer doppelten Gesamt-Xanthophyll-Konzentration die Reaktionszeiten für die einfache Lutein-Konzentration erreicht werden. Das ist nicht der Fall, somit könnte ein störender Einfluß der beiden Xanthophylle an den zentralen Bindungsstellen der Grund für die stärkere Verlängerung der Reaktionszeiten sein. Hohe Konzentrationen an Gesamt-Xanthophyllen mit einer nativen Pigmentzusammensetzung, ermöglichen, daß die weiteren Bindungsstellen für Xanthophylle, Neoxanthin und Violaxanthin schneller besetzt werden können. Dies unterstützt, im Umkehrschluß, die geringere Affinität des Luteins für die restlichen Bindungsstellen, die die vollständige Etablierung des Energietransfer dadurch verlängern würde (CROCE ET AL., 1999, RUBAN ET AL., 1999; HOBE ET AL., 2000).

Im Gegensatz zu allen anderen Konzentrationserhöhungen, erreicht bei Erhöhung der Einzelpigment-Konzentration, die Reaktionszeit  $\tau_2$  nie ein Übergewicht (Kap. 4.7.1). Der größte Anteil der Etablierung des Energietransfers ist der langsameren Komponente  $\tau_3$  vorbehalten. Eine Erklärung des Übergewichtes von  $\tau_3$ , ist die nicht optimale Xanthophyll-Zusammensetzung. Nicht alle für einen frühzeitigen Energietransfer notwendigen Xanthophyll-Positionen, können, durch die unterschiedlichen Affinitäten, zügig besetzt werden, dadurch ist ein vollständiger Energietransfer erst zu einem späten Zeitpunkt möglich.

#### **4.9 Chl a und Chl b limitieren einzelne Reaktionsphasen der Rekonstitution in unterschiedlichem Maß**

Eine unterschiedliche Entwicklung der beiden Reaktionszeiten der Rekonstitution wurde lediglich bei einer Meßreihe dieser Arbeit, der Variation des Chl a/b-Verhältnisses, erreicht.

Ein höherer Chl a-Anteil verkürzt die Reaktionszeit  $\tau_2$  (Abb. 3.8 A). Im Unterschied dazu, wird die Reaktionszeit  $\tau_3$  durch ein Optimum bei einem Chl a/b-Verhältnis von eins bis zwei

charakterisiert. Dieses Optimum wird durch den Einsatz einer geringeren Chl-Konzentration verstärkt (Abb. 3.8 B). Deutlich kann das anhand des Quotienten der beiden Reaktionszeiten festgehalten werden. Die Variation des Chl*a*/*b*-Verhältnisses ist der einzige Versuchsansatz dieser Arbeit, der eine unterschiedliche Entwicklung der Reaktionszeiten des Energietransfers beschreibt und somit erlaubt, diese Zeiten verschiedenen Ereignissen zuzuordnen. Diese zwei unterschiedlichen Ereignisse stehen im Widerspruch zu einer Reaktion höherer Ordnung, die lediglich durch zwei kinetische Komponenten beschreibbar wäre. Hervorzuheben ist aber auch, daß immer eine Xanthophyll-Konzentration im Bereich der Sättigung im Versuchsansatz gegeben sein muß, da sonst der Effekt der Chl*a*/*b*-Variation durch die limitierende Wirkung der Xanthophylle maskiert wird (Abb. 3.11).

Die unterschiedliche Entwicklung der beiden Reaktionszeiten läßt den Versuch einer Beschreibung der molekularen Vorgänge zu. Basis für die folgende Interpretationen, ist die Kristallstruktur des LHCII, aufgelöst bei 3.8 Å (Abb. 4.1). Bei dieser Auflösung kann nicht zwischen Chl*a* und Chl*b* unterschieden werden. Die sieben Chle wurden über theoretische Überlegungen um die beiden zentralen Xanthophylle angeordnet. Die Xanthophylle soll diese Chl*a*-Moleküle vor photooxidativen Schäden schützen. Chl*b* gibt seine Anregungsenergie so schnell an Chl*a* weiter, daß es nicht durch die Xanthophylle geschützt werden muß (KÜHLBRANDT ET AL., 1994). Diese Anordnung der Chle konnte teilweise durch Mutationsanalysen bestätigt werden (ROGL & KÜHLBRANDT, 1999; REMELLI ET AL., 1999). Jedoch sind auch gegenteilige Anordnungen durch spektroskopische Untersuchungen vorgeschlagen worden (TRINKUNAS ET AL., 1997). Darüber hinaus gründet sich der in dieser Arbeit vorgeschlagene molekulare Mechanismus auf die von KÜHLBRANDT und Mitarbeiter (1994) angenommenen, nichtkovalenten Bindungsmechanismen der Chle über Salzbrücken von Aminosäuren und Pigment-Pigment Bindungen.

Vier Chle werden über Chle als Liganden im Komplex gebunden. Es handelt sich um die in der Kristallstruktur bezeichneten Chle  $a_3$ ,  $a_7$ ,  $b_1$  und  $b_2$ . Bei den bindenden Chlen handelt es sich um 3-4 Chl*a* und 2-3 Chl*b*. Die Variation ist durch die Chl-Position  $a_3$  gegeben, die entweder Chl*a* oder Chl*b* binden kann. Drei Chle,  $a_3$ ,  $a_4$  und  $b_3$ , werden über Salzbrücken gebunden (KÜHLBRANDT ET AL., 1994; ROGL & KÜHLBRANDT, 1999; REMELLI ET AL., 1999).

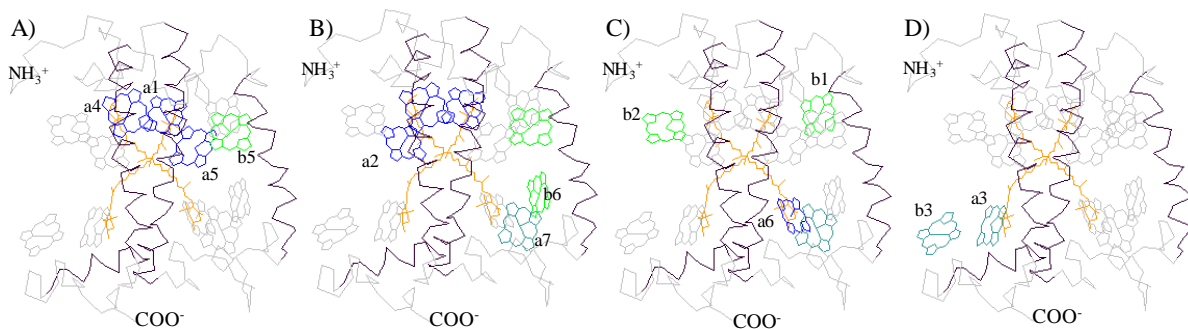


Abb. 4.1 Kristallstruktur nach Kühlbrandt et al., 1994. Helicale Bereiche schwarz, restliche Bereiche des LHCII grau unterlegt, Amino- und Carboxyterminus angegeben. Nomenklatur der Pigmentbindungsstellen nach KÜHLBRANDT ET AL. (1994). Zentrale Xanthophylle orange. Chl*a* blau, Chl*b* hellgrün, Stellen mit gleicher Affinität zu Chl*a* und Chl*b* türkis (ROGL & KÜHLBRANDT, 1999; REMELLI ET AL. 1999). A) Chle, die über Salzbrücken gebunden werden sowie Position  $a_3$ , Histidin-gebunden. B) Chle, die als Liganden dienen. C) Chl-gebundene Chle. D) restliche Chle.

Die beschleunigende Wirkung eines hohen Chl*a*-Anteils für  $\tau_2$ , könnte durch die frühe Bindung von Chlen an den zentralen Helices des LHCII hervorgerufen werden. Dabei handelt es sich überwiegend um mit Chl*b* besetzte Positionen. Eine bevorzugte, frühe Bindung von Chl*a* wird unterstützt von der Annahme eines höheren Anteils von Chl*a* (2:1)

an den strukturell wichtigen Salzbrücken. Die Besetzung der, für die thermische Stabilität wichtigen Position  $a_3$  (His68 gebunden), erfolgt ebenfalls mit Ch $b$  (REMELLI ET AL., 1999; YANG ET AL.; 1999). Die Jononringe der beiden zentralen Xanthophylle befinden sich in der unmittelbaren Nähe der beiden salzbrückengebundenen Ch $b$  und könnten so früh miteinander wechselwirken. Dies wäre ein Hinweis auf die kooperative Faltung des LHCII einerseits und die jeweils limitierende Wirkung von Ch $b$  oder Xanthophyllen andererseits. Die drei Chle, die über die Salzbrücken gebunden sind ( $a_3$ ,  $a_4$ ,  $b_5$ , Abb. 4.1 A), sind ebenfalls Liganden für die pigmentgebundenen Chle ( $a_3$ ,  $a_7$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ , Abb. 4.1 C). Auch bei den weiteren pigmentbindenden Chlen ( $a_3$ ,  $a_7$ ,  $b_6$ ) wird vornehmlich Ch $b$  benötigt (Abb. 4.1 B). Insgesamt würde bis zu diesem Zeitpunkt mehr Ch $b$  gebunden werden.

Im weiteren angenommenen Ablauf, wäre ein ausgeglichenes Pigmentverhältnis für die gleichmäßige, zügige Besetzung der pigmentassoziierten Chl-Bindungsstellen und der Chle im Bereich der Helix 4 notwendig (Abb. 4.1 C,D). Diese Annahme beschreibt das Optimum der Reaktionszeit  $\tau_3$ , bei einem annähernd ausgeglichenen Chl-Verhältnis. Es würde zu diesem Zeitpunkt auch die native Ausrichtung der amphiphilen Helix 4 erfolgen.

Bei hohem Chl $b$ -Anteil ist entsprechend eine langsamere Reaktionszeit  $\tau_2$ , gegeben, da die Bindung des, in geringerer Konzentration vorliegenden Ch $b$ , länger benötigt. Chl $b$  könnte, alternativ zu diesem Erklärungsansatz, Positionen von Ch $b$  im Komplex einnehmen, was aber aufgrund der niedrigeren Affinität dieser Bindungsstellen zu einer verlängerten Reaktionszeit führen würde. Die Möglichkeit, daß Bindungsstellen mit beiden Chlen jeweils besetzt werden können ist gegeben. Unterschiedliche Affinitäten von Ch $b$  und Chl $b$  für die Bindungsstellen des LHCII wurden berechnet (§. HOBE und H. FEY, nicht veröffentlicht).

Der Mangel an Chl $a$  im Reaktionsschritt  $\tau_2$  (hoher Chl $b$ -Anteil) oder von Chl $a$  bzw. Chl $b$  bei Reaktionsschritt  $\tau_3$  (außerhalb eines ausgeglichenen Chl-Verhältnisses), kann durch eine höhere Gesamtkonzentration an Chl verringert werden und unterstreicht die Vermutung der limitierenden Wirkung der Pigmente in den einzelnen Reaktionsphasen der Rekonstitution.

Der Amplitudenquotient der Reaktionszeiten von  $\tau_2$  und  $\tau_3$  erhöht sich mit steigender Chl-Verhältnis. Nach dem oben aufgeführten, hypothetischen molekularen Ablauf der Phasen der Rekonstitution, könnte dies in einer schnelleren Besetzung der Ch $b$ -Bindungsstellen begründet sein, da Chl $a$  dann nicht im Mangel vorliegen würde. Unterstützt wird diese Annahme durch die Amplitudenquotienten der Ch $b$ / $b$ -Variationen. Mit hohem Chl $a$ -Anteil in der angebotenen Rekonstitutionslösung, ist die Reaktionszeit  $\tau_2$  dominierend, was durch einen hohen Energietransfer schon frühzeitig ( $\tau_2$ ) in der Rekonstitution wider gespiegelt wird. Dabei wird für die Position  $a_2$ , wegen seinen spektralen Eigenschaften, eine zentrale Rolle für die Energieweiterleitung an die minoren Antennen, angenommen (REMELLI ET AL., 1999). Bei hohem Chl $b$ -Anteil ist jedoch die langsamere Reaktionszeit  $\tau_3$ , an der Signaländerung am stärksten beteiligt, was auf eine spätere Ausbildung des optimalen Energietransfers hindeutet und eine späte Besetzung der Position  $a$  hindeutet (Abb. 3.8 D).

Die Frage des Rekonstitutionsausbeute bei unterschiedlich angebotenen Chl $b$ / $b$ -Verhältnissen muß unbeantwortet bleiben. Durch die bei Kap. 4.5 geschilderte Problematik der Berechnung von Ausbeuten, kann nur mit Hilfe der Signaländerung der Chl-Emission der Erfolg annähernd bestimmt werden. Die Bezugsgröße dieser Methode, die Fluoreszenzemission des freien Chl $b$ , variiert bei unterschiedlichen Chl $a$ / $b$ -Verhältnissen. Da selbst bei einem hypothetisch gleichen Erfolg der Rekonstitution, unterschiedliche Anteile an freien Chl $a$  und Chl $b$  vorliegen, dadurch tritt ein starker artifizieller Effekt bei der Berechnung der

Ausbeute auf. Dies ist bei einer Variation der Gesamtchlorophyllmenge ebenso in Betracht zu ziehen. Vor allem bei sehr hohen Chl-Konzentrationen, muß der rechnerische Wert für die Ausbeute aufgrund des hohen Hintergrundsignals der freien Pigmente fallen.

#### 4.10 Native Lipide zeigen keinen spezifischen Einfluß auf die Rekonstitution des LHCII

Die *in vitro* Rekonstitution des monomeren LHCII ist ohne native Lipide möglich (Abb. 3.16). Das steht im Gegensatz zu Untersuchungen, die besonders  $\Delta$ -3-trans-Hexadecenyl-Phosphatidylglycerin als wichtige intrinsische Komponente des LHCII entdeckten. Das Lipid konnte auch nicht durch Detergens-Waschungen entfernt werden (NUßBERGER ET AL., 1993; TRÉMOLIÈRES ET AL., 1994). Jedoch wurden Rekonstitutionen des LHCII ohne Lipide auch schon mit Pigmenten aus acetonisch gefälltem Thylakoiden beschrieben (LUMLEY & SCHMIDT, 1987). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß assoziierte Lipide bei der acetonischen Fällung mit verschleppt werden. KRUPA und Mitarbeiter (1992) haben sogar eine Verhinderung der Rekonstitution beobachtet, wenn andere Lipide als das native PG mit der oben genannten Fettsäure verwendet wurde. Diese Beobachtung stimmt nicht mit den in dieser Arbeit gemachten überein, jedoch wurden auch unterschiedliche Rekonstitutionsysteme verwendet.

Der ohne Lipide rekonstituierte LHCII wurde jedoch nicht auf seine Trimerisierungsfähigkeit hin untersucht. Dazu ist PG zwingend notwendig, aber nicht  $\Delta$ -3-trans-Hexadecensäure als Fettsäurebestandteil des PG (NUßBERGER ET AL., 1993, HOBE ET AL., 1994). Auch wurde PG als Komponente des monomeren LHCII aufgrund von spektroskopischen Beobachtungen beschrieben (NUßBERGER ET AL., 1994). Eine spektroskopische Charakterisierung mittels der in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenz-Spektroskopie ermöglicht keine Rückschlüsse auf diese enge Wechselwirkung.

Die Erhöhung der Konzentration aller untersuchten Lipide verlängert die Rekonstitutionszeiten  $\tau_2$  und  $\tau_3$ , in gleichem Maße (Abb. 3.16 und 3.17). Dabei ist bei DPPG und DOPG eine nicht-lineare Verlängerung der Reaktionszeiten in Abhängigkeit von der Lipid-Konzentration zu beobachten. Eine Verdopplung der Standardkonzentration (Kap. 2.2.9) führt zu einer Verlängerung der Rekonstitution um den Faktor 1,2, während die fünffache Lipid-Konzentration auch eine um den Faktor fünf verlängerte Reaktionszeit bewirkt. Da beide Phospholipide keinen unterschiedlichen Einfluß auf die Reaktionszeit zeigen, kann ein Effekt der Kettenlänge der Fettsäuren ausgeschlossen werden. OG hat einen deutlich stärkeren Effekt auf die Reaktionszeiten als die Phospholipide. Eine annähernd zehnfachen Reaktionszeit erfolgt bei einer Vervielfachung der Konzentration der Micellen (Verdopplung der OG-Konzentration). Obwohl PG fest mit dem LHCII assoziiert ist, war kein spezifischer Effekt auf die Faltungskinetik des LHCII zu beobachten.

DGDG und MGDG zeigen im untersuchten Bereich eine lineare Verlängerung der Reaktionszeiten bei steigender Lipid-Konzentration. Es ist aber keine Aussage zur weiteren Entwicklung dieser Tendenz mit Konzentrationen über 0,08% [w/v] Lipid möglich (Abb. 3.17). Die Experimente konnten wegen der aufwendigen Isolierung dieser Lipide, nur bis zu einer doppelten Standardkonzentration durchgeführt werden. Beide Galactolipide haben eine vergleichbare Verlängerung der Reaktionszeiten zur Folge. Dies ist erstaunlich, da für DGDG im Gegensatz zu MGDG, mehrere periphere Bindungsstellen am LHCII vermutet werden (NUßBERGER ET AL., 1993). MGDG wird auch bei Untersuchungen zum Lipidgehalt der photosynthetischen Pigment-Protein-Komplexe eher dem PSII und besonders CP47 und nicht dem LHCII zugeordnet (TRÉMOLIÈRES ET AL., 1994). Beide Reaktionszeiten der Rekon-

stitution werden gleich beeinflusst. Die Galactolipide besitzen bei einer Verdopplung der Konzentration einen stärkeren Effekt auf die Reaktionszeiten als Phospholipide.

$A_2/A_3$  bleibt über einen weiten Konzentrationsbereich ohne Tendenz. Lediglich bei Konzentrationen über 0,12% [w/v] Lipid, fällt der Quotient auf unter 0,5 und deutet somit einen größeren Anteil der dritten Reaktionszeit an der Etablierung des Energietransfers an. Dies ist eine Entwicklung, die ebenfalls bei OG-Konzentrationsänderung zu beobachten ist und unterstützt die Annahme eines ähnlichen Effektes von Lipiden und Detergentien (Kap. 4.7.1) Die nativen Lipide scheinen ebenfalls verdünnend auf die Reaktanten-Konzentration zu wirken. Damit wird aber die Frage nach dem Mechanismus dieser Verdünnung durch Lipide aufgeworfen.

Vergleiche der reinen OG-Micellen mit den OG-PG-Mischmicellen konnten einen Hinweis geben. Zur Beurteilung der Geometrie des Detergens-Lipidsystems wurde die CMC bei unterschiedlichen Detergens/Lipid-Verhältnissen bestimmt (Abb. 3.15). Dazu diente, im wäßrigen System unlösliches, Jod als Indikator für Micellen. Sobald Jod bei 360nm absorbiert, sind Micellen vorhanden. Eine höhere Absorbanz zeigt mehr Micellen an. Es zeigte sich keine CMC-Verschiebung, jedoch nahm die Absorbanz des Jods, aufgrund der Zugabe von Lipid, bei der Detergens-Lipid-Konzentrationsreihe nicht im selben Maße zu, wie bei der reinen Detergens-Reihe. Dieser Effekt war bei höheren Lipidanteilen stärker. Dies kann an einer anderen Geometrie der Micellen bei gleicher CMC liegen. Die deutlich länger-kettigen Fettsäuren der Lipide könnten zu mehr elliptischen Micellen mit größerem hydrophilen Volumen führen und somit die Löslichkeit des Jod herabsetzen. Andererseits ist es möglich, daß sich die Löslichkeit des Jods in den Mischmicellen von der Löslichkeit in reinen Detergens-Micellen unterscheidet. Der größere polare Anteil der Lipide könnte die Absorbanz des im Wasser unlösliche Jod im Vergleich zum OG verringern.

Von einer gleichen Anzahl an Detergens-Micellen ausgehend, läßt sich der Effekt nicht auf eine einfache Verdünnung der Reaktanten zurückführen. Es bleibt eine direkte Wechselwirkung der Lipidmoleküle mit den Reaktanten oder ein starker Einfluß der oben angedeuteten Geometrie der Micellen zu fordern. Auch die Micellengröße oder der Ausbildung von verschiedenen Micellentypen wurde mit Hilfe von Lichtstreuungsmessungen untersucht. Jedoch konnten keine eindeutigen Aussagen aufgrund der hohen Absorbanz des Lipid-Detergens-Systems getroffen werden (C. JEGERSCHÖLD, persönliche Mitteilung). Zur Klärung des Effektes der Mischmicellen auf die Absorbanz von Jod, sind zunächst grundlegende Untersuchungen zu Interaktionen im verwendeten Detergens-Lipid-System notwendig.

Die apparente Ausbeute an rekonstituiertem LHCII fällt bei hohen Konzentrationen an DPPG und DOPG ab. Eine Aussage zu ähnlich hohen Konzentration an DGDG und MGDG, ist aus dem oben genannten Grund nicht möglich. Native Diacyl-Glyceride haben bei frühen Untersuchungen zur Rekonstitution des LHCII ebenfalls die Ausbeute verringert (LUMLEY & SCHMIDT, 1987). Auch für bR ist eine Abnahme der Rekonstitutionsausbeute aufgrund von Lipiden beschrieben. Dieser Effekt bezieht sich aber auf Experimente mit Vesikeln und wird mit einem lateralen Druck der Lipide innerhalb der Vesikel auf das Protein erklärt (BOOTH ET AL., 1997; CURRAN ET AL., 1999).

Die Ergebnisse dieser und voriger Arbeiten geben, aufgrund des niedrigeren Verhältnisses der Fluoreszenz von 660 nm zu 680 nm, einen Hinweis darauf, daß Lipide die Energieübertragung im LHCII verbessern (SCHMIDT, 1995). Es bleibt zu klären, ob dies durch ein Meßartefakt unterstützt wird. Freies Chlb kann, durch zu niedrige Detergens-Konzentration, an eng benachbartes freies Chla Energie übertragen. Fluoreszenz-Emissionen der Negativ-

Kontrolle mit hohem Lipidgehalt, zeigen im Gleichgewicht aber eine nur leichte Zunahme der Fluoreszenz bei 680 nm. Die Zunahme reicht nicht aus, um die höhere Energieübertragung bei Rekonstitutionen mit hoher Lipid-Konzentration zu erklären.

Der Effekt der nativen Lipide auf den LHCII ist weit von dem Effekt von Phospholipiden auf Lactose-Permease entfernt. Die Lipide haben einen, den Chaperones ähnlichen, Einfluß auf die Faltung der Lactose-Permease (BOGDANOV, 1999). Insgesamt bleibt es erstaunlich, daß kein spezifischer Effekt der nativ mit dem LHCII assoziierten Lipide, DGDG und PG, feststellbar ist, obwohl PG ein am monomeren LHCII festgebundenes Lipid und DGDG ein zumindest peripher gebundenes Lipid ist (NUßBERGER ET AL., 1993). Ein Effekt wäre auch aufgrund des verwendeten Vorläuferproteins pLhcb1, möglich gewesen. MGDG scheint spezifisch an den Transitsequenzen der Proteine zu binden, die in den Chloroplasten Import werden (PINNADUWAGE & BRUCE, 1996).

#### 4.11 Abiotische Faktoren beeinflussen spezifisch die Rekonstitution des LHCII

##### 4.11.1 Höhere Temperaturen verkürzen die Reaktionszeit

Die Erhöhung der Temperatur verkürzt die Rekonstitutionsdauer, bezogen auf die Chl $b$ -Emission, bis zu einer Temperatur von 25°C (Abb. 3.20). Dabei werden beide Reaktionszeiten im gleichen Maße beeinflusst. Die höheren Temperaturen lassen die Faltung entsprechend der grundlegenden thermodynamischen Gesetzmäßigkeiten schneller ablaufen (VOET & VOET, 1994). Bei 30 °C verlängert sich die Rekonstitutionszeit wieder. Dies könnte auf eine Schädigung der Chl $a$  aufgrund der hohen Temperatur zurückzuführen sein. Der Komplex selber könnte auch eine leichte Dissoziation erfahren. Versuche zur Stabilität des LHCII werden zum Teil bei nur 7°C höheren Temperaturen durchgeführt (YANG ET AL., 1999; HOBE ET AL., 2000).

Im Unterschied zu den Chl $b$ -Datensätzen, zeigen die beiden Reaktionszeiten der Chl $a$ -Signaländerungen eine unterschiedliche Entwicklung bei Temperaturerhöhung. Die Reaktionszeit  $\tau_2$  verlängert sich kontinuierlich, während bei  $\tau_3$  ein Optimum bei 20°C vorhanden ist. Auch die Verkürzung der Reaktionszeiten von annähernd 90%, ist deutlich höher als die der Chl  $b$ -Signaländerung.

Eine mögliche Erklärung ist der Einfluß der Signaländerung der freien Pigmente bei verschiedenen Temperaturen (Kap. 4.3). Die lineare Signalabnahme beträgt bei Standardtemperaturen ca. 3%, bezogen auf das Ausgangssignal. Bei höheren Temperaturen steigt dieser Anteil auf mehr als den doppelten Wert, da die Pigmente stärker geschädigt werden, verstärkt also diesen Effekt noch, der hauptsächlich auf die Rekonstitutionszeit  $\tau_3$  Einfluß hat. Dieser Erklärungsansatz wird durch eine Betrachtung der Gesamtemissionsänderung bestätigt. Die Chl $b$ -Signaländerung bleibt über den gesamten Temperaturbereich gleich, bei der Chl  $a$ -Emission ist jedoch eine Abnahme von ca. 30% des Signals bei 30°C zu beobachten. Der Meßartefakt macht sich deutlich bemerkbar.

Der Anteil der Reaktionszeit  $\tau_2$  an der Etablierung des Energietransfers überwiegt mit zunehmender Temperatur. Diese Verschiebung ist auf eine verstärkte Pigmentbindung in der frühen Phase der Rekonstitution zurückzuführen. Die Reaktanten treffen aufgrund der höheren Molekülbewegung mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zusammen, eine Optimierung der Ausrichtung der Pigmente des Komplexes wäre eher temperaturunabhängig.



#### 4.11.1.1 Aktivierungsenergie der Rekonstitution des LHCII

Die Aktivierungsenergie beschreibt die Energiebarriere, die überwunden werden muß, damit ein System von einem stabilen Zustand, d.h. von einem potentiellen Energieminimum zu einem anderen gelangen kann. Diese Energie läßt Rückschlüsse auf die Wechselwirkungen innerhalb des Systems zu, da für einzelne Wechselwirkungen zwischen Molekülen die entsprechenden Energien bestimmt wurden (STRYER, 1988; GLASER, 1996).

Zur Beschreibung der Aktivierungsenergie der Rekonstitution des LHCII werden die Signaländerung des Chl<sub>a</sub> nicht mit einbezogen. Aufgrund der oben beschriebenen, gegenläufigen Komponente vor allem bei hohen Temperaturen, wären nur drei Meßwerte ohne Einschränkung zur Erstellung einer Arrhenius-Gleichung brauchbar.

In vorigen Arbeiten zur Rekonstitution des LHCII wurde die Aktivierungsenergie der Rekonstitution mit  $30 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  ermittelt (SCHMIDT, 1995). Dabei wurden keine Werte über  $25^\circ\text{C}$  zur Berechnung herangezogen, da ebenfalls artifizielle Einflüsse angenommen wurden. Ein Unterschied zu der in dieser Arbeit ermittelten Aktivierungsenergie, besteht in der Berechnung von lediglich einem Wert, da in der vorigen Arbeit nicht die Komponente  $\tau_3$  aufgelöst werden konnte. Es wurde eine leicht niedrigere Aktivierungsenergie für die Rekonstitution des LHCII von  $18 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  für  $\tau_2$  und  $5 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  für  $\tau_3$  ermittelt, was auf die unterschiedlichen Berechnungsgrundlagen zurückzuführen ist.

Diese Aktivierungsenergie liegt im Bereich, der auch für andere Proteine beschrieben wurde. Für das Kälteschockprotein CspB wurden  $11 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  ermittelt (SCHINDLER ET AL., 1995). Für Nuclease von Staphylokokken (Snase) wurden mehrere Aktivierungsenergien bestimmt, die annähernd isoenergetisch für den Übergang zwischen drei Intermediaten sind ( $1,9 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  bzw.  $0,4 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ ) und im letzten Schritt zum nativen Protein eine, der Aktivierungsenergie des LHCII sehr ähnlichen, Energie von  $18 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  besitzt (SU ET AL., 1996). Für das Membranprotein Di-Acylglycerin-Kinase ist die Aktivierungsenergie zur Denaturierung der jeweilige Domäne des Proteins experimentell bestimmt worden. Für den cytosolischen Anteil des Proteins wurden  $24 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  herausgefunden, die Transmembrandomäne war mit  $65 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  ca. dreimal stabiler ermittelt worden (LAU & BOWIE, 1997). Die Aktivierungsenergie, die für Cytochrome-c-Oxidase bestimmt wurde liegt mit  $164 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  deutlich über dem Wert, der für den LHCII errechnet wurde (MORIN ET AL., 1990). Ebenfalls eine sehr hohe Aktivierungsenergie wurde für die Plasmamembran-Calciumpumpe bestimmt, diese unterscheidet sich mit einem Wert von ca.  $222 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  um eine Größenordnung von der Aktivierungsenergie des LHCII (LEVI ET AL., 2000).

Die Aktivierungsenergie des LHCII für  $\tau_2$  liegt im Bereich von Molekülen, die über elektrostatische oder Wasserstoffbrücken gebunden sind ( $12 - 29 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ ) und für  $\tau_3$  im Bereich von van der Waals Wechselwirkungen ( $4 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ ) (STRYER, 1988). Jedoch wirken in einer „Poly“peptidkette viele Moleküle in vielfältiger Weise aufeinander und können einzelne Bindungsenergien verstärken oder schwächen. Die Unterscheidung in der Qualität der Bindungen wäre auch beim LHCII anhand von Ergebnissen zur Pigmentvariationen aufrecht zu erhalten. Beide Reaktionszeiten zeigen Pigmentbindungen und diese müßten eine ähnliche Aktivierungsenergie in beiden Phasen der Rekonstitution erfordern. Wenn in der letzten Phase nur noch wenige Pigmente gebunden würden, so könnte die Aktivierungsenergie für  $\tau_3$ , die Ausrichtung der Pigmente durch Änderung der van der Waals Wechselwirkungen, andeuten.

#### 4.11.2 Niedrige pH-Werte verlängern die Rekonstitutionszeit

Der verzögernde und die Ausbeute verringernde Einfluß eines sinkenden pH-Wertes (Abb. 3.22 und 3.23), läßt sich über die Protonierung der Histidine des LHCII erklären. Zwei Histidine binden Chl, His68 und His212 (KÜHLBRANDT ET AL., 1994; REMELLI ET AL., 1999). Das an der amphipathischen Helix 4 bindende His212, dürfte dabei nicht den entscheidenden Einfluß ausüben. Dies wird durch Punktmutationen dieser Aminosäure gezeigt, die nicht eine entscheidende Rolle dieser Bindungsstelle in der Stabilität des Komplexes zuweisen (YANG ET AL., 1999). His68 bindet Chl an einer zentralen Stelle des Komplexes. Diese Bindungsstelle wird auch bei den Untersuchungen zum Chl *a/b*-Verhältnis als wichtige Position gefunden (Kap. 4.9) und bei Punktmutationen der Position, ebenfalls als wichtige Bindungsstelle beschrieben (YANG ET AL., 1999).

#### 4.11.3 Hohe Viskosität verlängert die Rekonstitutionszeit

Mit zunehmender Viskosität verlängern sich die Reaktionszeiten,  $\tau_2$  und  $\tau_3$ , im selben Verhältnis (Abb. 3.25). Die Reaktanten scheinen aufgrund der hohen Viskosität nicht schnell miteinander in Wechselwirkung treten zu können. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit wäre eine Einschränkung der intramolekularen Beweglichkeit des Pigment-Protein-Komplexes durch die hohe Viskosität, was zu einer verzögerten Etablierung des Energietransfers führen würde. Eine hohe Viskosität vervierfacht den Anteil der langsamen Reaktionszeit  $\tau_3$  an der Etablierung des Energietransfers. Damit entspricht dies dem Einfluß einer Erhöhung der Lipid- bzw. Detergens-Konzentration und zeigt eine entgegengesetzte Entwicklung zur Erhöhung der Temperatur und der Pigmentkonzentration. Es wäre somit eine „apparente Verdünnung“ der Reaktanten durch die hohe Viskosität denkbar.

Die Chl *a*-Emissionsänderungen bestätigen den Effekt auf die Rekonstitution des LHCII, der bei Chl *b*-Emissionen aufgezeigt ist. Lediglich bei der höchsten Glycerin-Konzentration ist ein Unterschied zur Chl *b*-Signaländerung gegeben. Die kinetische Funktion, mit der die Signaländerung der Chl *a*-Emission beschrieben werden kann, ist nur noch monoexponentiell. Dies liegt an dem in Kap. 4.3 beschriebenen, unterschiedlichen Effekten der verbliebenen freien Pigmente auf die Signaländerungen.

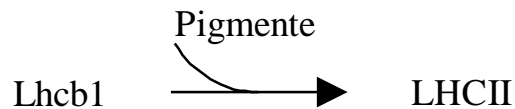
Die apparente Ausbeute der Rekonstitution fällt kontinuierlich mit steigender Glycerin-Konzentration und legt nicht-optimale Versuchsbedingungen nahe. Die Rekonstitution von Lysozym, kann bis zu einer Glycerin-Konzentration von 99,8% durchgeführt werden, dabei wird aber nur eine Aktivität von ca. 6% erreicht (RARIY & KLIBANOV, 1997). Bei optimalen Bedingungen (20 – 30% Glycerin) können 61% Aktivität des Lysozyms festgestellt werden. Die Aktivität ist aber immer noch deutlich geringer als im wäßrigen System. Die maximale Aktivität des Lysozyms wird bei 99% Glycerin erst nach 40 h erreicht (RARIY & KLIBANOV, 1997). Glycerin verlängert die Faltung des Lysozyms enorm. Im Vergleich dazu ist die Änderung der Reaktionszeiten der Rekonstitution des LHCII moderat. Mit zunehmendem Glycerin-gehalt aggregierte Lysozym stärker und senkt somit die Aktivität. Das muß nicht der Grund für die geringere Ausbeute des LHCII bei hohen Glycerin-Konzentrationen sein. Bei Lysozym wird eine verringerte Reoxidation in Glycerin und somit die Bildung der Disulfidbrücken verhindert, eine intramolekulare Bindung, die der LHCII nicht besitzt.

### 4.12 Mögliche Reaktionstypen der Rekonstitution des LHCII

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen keinen eindeutigen Schluß auf den Mechanismus der Rekonstitution des LHCII zu. Ebenfalls ist es nicht möglich, einen Rückschluß auf einen

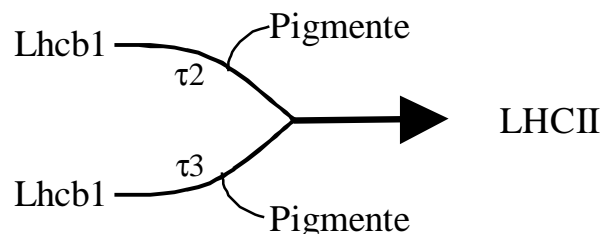
Reaktionstypus anhand der gewonnenen Daten zu bekommen. Das Für und Wider der möglichen Reaktionstypen soll aber einen Eindruck, vor allem vor dem Hintergrund der Diskussion über prinzipielle Theorien zur Proteinfaltung, geben.

a) Hochkooperativer Mechanismus nach dem „Two-state“ Modell



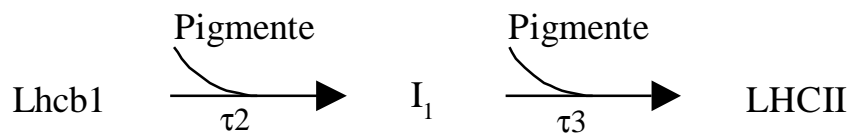
Dieser Reaktionsmechanismus läuft mit einer Kinetik höherer Ordnung ab, die durch die in dieser Arbeit verwendete, biexponentielle Funktion angenähert beschrieben werden kann. Jedoch wäre dann bei einem solchen Reaktionsmechanismus eine Anpassung der Meßwerte an eine Funktion vom Typ „Power“ an die Datenpunkte möglich (LEESON ET AL., 2000). Dies war nur selten bei den in dieser Arbeit beschriebenen Rekonstitutionen erreichbar und zwar bei sehr schnellen Rekonstitutionsbedingungen (höhere Temperatur in Kombination mit hohem molaren Überschuß an Pigmenten und einem Versuchsaufbau mit der „Rapid-Mixing“-Methode). Diese Signaländerungen der Rekonstitutionen waren auch mit einer triexponentiellen Funktion im selben Maße anpaßbar. Unterstützt wird dieses Modell durch die Abwesenheit eines Intermediates, obwohl viele Reaktionsparameter variiert wurden und durch die kooperative Eigenschaft der Rekonstitution, bei der alle Komponenten zur korrekten Faltung benötigt werden. Ein deutlicher Hinweis auf die Gültigkeit dieses Modells gibt die gleichförmige Veränderung der Reaktionszeiten bei fast allen Versuchsreihen dieser Arbeit.

b) Parallele Faltungswege aufgrund unterschiedlicher Ausgangsbedingungen



Zwei ungleiche Ausgangszustände des pLhcb1 führen zu unterscheidbaren Reaktionszeiten. Unterschiedliche Ausgangszustände zur Rekonstitution von Kälteschockproteinen wurden durch einen laserinduzierten, variablen Temperatursprung der Rekonstitutionlösung erreicht (LEESON ET AL., 2000). Durch diese verschiedenen Ausgangsbedingungen faltete sich das Protein unterschiedlich schnell zurück. Beim Lhcb1 könnte unterschiedlich denaturiertes Apoprotein für die beiden Reaktionszeiten verantwortlich sein oder zwei Populationen an Apoprotein haben unterschiedliche Affinitäten zu Pigmenten und falten sich dementsprechend schnell. Denkbar wäre dies für die Untersuchung zur Ch**a**/**b**-Variation folgendermaßen: Bei einer Population des Proteins liegt in einem schnellen, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt eine hohe Affinität zu Ch**a** vor, die andere Population besitzt aber für beide Pigmente eine gleich hohe Affinität. Die Folge wäre die, in Kap. 4.9 beschriebene, Aufspaltung der Reaktionszeiten. Aber dazu müßte ebenfalls ein, jeweils bei allen Rekonstitutionen, gleiches  $A_2/A_3$ -Verhältnis vorhanden sein, da von einer gleichen Ausbeute der Rekonstitutionen der beiden Populationen ausgegangen werden sollte. Diese Konstanz ist aber nicht gegeben.

## c) Sequentielle Proteinfaltung mit definierten Zwischenstufen



Dieser Reaktionstyp wird durch *Chl a/b*-Variationen angedeutet. Das ist jedoch der einzige Hinweis auf einen solchen Mechanismus und zusätzlich kann dieser molekulare Mechanismus, der bei Kap. 4.9 angenommen wird, auch bei einem hochkooperativen Reaktionstyp ablaufen, denn es ist eine Reihenfolge der Pigmentbindungen auch bei einer „Two-state“-Reaktion nicht auszuschließen. Es wurde kein Intermediat gefunden, jedoch werden für die Faltung wichtige Intermediate für Proteine im Allgemeinen, auch als zu labil angesehen, als daß sie isoliert werden könnten (CREIGHTON ET AL., 1996). Für Proteinintermediate wird auch das genaue Gegenteil diskutiert, Intermediate sind die Vorläufer zu Aggregaten und wären damit leicht zu entdecken. Diese Intermediate würden auch bei allen Proteinen unter geeigneten Umständen vorkommen (FINK, 1995; FINK, 1998, siehe zu Intermediaten auch Kap. 4.6). Bei den Untersuchungen an Lhcb1-Mutanten zu Pigmentaffinitäten, werden Komplexe mit weniger als der nativen Anzahl an Pigmenten isoliert. Dabei können aber maximal drei Pigmente fehlen und es zweifelhaft, ob es sich dabei um Intermediate auf dem Weg zum korrekt gefalteten Protein handelt (REMELLI ET AL., 1999; YANG ET AL., 1999; ROGL & KÜHLBRANDT, 1999; HOBE ET AL., 2000).

Die Zusammenschau aller zeitaufgelösten Rekonstitutionsversuche und das Fehlen von Intermediaten lassen auf einen kooperativen, hochmolekularen Mechanismus nach Modell a) schließen. Der definitive Ausschluß der beiden weiteren Modelle ist jedoch aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit nicht möglich, da Intermediate durch geschickte Wahl der Bedingungen noch abgefangen werden können und auch Modell b), parallele Faltungswege, läßt sich nicht ganz ausschließen, da in den überwiegenden Experimenten zwei Reaktionszeiten aufgelöst wurden. Jedoch ist dieses Modell mit der geringsten Wahrscheinlichkeit anzunehmen, da bei extremen Rekonstitutionsbedingungen  $\tau_3$  nicht mehr auflösbar war und nur vermutlich noch als weitere Komponente über einen sehr langen Zeitraum auflösbar wäre. Diese Untersuchung wird aber mit Nebeneffekten aufgrund der Alterung der Lösungen erschwert. Weiterhin steht dieses Modell im Widerspruch zu den Versuchen der *Chl a/b*-Variation in Bezug auf die Amplitudenquotienten der Reaktionszeiten (s.o.).

#### 4.13 Thermische Stabilität des rekonstituierten LHCII

Der rekonstituierte LHCII kann bei 47°C dissoziiert werden. Der Energietransfer bricht zusammen. Dieser Vorgang kann anhand der Zunahme der *Chl b*- und der Abnahme der *Chl a*-Emission beobachtet werden. Die Untersuchung des LHCII auf seine thermische Stabilität, gibt einen Hinweis auf stabilisierende oder destabilisierende Effekte. Mit 47°C wurde eine Temperatur gewählt, bei der eine Dissoziation des Komplexes in einer Geschwindigkeit abläuft, die sich für eine zeitliche Auflösung des Zerfalls sehr gut eignet. Temperaturen unter 40°C lassen den Komplex zum Teil unbeeinträchtigt. Werden Temperaturen deutlich über 50°C gewählt, so ist der Zerfall zu schnell, als daß Unterschiede auflösbar wären. Bei 47°C können sehr stabile Komplexe auch nach Abschluß der Messung und Aufnahme des Gleichgewichtsspektrum noch nicht völlig zerfallen sein, was an einer Schulter bei 680 nm zu erkennen ist (Abb. 3.9).

#### 4.13.1 Hohes Chl *a/b*-Verhältnis verringert die thermische Stabilität

Ein hoher molarer Überschuß an Chl zeigt keine Wirkung auf die Stabilität des LHCII. Ein Effekt ist lediglich bei der wiederholten Reassoziaton durch Temperaturwechsel zu beobachten. Ein Überschuß kann häufigere Reassoziationszyklen zulassen, was leicht durch die dann noch ausreichende Konzentration an intaktem Chl zu erklären ist.

Ein deutlicher Unterschied auf die Stabilität des Komplexes ergibt sich, wenn verschiedene Chl-Verhältnisse in der Rekonstitutionslösung angeboten werden. Dieses Angebot kann die Stöchiometrie der Pigmente in den Komplexen beeinflussen. Da nicht alle Chl-Bindungsstellen entweder nur Chl *a* oder Chl *b* binden, sondern mindestens drei Bindungsstellen die gleiche Affinität haben, werden diese Positionen vorzugsweise mit dem im Überschuß angebotenen Chl besetzt (REMELLI ET AL., 1999; S. HOBE, persönliche Mitteilung).

Wurde ein hohes Chl *a/b*-Verhältnis angeboten, so verringert sich der Energietransfer durch thermischen Streß des Komplexes mehr als doppelt so schnell wie bei einem LHCII, der mit einem niedrigen Chl *a/b*-Verhältnis rekonstituiert wurde. Eine Erklärung wäre durch einen erhöhten Anteil an Chl *a* im Komplex gegeben. Chl *b* könnte mit seiner polareren Formyl-Gruppe, im Vergleich zum Chl *a* und dessen Methyl-Gruppe, mehr Wasserstoffbrückenbindungen zu Aminosäureresten aufbauen und somit eine stärkere Bindung mit dem Protein eingehen. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß nicht die Menge des Chl *b* im Komplex ausschlaggebend für die erhöhte Stabilität ist, sondern die Besetzung der für die Stabilität wichtigen Chl *b*-Positionen mit Chl *b*. Die höhere Wahrscheinlichkeit eines Moleküls Chl *b* in diesen Positionen ergibt sich aufgrund des niedrigen Chl *a/b*-Verhältnisses in der Rekonstitutionslösung. Eine dieser möglichen Bindungsstellen ist  $\delta$  an der Helix 2 des LHCII. Diese Position stellte sich nach Aminosäureaustausch durch Punktmutation, als sensitiv für die Stabilität des Komplexes heraus (YANG ET AL., 1999; ROGL & KÜHLBRANDT, 1999). Dies könnte unter anderem in der Wechselwirkung mit zwei weiteren Chl begründet sein, für die keine Bindungsstellen am Protein lokalisiert wurden. Position  $\epsilon$  wird dabei als Ligand für ein Chl in der Position  $\alpha$  angesehen, welches wieder als Ligand für Position  $\delta$  notwendig ist (REMELLI ET AL., 1999). Die Bindungsstelle  $\alpha$  besitzt als Liganden Histidin. In Mutationsexperimenten wurde Histidin ersetzt, mit der Folge einer geringeren thermische Stabilität gegenüber dem Wildtypprotein (YANG ET AL., 1999). In weiteren Mutationsuntersuchungen wurde diese Position als Chl *a*-Bindungsstelle angesehen (REMELLI ET AL., 1999). Ein höheres Chl *b*-Angebot könnte diese Position aber mit Chl *b* besetzen und eine höhere Stabilität durch weitere Ausbildung von Wasserstoffbrücken ermöglichen.

Die in dieser Arbeit gefundenen Effekte auf die Stabilität des LHCII durch Chl *e*, unterstützen Beobachtungen, die bei Trimerisierungsversuchen gemacht wurden. Es wurden stabile Trimere gebildet, die rechnerisch nur ein Chl *a* pro Trimer gebunden hatten. Umgekehrt sind jedoch Komplexe mit stark abgereichertem Chl *b* nicht stabil (KLEIMA ET AL., 1999; S. HOBE, persönliche Mitteilung).

#### 4.13.2 Native Lipide erhöhen die thermische Stabilität

Die in dieser Arbeit untersuchten Lipide stabilisieren den LHCII gegen thermischen Streß. Die Phospho- und Galactolipide unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer Wirkung (Abb. 3.18). Der stabilisierende Effekt wird mit zunehmendem Anteil der Lipide in den Detergens-Lipid-Mischmicellen größer. Im Gegensatz zur den Rekonstitutionsversuchen unterscheiden sich die Detergentien und Lipide in ihrem Einfluß auf die Stabilität drastisch. Erhöhte Detergens-Konzentrationen führten dazu, daß die Komplexe keinen Zusammenbruch des Ener-

gietransfers aufgrund des Temperatursprungs mehr zeigten. Die Chl $b$ -induzierte Chl $a$ -Emission war nicht mehr vorhanden. Die Pigment-Protein-Komplexe sind schon während der Lagerung durch die hohen Detergens-Konzentrationen zerfallen. Detergentien destabilisieren vor allem die Helix-Helix Interaktionen der Membranproteine (STURGIS ET AL., 1998). Ein weiterer Ansatz um Detergens-Protein Interaktionen abzuschätzen, ebenso wie einen unterschiedlichen Effekt der Lipide, z.B. bezüglich der Affinitäten zum Protein, wäre mit bromierten Detergentien möglich (FORESTA ET AL., 1996).

Untersuchungen von anderen Autoren zeigen ebenfalls eine stabilisierende Wirkung von Lipiden bei *in vitro* Systemen. Aus der Membran extrahiertes und anschließend in Phospholipid-Detergens-Micellen rekonstituiertes bR, ist thermisch instabiler und gegenüber pH-Wert Veränderungen sensibler als bR in der nativen Membran (BROUILLETES ET AL., 1989). Die thermische Stabilität von in Vesikeln rekonstituierter Cytochrom-c-Oxidase wird durch Phospholipide erhöht, jedoch nicht alle Untereinheiten werden dadurch beeinflusst (MORIN ET AL., 1990). Tyrosinase und zwei verwandte Proteine werden durch native Lipide in Detergens-Micellen stabilisiert. Die drei Membranproteine werden durch völlige Entfernung der Lipide destabilisiert (JIMENEZ-CERVANTES ET AL., 1995). Verschiedene Phospholipide stabilisieren die Plasmamembran-Calciumpumpe, abhängig von ihrer Affinität zum Protein und zeigen somit eine spezifische Eigenschaft der Lipide, die in dieser Arbeit nicht gefunden wurde (LEVI ET AL., 2000). Aber Lipide können auch gegenteiliges Bewirken. PG scheint die thermische Stabilität von Hitzeschock-Protease (HtrA) zu destabilisieren (KORKO-GLONEK ET AL., 1997).

#### 4.13.3 Abiotische Faktoren beeinflussen spezifisch die thermische Stabilität

Die Rekonstitutionstemperatur zeigt keinen Einfluß auf die thermische Stabilität des LHCII. Die Rekonstitution des LHCII läuft bei hohen Temperaturen, ebenso wie bei einem hohen Chl  $a/b$ -Verhältnis, sehr schnell ab. Mit einem hohen Chl  $a/b$ -Verhältnis rekonstituierter Komplex ist deutlich instabiler als der bei hohen Temperaturen mit Standardpigment-Verhältnis rekonstituierte LHCII. Somit kann davon ausgegangen werden, daß nicht eine zu schnelle Faltung des Komplexes der Grund für den thermisch instabilen LHCII ist. Dieser Vergleich bestätigt vielmehr, daß es an der Pigmentzusammensetzung der Rekonstitutionslösung liegen muß, die sich im Chl  $a/b$ -Verhältnis im LHCII widerspiegelt.

Entgegen der Erwartung aufgrund biochemischer Laborpraxis, bei der Glycerin zur Stabilisierung von Proteinen eingesetzt wird, wirkt eine hohe Glycerin-Konzentration nicht erhöhend auf die thermische Stabilität des LHCII. Jedoch ist eine genaue Aussage zu diesem Phänomen nicht möglich. Bei Glycerin-Konzentrationen über 20% [w/v], war sogar eine Abnahme der Chl $b$ -Fluoreszenz zu beobachten. Dies ist ein artifizielles Signal, das ohne weitere Untersuchungen des Glycerineinflusses nicht interpretiert werden kann.

Der pH-Wert beeinflusst die thermische Stabilität des rekonstituierten LHCII. Bei einem pH-Wert < 7 zerfällt der LHCII doppelt so schnell wie bei Ansätzen mit höherem pH-Wert. Die Protonierung des Histidin, vor allem an der Chl-Bindungsstelle  $\epsilon_{5aa}$  an His68, scheint den LHCII sensibler gegen thermischen Stress zu werden. Diese Bindungsstelle war auch bei Mutationsanalysen des LHCII als stabilitätsbeeinflussend entdeckt worden (YANG ET AL., 1999).

#### 4.13.4 Native Lipide beeinflussen spezifisch die Reassoziation des dissoziierten LHCII

Eine Temperatursenkung von 47°C auf RT läßt den Pigment-Protein-Komplex reassoziieren (Abb. 3.9). Die Reassoziation ist nicht so erfolgreich, wie eine Standardrekonstitution bei Raumtemperatur. Darüber hinaus läßt sich der Zyklus nur bis zu fünf Mal wiederholen, danach bleibt eine Signaländerung der Chl-Emissionen, die eine Rekonstitution anzeigen, aus. Das Ausbleiben einer weiteren Reassoziation kann durch die thermische Schädigung der Pigmente erklärt werden und zeigt wiederum die Bedeutung einer ausreichenden Anzahl intakter Pigmente für eine Rekonstitution. Das Prinzip des Temperaturwechsels wird bei der zuerst entwickelten Methode der Rekonstitution des LHCII mit Gefrier-Tau-Zyklen ebenfalls verwendet (PAULSEN ET AL., 1990).

Die Reassoziationsfähigkeit des LHCII wurde vom Lipidanteil und der Lipidart sowie dem Glycerin- und der Detergens-Konzentration, beeinflußt. Die anderen variierten Parameter der Rekonstitution, wie Pigmente, pH-Wert oder Temperatur zeigten keine besonderen Effekte auf die Reassoziation. Die Erhöhung der Zyklenzahl bei einer Erhöhung der Chl-Konzentration ist sehr einfach mit der größeren Menge an intaktem Chl nach thermischen Streß zu erklären.

Hohe Detergens- und Glycerin-Konzentration ließen keine Reassoziation mehr zu. Dieser Effekt hatte sich aber schon in den Versuchen zur Destabilisierung angedeutet. Wenn der Komplex aufgrund der Rekonstitutionsbedingungen schon vorzeitig zerfällt, so ist eine Reassoziation durch Temperatursenkung nicht zu erwarten.

Ohne Lipide ließ sich der dissoziierte LHCII ohne weiteres wieder assoziieren. Die Lipide zeigten ein differenziertes Verhalten auf die Reassoziation. Phospho-Lipide hatten keinen negativen Einfluß auf die wiederholte Komplexbildung. DGDG und MGDG beeinflussten die Ausbildung des Komplexes drastisch. So war schon bei der am geringsten eingesetzten DGDG-Konzentration nur eine minimale Signaländerung, die eine Reassoziation anzeigte, zu erkennen. MGDG ermöglichte mit dieser geringen Konzentration zumindest noch eine schwache Reassoziation. Jedoch bei hohen MGDG-Konzentrationen war auch keine Reassoziation mehr zu beobachten. Dabei kann davon ausgegangen werden, daß es nicht um eine mangelnde Stabilisierung des Komplexes handelte, sondern eine Behinderung des Rückfaltungsprozesses, da der LHCII sich ohne Lipide reassoziieren ließ. Eine Hinderung der Rekonstitution des LHCII durch Lipide wurde auch schon beschrieben (KRUPA ET AL., 1992). Die Autoren beobachteten nur eine erfolgreiche Rekonstitution des LHCII, wenn das natürliche PG, verestert mit  $\Delta$ -3-trans-Hexadecensäure, als Lipid eingesetzt wurde. Dieses Ergebnis ist nicht mit den eigentlichen Rekonstitutionsversuchen dieser Arbeit in Einklang zu bringen. Dabei ist ein Einfluß auf die Ausbeute nur bei sehr hohen Konzentrationen zu erkennen, jedoch wird die Rekonstitution nicht insgesamt verhindert.

Die unterschiedlichen Effekte der Lipide lassen sich auch schlecht mit den bekannten biophysikalischen Eigenschaften erklären. Eine denkbare Erklärung wäre ein Phasenübergang der Lipide, verbunden mit einer unterschiedlichen Verteilung der Pigmente und des Proteins bei hoher Temperatur. Diese Trennung könnte zur Folge haben, daß auch nach Temperatursenkung, die Reaktanten nicht mehr in ausreichender Konzentration in den jeweiligen Micellen vorliegen und somit eine Rekonstitution nicht mehr stattfinden kann. Jedoch ist nur für DPPG ein Phasenübergang im Temperaturbereich von 20-47°C beschrieben. Bei den anderen Lipiden liegen diese Übergänge deutlich über 50°C (WILLIAMS, 1998). Und gerade bei DPPG ist eine Rekonstitution möglich. Erstaunlich ist auch, daß DGDG als lamellares Lipid, und im Phasenverhalten eher den Phospho-Lipiden zuzuordnen, nicht einen Einfluß

wie diese ausübt. DGDG kann sogar noch stärker eine Reassoziierung verhindern als MGDG, eine Lipid, daß ein nichtlamellares Phasenverhalten zeigt (WEBB & GREEN, 1991; WILLIAMS, 1998). Um eine genaue Beurteilung des Effektes der Galacto-Lipide treffen zu können, ist eine genauere Kenntnis der Lipid-Detergens-Micellen notwendig. Aber gerade diese wichtigen Eigenschaften sind noch nicht erforscht, obwohl viele Faltungsstudien von Membranproteinen gerade in diesen Systemen stattfinden (WEBB & GREEN, 1991).

#### 4.14 Ausblick

Mit der Möglichkeit der zeitaufgelösten Messung zur Rekonstitution des LHCII, ist eine sehr gute Methode zur Untersuchung der Faltung dieses Membranproteins gegeben. Nachdem eine breite Untersuchung des nativen LHCII stattgefunden hat und das System damit gut charakterisiert werden konnte, sind nun Untersuchungen mit genetisch verändertem LHCII möglich.

In einer weiterführenden Arbeit könnten die schon durch die Arbeitsgruppe überexprimierte Klone des LHCII mit Modifikationen an Pigmentbindungsstellen, hinsichtlich ihres Faltungsverhaltens untersucht werden (YANG ET AL., 1999). Damit könnten die Ergebnisse aus Experimenten zur Stabilität sowie den Pigmentaffinitäten dieser modifizierten LHCII, um kinetische Daten zur Rekonstitution ergänzt werden. Über Mutationen am LHCII wäre auch eine Bedingung für die Ausbildung eines stabilen Intermediates vorstellbar.

Modifizierter Lhcb1 kann mit Farbstoffen markiert werden. Durch eine geschickte Wahl der Bindungsstellen dieser Farbstoffe wäre es möglich, einzelne Abschnitte des Proteins, wie zum Beispiel die Verbindungen zwischen den Helices, in ihrem Faltungsverhalten zu beobachten. Interessant wäre die Verwendung von Farbstoffen, die im polaren und unpolaren Milieu verschiedene Fluoreszenzemissionen zeigen. Dies ermöglicht einen Hinweis auf den Mechanismus der Faltung dieses Proteinabschnittes zu erhalten, ob z.B. ein Wechsel vom wässrigen Milieu in eine Detergens-Umgebung stattfindet.

Die Verwendung von zwei Farbstoffen, von denen einer Anregungsenergie an den zweiten weitergeben kann, würde eine von den Chl<sub>b</sub>, und somit von dem Energietransfer des Chl<sub>b</sub> auf Chl<sub>a</sub>, unabhängige Charakterisierung ermöglichen. Somit wäre der indirekte Nachweis der Proteinfaltung durch die Etablierung des Energietransfers, durch einen direkteren Nachweis möglich. Denkbar ist hier, zwei Stellen zu markieren, die im nativen Zustand eng beieinander liegen, aber im denaturierten Zustand an weit entfernten Stellen in der Polypeptidkette liegen.

Eine weitere Methode, mit der direkt auf Eigenschaften der Proteinstruktur geschlossen werden kann, sind Untersuchungen zum Circular-Dichroismus. Dazu sind bereits vorbereitende Arbeiten erfolgt, um die zeitlich aufgelöste CD-Spektroskopie in einem ähnlichen Maße wie die Fluoreszenz-Spektroskopie zur Untersuchung des LHCII zu nutzen (R. HORN UND H. PAULSEN, persönliche Mitteilung).

Um ein besseres Verständnis der Assemblierung des LHCII in der Thylakoidmembran zu erhalten, sollte auch die zeitlich aufgelöste Rekonstitution in Vesikeln untersucht werden. Eine Methode zur Rekonstitution des LHCII in Vesikeln wird versucht zu etablieren (R. BEUTELMANN, persönliche Mitteilung). bR läßt sich in Vesikeln rekonstituieren und die Rückfaltung wurde zeitaufgelöst untersucht (HUNT ET AL., 1997; CURRAN ET AL., 1999).



Weitere Untersuchungen können ebenfalls mit der „Stopped-Flow“-Methode durchgeführt werden. Erste Versuche von Doppelsprunguntersuchungen mit Xanthophyllen und Chl<sub>a</sub>, die in zwei Schritten dem Protein zur Rekonstitution angeboten werden, wurden schon durchgeführt (C. JEGERSCHÖLD, persönliche Mitteilung). Mit dieser Methode könnte der molekulare Mechanismus und eine Reihenfolge der Pigmentbindung besser untersucht werden. Mit der Doppelsprungmethode kann auch die Frage eindeutig geklärt werden, ob eine Prolin-Isomerisierung für die Faltung des LHCII relevant ist, da auch eine sehr schnelle Isomerisierung des Prolins verhindert werden kann.

Der Lichtsammelkomplex des PSI kann ebenfalls rekonstituiert werden (SCHMID ET AL., 1997). Wenn die Rekonstitutionsbedingungen des LHCI angepaßt würden, so daß die zeitlich aufgelöste Fluoreszenz-Spektroskopie als Methode angewendet werden kann, wäre ein Vergleich im Faltungsverhalten der beiden Antennenkomplexe möglich.

Nicht zuletzt gibt die zeitliche aufgelöste Untersuchung der thermischen Stabilität des LHCII, bzw. des modifizierten LHCII, Hinweise darauf, wie das Protein verändert werden muß, damit es auch über lange Zeiträume unter extremen Bedingungen seine Aufgabe erfüllen kann. Das optimierte Protein könnte Anwendung, z.B. im Bereich der Photovoltaik finden.

## 5. Zusammenfassung

Viele Informationen sind über den Hauptlichtsammelkomplex des Photosystem II (LHCII) in der letzten beiden Dekaden gewonnen worden. Die Struktur des Membranproteins wurde bei 3,4 Å aufgelöst, die Lage und Orientierung als Bestandteil des PSII in der Membran herausgefunden, die Funktion untersucht und der Pigment-Protein-Komplex *in vitro* rekonstituiert. Erstaunlich wenig ist jedoch, wie bei allen Proteinen, über den Faltungscode, d.h. über die Verschlüsselung des Weges von der eindimensionalen Aminosäurekette zur dreidimensionalen Struktur des Proteins, bekannt. Der LHCII ist *in vitro* in hohem Maße selbstorganisierend und seine Rückfaltung in den nativ-ähnlichen Zustand des Monomers kann mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie zeitaufgelöst erfaßt werden. Als Merkmal dieses Zustandes wird der sich etablierende Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* aufgezeichnet.

Ziel dieser Arbeit ist es, mehr Einblick über den Ablauf des „Assembly“ des LHCII, der Faltung des Apoproteins und somit über den Faltungsmechanismus von Membranproteinen zu gewinnen. Dazu mußten zunächst die Bedingungen der Rekonstitution des LHCII auf zeitaufgelöste, reproduzierbare Messungen hin optimiert werden. Das Pigment/Protein-Verhältnis und die Methode der Probenaufbereitung zeigten sich sehr sensitiv hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und des Erfolges der Rekonstitution. Es wurden bis zu drei Reaktionszeiten aufgelöst. Die erste Komponente ( $\tau_1$ ) ist schnell und, mit einer Reaktionszeit von unter 10 Sekunden, mit den in dieser Arbeit verwendeten Methode nicht immer auflösbar. Die folgende Komponente ( $\tau_2$ ) besitzt eine Reaktionszeit von einer halben Minute, die letzte Komponente ( $\tau_3$ ) ist mit einer Reaktionszeit zwischen sechs und zehn Minuten, um eine Größenordnung länger. Die in dieser Arbeit intensiv untersuchten Reaktionszeiten der Rekonstitution  $\tau_2$  und  $\tau_3$ , sind abhängig von der Konzentration der Reaktanten. Es findet somit bei beiden Reaktionszeiten eine Bindung der Pigmente an das Protein statt.

Die Veränderung der Parameter Chl-, Xanthophyll-, Lipid- und Detergens-Konzentration sowie die Variation der Temperatur, des pH-Wertes und der Viskosität, führt zu einer Änderung der Reaktionszeiten  $\tau_2$  und  $\tau_3$ . Die Reaktionszeiten entwickeln sich bei fast allen Untersuchungen proportional. Diese Ergebnisse und das Fehlen von Intermediaten lassen auf einen höhermolekularen Reaktionsschritt und eine Proteinfaltung nach dem „Two-state“ Modell schließen, bei dem lediglich zwei Zustände, nativ und denaturiert, möglich sind.

Eine unterschiedliche Entwicklung der Reaktionszeiten  $\tau_2$  und  $\tau_3$ , ist nur bei Veränderung des Chl-Verhältnisses zu beobachten.  $\tau_2$  wird durch eine hohe Chl *a*-Konzentration kontinuierlich kürzer,  $\tau_3$  zeigt ein Optimum bei annähernd ausgeglichenem Chl-Verhältnis. Diese Pigmentabhängigkeit ist die Basis für einen Vorschlag zur Bindungsreihenfolge der Pigmente an das Apoprotein. In einer ersten Phase werden zuerst die Positionen besetzt, die weitere Pigmente binden und/oder über Salzbrücken dem Pigment-Protein-Komplex Stabilität verleihen. Chl *a* ist überwiegend an diesen Bindungen beteiligt. In der folgenden Phase wird ein ausgeglichenes Pigment-Verhältnis benötigt, um die restlichen Stellen mit Chl zu besetzen. Dieses Verhalten der Reaktionszeiten erweitert die möglichen Modelle um sequentielle oder parallele Faltungsschritte des LHCII.

Die Rekonstitution des LHCII mit einem hohen Chl *b*/*a*-Verhältnis führt zu thermisch instabileren Pigment-Protein-Komplexen, hervorgerufen durch einen höheren Anteil von Chl *b* im Komplex. Ein niedriges Chl *a*/*b*-Verhältnis stabilisiert den Komplex. Eine Erhöhung der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen in für die Stabilität entscheidenden Pigmentbindungsstellen durch Chl *b*, ist als Grund für die erhöhte Stabilität denkbar.

Xanthophylle sind für die Rekonstitution limitierend. Dabei übt Lutein einen stärkeren Einfluß als Violaxanthin und Zeaxanthin aus. Der starke Einfluß des Luteins kann durch eine für die Ausbildung des Energietransfers notwendige frühe Bindung an den zentralen Xanthophyllbindungsstellen, erklärt werden.

Eine Erhöhung der Konzentration der Lipide verlängert  $\tau_2$  und  $\tau_3$  der Rekonstitution in gleichem Maße. Die vier eingesetzten nativen Lipide (MGDG, DGDG, DOPG, DPPG in Mischmicellen mit Detergens) unterscheiden sich nicht in ihrem Effekt. Ein Erklärungsansatz ist die Verdünnung der Reaktanten durch Lipide in den Lipid-Detergens-Mischmicellen. Die vier Lipide erhöhen die thermische Stabilität des LHCII im gleichen Maße. Bei einer temperaturinduzierten Rückfaltungen zeigen die Lipide ein selektives Verhalten. MGDG und DGDG lassen eine wiederholte Rückfaltung des LHCII kaum oder nicht zu, DOPG und DPPG behindern die Rückfaltung nicht, vermutlich ist das Phasenverhalten der Lipide ausschlaggebend für die unterschiedliche Reassoziationsfähigkeit.

Eine Temperaturerhöhung verkürzt die Reaktionszeiten. Dabei wird die thermische Stabilität nicht beeinflusst. Somit kann eine schnelle Rekonstitution als Grund für den instabilen LHCII mit hohem Chl<sub>a</sub>-Anteil, ausgeschlossen werden. Die beiden ermittelten apparenten Aktivierungsenergien der Rekonstitution, liegen im Bereich der Bindungsenergien von elektrostatischen oder Wasserstoffbrücken ( $18 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  für  $\tau_2$ ) einerseits und van der Waals-Wechselwirkungen ( $5 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  für  $\tau_3$ ) andererseits. Die pH-Wertabhängigkeit der Rekonstitution macht eine Protonierung von His68 der wichtigen Pigmentbindungsstelle  $\alpha_5$  sowie His212, als Ursache für die Verlängerung der Reaktionszeiten und die Verringerung der Ausbeute wahrscheinlich.

## 6. Literatur

- Allen, J. F.; How Does Protein Phosphorylation Regulate Photosynthesis?. Trends Biochemistry Sci. 17(1), 12-17. (1992).
- Anderson, W. H., Hawkins, J. M., Gellermann, J. L., und Schlenk, H.; Fatty acid composition as criterion in taxonomy of mosses. J. Hattori Bot. Lab. 39, 99-103. (1974).
- Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M., und White, F. H. Jr.; The Kinetics of Formation of Native Ribonuclease during Oxidation of the Reduced Polypeptide Chain. Proc. Natl. Acad. Sci 47(9), 1309ff. (1961).
- Baldwin, R. L.; On-pathway versus off-pathway folding intermediates. Fold.-Des 1(1), R 1-8. (1996).
- Baldwin, R. L. und Rose, G. D.; Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. Trends-Biochem-Sci. 24(1), 26-33. (1999).
- Baldwin, R. L. und Rose, G. D.; Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states [erratum: Trends Biochem. Sci. May 1999, 24(5), 185]. Trends-Biochem-Sci. 24(2), 77-83. (1999b).
- Barber, J.; Photosystem II. Biochem. Biophys. Acta 1365, 269-277. (1998).
- Bieri, O., Wirz, J., Hellrung, B., Schutkowski, M., Drewello, M., und Kiefhaber, T.; The speed limit for protein folding measured by triplet-triplet energy transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 9597-9601. (1999).
- Bilsel, O., Zitzewitz, J. A., Bowers, K. E., und Matthews, C. R.; Folding mechanism of the  $\alpha$ -subunit of tryptophan synthase, an  $\alpha/\beta$  barrel protein: global analysis highlights the interconversion of multiple native, intermediate, and unfolded forms through parallel channels. Biochemistry 38(3), 1018-29. (1999).
- Boekema, E. J., van Roon, H., van Breemen, J. F. L., und Dekker, J. P.; Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. Eur. J. Biochem. 266(2), 444-452. (1999).
- Bogdanov, M., Umeda, M., und Dowhan, W.; Phospholipid-assisted refolding of an integral membrane protein. Minimum structural features for phosphatidylethanolamine to act as a molecular chaperone. J. Biol. Chem. 274(18), 12339-45. (1999).
- Booth, P. J., Flitsch, S. L., Stern, L. J., Greenhalgh, D. A., Kim, P. S., und Khorana, H. G.; Intermediates in the folding of the membrane protein bacteriorhodopsin. Nature Struct. Biol. 2(2). (1995).
- Booth, P. J. und Paulsen, H.; Assembly of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex *in vitro*. Time-resolved fluorescence measurements. Biochemistry 35(16), 5103-5108. (1996).
- Booth, P. J., Riley, M. L., Flitsch, S. L., Templer, R. H., Farooq, A., Curran, A. R., Chadborn, N., und Wright, P.; Evidence that bilayer bending rigidity affects membrane protein folding. Biochemistry 36(1), 197-203. (1997).
- Brouillette, C. G., McMichens, R. B., Stern, L. J., und Khorana, H. G.; Structure and thermal stability of monomeric bacteriorhodopsin in mixed phospholipid/detergent micelles. Proteins 5(1), 38-46. (1989).
- Bruce, B. D.; The role of lipids in plastid protein transport. Plant Mol. Biol. 38(1-2), 223-246. (1998).

- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M. T., und Dobberstein, B.; A T5-promoter-based transcription-translation system for the analysis of protein *expression in vivo* and *in vitro*. *Methods Enzymol.* 155, 416-433. (1987).
- Chan, H. S., Bromberg, S., und Dill, K. A.; Models of cooperativity in protein folding. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 348(1323), 61-70. (1996).
- Chan, H. S. und Dill, K. A.; A simple model of chaperonin-mediated protein folding. *Proteins* 24(3), 345-51. (1996).
- Chapmann, D. J., De-Felice, J., und Barber, J.; Growth Temperature Effects on Thylakoid Membrane Lipid and Protein Content of Pea Chloroplasts. *Plant Physiol.* 72, 225-228. (1983).
- Chen, L. J. und Li, H. M.; A mutant deficient in the plastid lipid DGD is defective in protein import into chloroplasts. *Plant J.* 16(1), 33-39. (1998).
- Chiba, K., Ikai, A., Kawamura-Konishi, Y., und Kihara, H.; Kinetic Study on Myoglobin Refolding Monitored by Five Optical Probe Stopped-Flow Methods. *Proteins* 19, 110-119. (1994).
- Cline, K., Fulsom, D. R., und Vitanen, P. V.; An imported thylakoid protein accumulates in the stroma when insertion into thylakoids is inhibited. *J. Biol. Chem.* 264(24), 14225-14232. (1989).
- Connelly, J. P., Muller, M. G., Bassi, R., Croce, R., und Holzwarth, A. R.; Femtosecond transient absorption study of carotenoid to chlorophyll energy transfer in the light-harvesting complex II of photosystem II. *Biochemistry* 36(2), 281-7. (1997).
- CRC Handbook of Chemistry and Physics*, (1980), 61. Auflage, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Creighton, T. E., Darby, N. J., und Kemmink, J.; The roles of partly folded intermediates in protein folding. *FASEB J.* 10(1), 110-118. (1996).
- Croce, R., Remelli, R., Varotto, C., Breton, J., und Bassi, R.; The neoxanthin binding site of the major light harvesting complex (LHCII) from higher plants. *Febs Letters* 456(1), 1-6. (1999).
- Croce, R., Weiss, S., und Bassi, R.; Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants. *J. Biol. Chem.* 274(42), 29613-29623. (1999b).
- Curran, A. R., Templer, R. H., und Booth, P. J.; Modulation of folding and assembly of the membrane protein bacteriorhodopsin by intermolecular forces within the lipid bilayer. *Biochemistry* 38(29), 9328-9336. (1999).
- Dainese, P. und Bassi, R.; Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem II antenna system and aggregation state of the component chlorophylla/b binding proteins. *J. Biol. Chem.* 266(13), 8136-8142. (1991).
- Davies, B.H.; (1974) Carotenoids in *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. (Goodwin, T.W. Herausgeber), S. 38-165, London, Academic Press.
- deForesta, B., Legros, N., Plusquellec, D., Lemaire, M., und Champeil, P.; Brominated detergents as tools to study protein-detergent interactions. *Eur. J. Biochem.* 241(2), 343-354. (1996).
- Dekker, J. P., van Roon, H., und Boekema, E. J.; Heptameric association of light-harvesting complex II trimers in partially solubilized photosystem II membranes. *Febs Letters* 449(2-3), 211-214. (1999).
- Demmig-Adams, B. und Adams, W. W.; The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1(1), 21-26. (1996).
- Dill, K. A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K. M., Yee, D. P., Thomas, P. D., und Chan, H. S.; Principles

- of protein-folding - a perspective from simple exact models. *Protein. Sci.* 4(4), 561-602. (1995).
- Dorne, A. J., Block, M. A., Joyard, J., und Douce, R.; Do thylacoids really contain phosphatidylcholin? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 71-74. (1990).
- Dornmair, K., Kiefer, H., und Jähnig, F.; Refolding of an integral membrane protein. OmpA of *Escherichia coli* *J. Biol. Chem.* 265(31), 18907-18911. (1990).
- Dreyfuss, B. W. und Thornber, J. P.; Assembly of the light-harvesting complexes (LHCs) of photosystem II. Monomeric LHC IIb complexes are intermediates in the formation of oligomeric LHC IIb complexes. *Plant Physiol.* 106(3), 829-839. (1994).
- Du, M., Xie, X., Mets, L., und Fleming, G. R.; Direct Observation of Ultrafast Energy Transfer Processes in Light-Harvesting Complex II. *J. Phys. Chem.* 98, 4736-4741. (1994).
- Dubertret, G., Mirshahi, A., Mirshahi, M., Gerardhirne, C., und Trémolières, A.; Evidence from *in vivo* manipulations of lipid composition in mutants that the  $\Delta$ (3)-trans-hexadecenoic acid-containing phosphatidylglycerol is involved in the biogenesis of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 226(2), 473-482. (1994).
- Eisele, J. L. und Rosenbusch, J. P.; *In vitro* Folding and Oligomerization of a Membrane Protein Transition of Bacterial Porin from Random Coil to Native Conformation. *J. Biol. Chem.* 265(18), 10217-10220. (1990).
- Fedorov, A. N. und Baldwin, T. O.; GroE Modulates Kinetic Partitioning of Folding Intermediates between Alternative States to Maximize the Yield of Biologically Active Protein. *J. Mol. Biol.* 268(4), 712-723. (1997).
- Fedorov, A. N. und Baldwin, T. O.; Process of Biosynthetic Protein Folding Determines the Rapid Formation of Native Structure. *J. Mol. Biol.* 294(2), 579-586. (1999).
- Fersht, A. R.; Optimization of rates of protein folding: The nucleation-condensation mechanism and its implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(24), 10869-10873. (1995).
- Fink, A. L.; Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.* 79(2), 425-449. (1999).
- Fink, A. L.; Compact intermediate states in protein folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24, 495-522. (1995).
- Fink, A. L.; Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold-Design* 3(1), R9-23. (1998).
- Gellerman, J. L., Anderson, W. H., Richardson, D. G., und Schlenk, H. Distribution of arachidonic and eicosapentaenoic acids in the lipids of mosses. *Biochem. Biophys. Acta* 388, 277-290. (1975).
- Glaser, R.; *Biophysik*. (1996). 4. Auflage, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- Harrison, M. A., Nemson, J. A., und Melis, A.; Assembly and Composition of the Chlorophyll *a/b* Light-Harvesting Complex of Barley (*Hordeum vulgare* L.) - Immunochemical Analysis of Chlorophyll *b*-Less and Chlorophyll *b*-Deficient Mutants. *Photosynth. Res.* 38(2), 141-151. (1993).
- He, M. M. und Kaback, H. R.; *In vitro* folding of a membrane protein: effects of denaturation and renaturation on substrate binding by the lactose permease of *Escherichia coli* *Mol. Membrane Biol.* 15(1), 15-20. (1998).
- Heinemann, B.; Random mutations directed to transmembrane and loop domains of light-harvesting chl *a/b* protein: Impact on complex formation and pigment binding. (1999). Aachen, Shaker Verlag.

- Heinemann, B. und Paulsen, H.; Random mutations directed to trans-membrane and loop domains of light-harvesting chlorophyll $a/b$  protein: Impact on pigment binding. *Biochemistry* 38, 14088-14093. (1999).
- Helenius, A., McCaslin, D. R., Fries, E., und Tanford, C.; Properties of Detergents. *Methods Enzymol.* 56, 734-746. (1979).
- Hemelrijk, P. W., Kwa, S. L. S., van Grondelle, R., und Dekker, J. P.; Spectroscopic properties of LHCII, the main light-harvesting chlorophyll $a/b$  protein complex from chloroplast membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 1098, 159-166. (1992).
- Hobe, S.; Trimerisierung des *in vitro*-rekonstituierten Lichtsammelkomplexes höherer Pflanzen und spektroskopische Untersuchungen zur Pigmentorganisation. (1995). Aachen, Mainz Verlag.
- Hobe, S., Förster, R., Klingler, J., und Paulsen, H.; N-proximal sequence motif in light-harvesting chlorophyll  $a/b$ -binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll  $a/b$  complex. *Biochemistry* 34(32), 10224-10228. (1995).
- Hobe, S., Niemeier, H., Bender, A., und Paulsen, H.; Carotenoid binding sites in LHCIIb - Relative affinities towards major xanthophylls of higher plants. *Eur. J. Biochem.* 267(2), 616-624. (2000).
- Hobe, S., Prytulla, S., Kühlbrandt, W., und Paulsen, H.; Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll $a/b$  complex. *EMBO J.* 13(15), 3423-3429. (1994).
- Holzwarth, A. R.; Fluorescence Lifetimes in Photosynthetic Systems. *Photochem. Photobiol.* 43(6), 707-725. (1986).
- Huang, K.-S., Bayley, H., Liao, M.-J., London, E., und Khorana, H. G.; Refolding of an Integral Membrane Protein. Denaturation, Renaturation, and Reconstitution of intact Bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments. *J. Biol. Chem.* 256(8), 3802-3809. (1981).
- Hunt, J. F., Earnest, T. N., Bousche, O., Kalghatgi, K., Reilly, K., Horvath, C., Rothschild, K. J., und Engelman, D. M.; A biophysical study of integral membrane protein folding. *Biochemistry* 36(49), 15156-15176. (1997).
- Jänicke, R.; Protein self-organization *in vitro* and *in vivo*: partitioning between physical biochemistry and cell biology. *Biol. Chem.* 379(3), 237-43. (1998).
- Jänicke, R.; What does protein folding *in vitro* tell us about protein folding in cell? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 339(1289), 287-95. (1993).
- Jegerschöld, C., Petrovic, A., Khoo, B.J., Reinsberg, D., Paulsen, H., und Booth, P.J.; (1998), Kinetic studies of the assembly of plant light harvesting complex I $h$  *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. (Garab, G. Herausgeber), S. 365-368, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Jennings, P. A. und Wright, P. E.; Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. *Science* 262, 892-896. (1993).
- Jimenez-Cervantes, C., Garcia-Borrón, J. C., Lozano, J. A., und Solano, F.; Effects of detergents and endogenous lipids on the activity and properties of tyrosinase and its related proteins. *Biochem. Biophys. Acta* 1243(3), 421-30. (1995).
- Joyard, J., Marechal, E., Miege, C., Block, M.A., Dorne, A.J., und Douce, R.; (1998), Synthesis of Plastid Glycerolipids in *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function, and Genetics* (Siegenthaler, P.A. und Murata, N., Herausgeber), S. 24ff. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Kates, M.; Techniques of Lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. (1986). 2. Auflage, Amsterdam, Elsevier.

- Kiefhaber, T.; Kinetic traps in lysozyme folding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(20), 9026-33. (1995).
- Kleima, F. J., Hobe, S., Calkoen, F., Urbanus, M. L., Peterman, E. J. G., van Grondelle, R., Paulsen, H., und van Amerongen, H.; Decreasing the chlorophylla/b ratio in reconstituted LHCII: Structural and functional consequences. *Biochemistry* 38(20), 6587-6596. (1999).
- Knox, J. P. und Dodge, A. D.; Singlet Oxygen and Plants. *Phytochemistry* 24(5), 889-896. (1985).
- Kogata, N., Nishio, K., Hirohashi, T., Kikuchi, S., und Nakai, M.; Involvement of a chloroplast homologue of the signal recognition particle receptor protein, FtsY, in protein targeting to thylakoids. *Febs Letters* 447(2-3), 329-333. (1999).
- Krupa, Z., Williams, J. P., Khan, M. U., und Huner, N. P. A.; The role of acyl lipids in reconstitution of lipid-depleted light-harvesting complex-II from cold-hardened and nonhardened rye. *Plant Physiol.* 100(2), 931-938. (1992).
- Kruse, O., Hankamer, B., Konczak, C., Gerle, C., Morris, E., Radunz, A., Schmid, G. H., und Barber, J.; Phosphatidylglycerol is involved in the dimerization of photosystem II. *J. Biol. Chem.* 275(9), 6509-6514. (2000).
- Kühlbrandt, W., Wang, D. N., und Fujiyoshi, Y.; Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367, 614-621. (1994).
- Kuttkat, A., Hartmann, A., Hobe, S., und Paulsen, H.; The C-terminal domain of light-harvesting chlorophylla/b-binding protein is involved in the stabilisation of trimeric light-harvesting complex. *Eur. J. Biochem.* 242(2), 288-292. (1996).
- Kwa, S. L. S., van Amerongen, H., Lin, S., Dekker, J. P., van Grondelle, R., und Struve, W. S.; Ultrafast Energy Transfer in LHC-II Trimers from the Chla/b Light-Harvesting Antenna of Photosystem-II. *Biochim. Biophys. Acta* 1102(2), 202-212. (1992).
- Laemmli, U. K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685. (1970).
- Lau, F. W. und Bowie, J. U.; A method for assessing the stability of a membrane protein. *Biochemistry* 36(19), 5884-5892. (1997).
- Lee, A. L. C. und Thornber, J. P.; Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from barley (*Hordeum vulgare*) - The xanthophyll cycle intermediates occur mainly in the light-harvesting complexes of photosystem I and photosystem II. *Plant. Physiol.* 107(2), 565-574. (1995).
- Leeson, D. T., Gai, F., Rodriguez, H. M., Gregoret, L. M., und Dyer, R. B.; Protein folding and unfolding on a complex energy landscape. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(6), 2527-2532. (2000).
- Levi, V., Rossi, J. P., Echarte, M. M., Castello, P. R., und Gonzalez-Flecha, F. L.; Thermal stability of the plasma membrane calcium pump. Quantitative analysis of its dependence on lipid-protein interactions. *J. Membr. Biol.* 173(3), 215-25. (2000).
- Levinthal, C., Debrunner, P., Tsibris, J. C., und Münch, E.; (1969), Proceedings of a Meeting held at Allerton House, S. 22-24, Urbana, University of Illinois.
- Li, X. X., Henry, R., Yuan, J. G., Cline, K., und Hoffman, N. E.; A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(9), 3789-3793. (1995).
- London, E. und Khorana, H. G.; Denaturation and renaturation of bacteriorhodopsin in detergents and lipid-detergent mixtures. *J. Biol. Chem.* 257(12), 7003-7011. (1982).



- Marti, T.; Refolding of bacteriorhodopsin from expressed polypeptide fragments. *J. Biol. Chem.* 273(15), 9312-9322. (1998).
- Matagne, A., Chung, E. W., Ball, L. J., Radford, S. E., Robinson, C. V., und Dobson, C. M.; The origin of the alpha-domain intermediate in the folding of hen lysozyme. *J. Mol. Biol.* 277(5), 997-1005. (1998).
- Moore, M., Harrison, M. S., Peterson, E. C., und Henry, R.; Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *J. Biol. Chem.* 275(3), 1529-32. (2000).
- Morin, P. E., Diggs, D., und Freire, E.; Thermal stability of membrane-reconstituted yeast cytochrome c oxidase. *Biochemistry* 29(3), 781-8. (1990).
- Mörschel, E.; (1999), Architektur des Photosyntheseapparates in *Photosynthese* (Häder, D.P., Herausgeber.), Thieme Verlag, Stuttgart.
- Mouritsen, O. G. Self-assembly and organization of lipid-protein membranes. *Curr. Opin. Colloid a. Interface Sci.* 3(1), 78-87. (1998).
- Murata, N. und Siegenthaler, P.A.; (1998), Introduction to Lipids in Photosynthesis in *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function, and Genetics* (Siegenthaler, P.A. und Murata, N., Herausgeber), S. 2ff, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Nield, J., Orlova, E. V., Morris, E. P., Gowen, B., van Heel, M., und Barber, J.; 3D map of the plant photosystem two supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis. *Nat.Struc.Biol.* 7, 44-47. (2000).
- Nußberger, S., Dekker, J. P., Kühlbrandt, W., van Bolhuis, B. M., van Grondelle, R., und van Amerongen, H.; Spectroscopic characterization of three different monomeric forms of the main chlorophyll *a/b* binding protein from chloroplast membranes. *Biochemistry* 33(49), 14775-14783. (1994).
- Nußberger, S., Dörr, K., Wang, D. N., und Kühlbrandt, W.; Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J. Mol. Biol.* 234(2), 347-356. (1993).
- Onuchic, J. N., Wolynes, P. G., Luthey-Schulten, Z., und Socci, N. D.; Toward an outline of the topography of a realistic protein-folding funnel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 3626-3630. (1995).
- Ottmann, K.; Zeitaufgelöste Messungen zur Faltung des Chl *a/b*-Lichtsammelproteins: Xanthophyllvariation und Fluoreszenzfarbstoffmarkierung. (1999), Diplomarbeit betreut von H. Paulsen und D. Reinsberg am Fachbereich Biologie der Universität Mainz, Mainz.
- Paulsen, H., Finkenzeller, B., und Kühlein, N.; Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur. J. Biochem.* 215, 809-816. (1993).
- Paulsen, H. und Hobe, S.; Pigment-binding properties of mutant light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur. J. Biochem.* 205(1), 71-76. (1992).
- Paulsen, H., Rümmler, U., und Rüdiger, W.; Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein overexpressed in *Escherichia coli* *Planta* 181, 204-211. (1990).
- Payan, L. A. und Cline, K.; A stromal protein factor maintains the solubility and insertion competence of an imported thylakoid membrane protein. *J. Cell Biol.* 112(4), 603-613. (1991).
- Pichersky, E. und Jansson, S.; (1996), The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding polypeptides and their genes in angiosperm and gymnosperm species in *Oxygenic photosynthesis: the light reactions* (Ort, D. R. and Yocum, C. F., Herausgeber), S. 507-521, Dordrecht, Kluwer

Academic Publishers.

- Pinnaduwege, P. und Bruce, B. D.; *In vitro* Interaction between a Chloroplast Transit Peptide and Chloroplast Outer Envelope Lipids Is Sequence-specific and Lipid Class-dependent. *J. Biol. Chem.* 271(51), 32907-32915. (1996).
- Plumley, F. G. und Schmidt, G. W.; Reconstitution of chlorophyll *a/b* light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 146-150. (1987).
- Pogson, B. J., Niyogi, K. K., Björkman, O., und DellaPenna, D.; Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in *Arabidopsis* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(22), 13324-13329. (1998).
- Polivka, T., Herek, J. L., Zigmantas, D., Akerlund, H. E., und Sundstrom, V.; Direct observation of the (forbidden) S-1 state in carotenoids. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96(9), 4914-4917. (1999).
- Popot, J. L. und Engelman, D. M.; Membrane protein folding and oligomerization: The two-stage model. *Biochemistry* 29(17), 4031-4037. (1990).
- Porra, R. J., Thompson, W. A., und Kriedemann, P. E.; Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975, 384-394. (1989).
- Preiss, S. und Thornber, J. P.; Stability of the apoproteins of light-harvesting complex I and II during biogenesis of thylakoids in the chlorophyll *b*-less barley mutant chlorina f2. *Plant Physiol.* 107(3), 709-717. (1995).
- Privalov, P. L.; Intermediate states in protein folding. *J. Mol. Biol.* 258(5), 707-25. (1996).
- Rariy, R. V. und Klibanov, A. M.; Correct protein folding in glycerol. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94(25), 13520-13523. (1997).
- Remelli, R., Varotto, C., Sandona, D., Croce, R., und Bassi, R.; Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex - A mutation analysis of chromophore-binding residues. *J. Biol. Chem.* 274(47), 33510-33521. (1999).
- Richter, G. (1997), *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen* 6. Auflage, Stuttgart, Thieme Verlag.
- Riley, M. L., Wallace, B. A., Flitsch, S. L., und Booth, P. J.; Slow a helix formation during folding of a membrane protein. *Biochemistry* 36(1), 192-196. (1997).
- Rogl, H. und Kühlbrandt, W.; Mutant trimers of light-harvesting complex II exhibit altered pigment content and spectroscopic features. *Biochemistry* 38(49), 16214-16222. (1999).
- Ross, S und Olivier, J. P.; A New Method for the Determination of Critical Micelle Concentration of unionized Assoziation Colloids in Aqueous or in non-Aqueous Solution. *J. Phys. Chem.* 63, 1671-1674. (1959).
- Ruban, A. V., Lee P. J. Wentworth M., Young A. J. und Horton, P.; Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light-harvesting complexes. *J. Biol. Chem.* 275, 10458-10465. (1999).
- Sabelko, J., Ervin, J., und Gruebele, M.; Observation of strange kinetics in protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 6031-6036. (1999).
- Scheer, H. (1999), *Pigmente und Antennenkomplexe in Photosynthese* (Häder, D.P., Herausgeber), Stuttgart, Thieme Verlag.

- Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M. A., und Schmid, F. X.; Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nature Struct. Biol.* 2(8), 663-673. (1995).
- Schmid, F. X.; Prolyl Isomerase: Enzymatic Catalysis of Slow Protein-Folding Reactions. *Annu. Rev. Biophys. Struct.* 22, 123-43. (1993).
- Schmid, M. Pigmentbindung an das Lichtsammelprotein: Zeitaufgelöste Messung und Variation der Chlorophyll-Stöchiometrie. (1995). München, Diplomarbeit an der Universität München.
- Schmid, V. H. R., Cammarata, K. V., Bruns, B. U., und Schmidt, G. *Wit vitro* reconstitution of the photosystem I light-harvesting complex LHCl-730: Heterodimerization is required for antenna pigment organization. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94 (14), 7667-7672. (1997).
- Schnell, D. J. und Blobel, G.; Identification of Intermediates in the Pathway of Protein Import into Chloroplasts and Their Localization to Envelope Contact Sites. *J. Cell Biol.* 120(1), 103-115. (1993).
- Seckler, R. und Jänicke, R.; Protein Folding and Protein Refolding. *FASEB J.* 6(8), 2545-2552. (1992).
- Segel, D. J., Bachmann, A., Hofrichter, J., Hodgson, K. O., Doniach, S., und Kiefhaber, T.; Characterization of Transient Intermediates in Lysozyme Folding with Time-resolved Small-angle X-ray Scattering. *J. Mol. Biol.* 288(3), 489-499. (1999).
- Segel, D. J., Eliezer, D., Uversky, V., Fink, A. L., Hodgson, K. O., und Doniach, S.; Transient dimer in the refolding kinetics of cytochrome c characterized by small-angle X-ray scattering. *Biochemistry* 38(46), 15352-9. (1999b).
- Skorko-Glonek, J., Lipinska, B., Krzewski, K., Zolse, G., Bertoli, E., und Tanfani, F.; HtrA Heat Shock Protease Interacts with Phospholipid Membranes and Undergoes Conformational Changes. *J. Bio. Chem.* 272(14), 8974-8982. (1997).
- Stryer, L.; *Biochemistry*. (1988), Third Edition, New York, W.H. Freeman & Company.
- Sturgis, J., Robert, B., und Goormaghtigh, E.; Transmembrane helix stability: the effect of helix-helix interactions studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biophys. J.* 72, 988-94. (1998).
- Su, Z. D., Arooz, M. T., Chen, H. M., Gross, C. J., und Tsong, T. Y.; Least activation path for protein folding: Investigation of staphylococcal nuclease folding by stopped-flow circular dichroism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93(6), 2539-2544. (1996).
- Surrey, T. und Jähnig, F.; Kinetics of folding and membrane insertion of a  $\beta$ -barrel membrane protein. *J. Biol. Chem.* 270(47), 28199-28203. (1995).
- Surrey, T., Schmid, A., und Jähnig, F.; Folding and membrane insertion of the trimeric  $\beta$ -barrel protein OmpF. *Biochemistry* 35, 2283-2288. (1996).
- Theg, S. M. und Scott, S. V.; Protein import into chloroplasts. *Trends Cell Biol.* 3, 186-190. (1993).
- Trémolières, A., Dainese, P., und Bassi, R.; Heterogenous lipid distribution among chlorophyll-binding proteins of photosystem II in maize mesophyll chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* 221(2), 721-30. (1994).
- Trémolières, A., Dubacq, J. P., Ambard-Bretteville, F., und Remy, R.; Lipid composition of chlorophyll-protein complexes: Specific enrichment in *trans*-hexadecenoic acid of an oligomeric form of light-harvesting chlorophyll $a/b$  protein. *Febs Lett.* 130(1), 27-30. (1981).
- Trinkunas, G., Connelly, J. P., Muller, M. G., Valkunas, L., und Holzwarth, A. R.; Model for the excitation dynamics in the light harvesting complex II from higher plants. *J. Phys. Chem.*

101(37), 7313-7320. (1997).

- Tu, C. J., Schünemann, D., und Hoffman, N. E.; Chloroplast FtsY, chloroplast signal recognition particle, and GTP are required to reconstitute the soluble phase of light-harvesting chlorophyll protein transport into thylakoid membranes. *J. Biol. Chem.* 274(38), 27219-27224. (1999).
- Tu, C. J., Peterson, E. C., Henry, R., und Hoffmann, N. E.; The L18 Domain of Light-harvesting Chlorophyll Proteins Binds to Chloroplast Signal Recognition Particle 43. *J. Biol. Chem.* 275(18), 13187-90. (2000).
- van Grondelle, R., Dekker, J. P., Gillbro, T., und Sundstrom, V.; Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochem.Biophys.Acta* 1187, 1-65. (1994).
- Voeth, D. und Voeth, J. G.; *Biochemie*. (1994). Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Wagner, C. und Kiefhaber, T.; Intermediates can accelerate protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci* 96(12), 6716-21. (1999).
- Webb, M. S. und Green, B. R.; Biochemical and Biophysical Properties of Thylakoid Acyl Lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1060(2), 133-158. (1991).
- White, S. H. und Wimley, W. C.; Membrane protein folding and stability: Physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struc.* 28 , 319-365. (1999).
- Wildeggeer, G. und Kiefhaber, T.; Three-state modell for lysozyme folding: triangular folding mechanism with an energetically trapped intermediate. *J. Mol. Biol.* 270(2), 294-304. (1997).
- Williams, W.P. (1998), The Physical Properties of Thylakoid Membrane Lipids and Their Relation to Photosynthesis in *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function, and Genetics*(Siegenthaler, P.A. und Murata, N., Herausgeber), S. 103ff, Dordrecht, Kluwer Academic Publisher.
- Xu, Y. N. und Siegenthaler, P. A.; Effect of non-chilling temperature and light intensity during growth of squash cotyledons on the composition of thylakoid membrane lipids and fatty acids. *Plant Cell Physiol.* 37(4), 471-479. (1996).
- Yang, C., Kosemund, K., Cornet, C., und Paulsen, H.; Exchange of pigment-binding amino acids in light-harvesting chlorophyll $a/b$  protein. *Biochemistry* 38(49), 16205-13. (1999).
- Zwanzig, R, Szabo, A., und Bagchi, B.; Levinthal's paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 20-22. (1992).