

**„Biochemische Untersuchungen des Lichtsammlerprotein  
(LHCP) im Komplex mit seinem Chaperon, dem  
plastidären Signalerkennungspartikel cpSRP“**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des Grades**

**Doktor der Naturwissenschaften**

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Andreas Richter**

**geb. am 08.03.1984 in Hünfeld**

**Mainz, August 2014**



**Das Leben kann nur in der Schau nach rückwärts verstanden,  
aber nur in der Schau nach vorwärts gelebt werden.**

(Søren Kierkegaard)

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

**Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2014**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Chloroplasten und Gentransfer .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2. Proteintranslokation.....</b>	<b>11</b>
1.2.1. Cytosolische Proteintranslokation .....	11
1.2.2. Chloroplastidäre Proteintranslokation.....	12
<b>1.3. Das Signalerkennungspartikel - SRP .....</b>	<b>13</b>
1.3.1. Der eukaryotische SRP-Weg .....	13
1.3.2. Der prokaryotische SRP54-Weg.....	14
1.3.3. Der chloroplastidäre co-translationale SRP-Weg.....	15
<b>1.4. Der chloroplastidäre SRP (cpSRP)-Komplex.....</b>	<b>16</b>
1.4.1. Interaktion des cpSRP (43) mit LHCP.....	17
<b>1.5. Die Biogenese des LHCP .....</b>	<b>19</b>
<b>1.6. Andere Chaperonsysteme und deren Funktionsweise.....</b>	<b>22</b>
<b>1.7. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>23</b>
<b>2. Materialien .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Geräte .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2. Chemikalien.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3. Längenstandards .....</b>	<b>28</b>
2.1.1. Denaturierende Gelelektrophorese.....	28
2.1.2. Native Gelelektrophorese .....	29
2.1.3. Eichproteine für die Gelfiltrationschromatographie .....	30
<b>2.4. Bakterienstämme .....</b>	<b>30</b>
<b>2.5. Vektoren .....</b>	<b>30</b>
<b>2.6. Rekombinante Proteine .....</b>	<b>31</b>
<b>2.7. EPR-Label .....</b>	<b>32</b>
<b>3. Methoden.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>33</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.1.	Anzuchtsmedien für Bakterien .....	33
3.1.2.	Bakterienvereinzelung .....	33
3.1.3.	Plasmidisolation und DNA-Quantifizierung .....	34
3.1.4.	Transformation .....	34
<b>3.2.</b>	<b>Biochemische und präparative Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.2.1.	Isolation von Stromaextrakt (SE) aus jungen Erbsenpflanzen .....	35
3.2.2.	Überexpression rekombinanter Proteine .....	37
3.2.3.	Totalproteinbestimmung .....	38
3.2.4.	Aufarbeitung der überexprimierten Proteine .....	39
3.2.5.	Protein- und Pigmentquantifizierung .....	40
3.2.6.	Metallaffinitätschromatographie .....	42
3.2.7.	(54M)-cpSRP-Komplexbildung .....	44
3.2.8.	Entsalzung und Umpufferung der aufgereinigten Proteine .....	45
3.2.9.	Proteinaufkonzentrierung .....	46
3.2.10.	Chaperon-LHCP-Komplexbildung .....	46
3.2.11.	LHCP-Labeling .....	49
3.2.12.	Essigsäure Acetonfällung von Proteinen .....	50
<b>3.3.</b>	<b>Analytisch biochemische Methoden .....</b>	<b>50</b>
3.3.1.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	50
3.3.2.	Westernblot .....	53
3.3.3.	Gelpermeationschromatographie (GPC) .....	57
3.3.4.	Densitometrische Stöchiometriebestimmung .....	61
3.3.5.	Elektronen-paramagnetische Resonanz (EPR-)Spektroskopie .....	62
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1.</b>	<b>Charakterisierung des chloroplastidären Signalerkennungspartikels (cpSRP) .....</b>	<b>64</b>
4.1.1.	Überexpression und Aufarbeitung der cpSRP-Komponenten .....	64
4.1.2.	Gelfiltrationschromatographische Charakterisierung des cpSRP .....	69
4.1.3.	Optimierungsversuche der cpSRP-Komplexbildung .....	75
<b>4.2.</b>	<b>LHCP in Assoziation mit seinem nativen Chaperon cpSRP43 .....</b>	<b>79</b>

4.2.1. Einfluss der Komplexbildungsmethode auf den Oligomerisierungsgrad des cpSRP43-LHCP-Komplexes .....	80
4.2.2. Einfluss der Kopplungskonzentration auf den Oligomerisierungsgrad des cpSRP43-LHCP-Komplexes .....	83
4.2.3. Einfluss von Detergentien auf den Oligomerisierungsgrad des cpSRP43-LHCP-Komplexes .....	84
4.2.4. Alternative Kopplungszusätze/Kopplungsvariationen zur Verminderung des Oligomerisierungsgrades .....	89
4.2.5. Densitometrischer Ansatz zur Bestimmung der Stöchiometrie im cpSRP43-LHCP-Komplex 91	
<b>4.3. Vollängen-Transitkomplex.....</b>	<b>94</b>
4.3.1. Aufkonzentrierung/ Kopplungskonzentration des Transitkomplexes .....	94
4.3.2. Einfluss von potentiellen Proteinaggregationhemmern auf den Oligomerisierungsgrad des Transitkomplexes .....	97
4.3.3. Visualisierung von Vollängen-Transitkomplex in nativer Gelelektrophorese .....	98
4.3.4. Stöchiometriebestimmung im Vollängen-Transitkomplex .....	100
<b>4.4. Transitkomplex mit deletiertem cpSRP54M .....</b>	<b>102</b>
4.4.1. Einfluss der Aufkonzentrierung auf Transitkomplex mit cpSRP54M.....	102
4.4.2. Stöchiometrischer Überschuss von 54M-cpSRP-Komplex bzw. cpSRP54M-Spezies	104
4.4.3. Alternative Aufkonzentrierungsversuche.....	107
4.4.4. Stöchiometriebestimmung im 54M-Transitkomplex .....	110
4.4.5. EPR-spektroskopische Vermessung des cpSRP54M-Transitkomplexes .....	110
<b>4.5. Natives cpSRP / Transitkomplex mit nativem cpSRP .....</b>	<b>115</b>
4.5.1. Charakterisierung von nativem cpSRP .....	116
4.5.2. Transitkomplexbildung in Stromaextrakt.....	118
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>123</b>
<b>5.1. Das chloroplastidäre Signalerkennungsprotein (cpSRP) .....</b>	<b>123</b>
5.1.1. cpSRP43 zeigt anomales Verhalten in der Gelfiltrationschromatographie .....	123
5.1.2. Präparative Aspekte zur cpSRP-Komplexbildung.....	126
5.1.3. Das Oligomerisierungsverhalten des cpSRP-Komplexes ist stark konzentrationsabhängig.....	129

5.1.4.	Der N-Terminus und die G-Domäne des cpSRP54 wirken potentiell oligomerisierungsauslösend.....	132
5.1.5.	Eigenschaften von nativem cpSRP .....	134
<b>5.2.</b>	<b>LHCP in Assoziation mit Solubilisierungs-vermittelndem cpSRP.....</b>	<b>137</b>
5.2.1.	Die densitometrische Auswertung zeigt variable Komplexstöchiometrien.....	137
5.2.2.	Hydrophobe Interaktion nicht abgeschirmter LHCP-Bereiche führt zur Oligomerisierung der cpSRP-LHCP-Spezies .....	140
5.2.3.	Kopplung mit Urea-gelöstem bzw. Detergenz-gelöstem LHCP führt zu mechanistisch unterschiedlich ablaufenden Komplexkopplungen .....	144
5.2.4.	Der Oligomerisierungsgrad der cpSRP-LHCP-Spezies ist stark konzentrationsabhängig	147
5.2.5.	Aggregationshemmer können die unspezifische LHCP-Interaktion nicht verhindern.	150
5.2.6.	Die nicht-kovalente Interaktion im cpSRP-/ Transitkomplex ist „Elektrophorese-labil“	153
5.2.7.	Aspekte zum 54M-Transitkomplex .....	155
5.2.8.	Aspekte zu Transitkomplexen mit/in SE.....	159
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>163</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>165</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>174</b>
<b>8.1.</b>	<b>Zusatzmaterial des Ergebnisteils .....</b>	<b>174</b>
8.1.1.	Bezug auf 4.2.1 .....	174
8.1.2.	Bezug auf 4.2.3.1 .....	174
8.1.3.	Bezug auf 4.2.4.....	175
8.1.4.	Bezug auf 4.3.2.....	176
8.1.5.	Bezug auf 4.4.5.1 .....	177
8.1.6.	Bezug auf 4.4.5.2.....	178
<b>8.2.</b>	<b>Sequenzen .....</b>	<b>180</b>
8.2.1.	Basensequenz/Primärsequenz von His-cpSRP43 .....	180
8.2.2.	Basensequenz/ Primärsequenz von cpSRP54 und cpSRP54M.....	181
<b>8.3.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>183</b>
8.3.1.	Aminosäuren .....	184



<b>8.4. Verzeichnisse .....</b>	<b>185</b>
8.4.1.    Abbildungsverzeichnis .....	185
8.4.2.    Tabellenverzeichnis .....	187
<b>9. Erklärung .....</b>	<b>188</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Chloroplasten und Gentransfer

Die Vakuole und die Plastiden stellen Pflanzen-exklusive Zellorganellen dar. Letztere definieren Pflanzen jedoch aus 2 Gründen einschlägiger: 1. Sie sind die Orte der Photosynthese-Aktivität und somit die primären „Kraftwerke“ einer Pflanzenzelle. 2. Sie sind das, besonders im anabolischen Sinne, zentrale Stoffwechselkompartiment von Pflanzen. Plastiden sind prokaryotischen Ursprungs. Sie gehen auf ein Endosymbioseereignis eines heterotrophen Eukaryoten zurück, welcher ein photoautotrophes Cyanobakterium inkorporierte (Cavalier-Smith, 1982). Der genaue Zeitpunkt dieses in der Evolution höchst seltenen Vorkommens der Symbiogenese (ansonsten nur in Verbindung mit dem Ursprung der Mitochondrien sowie 2 sekundären eukaryotischen Endosymbiosen) kann nicht genau datiert werden (Cavalier-Smith, 2000). Jedoch herrscht größtenteils Einigkeit darüber, dass die anoxygene Photosynthese vor > 3,5 Mrd. Jahre ihren Ursprung hatte; die oxygene Photosynthese evolvierte mindestens 600 Mio Jahre später (Nisbet et al., 2008). Es existieren neben den Chloroplasten mit ihrem herausragenden Merkmal der Photosynthesaktivität noch weitere Plastidentypen (z.B. Chromoplasten, Etioplasten, Leukoplasten), doch spielen diese eine untergeordnete Rolle in der Pflanze. Die Chloroplasten besitzen aber nicht nur die Aufgabe eines „Solarmoduls“, sondern führen auch eine zentrale Rolle im Pflanzenmetabolismus durch (Neuhaus und Emes, 2000). So findet beispielsweise dort die Fettsäuren- sowie der Großteil der Aminosäurenproduktion statt. Darüber hinaus spielen Chloroplasten die zentrale Rolle bei der Synthese von zentralen Metaboliten bzw. Sekundärmetaboliten (Purin-/Pyridinbasen, Tetrapyrrole, Isoprenoide, etc.) (López-Juez, 2006). Solch ein Sammelsurium von Biogenesewegen erfordert eine große Anzahl von spezifischen Enzymen. Tatsächlich beherbergen Chloroplasten ca. 3500 – 4000 Polypeptide, besitzen gleichzeitig aber nur eine „coding“-Kapazität von ca. 200 Genen (Schleiff und Becker, 2011). Während der Evolution wanderte ein Großteil des genetischen Materials, sofern es nicht in der Symbiosebeziehung obsolet wurde, in das Kerngenom des eukaryotischen Wirtes. Dieses Phänomen kann auf Grundlage des „Muller’s ratchet“ (dt. „Muller Ratsche“) verstanden werden (Moran, 1996; Kurland, 1992). Dieses besagt, dass schädliche Mutationen schneller in asexuellen als in sexuellen Genomen akkumulieren. In letzterem Fall können diese durch Rekombination kompensiert werden. Somit existiert im Falle der prokaryotischen Endosymbiose ein selektiver Druck in Richtung des Kerntransfers der DNA (Moran et al., 1996; Martin et al., 1998). Zusätzlich kommt im Hinblick auf die besondere Photochemie und der damit verbundenen hohen Konzentrationen von potentiell mutagenen Sauerstoffspezies in den Chloroplasten ein weiterer Faktor hinzu, der den Gentransfer womöglich entscheidend begünstigte (Race et al., 1999). Die Folge eines solchen Genshifts war die gleichzeitige Evolvierung eines hoch-spezialisierten und effizienten Proteintranslokationssystems.

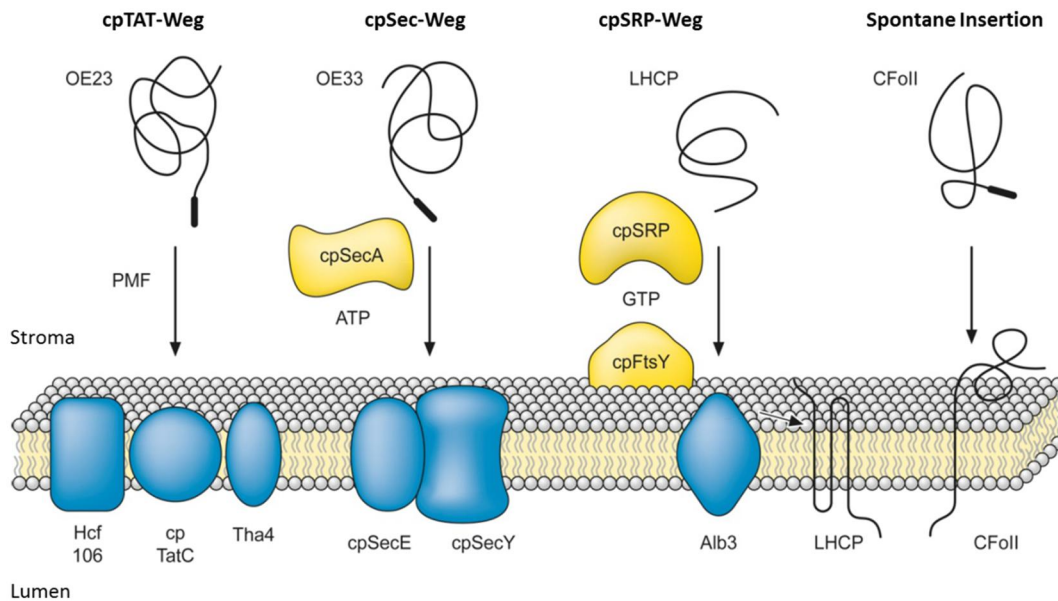
## 1.2. Proteintranslokation

### 1.2.1. Cytosolische Proteintranslokation

Es existieren zwei grundlegende Mechanismen der Proteintranslokation in Zellen: der co- sowie der posttranslationale Weg. Beide Wege erfordern neben einem elaborierten Effektorsystem insbesondere proteinogene Signalsequenzen, die einen spezifischen Transport zum Zielorganell codieren und sicherstellen. Die co-translationale Zielführung wird im Cytosol i.d.R. vom „signal recognition particle“ (SRP, dt. Signalerkennungspartikel) übernommen. Dieser ubiquitäre Faktor spielt bei einer Vielzahl von Proteinen, die für die Sekretion bestimmt sind sowie integral in Membranen eingebaut werden, eine entscheidende Rolle. SRP bindet in unmittelbarer Nachbarschaft des „exit“-Tunnels des Ribosoms und assoziiert an eine hydrophobe N-terminale Signalsequenz des naszierenden Proteins. Der Signalerkennungspartikel leitet die als ribosome nascent chain complex (RNC-Komplex) bezeichnete Struktur aus Ribosom und naszierender Polypeptidsequenz zum Endoplasmatischen Reticulum (ER). Es bedarf dabei zusätzlich eines weiteren peripheren Membranfaktors, dem signal recognition receptor (SR), welcher spezifisch an das SRP assoziiert. An der ER-Membran wird der RNC-Komplex schließlich durch GTP-getriebene Dissoziation des SRP vom SR an ein Translocon frei gegeben. Die nach Anbindung des SRP an den RNC-Komplex vorübergehend unterbrochene Translation wird fortgesetzt (Review: Keenan et al., 2001). Der Proteintransport in subzelluläre Strukturen, insbesondere auch die Proteintranslokation in Chloroplasten läuft hingegen posttranslational unter Vermittlung von Chaperonen ab (Schleiff und Becker, 2011). Dabei spielen in Pflanzenzellen insbesondere die Hitzeschockproteine Hsp 70 und Hsp 90 eine wichtige Rolle. Beide Chaperone kooperieren besonders bei der Translokation von stark hydrophoben Proteinen (Qbadou et al., 2006). Außerdem spielt im Zusammenhang mit precursor-Chloroplastenproteinen ein sogenannter „guidance“-Komplex, bestehend aus Hsp 70 und 14-3-3 Protein, eine entscheidende Rolle. 14-3-3-Protein ist ein in Eukaryoten exprimiertes Protein, welches spezifisch an Phosphoserinmotive bindet und effizient die cytosolische Proteinielführung katalysiert (Oecking und Jaspert, 2009). Martin et al., 2006 konnten eine Serin/Threonin-spezifische Kinase aus *Arabidopsis*-Cytosol extrahieren. Diese übernimmt aufgrund ihrer Substraterfordernisse sehr wahrscheinlich die Phosphorylierung der precursor Signalsequenz von Chloroplastenproteinen. Generell zeichnen sich die Signalsequenzen von Chloroplastenproteinen durch einen Reichtum von hydroxylierten Aminosäuren (AS) aus. Neben einem ansonsten breiten Spektrum von genauer AS-zusammensetzung und AS-länge besitzen die Signalsequenzen verschiedener Proteine darüberhinaus die Gemeinsamkeit, eine kationische Gesamtladung zu tragen sowie eine amphiphile  $\alpha$ -Helix zu formen (Schleiff und Becker, 2011). Die Signalsequenzen in Verbindung mit den Chaperonen stellen die posttranslationale Solubilisierung, die Zielführung in Richtung Membranoberfläche sowie die dort ablaufende Erkennung durch Rezeptoren sicher.

### 1.2.2. Chloroplastidäre Proteintranslokation

Die Translokation cytosolischer Proteine geschieht über die Chloroplastenhüllmembran. Im Speziellen sind hier sowohl in der äußeren Membran (translocon at the outer envelope of chloroplasts (TOC)) als auch in der inneren Membran (translocon at the inner envelope of chloroplasts (TIC)) multimere Proteinkomplexe angeordnet. Diese bilden jeweils eine Porenstruktur aus, durch welche die entfalteten Proteine in den Chloroplasten „eingefädelt“ werden (Schleiff et al., 2003; Inaba und Schnell, 2008; Flores-Pérez und Jarvis, 2013; Chou et al., 2006). Es schließt sich eine Prozessierung der Chloroplasten Transitsequenz durch eine im Stroma positionierte Signalprotein-Peptidase (SPP) an. Im Stroma des Chloroplasten werden die Peptide, welche in die Thylakoidmembran inseriert bzw. über selbige ins Lumen transportiert werden, anschließend auf einem von vier unabhängigen Wegen weiter transportiert. Diese verschiedenen „targeting“- Wege unterscheiden sich auf Basis ihrer stromalen Faktoren sowie ihrer energetischen Eigenschaften (Ouyang et al. 2011): 1. *In vitro*-Studien zeigten, dass der twin-arginine translocation (cpTat)-Weg den über die Thylakoidmembran bestehenden pH-Gradienten (Alder und Theg, 2003) nutzt. Neuere Studien in *in vivo*-Systemen lassen jedoch eher darauf schließen, dass das Membranpotential der Thylakoidmembran die Triebkraft der Translokation ist (Braun et al., 2007). Der cpTat-Weg besteht aus den drei Transmembrankomponenten Tha4, Hcf106 sowie TatC und bewältigt im Wesentlichen den Transport von Lumenproteinen, deren Erkennung einer weiteren Transitpeptidsequenz bedarf. Es existieren mehrere Hinweise darauf, dass erst durch die Wechselwirkung der Transitsequenz sich der funktionelle Translokasekomplex ausbildet (Cline und Dabney-Smith, 2008). Ein entscheidender Unterschied des cpTat-Wegs zu anderen Translokationswegen ist, dass dieser vollständig gefaltete Proteine transloziert (Aldridge et al., 2009). 2. Der cpSec-Weg scheint dem bakteriellen Sec-abhängigen Proteintransport sehr ähnlich zu sein. Dieser ist in Prokaryoten für die Translokation von integralen Proteinen der Cytoplasmamembran sowie periplasmatischen Proteinen zuständig und erfordert die Gegenwart und Hydrolyse von ATP. Signalerkennungsprotein (SRP) agiert im cpSEC-Weg i.d.R. vorgeschaltet und transportiert Membranproteine bis zu Membran. Periplasmatische Proteine werden hingegen durch das molekulare Chaperon SecB zusammen mit der ATPase SecA in Richtung Sec Translocon (SecYEG) transportiert. SecB bindet dabei posttranslational an sein Cargoprotein und hält es in einem elongierten Translokations-kompetenten Zustand (Driessen und Nouwen, 2008). In Chloroplasten konnte ein Großteil dieser Transportmaschinerie als cpSEC-Homolog identifiziert werden, so dass davon ausgehen ist, dass dort sowohl co- als auch posttranslationaler Transport über diesen Weg ablaufen (Nakai et al., 1994; Schuenemann, 1999). Beide vorgestellten Translokationswege spielen u.a. im Zusammenhang mit den Untereinheiten des oxygen evolving complexes (OEC) eine wichtige Rolle.



**Abbildung 1.1: Proteintransportwege im Chloroplasten.**

Es sind die unterschiedlichen Proteintransportwege im Chloroplasten gezeigt. Der chloroplastidäre Tat-Weg sowie der cpSec-Weg translozieren Proteine in das Thylakoidlumen. Der cpSRP-Weg sowie die spontane Insertion translozieren integrale Thylakoidmembranproteine. Die Membranfaktoren sowie lösliche Faktoren der Translokationswege sind im vorangegangenen Fließtext erläutert. OE23/33 = oxygen evolving protein mit 23/33 kDa. LHCP = light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. Abbildung verändert nach [REDACTED]

3. Es existiert darüberhinaus ein energieunabhängiger spontaner Weg der Insertion von integralen Thylakoidmembranproteinen. Für die ATP-Synthase Unterheit CF<sub>0</sub>II wurde eine Insertion ohne jegliche Assoziation an lösliche oder membran-gebundene Assistenzfaktoren gezeigt (Michl et al., 1994). Dieser Transportweg scheint aber letztlich nur eine sehr untergeordnete Rolle in der Zielführung von Thylakoidmembran-insertierten Proteinen zu spielen. 4. Chloroplasten nutzen schließlich einen weiteren von Bakterien abgeleiteten Transportweg, der homologe Faktoren des SRP- bzw. fifty four homolog (Ffh)-Wegs nutzt. Innerhalb dieses Translokationswegs spielt Alb3 als Insertase eine wichtige Rolle.

### 1.3. Das Signalerkennungspartikel - SRP

#### 1.3.1. Der eukaryotische SRP-Weg

Der SRP-Weg wurde schon zuvor in seinen Grundzügen kurz beschrieben. Dieser Transportweg ist in allen Reichen des Lebens universell vorhanden, und die zugehörigen Komponenten sind hochkonserviert (Keenan et al., 2001). Die mammalischen SRP-Komponenten wurden als erstes durch Walter und Blobel, 1980 beschrieben. Sie bestehen insgesamt aus 6 proteinogenen Untereinheiten (SRP 9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68, SRP72) sowie einer als 7SL-RNA oder SRP-RNA bezeichneten Ribonukleotidsequenz. Der Multi-Ribonukleoprotein-Komplex wird grundlegend in eine Alu-Domäne sowie eine S-Domäne unterschieden. Die Alu-Domäne besteht aus dem Heterodimer SPR9/14 und spielt im Zusammenhang mit der Verzögerung der Proteintranslation nach Anbindung an

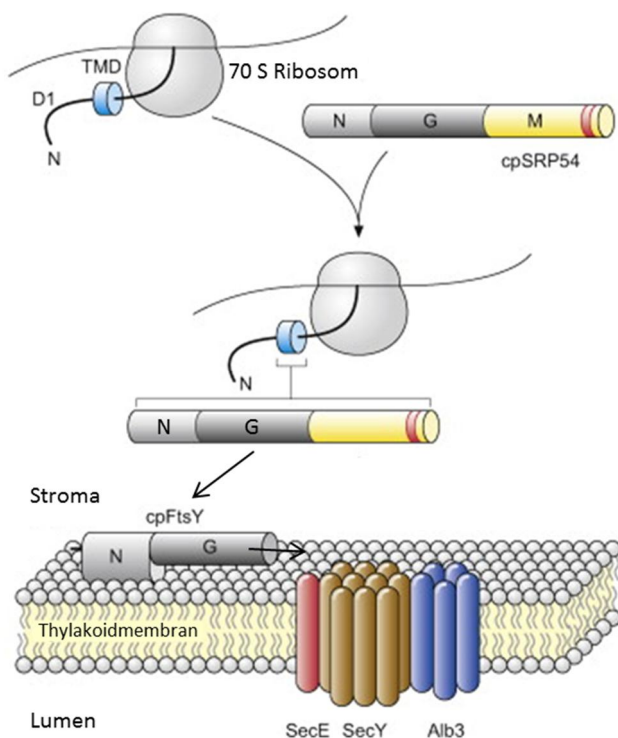
das Ribosom eine entscheidende Rolle. Die S-Domäne beinhaltet demgegenüber die Bindetselle für die Assoziation mit dem Ribosomenkomplex bzw. der Signalsequenz des naszierenden Polypeptids (Kurzchalia et al., 1986; Grudnik et al., 2009). Das SRP54 bildet schließlich den zentralen Core der S-Domäne. Dieses übernimmt neben der Signalerkennung die Anbindung an Helix 8 der assoziierten RNA-Einheit. Außerdem besitzt das modular aufgebaute SRP54 eine GTPase-Funktion (Freyman et al. 1997). Diese als G-Domäne bezeichnete Einheit ist mit einer N-terminalen Verlängerung (N-Domäne) verbunden. Die Anbindung an das Ribosom stimuliert zunächst die GTP-Bindung (Bacher et al. 1996). Der gebildete RNC-SRP-Komplex benötigt jedoch einen weiteren Faktor, den SRP-Rezeptor (SR $\alpha$ ), um das Targeting in Richtung des ER zu bewältigen. SR $\alpha$  ist seinerseits ebenso eine GTPase, die strukturell und funktionell stark der NG-Domäne des SRP54 ähnelt (Keenan et al. 2001). SRP und SR $\alpha$  bilden einen heterodimeren Komplex durch Wechselwirkung ihrer analogen NG-Domänen und stimulieren dadurch wechselseitig ihre GTPase-Funktion (Powers und Walter, 1995). Die SRP-RNA stimuliert ihrerseits die ansonsten geringe Affinität des SRP und SR $\alpha$  zueinander um den Faktor 200 (Peluso et al., 2000). Eukaryotischer SRP-Rezeptor besteht darüberhinaus aus SR $\beta$  (SR $\alpha$  + SR $\beta$  = SR), einer weiteren membranständigen GTPase mit einem integralen Membrananker. Nach Assoziation des SRP-SR $\alpha$ -Komplexes an SR $\beta$  gelangt der SRP-SR-Komplex mit assoziiertem RNC an seine finale Destination, den Membrantransloconkomplex Sec61 im ER. Dieser Komplex reguliert schließlich den GTP-Hydrolyse-Zyklus des SRP-SR-Komplexes und führt somit zur Freisetzung der gesamten SRP-Komponenten (Song et al., 2000). Der RNC verbleibt gebunden an das Membrantranslocon am ER und setzt die Proteintranslation fort.

### 1.3.2. Der prokaryotische SRP54-Weg

Der prokaryotische SRP-Weg ist prinzipiell homolog, beinhaltet jedoch weniger Komponenten als beschriebener eukaryotischer Weg. Das bakterielle SRP54-Homolog wird auch als Ffh bezeichnet und agiert ohne weitere proteiogene Faktoren nur in Assoziation mit einer 4,5S RNA-Einheit. Im Gegensatz zu dem eukaryotischen Transport konnte für den prokaryotischen SRP-Weg keine Involvierung dieses in den Transport sekretorischer Proteine nachgewiesen werden. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass dieser nur bei der Translokation von Membranproteinen eine Rolle spielt (Keenan et al., 2001). SRP54 ist ein Multidomänenprotein mit einer strukturell und funktionell gekoppelten NG-Domäne, welche mit FtsY (SR $\alpha$ -Homolog) spezifisch wechselwirkt. Die hochkonservierten Interaktionsstellen befinden sich in der N-Region (ALLEADV-Motiv) sowie in der G-Domäne (GQ- und DARGG-Motiv) (Grudnik et al., 2009). Darüberhinaus besteht SRP54 aus einer strukturell abgetrennten M-Domäne, die durch einen Linkerarm senkrecht mit der NG-Domäne verbunden ist. Diese bindet zum einen die 4,5S RNA-Einheit, zum anderen assoziiert sie mit der hydrophoben Signalsequenz des Cargoproteins. Letzteres bindet in eine hydrophobe Tasche (Rosendal et al. 2003). Die Substraterkennung der M-Domäne ist überaus variabel, d.h. es wird ein breites Spektrum unterschiedlicher Signalsequenzen gebunden (von Heijne, 1990). Kryo-Elektronenmikros-

kopische Aufnahmen zeigen, dass die Interaktion des SRP54 mit dem Ribosom in unmittelbarer Nähe zum Exit-Tunnel stattfindet. Insbesondere die SRP-RNA spielt hier eine wichtige Rolle in der Anbindung (Schaffitzel et al., 2006). Im Gegensatz zum eukaryotischen Weg besteht der SRP-Rezeptor bei Bakterien nur aus einem Faktor, FtsY. Dieses liegt sowohl im Cytosol als auch als peripheres Membranprotein vor. Letzteres liegt in dem Vorhandensein zweier Membraninteraktionsstellen begründet, welche vorzugsweise mit anionischen Lipiden wechselwirken. Die GTPase Funktion des cpFtsY wird sowohl durch die Komplexbildung mit dem SRP54 als auch durch die erwähnte Membraninteraktion zusätzlich stimuliert (de Leeuw et al., 2000). Darüberhinaus interagiert FtsY direkt mit einer cytosolischen Domäne des Sec-Translocon in der Cytoplasmamembran (Angelini et al., 2006). Der letzte Schritt des prokaryotischen SRP-Wegs umfasst die Insertion der Signalsequenz in das Translocon, sowie die Hydrolyse des im SRP54-FtsY-Komplex gebundenen GTPs. Die freiwerdende Energie dient der Dissoziation des SRP54-FtsY-Komplexes. Jedoch sind die genaue Regulation der GTP-Hydrolyse sowie die Übergabe der Signalsequenz derzeit noch nicht geklärt.

### 1.3.3. Der chloroplastidäre co-translational SRP-Weg



**Abbildung 1.2: Der co-translationalen cpSRP-Transport.**

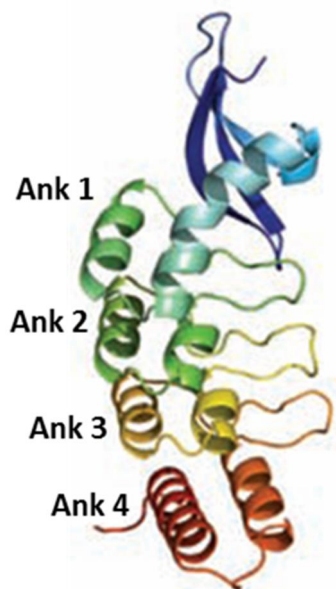
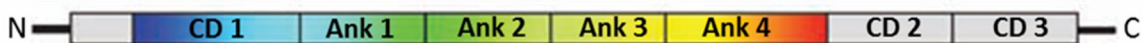
Cp SRP54 interagiert mit naszierendem D1-Protein an plastidären 70 S Ribosomen. Die Interaktion geschieht vornehmlich über die erste TMH des D1 Proteins. Die Komplexbildung mit cpFtsY führt zu einer Membranassoziation des SRP-RNC-Komplexes. Weitere Erläuterung siehe Fließtext. Abbildung verändert nach Dünschede, 2011.

Das chloroplastidäre Signalerkennungsprotein cpSRP evolvierte aus dem bakteriellen SRP-System. Es zeigt dementsprechend eine Vielzahl von Homologien, gleichzeitig aber auch eine sehr spezielle Anpassung an seine Aufgaben im Pflanzenorganell. Chloroplastidäres Signalerkennungsprotein 54 (cpSRP54) ist als Homolog zu cytosolischem SRP54 von Bakterien in den co-translationalen Transport involviert. Ein entscheidender Unterschied besteht darin, dass Chloroplasten keine SRP-RNA enthalten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass cpSRP54 auch nicht in der Lage ist bakterielle SRP-RNA zu binden. Es wurden hierfür zwei mutierte Aminosäuren im RNA-Bindemotiv des cpSRP54 identifiziert werden (Richter et

al., 2008). Zusätzlich existiert in den grünen Pflanzenorganellen mit cpFtsY ein Homolog zu seinem cytosolischen SRP-Rezeptor (Kogata et al., 1999). In Bakterien ist die SRP-RNA unabdinglich für die effiziente SRP54-FtsY-Komplexbildung und somit den co-translationalen Transport. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass aufgrund konformationeller Modifikationen der chloroplastidären Proteine auch ohne die SRP-RNA eine vergleichbare Komplexbildungsrate erreicht wird (Jaru-Ampornpan et al., 2009). Der Komplex spielt besonders im Rahmen des co-translationalen Transports und der Thylakoidinsertion des Photosystem II (PSII)-Reaktionszentrums (D1-Protein) eine entscheidende Rolle (Nilsson und Wijk, 2002). Die Insertion an der Thylakoidmembran erfolgt durch die cpSecY Translokase. Ebenso scheint ein weiteres als Alb 3 bezeichnetes Translocon in der Thylakoidinsertion beteiligt zu sein (Pasch et al., 2005).

### 1.4. Der chloroplastidäre SRP (cpSRP)-Komplex

Daneben existiert jedoch noch ein post-translationaler cpSRP-Weg. Dieser ist einzigartig in Chlorplasten und bewältigt u.a. den Transport und die Membraninsertion des light harvesting chlorophyll a/b-binding proteins (LHCP) (Richter et al., 2008).



**Abbildung 1.3: Schematische Struktur und Bändermodell des cp-SRP43.**

Die Bilderläuterung ergibt sich aus dem Fließtext. CD = Chromodomäne; Ank = Ankyrin. Abbildung entnomme aus Stengel et al., 2008

Der post-translationaler Weg wird durch den heterodimeren Komplex aus cpSRP54 und dem Chlorplasten-exklusiven cpSRP43 durchgeführt (Schünemann et al., 1998; Groves et al., 2001). Es kann angenommen werden, dass sich das cpSRP54 des co-translationalen nicht von dem des post-translationalen Transports unterscheidet (Amin et al., 1999). Chloroplastidäres Signalerkennungsprotein 54 stimmt in seinem Aufbau grundlegend mit all seinen SRP-Homologen überein. Es zeigt in gleicher Weise wie oben beschriebenes eukaryotisches SRP54 eine strukturell gekoppelte NG-Domäne mit einer GTPase-Funktion (G-Domäne). Darüberhinaus weist es eine Methionin-reiche M-Domäne auf (Franklin und Hoffman, 1994). Chloroplastidäres Signalerkennungsprotein 43 wurde insbesondere aufgrund seiner Eigenschaft als molekulares Chaperon für LHCP zu fungieren eingehend strukturell untersucht (Falk und Sinning, 2010). Stengel et al, 2008 lösten röntgenkristallographisch die Aminosäuren 85-267 bei 1,5 Å auf. Das Peptid beinhaltet zwei weit verbreitete Proteininteraktionsdomänen: Auf eine N-terminale Chromodomäne

(CD 1) folgen vier „ankyrin-repeats“ (Ank 1-4), die im Röntgen-kristallographischen Bild die Form eines verlängerten Hufeisens zeigen.

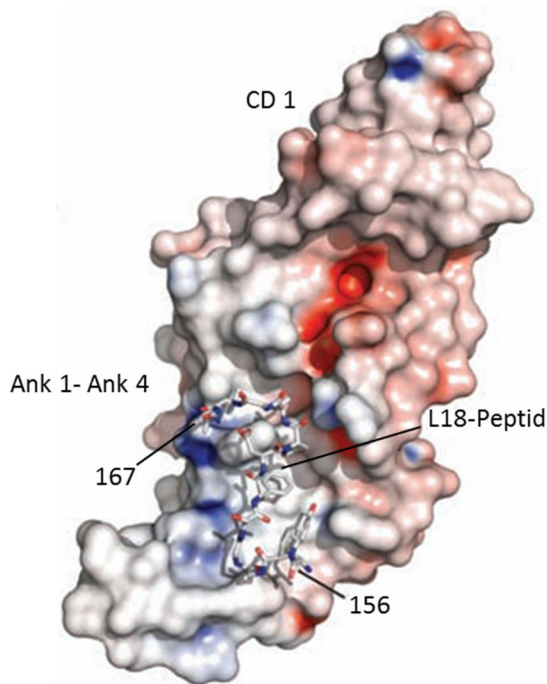


Die konvexe Seite des Hufeisens weist eine Vielzahl negativer Ladungen auf, die konkave zeichnet sich durch das Vorhandensein von zwei hydrophoben Vertiefungen aus. Es folgen schließlich zwei weitere C-terminale Chromodomänen (CD2 und CD3). Röntgen-Kleinwinkelstreuung (SAXS) zeigte, dass Volllängen-cpSRP43 mit einer Länge von 120 Å sowie einem Durchmesser von 40 Å eine große Oberfläche besitzt (Jaru-Amporpan et al., 2010) und somit viel Platz für Interaktionen bietet. Die Wechselwirkung des cpSRP54 mit dem cpSRP43 erfolgt hochspezifisch durch die Interaktion eines am C-Terminus des Proteins (M-Domäne) sitzenden RRKR-Motivs (Funke et al., 2005). Holdermann et al., 2012 konnten diese Interaktion noch detaillierter beschreiben. Röntgenstrukturanalysen sowie heteronukleare NMR-Spektroskopie mit einem synthetischen (RRKR<sub>p10</sub>)-Decamer zeigten, dass dieses an der Schnittstelle zwischen CD2 und dem vierten „ankyrin-repeat“ des cpSRP43 bindet. Holdermann et al. beschreiben die CD2 von cpSRP43 als überaus flexible Proteindomäne, die keine tertiäre Interaktion mit dem restlichen Protein eingeht. Bei Bindung des RRKR-Motivs konnte jedoch eine konformationelle Änderung der Domäne beobachtet werden, die zu einer engeren Positionierung der CD2 zum „ankyrin-repeat“ 4 des Proteins führt. Die Autoren vermuten in dieser hohen Strukturflexibilität der CD2 auch einen entscheidenden Beitrag bei der Bindung der Transmembrandomänen des LHCP an cpSRP43. Hinsichtlich der Stöchiometrie des Komplexes beobachteten Schünemann et al., 1998 nativen cpSRP aus Erbsenpflanzen in Gelfiltrationsläufen bei 200 kDa. Rekombinanter Komplex mit GST-fusioniertem cpSRP43 lief bei 255 kDa. Da nach cDNA-Daten das Molekulargewicht (MW) des heterodimeren Komplexes bei 89 kDa liegen sollte, mutmaßten die Autoren einen tetrameren Zustand mit je 2 Untereinheiten. Groves et al., 2001 wiesen jedoch rekombinanten cpSRP-Komplex in Gelfiltrationsläufen bei 120 kDa nach. Gleichgewichts-Ultrazentrifugationsläufe zeigten eine molekulare Masse von 98 kDa. Diese Autoren konnten keine Komplexe mit höherem MW feststellen und beschreiben cpSRP-Komplex als monodispers hetrodimeren Komplex.

### 1.4.1. Interaktion des cpSRP (43) mit LHCP

Wie zuvor beschreiben, fungiert das cpSRP43 als spezifisches Chaperon des murenen LHCPs. Das Protein ist alleine in der Lage das stark hydrophobe LHCP in Lösung zu halten (Jaru-Amporpan, 2010). Studien zur Solubilisierung von LHCP mit anderen bakteriellen Chaperonen wie z.B. Hsp60, Hsp70 oder „trigger factor“ zeigten, dass keiner dieser Faktoren LHCP in Lösung halten kann (Yuan et al., 1993; Yalovsky et al., 1992; Falk und Sinning 2010). Letzt genannte Autoren konnten sogar eine ATP-unabhängige Desaggregation des LHCP durch cpSRP43 beobachten. Jaru-Amporpan, 2013 bestätigen dieses Desaggregationsvermögen und bezeichnen cpSRP43 als neuen Typ von Chaperon, welcher nur aufgrund der freiwerdenden Bindungsenergie bei der Interaktion mit seinem Substrat dessen Desaggregation leistet. Somit stellt sich die Frage nach den spezifischen Wechselwirkungen und derer Natur im cpSRP43-LHCP-Komplex. Falk und Sinning, 2010 zeigten, dass die Wechselwirkung zwischen cpSRP43 und LHCP vorwiegend hydrophober Natur sein muss.

Selbst in Gegenwart von 1 mol/l Salzkonzentration fand noch eine weitestgehend störungsfreie Komplexbildung statt. Stengel et al., 2008 haben auf Grundlage von Röntgen-kristallographischen Auflösungen des cpSRP43 (CD1-Ank4) gezeigt, dass eine als L18 bezeichnete Region im stromalen



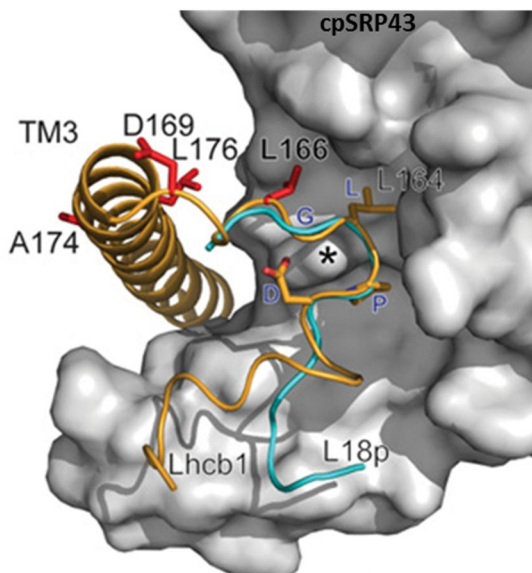
**Abbildung 1.4: Oberflächenpräsentation des cpSRP43/L18 Peptid-Komplexes.**

Die Bilderläuterung ergibt sich aus dem Fließtext. CD = Chromodomäne; Ank = Ankyrin. Die Zahlen indizieren die entsprechende AS-Position im maturen LHCP.

Loop des LHCP notwendig für die Interaktion ist. Diese L18-Region liegt im maturen LHCP zwischen den AS 152-169. Bindungsversuche zwischen einem synthetischen L18-Peptid und cpSRP43 zeigten eine 1:1-Stöchiometrie der Bindung. Die Struktur bindet spezifisch in eine hydrophobe Vertiefung der konkaven Seite des cpSRP (s.o). Die Röntgenkristallographische Aufnahmen zeigen, dass innerhalb der bindenden L18-Region die Tetrapeptid-Struktur DPLG (Asp-Pro-Leu-Gly) essentiell für die Bindung ist. Dieses hoch-konservierte Motiv findet sich in allen LHCPs und konnte sogar bei Sequenzanalysen von Fucoxanthin chlorophyll a/c-binding proteins (FCPs) identifiziert werden. Dort ist es im N-Terminus der Proteine lokalisiert (Lang und Kroth, 2001). Plumley und Schmidt, 1995 erkannten dieses Motiv schon als essentiell für die LHCP-Faltung. Tatsächlich legt sich das DPLG-Motiv im Komplex auf stromaler Seite um eine Kopfgruppe

eines der gebundenen Luteine (Standfuss et al., 2005). Im Falle des cpSRP43-L18-Komplexes legt sich das Tetrapeptid-Motiv um das Tyrosin 204 des cpSRP43. Stengel et al., 2008 konnten durch Überlagerung der kristallographischen Strukturen des LHCP-Komplexes und des cpSRP43/L18-Peptids zeigen, dass in beiden Fällen die Struktur des DPLG-Motivs identisch ist. Es kann daher vermutet werden, dass diese Interaktion zwischen LHCP und cpSRP43 eine Voraussetzung bzw. eine Vorfaltung für die Bindung der Carotinoide darstellt. Komplexbildungsversuche zwischen mutagenisiertem L18-Peptid und cpSRP43 zeigten, dass ein AS-austausch von Tyrosin 204 gegen Alanin zu einer Auflösung der Bindung führte. Neben dieser hoch-spezifischen Bindungsstelle sind aber insbesondere im Hinblick auf die Chaperonaktivität des cpSRP43 noch weitere Interaktionen zwischen hydrophoben Bereichen des LHCP und cpSRP43 unbedingt anzunehmen. Jaru-Ampornpan et al., 2010 zeigten, dass Vollängen-LHCP um mindestens eine Größenordnung stärker an cpSRP43 bindet als dies L18-Peptid tut. Cain et al. (2011) konnten mithilfe von Crosslinker-Versuchen weitere Interaktionsstellen zwischen cpSRP43 und LHCP zeigen. Insbesondere der erste Teil der Transmembranhelix 3 (AS 170-199) interagiert bis einschließlich Aminosäureposition 176 stark mit dem cpSRP43. In diesem Zusammenhang und unter Berücksichtigung oben erwähnter Daten wird

postuliert, dass mindestens 20 Aminosäuren des LHCP (156-176) intensiv mit dem cpSRP43 wechselwirken und es wird ein Model vorgeschlagen, in welchem die TM3 in eine Furche des cpSRP43 bindet. Sowohl von Cain et al. als auch aus anderen Studien sind hingegen keine weiteren direkten Wechselwirkungen zwischen der TM1/TM2 des LHCP mit seinem spezifischen Chaperon bekannt. In Desaggregationsversuchen von LHCP-Mutanten, in welchen die Reihenfolge der TMs vertauscht wurde bzw. TM-Bereiche gegen hydrophobe Membran-durchspannende Domänen anderer Proteine ausgetauscht wurden, zeigte cpSRP43 dennoch Chaperonaktivität (Jaru-Amporpan, 2013). Entscheidend bei der Desaggregation zeigte sich nur das Vorhandensein der L18-Sequenz. Diese Ergebnisse deuten auf promiskuitive unspezifische Wechselwirkung des cpSRP43 mit hydrophoben Domänen hin. Das Chaperon scheint grundlegend hydrophobe Wechselwirkungen überwinden zu können. Für chloroplastidäres SRP54 wurde im Unterschied dazu noch keinerlei Interaktion mit LHCP nachgewiesen (Cain et al., 2011). Das Protein ist allein nicht in der Lage LHCP in Lösung zu halten (Falk und Sinning, 2010).



**Abbildung 1.5: Interaktion der L18-TM3-Domäne des LHCP mit cpSRP43.**

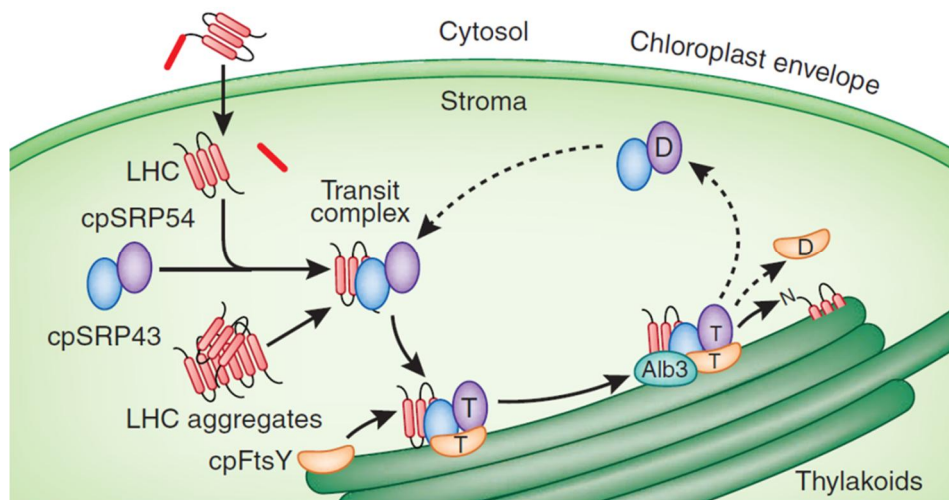
Die Abbildung zeigt ein Modell nach Cain et al., 2011. In blau ist das L18-Peptid (entspricht LHCP 152-169) strukturell bei der Anbindung an das cpSRP43 dargestellt. In gelb ist auf Grundlage der Crosslinker Interaktionsstellen die L18-TM3-Domäne des gefalteten LHCPs in die cpSRP43 Struktur einmodelliert. Abbildung verändert nach Cain et al., 2011.

## 1.5. Die Biogenese des LHCP

Der post-translationale cpSRP-Weg dient exklusiv dem stromalen Transport sowie der Zielführung der Mitglieder der LHC-Protein Familie. Diese zeichnen sich durch drei Transmembrandomänen aus und liegen in der Thylakoidmembran als integraler Chlorophyll- und Carotinoid-bindender light-harvesting chlorophyll a/b-binding complex (LHCII) vor. LHCII fungiert dort als Lichtantenne, welche primär für die Excitonensammlung und somit für eine effiziente photochemische Reaktion im Reaktionszentrum II des photosynthetischen Apparats verantwortlich ist. Zusätzlich spielt der LHCII im Falle einer Überenergetisierung und der damit einhergehenden Gefahr reaktiver O<sub>2</sub>-Spezies eine entscheidende Rolle in der Dissipation überschüssiger Lichtenergie. Die Relevanz des LHCII für die Photosynthese wird deutlich bei der Betrachtung, dass dieser bis zu 30% des Gesamtproteins in der

## Einleitung

Thylakoidmembran ausmacht (Peter und Thornber, 1999). LHCP ist kerncodiert und wird zunächst als precursor-LHCP mit einer N-terminalen Signalsequenz an cytosolischen Ribosomen translatiert. Die Signalsequenz ist für die Translokation in den Chloroplasten verantwortlich. Die Insertion über die Chloroplastenhüllmembran geschieht über den oben beschriebenen TOC-/TIC-Komplex. Nach der Insertion wird die Signalsequenz durch eine spezifische SPP (s.o.) entfernt. Das stark hydrophobe mature Protein ist überaus aggregationsanfällig und benötigt für die Translokation durch das Stroma ein Chaperon. Darüberhinaus muss die spezifische Zielführung des Apoproteins bis hin zum Translocon in der Thylakoidmembran sicher gestellt sein. Diese Aufgaben werden in Chloroplasten vom cpSRP-Komplex übernommen.

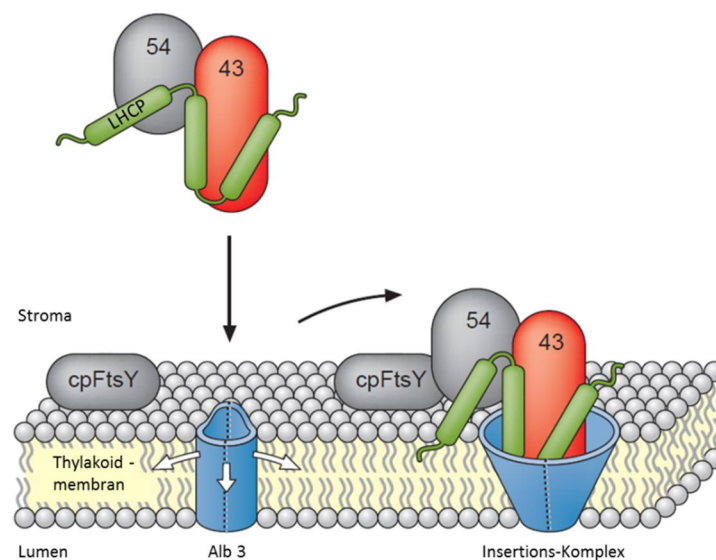


**Abbildung 1.6: Biogeneseweg des LHCP.**

Die dargestellten Vorgänge der Biogenese sind dem Fließtext zu entnehmen. Rot = N-terminale Transitsequenz. T = GTP-gebundener Zustand des cpSRP54/cpFtsY; D = GDP-gebundener Zustand des cpSRP54/cpFtsY. Abbildung verändert nach Henry R. (2010).

Der Komplex erkennt sein hydrophobes Cargoprotein und hält es in Lösung (Schünemann et al. 1998). Payan und Cline, 1991 beschrieben ohne die genaue Kenntnis der cpSRP-Komponenten eine lösliche LHCP-Spezies im Stroma mit einer molekularen Masse von 120 kDa. Die Autoren konnten diese Spezies sowohl nach Chloroplasteninsertion von radioaktiv markiertem LHCP sowie bei Zugabe von radioaktiv markiertem LHCP zu zuvor isoliertem Stromaextrakt identifizieren. Das Molekulargewicht stimmt mit einem potentiell ternären Komplex aus cpSRP54, cpSRP43 und LHCP überein. Dieser wird als sogenannter Transitkomplex bezeichnet. Chloroplastidäres FtsY assoziiert an den Transitkomplex und führt diesen zur Alb 3 Translokase (Moore et al., 2003). Alb3 gehört mit YidC und Oxa1 zu einer konservierten Gruppe von Proteinen, die sich als Translokasen in der Cytoplasmembran von Bakterien (YidC), der inneren Mitochondrienmembran (Oxa1) und eben in der Thylakoidmembran (Alb3) befinden. Obwohl die genauen Mechanismen der Translokasen noch nicht verstanden sind, wird allgemein angenommen, dass sie auch bei der Faltung bzw. Assemblierung der von ihnen inserierten Proteine eine wichtige Rolle spielen (Wang und Dalbey, 2011). Alb3 besitzt 5 Transmembranhelices (TMH) und exponiert den ungefalteten C-Terminus in Richtung Stroma. Die

Wechselwirkung von Alb3 mit dem cpFtsY-Transitkomplex erfolgt spezifisch über die CD2 des cpSRP43 und induziert eine konformationelle Änderung mit  $\alpha$ -helikalen Anteilen im C-Terminus des Alb3 (Falk et al., 2010). Dünschede et al., 2011 konnten zeigen, dass die AS-sequenz 374-388 im stromalen C-Terminus sowie die AS 314-318 am lumenalen Ende der TMH 5 direkt mit cpSRP43 wechselwirken. Die Autoren schlagen einen Mechanismus vor, in welchem zunächst cpSRP43 in Interaktion mit denen im Stroma exponierten AS tritt. Eine dadurch ausgelöste Konformationsänderung induziert die Bildung einer Membranpore. Die Autoren spekulieren weiter, ob diese Wechselwirkung gar zu einer Dimersisierung des Alb3 führt. Blue Native PAGE belegte ein solches generelles Dimerisierungspotential der Insertase. Im Falle der YidC- und Oxa1-Insertase wurde ein solches „Poren-bildendes“ Dimerisierungspotential nachgewiesen. Bei diesen verwandten Insertasen wird durch Wechselwirkung mit dem Ribosom bei der Insertion von co-translational translozierten Proteinen die Dimerisierung induziert und auch stabilisiert (Kohler et al., 2009). Die Interaktion mit den lumenal gelegenen AS der TMH 5 von Alb3 lässt schlussfolgern, dass chloroplastidäres SRP43 in diese Pore eintaucht. Gleichzeitig könnte das gebundene LHCP mit in die Pore co-insertieren. Lewis et al. 2010 beschreiben in ihren Ergebnissen Hinweise darauf, dass die Alb3-cpSRP43 Wechselwirkung die Stabilität des Transitkomplex beeinflusst. Nachgeschaltete Ereignisse wie die GTP-Hydrolyse im cpSRP54 und cpFtsY könnten zur Freisetzung des LHCP führen. Weitere Details der LHCP-Insertion und besonders der Ablauf der Faltung mit Pigmentbindung zum LHCII sind bisher noch nicht aufgeklärt.



**Abbildung 1.7: Modell der Thylakoidinsertion des LHCP.**

Die dargestellten Vorgänge des Andockens des Transitkomplexes an die Thylakoidmembran sowie die Insertion in Alb3 sind dem Fließtext zu entnehmen. Alb3 ist als Dimer dargestellt. Abbildung verändert nach Dünschede et al., 2011.

### 1.6. Andere Chaperonsysteme und deren Funktionsweise

Chloroplastidäres SRP43 nimmt als spezifisches Chaperon eine Sonderstellung unter einer überschaubaren Vielfalt von Chaperonen ein. Allgemein erfordert die Protein Homöostase in Zellen ein ausgeklügeltes Netzwerk molekularer Chaperone. Dies ist unbedingt notwendig, da Proteinmissfaltung und als Folge mögliche Aggregation nicht nur dazu führt, dass Proteine ihrer physiologischen Aufgabe nicht nachkommen, sondern auch zelltoxische Wirkung haben können (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Molekulare Chaperone zeichnen sich insbesondere dadurch aus, dass sie die Ausbildung von fehlerhaften Strukturen bzw. Intermediatstrukturen, die zu einer nicht-funktionellen Konformation führen, verhindern (Ellis und Hemmingsen, 1989). Da eine solche Gefahr prinzipiell für jedes Polypeptid existiert, das zelluläre Repertoire an unterschiedlichen Chaperonsystemen jedoch begrenzt ist, zeigen die meisten bekannten Chaperone eine geringe Substratspezifität. Gleichzeitig zeigen sie einen im Kern jedoch sehr ähnlichen Wirkmechanismus. Sie besitzen alle die Fähigkeit Faltungsintermediate durch Anbindung und Abschirmung vor unspezifischer Aggregation zu schützen (Ellis et al., 1993).

Hoffmann et al., 2004 schlagen eine Kategorisierung von Chaperonsystemen in „Foldasen“ und „Holdasen“ vor: Zur Ersteren gehören die Vertreter der „ATPases associated with various cellular activities“ AAA<sup>+</sup>-Familie, die meist sehr große multimere Strukturen mit bis zu mehreren Megadalton darstellen (Bukau und Horwich, 1998). „Holdasen“ sind hingegen deutlich kleinere Strukturen, die monomolekular arbeiten. Zur AAA<sup>+</sup>-Familie gehören z.B. Clp/Hsp 100 sowie GroEL/Hsp 60. Es handelt sich in beiden Fällen um homohexamere ATPasen, welche in Bakterien, Pflanzen sowie Tieren vorkommen und dort die Entfaltung bzw. Desaggregation von Proteinen bewerkstelligen (Doyle und Wickner, 2008). Diese Chaperonsysteme werden auch als Chaperonine bezeichnet. Typisch für diese Klasse der molekularen Chaperone ist ein zylindrischer Hohlraum, welcher dem Substratprotein als isolierter Reaktionsraum dient (Horwich et al., 2007). Ungefaltete Proteine oder Faltungsintermediate werden als „Ganzes“ aufgenommen. In der Isolation kann das Protein ungestört in einem unimolekularen Prozess korrekt assemblieren. Die kleineren „Holdasen“ binden hingegen meist sehr eng an ihre Faltungsintermediate und arbeiten ebenso wie die „Foldasen“ unter ATP-Verbrauch. Einer der bekanntesten Vertreter stellt das Hsp70-Chaperon dar. Dieses spielt von der Assistierung bei Proteinneufaltung bis hin zur Proteinlenkung bei der Translokation über Membranen eine wichtige Rolle. Hsp70 interagiert in einer 1:1-Stöchiometrie mit seinem Substrat. Zhu et al., 1996 verdeutlichten mithilfe von Kristallstrukturdaten der Substrat-bindenden Domäne des bakteriellen Hsp70 Homologs DnaK die Arbeitsweise von „Holdasen“. Die Autoren lösten die Bindetasche mit dem gebundenen Heptapeptid NRLLLTG röntgenkristallographisch auf. Das Substrat wird in der Bindetasche, die strukturell einen hydrophoben Kanal mit einem Durchmesser von 5-7 Å darstellt in einer langgestreckten Form gebunden. Die Struktur des Kanals lässt darauf schließen, dass der interagierende Polypeptidabschnitt eines Substrats mindestens 10 Å vom Rest des Substrats

positioniert sein und darüberhinaus ungefaltet vorliegen muss. Da immer nur kurze Sequenzen des Substrats gebunden werden können, kommt es i.d.R. zu wiederholten Zyklen von Bindung und Freisetzung des Substrats (Szabo et al., 1995). Darüberhinaus konnte sowohl in *in vivo* als auch *in vitro* Studien gezeigt werden, dass eine effiziente Desaggregation von Proteinen nur in Gegenwart beider Chaperonsysteme, d.h. „Holdasen“ und „Foldasen“ abläuft. (Mogk et al., 1999; Goloubinoff et al., 1999). Neben vorgestelltem Hsp 70 repräsentieren die small heat shock proteins (sHSPs) eine weitere interessante Untergruppe innerhalb der „Holdasen“. Die sHSPs sind passive und Energie-unabhängige Chaperone mit einer molekularen Masse von 12-40 kDa pro Untereinheit. Sie liegen normalerweise als Oligomere vor (Mc Haourab et al., 2009). Erst eine Stimulationsreiz wie z.B. ein Hitzeschock ( $\geq 38$  °C) führt *in vivo* zur Akkumulation von bis zu ~1% des Zelltotalproteins (DeRocher et al., 1991). Stengel et al., 2009 führten Studien bezüglich der Bindungsstöchiometrie des sHSP 18.1 aus Erbsen mit hitze-denaturierter Luciferase durch. Diese wurden mittels Massenspektrometrie (MS) sowie Gelfiltrationschromatographie (GFC) ermittelt. In den Ansätzen wurde HSP 18.1 als intaktes Dodecamer zu Luciferase in einem Verhältnis von 1:1 gegeben. Massenspektroskopische Untersuchungen ergaben über 300 verschiedene HSP 18.1: Luciferase Kombinationen. In weiteren Untersuchungen konnten innerhalb dieser Komplexe nur Spezies mit 14-36 HSP 18.1 Untereinheiten und 1-3 Luciferase Molekülen identifiziert werden. Alle Stöchiometrien, die Stengel et al. berichten, enthielten jeweils einen massiven molaren Überschuss von sHSPs zu denaturiertem Substrat, was die Interaktion mehrerer Chaperone mit einem denaturiertem Substratmolekül impliziert.

### 1.7. Zielsetzung der Arbeit

Die Erstellung dieser Arbeit erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Danja Schünemann der AG Molekularbiologie Pflanzlicher Organellen an der Ruhr-Universität Bochum. Kernaspekt war die Charakterisierung des LHCP in Assoziation mit seinem spezifischen Chaperon cpSRP43 bzw. in Assoziation mit cpSRP als Transitkomplex. Die Arbeit gliedert sich in ein übergeordnetes Projekt ein, welches die Konformation bzw. Faltungszustände des LHCP insbesondere in Abhängigkeit von dessen Biogenesezustand beleuchten soll. In vorangegangenen Arbeiten konnte das Potential der Elektronen paramagnetischen Resonanz (EPR-)Spektroskopie als Möglichkeit der Strukturaufklärung von gelösten Proteinen bzw. Proteinkomplexen gezeigt werden. Solche Messungen im Zusammenhang mit LHCP könnten einen Rückschluss auf eine möglicherweise vorhandene Vorfaltung des Apoproteins im Chaperon-gelösten Zustand unmittelbar vor Thylakoidinsertion zulassen. Sie erfordern jedoch aus messtechnischen Gründen eine Monomolekularisierung des LHCP im Chaperonkomplex. In dieser Arbeit wurden insgesamt 3 unterschiedliche LHCP-Komplexspezies in Detergenz-/Chaotrop-freier Umgebung näher charakterisiert: 1. cpSRP43-LHCP-Komplex als Minimaleinheit der Chaperonisierung in wässriger Umgebung. 2. Transitkomplex –die eigentliche funktionelle Einheit in Chloroplasten. 3. cpSRP54M-Transitkomplex mit einer deletierten Version des

cpSRP54 (ohne NG-Domäne). Es sollte eine Charakterisierung insbesondere auf Ebene des Oligomerisierungsverhaltens sowie der Proteinstöchiometrien in den Komplexen erfolgen. Gelfiltrationschromatographische Untersuchungen sowie (native) Elektrophorese kamen hinsichtlich der Detektion der Oligomerisierung methodisch zum Einsatz. Proteinstöchiometrien sollten auf Grundlage densitometrischer Auswertungen bestimmt werden. Das Vorhandensein oligomerisierter Komplexspezies machte Modifikationen in den Bedingungen der Komplexbildung bzw. dessen Methode notwendig. Hinsichtlich der Vermeidung mutmaßlicher hydrophober Interaktion sollten insbesondere der Einfluss von Detergentien bzw. Proteinaggregationshemmern getestet werden. Da widererwartend schon Vollängen-cpSRP-Komplex ausgeprägtes Oligomerisierungsverhalten aufweist, rückte auch dessen Betrachtung in den Fokus. Zahlreiche Modifikationen der Komplexaufarbeitung, mit dem Ziel monodispers heterodimeren cpSRP-Komplex zu generieren, wurden getestet. Strukturell einheitliche cpSRP-Komplexe müssen als Voraussetzung zur Bildung definierter Transitkomplexe angesehen werden.

Die Literatur ist im Hinblick auf die spezifischen Bindungsstellen zwischen cpSRP43 und LHCP relativ umfangreich und postuliert eine 1:1-Stöchiometrie. Es existieren jedoch nur Studien im Zusammenhang mit Deletionsmutanten bzw. Bindungsdomänen enthaltenen Oligopeptiden. Auch für den cpSRP-Komplex existiert hinsichtlich des Oligomerisierungszustands eine widersprüchliche Datenlage. Die Isolation von cpSRP aus jungen Erbsenpflanzen sollte einen Aufschluss über die nativen Verhältnisse geben. Die Verwendung von Stromaextrakt (SE) im Zusammenhang mit Transitkomplexansätzen diene einerseits der Klärung, inwiefern die Verwendung von rekombinanten Proteinen u.U. eine artifizielle Oligomerisierung hervorruft. Andererseits sollte überprüft werden, ob SE einen Oligomerisierungs-mindernden Faktor enthält.



## 2. Materialien

### 2.1. Geräte

Absorptionsspektrometrie	Jasco V550 UV Vis Spectrophotometer	Jasco Labor- u. Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
	Software: Spectra Manager 5	
	Küvetten - UV-Messungen: Präzisionskü-vetten aus Quarzglas Suprasil, Typ 104.00 2B-QS	
	Küvetten – Vis-Messungen: Präzisionskü-vetten aus optischem Spezialglas, Typ 104.00 2B-OS	
Autoklav	Systec DX 150	Systec GmbH Labor- technik, Wetterberg
	Autoklaviertopf, Omni perfect	Blitz-Elektro- Erzeugnisse Manufaktur Handels- GmbH, Rosbach
Biophotometer	Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf AG, Ham- burg
	Küvetten: Greiner Bio-one cuvettes, semi-micro	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Brutschrank	Modell B50	Memmert GmbH, Schwabach
Densitometrie	VersaDoc Imaging System Model 3000	BioRad Laboratories GmbH, München
	Software: Quantity One V 4.6.3	
Drehrad	Intelli-Mixer	NeoLab, Heidelberg
Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese	Gießapparatur: Midget-Systems	Hoefer, Pharmacia Bio- tec Inc., San Francisco, CA, USA
	Kammer: Mighty Small II SE 259/SE 260	
	Spannungsquelle: Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotec, Buckingham- shire, GB
Entgasung	Aquastop II	Van der Heijden Labor- technik GmbH, Dören- trup

## Material

Gelarchivierung	Geltrockner: Slab Gel Dryer 2003	LKB Produkter AB, Bromma, Schweden
	Vakuumpumpe: Edwards RV5	Crawley, Sussex, GB
	Kühlfalle: KF-2-60	Bachofer GmbH, Reut- lingen
	Vacuum Concentrator Mini 20 BaVaCo	
Gelpermeationschromatographie	Gradientenpumpe: Workstation Gradient Pump	BioRad Laboratories GmbH, München
	Verteilerventil: Diverter Valve SV5-4, BL	
	Injektionsventil: AV7-3 Automated Inject Valve	
	Detektoreinheit: OM-II UV Optics Module and Conductivity Flow Cell	
	Fraktionssammler: Model 2128 Fraction Collector	
Gelpermeationssäulen	Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
	Superose 6 10/300 GL	
Mischgeräte	Vortexer: MS2 Minishaker	IKA-Labortechnik, Wilmington, USA
	Magnetrührer: IKAMAG RCT	IKA-Labortechnik, Staufen
	Inkubationsschüttler: Certomat R/H	Firma B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
	Gelschüttler: Shaker DOS-10Lr	NeoLab, Heidelberg
	Rotationsvorrichtung: Kulturenrad Typ Rotator	Bachofer GmbH, Reut- lingen
	Thermoschüttler: Thermomixer comfort 5355	Eppendorf AG, Ham- burg
Mixer	Heavy Duty Blender	Waring Commercial, New Hartford, CT, USA
Native Polyacrylamid Gelelektrophorese	X Cell SureLock™ MiniCell	Life Technologies GmbH, Darmsatdt

		<b>Material</b>
pH-Meter	pH-Meter: Inolab pH Level 2	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
	pH-Elektrode: SenTix81	
Pipetten	Pipetman P2, P20, P100, P200, P1000, P5000	Gilson Inc, Middlton, WI, USA
Probenaufkonzentrierung	Amicon Ultra 10 30 kMWCO	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
	Lyophilisator: Alpha 2-4 LSC	Christ Ltd, Newton, UK
	Vakuumpumpe: Duo5	Pfeiffer Vacuum GmbH, Asslar
Rotationsverdampfer	Rotator: Heidolph VV2000	Heidolph Elektro GmbH, Kehlheim
	Heizbad: Heidolph VB 2000	
	Kühlung: Minichiller	Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg
Sterilbank	Laminar Flow Typ HLF H	SLEET Technik GmbH, Mainz
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 102 H	Bandelin Electronic GmbH, Berlin
Ultraschallstab	VIA, V9906 Vibra Cell	Sonic & Materials Inc., Danbury, CT, USA
Umpufferung	Zeba™ Desalt spin columns 5ml/10ml	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Waagen	Analysenwaage: Analytik A 200 S	Sartorius Stedium Biotech S.A., Göttingen
	Präzisionswaagen: BP 2100 S bzw. L610	
Wärmeschrank	T 5042	Heraeus GmbH, Hanau
Wasserbad	Thermomix MM	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen
Wasserkocher	HB4 Basic	IKA Labortechnik, Staufen

## Material

---

Western Blot	Trans-Blot SD Cell	BioRad Laboratories GmbH, München
Zentrifugen	Tischzentrifugen: Hettich EBA 12, Rotor 1124	
	Kühlzentrifuge: Mikro 22 R Typ 1110 Rotoren: 1015, 1195, 1016	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
	Kühlzentrifuge: Rotina 38 R Typ 11707 Rotoren: 1792, 1789-L	
	Kühlzentrifuge: Avanti J-26 XP Rotoren: JLA 10.500, JA 20	Beckmann Coulter GmbH & Co. KG, Krefeld

## 2.2. Chemikalien

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden von folgenden Herstellern in möglichst hoher Reinheit bezogen: Agilent Technologies (Waldbronn), BASF (Ludwigshafen), Becton Dickinson GmbH (Heidelberg), Biomol (Hamburg), Bio-Rad (München), Boehringer (Mannheim), Fermentas (Sankt Leon-Rot), Invitrogen (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren), Merck KGaA (Darmstadt), New England Biolabs GmbH (Frankfurt), Novagen (Darmsatdt) Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen), PerkinElmer Life Sciences (Waltham, MA, USA), Roth GmbH (Karlsruhe), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg), SIGMA-Aldrich (München), Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich), VWR International GmbH (Frankfurt).

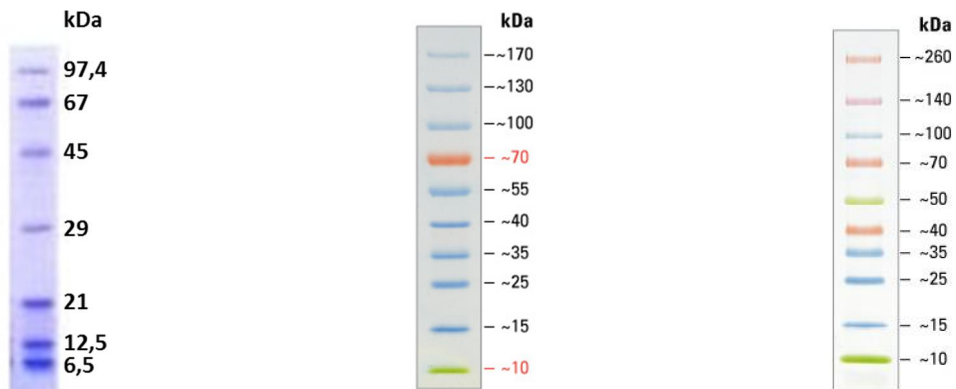
## 2.3. Längenstandards

Für die Auftrennung von Proteinen mittels nativer bzw. denaturierender Gelelektrophorese wurden zur Identifizierung der Molekulargröße verschiedene Längenstandards eingesetzt. Diese bestehen aus einem Proteingemisch mit bekannten Molekulargewichten. Ebenso kamen im Rahmen der Größeneichung der Gelfiltrationschromatographie (GFC) standardmäßige Protein zum Einsatz

### 2.1.1. Denaturierende Gelelektrophorese

Wurde eine Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) geblottet, kam immer „prestained“ Proteinmarker (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder bzw. PageRuler Prestained Protein Ladder (beide Thermo Fisher Scientific) zum Einsatz. Ansonsten wurde standardmäßig Protein Test Mixture 6 (Serva) verwendet. Die ersten beiden Marker wurden als „ready to use“-Mischung

verwendet. Protein Test Mixture 6 wurde in SDS-Probenpuffer mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst.



**Abbildung 2.1: Längenstandards für die denaturierende PAGE.**

Links: Protein Test Mixture 6. Mitte: PageRuler Prestained Protein Ladder. Rechts: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder. Abbildungen entnommen von [www.serva.de](http://www.serva.de); [www.piercenet.com](http://www.piercenet.com).

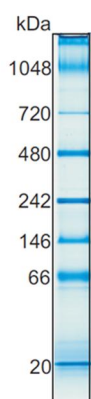
---

**SDS-Probenpuffer:** 15% Glycerin  
 2% SDS  
 0,025% Bromphenolblau  
 125 mmol/l Tris-HCl<sub>pH 6,8</sub>  
 10 mmol/l DTT

---

### 2.1.2. Native Gelelektrophorese

Sowohl für die „Blue native“ (BN-)PAGE, als auch die „colourless native“ (CN-)PAGE, wurde NativeMARK Unstained Protein Standard (Invitrogen) verwendet. Der Marker wurde als „ready to use“-Mischung verwendet.



**Abbildung 2.2: Längenstandards für die native PAGE.**

NativeMARK Unstained Protein Standard aufgetrennt in einem 4-16% Bis-Tris Gel. Abbildung entnommen aus Invitrogen Manual „NativeMARK Unstained Protein Standard“.

### 2.1.3. Eichproteine für die Gelfiltrationschromatographie

Tabelle 2.1: Eichproteine für die Gelfiltrationschromatographie.

Protein/Glykan	Molekulargewicht [kDa]
Blue Dextran	2000
Thyroglobulin	669
Apoferritin	443
$\beta$ -Amylase	200
Alkohol-Dehydrogenase (ADH)	150
Serumalbumin-Rind (BSA)	66
Ovalbumin	42,8
Myoglobin	17

### 2.4. Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden 3 Varianten von kompetenten *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterienstämmen verwendet. JM101 diente der Überexpression von LHCP-Varianten. Rosetta (DE3) diente der Überexpression von cpSRP43, cpSRP54 sowie deren Deletionsvarianten. JM101 besitzt keine intrinsische Antibiotikum-Resistenz. Rosetta (DE3) ist ein BL21-Abkömmling und besitzt ein pRARE-Vektor. Darauf befindet sich eine Chloramphenicol-Resistenz. Zusätzlich codiert der pRARE-Vektor für im *E. coli* codon usage wenig gebrauchte 6 Selten-tRNAs und stellt somit die effiziente Translation von eukaryotischen Genen sicher. DH5 $\alpha$  diente ausschließlich der Plasmidvervielfältigung und anschließenden Isolation.

#### DH5 $\alpha$

**Genotyp:** F-  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-,mK+) *phoA supE44*  $\lambda$ - *thi-1 gyrA96 relA1*

**Hersteller:** Invitrogen, Karlsruhe

#### JM101

**Genotyp:** *supE thi-1*  $\Delta$ (lac-proAB) [*F'*traD36 *proAB lac<sup>q</sup>ZAM15*]

**Hersteller:** New England BioLabs, Frankfurt am Main

#### Rosetta (DE3)

**Genotyp:** *F ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm pRARE (Cam<sub>R</sub>)*

**Hersteller:** Novagen, Merck Bioscience, Darmstadt

### 2.5. Vektoren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Strukturgene befanden sich auf insgesamt 4 unterschiedlichen Vektoren, die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen:

pDS12-RBSII

Dieser Vektor trägt alle Varianten des LHCP-Strukturgens. Das Plasmid beinhaltet ein Col E1 Replicon sowie eine „multiple cloning site“ (MCS). Der MCS ist ein Promotor aus dem T5-Phagen sowie ein Operator, der unter der Kontrolle des lac-Operators steht, vorgeschaltet. Die Transkription ist somit Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)-induziert. Darüberhinaus codiert der Vektor für  $\beta$ -Lactamase (Amp<sup>r</sup>) und erhält so seine Ampicillin-Resistenz.

pETDuet-1

Der Vektor trägt das Strukturgen für N-terminal His<sub>6</sub>-tag tragenden cpSRP43 sowie His-cpSRP54M. Das Plasmid beinhaltet 2 MCS und ist somit prinzipiell zur Coexpression befähigt. Jeder MCS gehen ein T7-Promotor, ein lac-Operator sowie eine eigene ribosome binding site (RBS) voraus. Die Transkription ist IPTG-induziert. Der Vektor trägt ein Col E1 Replicon und codiert für Chloramphenicol-Acetyltransferase (Chloramphenicol-Resistenz). Es ist eine Co-Transformation mit anderen Duet-Vektoren mit unterschiedlichem Replicon und Antibiotikum-Resistenz möglich.

pCOLADuet-1

Dieser Vektor trägt das Strukturgen für das cpSRP54. Das Plasmid beinhaltet 2 MCS und ist somit prinzipiell zur Coexpression befähigt. Jeder MCS gehen ein T7-Promotor, ein lac-Operator sowie eine eigene ribosome binding site (RBS) voraus. Die Transkription ist IPTG-induziert. Der Vektor trägt ein COLA Replicon und codiert für N-Acetyltransferase (Kanamycin-Resistenz).

pRSFDuet-1

Der Vektor trägt das Strukturgen für das cpSRP54M. Das Plasmid beinhaltet 2 MCS und ist somit prinzipiell zur Coexpression befähigt. Jeder MCS gehen ein T7-Promotor, ein lac-Operator sowie eine eigene ribosome binding site (RBS) voraus. Die Transkription ist IPTG-induziert. Der Vektor trägt ein RSF Replicon und codiert für N-Acetyltransferase (Kanamycin-Resistenz).

## 2.6. Rekombinante Proteine

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende rekombinant hergestellte Proteine bzw. Varianten dieser Proteine verwendet:

**Tabelle 2.2: Verwendete rekombinante Proteine.**

Protein(-variante)	Molekulargewicht [kDa]	Wirtsvektor	Überexpressionsstamm
(His-)LHCP	25 bzw. 25,9	pDS12-RBSII	JM101
His-cpSRP43	36,8	pETDuet-1	Rosetta(DE3)
cpSRP54	52,3	pCOLADuet-1	Rosetta(DE3)
cpSRP54M	21,5	pRSFDuet-1	Rosetta(DE3)
His-cpSRP54M	23	pETDuet-1	Rosetta(DE3)

## Material

Die verwendeten cpSRP-Proteine wurden als Dauerkulturen von der AG Schünemann, Ruhr-Universität Bochum zur Verfügung gestellt. Alle cpSRP-Varianten mit His<sub>6</sub>-tag trugen diesen N-terminal. Im Falle des LHCP wurden verschiedene Varianten des wildtypischen Proteins verwendet. His<sub>6</sub>-tag tragende Versionen hatten diesen C-terminal sitzend. Tabelle 2.3 stellt die verwendeten LHCP-Varianten und deren Veränderung im Vergleich zum wildtypischen Protein vor.

**Tabelle 2.3: Verwendete LHCP-Varianten.**

D7f3 codiert für nativen LHCP. Die Beschreibungen erklären jeweils die Veränderung im Vergleich zu nativem LHCP. As= Aminosäure; Pos. = Position; Gängige Abkürzungen für die As Cystein, Serin, Valin.

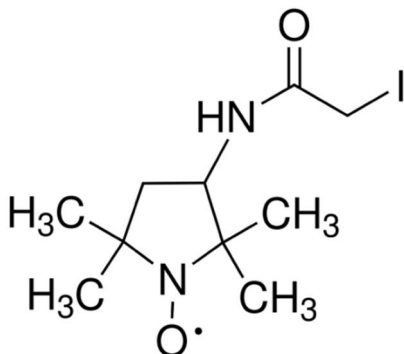
LHCP-Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
D7f3	Wildtypischer LHCP	Dilly-Hartwig, 1998
C79S	As-Austausch an Pos. 79 Cys→Ser	
C79Sh	Siehe C79S;C-terminaler His <sub>6</sub> -tag	Müller, 2008
V90C	As-Austausch an Pos. 90 Val→Cys	
S59C/V90C	As-Austausch an Pos.59 Ser→Cys; Pos.90 Val→Cys	
S106C	As-Austausch an Pos. 106 Ser→Cys	
S106C/S160C	As-Austausch an Pos.106 Ser→Cys; Pos.160 Ser→Cys	

## 2.7. EPR-Label

Für EPR-spektroskopische Vermessungen wurde das freie Radikal 3-(2-Iodacetamido)-PROXYL (Sigma-Aldrich) verwendet. Die reaktive Gruppe ist eine nukleophil angreifbare Methylengruppe in Nachbarschaft zu einer Carbonylgruppe bzw. eines Iodsubstituenten.

**Tabelle 2.4: Struktur und Daten zu 3-(2-Iodacetamido)-PROXYL.**

Struktur und Daten entnommen von [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com).



### 3-(2-Iodacetamido)-PROXYL

Molekulargewicht: 325,17 g/mol

Löslich in: DMSO,DMF, Ethanol

Reaktive Gruppe: Methylengruppe

Besonderheiten: Licht-sensitiv



### 3. Methoden

#### 3.1. Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1. Anzuchtsmedien für Bakterien

Lysogeny broth - (LB-)Medien bzw. LB-Agarplatten wurden in Verbindung mit der Bakterienvereinzelnung bzw. Bakterienanzucht (Flüssigmedien) verwendet. LB-Flüssigmedien wurden in verschiedenen Volumina angesetzt und in Erlenmeyerkolben autoklaviert. Die Lagerung erfolgte mit Alufolie dicht verschlossen bei Raumtemperatur (RT). Antibiotika wurden unmittelbar vor Gebrauch jeweils aus einer 1000-fach konzentrierten Stammlösung unter sterilen Bedingungen zugegeben.

LB-Agar wurde nach dem Autoklavieren im Wasserbad auf 50 °C temperiert. Es wurden ggf. Antibiotika aus einer 1:1000-fach konzentrierten Stammlösung unter sterilen Bedingungen zugegeben. Anschließend wurde das flüssige Medium so in Petrischalen gefüllt, dass der Boden vollständig bedeckt war. Die Aushärtung erfolgte bei RT, die Lagerung Kopf-über bei 4 °C.

---

<b>LB-Medium:</b>	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl → pH-Einstellung auf 7,5 (mit NaOH)	<b>LB-Agar:</b>	LB-Medium 1,5% (w/v) Agarose → pH-Einstellung auf 7,5 (mit NaOH)
<b>Ampicillin- 1000 x:</b>	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	<b>Chloramphenicol- 1000 x:</b>	34 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
<b>Kanamycin- 1000 x:</b>	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>		

---

##### 3.1.2. Bakterienvereinzelnung

Die Bakterienvereinzelnung auf LB-Agarplatten erfolgte in 2 Zusammenhängen: 1. Die Bakterienanzucht/-vereinzelnung aus Dauerkulturen. Dazu wurde eine ausgeglühte Impföse nach Erkalten in die jeweilige Dauerkultur getaucht und diese im Dreistrichverfahren auf einer entsprechenden Antibiotika-Platte ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht (üN) bei 37 °C Kopf-über inkubiert. 2. Die Bakterienvereinzelnung von Transformationsansätzen (vgl. 3.1.4). Dazu wurden 100-250 µl Transformationsansatz auf eine entsprechende Antibiotika-Platte gegeben und sorgfältig

mit einem abgeflamten Drigalskispatel bis zum vollständigen Einziehen der Suspension verteilt. Die Platten wurden üN bei 37 °C Kopf-über inkubiert.

In beiden Fällen wurden die vereinzelt Bakterienkolonien für einen weiteren Gebrauch bei 4 °C Kopf-über gelagert. Entsprechende Petrischalen waren mit Parafilm abgedichtet.

### 3.1.3. Plasmid isolation und DNA-Quantifizierung

Neben der genomischen Bakterien-DNA (Nucleoid), besaßen die verwendeten Bakterienstämme Vektoren, welche die genomische Sequenz der Zielproteine trugen. Der große Vorteil, DNA-Sequenzen auf solchen Strukturen unterzubringen, besteht darin, diese spezifisch isolieren zu können. Die Plasmid isolation erfolgte mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II und 10-25 ml einer üN-Kultur von Bakterien mit entsprechendem Plasmid. Es wurde entsprechend den Herstellerangaben gearbeitet. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 70 µl auf 50 °C vorgewärmtes steriles H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> benutzt. Der Durchlauf der Säule wurde erneut aufgetragen und ein zweites Mal eluiert.

Die Quantifizierung der DNA erfolgte fotometrisch bei λ=260 nm im Biofotometer (Eppendorf AG, Hamburg). Die Reinheit der DNA wird mithilfe zweier Messungen bei λ=280 nm sowie λ=320 nm bestimmt. Bei erster Wellenlänge absorbieren insbesondere Proteinverunreinigungen (speziell: Tyr, Trp); die zweite Wellenlänge dient der Detektion des generellen Hintergrundrauschens der Probe. Ein 260 nm/280 nm Quotient von 1,8 zeigt eine nahezu proteinfreie Umgebung an. Zunehmende Verunreinigung wirkt sich in einer Abnahme des Quotienten aus. Die tatsächliche Proteinkonzentration wird nach folgender Formel berechnet:

$$c(\text{DNA}) [\text{ng}/\mu\text{l}] = (A_{260} - A_{320}) \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 3.1.4. Transformation

Eine Transformation dient dem Import bzw. der Inkorporation isolierter Plasmid-DNA in eine kompetente, d.h. aufnahmefähige, Bakterienzelle. In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils nur chemisch kompetente Zellen, deren Aufnahmefähigkeit auf einer Schwächung/Perforierung der Zellmembran in Folge einer CaCl<sub>2</sub>-Behandlung beruht, verwendet. Generell bedürfen Transformationen sehr hoher Sorgfalt und Vorsicht, da kompetente Zellen in flüssiger Umgebung äußerst fragil sind.

#### Transformation in DH5α-Zellen

Die Einbringung von Plasmid-DNA in den „high copy plasmid“-Stamm DH5α diente der Vervielfältigung der DNA. Es wurden 50 µl kompetente Zellen ca. 10 min. auf Eis aufgetaut und 1 µl (10-100 ng) isolierter Plasmid-DNA sehr vorsichtig unter leichtem Rühren mit einer geeigneten Pipettenspitze eingebracht. Es folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis sowie ein Hitzeschock bei

42 °C (temperiertes Wasserbad) für exakt 45 s. Anschließend wurden 450 µl auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben. Die Probe wurde ca. 1-2 h bei 37 °C unter Bewegung (z.B. Drehrad) inkubiert und schließlich auf entsprechende LB-Platten (Antibiotika-Resistenz) zur Vereinzelung ausplattiert (vgl. 3.1.2).

#### Transformation in Rosetta-Zellen

Kompetente Rosetta-Zellen kamen immer dann zum Einsatz, wenn frisch transformierte Zellen für Überexpressionskulturen benötigt wurden. Die bei -80 °C gelagerten 50 µl Aliquots mit kompetenten Zellen wurden 10 min. auf Eis aufgetaut, ehe 1 µl (5-25 ng) isolierte Plasmid-DNA unter sehr leichtem Rühren mit einer geeigneten Pipettenspitze zugegeben wurde. Es folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis mit anschließendem Hitzeschock bei 42 °C für 30 s. Anschließend wurde der Ansatz erneut für 2 min auf Eis gelagert, ehe 225 µl SOC-Medium zugesetzt wurden. Der Rest erfolgte analog der DH5α-Transformation.

---

**SOC-Medium:** 2% (w/v) Trypton  
0,5% (w/v) Hefeextrakt  
0,05% (w/v) NaCl  
20 mmol/l Glucose  
2,5 mmol/l KCl  
10 mmol/l MgCl<sub>2</sub>  
→ pH Einstellung auf 7,0  
(mit NaOH)

---

## **3.2. Biochemische und präparative Methoden**

### **3.2.1. Isolation von Stromaextrakt (SE) aus jungen Erbsenpflanzen**

Zur Isolation des SE wurden 8-11 Tage alte Erbsenpflanzen verwendet. Es wurde ein 10 l Eimer halb voll mit Erbsensamen („Kleine Rheinländerin“ oder auch „Petit Provencale“ genannt) gefüllt und ca. 3/4 mit Leitungswasser befüllt. Die Erbsensamen wurden mind. 1,5 Tage unter Luftzufuhr eingequollen. Nach dem Quellen waren die Eimer meist voll mit Erbsen und wurden in halbvoll gefüllte Schalen mit Vermiculit ausgesät. Die Aussaat erfolgte sehr dicht, dass ca. 80-90% der Vermiculit-Oberfläche mit Erbsensamen bedeckt waren. Ein voller 10 l Eimer genügt dabei zur Aussaat von 6-7 Schalen. Die Erbsen wurden schließlich mit wenig Vermiculit überstreut und in Klimakonstanträumen unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht) bei einer Leuchtintensität von ca. 150 µmol e<sup>-</sup> · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> angezogen. Die Ernte wurde spätestens einen Tag, nachdem die Primärblätter der Erbsen sich entfaltet hatten, durchgeführt.

### 3.2.1.1. Chloroplasten-Isolation

Bei der Aufarbeitung von mehr als 4 Schalen bietet es sich an diese auf 2 Tage aufzuteilen. In der Beschreibung der Methode wird auf den geeigneten Unterbrechungsschritt hingewiesen.

Es wurde der obere Teil der Erbsen (Blattmaterial) mit einer Schere geerntet und dieses nochmals leicht zerkleinert. Das vorgeschchnittene Material wurde in den Waring Blender gegeben und sofort mit kaltem Isolationsmedium vermenget. Pro 2 Schalen wurden ca. 0,75-1 l Isolationsmedium verwendet. Das Blattmaterial wurde auf mittlerer Stufe für wenige Sekunden gehäckselt. Dies wurde so lange wiederholt, bis nur noch wenige Quadratmillimeter große Blattstücke zu erkennen waren. Anschließend erfolgte eine Filtrierung des Homogenats durch 4 Lagen Baumwollmull sowie eine Lage Nylongaze (20  $\mu$ m). Der Durchfluss wurde in 400 ml Zentrifugenbechern aufgefangen und in diesen zentrifugiert (4 °C , 2 min, 4500 rpm im Rotor JLA 10.500). Der grüne Überstand wurde sofort dekantiert und das tief grüne Pellet auf Eis gelagert. Es wurden 10-15 ml Isolationsmedium zu jedem Pellet gegeben und dieses mit einem Haarpinsel sehr vorsichtig resuspendiert. Zur Auftrennung von intakten Plastiden und Chloroplastenbruch wurde die Suspension auf Percoll-Gradienten aufgetragen. Diese Gradienten bestanden aus 15 ml 40% Percoll-Puffer, welcher mit 10 ml 85% Percoll-Puffer zunächst unterschichtet wurde. Es wurden anschließend 7-8 ml Chloroplastensuspension pro Percoll-Stufengradienten aufgetragen. Es bietet sich an, einen Gradienten nur mit 2-3 ml zu füllen, um die spätere Bandierung von intakten Chloroplasten und Plastidenbruch besser erkennen zu können. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C, 12 min, 5000 rpm im Rotor JS 13.11. Die obere tief grüne Bande des Percoll-Gradienten wurde vorsichtig abgezogen und verworfen (Chloroplastenbruch). Die untere tiefgrüne Bande wurde abgezogen und auf Eis gelagert. Eine eventuelle Unterbrechung der Methode kann bei diesem Schritt erfolgen. Die intakten Chloroplasten werden dann im relativ viskosen isoosmotischen Medium bis zum nächsten Tag auf Eis gelagert.

Die Suspension wurde 1:4 mit Sorbitolpuffer verdünnt und erneut zentrifugiert (4° C, 3 min, 4000 rpm im JLA 10.500). Der Überstand wurde anschließend vorsichtig dekantiert und das Chloroplastenpellet in 2-3 ml Sorbitolpuffer resuspendiert. Alle resuspendierten Pellets wurden vereint, das Gesamtvolumen bestimmt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

<b>Isolationsmedium:</b> 330 mmol/l Sorbitol 50 mmol/l HEPES 1,5 mmol/l MgCl <sub>2</sub> → pH Einstellung auf 8,0 (mit KOH)	<b>Sorbitolpuffer:</b> 330 mmol/l Sorbitol 50 mmol/l HEPES → pH Einstellung auf 8,0 (mit KOH)
<b>Percoll-Lösungen:</b> 85 bzw. 40% Percoll 330 mmol/l Sorbitol 50 mmol/l HEPES 1 mmol/l EDTA → pH Einstellung auf 8,0 (mit KOH)	

---

### 3.2.1.2. Stromaextraktion

Von der vereinten Chloroplastensuspension wurde eine 1:1000 oder 1:500 Verdünnung in 80% Aceton hergestellt und diese fotometrisch vermessen (vgl. 3.2.5.1). Nach einem Zentrifugationsschritt (4 °C, 3 min, 4000 rpm im Rotor JA 20) wurde das Pellet in so viel hypoosmotischem Lysispuffer aufgenommen, dass die Chlorophyllkonzentration 1,5 mg/ml betrug. Das Pellet wurde nun durch Vortexen vollständig resuspendiert und zur Lyse 10 min auf Eis gelagert. Es schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt (4 °C, 15 min, 18000 rpm im Eppi-Rotor: 1195 oder JA 20) zur Trennung von Stroma und Thylakoiden an. Der Überstand wurde abschließend vorsichtig dekantiert oder mit einer Pipette abgezogen und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und gelagert. Das Thylakoidpellet wurde verworfen. Die Konzentrationsabschätzung von nativem cpSRP im SE wird in 3.2.5.2 beschrieben.

---

<b>Lysispuffer:</b>	10 mmol/l HEPES → pH Einstellung auf 8,0 (mit KOH)
---------------------	--

---

### 3.2.2. Überexpression rekombinanter Proteine

Es erfolgte sowohl eine Überexpression von wasserlöslichen (cpSRP) als auch von hydrophoben (LHCP) Proteinen. Das Prinzip ist in beiden Fällen gleich. Letztere unterscheiden sich dadurch, dass sie vom Überexpressionswirt als Inclusion bodies (IBs) abgelagert werden und sich in der späteren Aufarbeitung im Pellet befinden.

In beiden Fällen (spezifische Unterschiede: siehe unten) erfolgte die im präparativen Maßstab durchgeführte Überexpression jeweils in 800 ml LB-Flüssigmedien mit entsprechenden Antibiotika-

## **Methoden**

---

Zusatz (vgl. 3.1.1). Nach Bakterienanzucht (Wachstumsphase) betrug die Überexpressionsphase jeweils 3-5 h und wurde durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mmol/l) induziert. Anzucht und Induktion erfolgte jeweils auf einem Orbitalschüttler bei 180 rpm und 37 °C. Die Bakterienkultur bzw. der Abbruch der Überexpression erfolgte durch Zentrifugation der Bakteriensuspensionen (4 °C, 5 min, 8000 rpm im Rotor JLA 10.500). Die Pellets wurden ggf. zur Lagerung eingefroren.

### Überexpression des LHCP in JM101

Es wurde jeweils eine Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze aus einem Vereinzlungsausstrich gepickt und direkt in den 800 ml Überexpressionsansatz gegeben. Die Bakterienwachstumsphase erfolgte üN. Die abzentrifugierten Pellets wurden meist direkt weiterverarbeitet.

### Überexpression der cpSRP-Einzelproteine in Rosetta

Es wurde jeweils eine einzelne Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von Transformationsplatten gepickt. Besonders im Falle des cpSRP54 ist es wichtig, die Bakterienkolonien nur von frisch transformierten LB-Platten (nicht älter als 1 Woche) zu verwenden. Die gepickten Kolonien wurden zunächst in 50-100 ml Vorkultur üN wachsen gelassen und wurden am nächsten Tag abzentrifugiert (4 °C, 5 min, 8000 rpm im Rotor JA 20). Es erfolgte eine Resuspendierung der Bakterienpellets in frischem LB-Medium. Anschließend wurde frisches, mit entsprechenden Antibiotika versetztes LB-Flüssigmedium (800 ml) ~ 1:30 mit der Vorkultur-Suspension versetzt. Die Anzucht erfolgte für 3-4 h bis zu einer  $OD_{600nm} \leq 2$ . Bei Erreichen dieser optischen Dichte wurde IPTG zugegeben. Die abzentrifugierten Pellets wurden vor der weiteren Verarbeitung immer eingefroren.

### Coexpression von His-cpSRP43 und cpSRP54

Es erfolgte das Picken einer einzelnen Bakterienkolonie von einer LB-Platte mit frisch co-transformierten Rosetta-Zellen. Der restliche Verlauf entsprach der Überexpression der cpSRP-Einzelproteine

### **3.2.3. Totalproteinbestimmung**

Eine Totalproteinbestimmung dient der Kontrolle des Überexpressionserfolgs. Dazu wird eine Probe vor IPTG-Induktion einer Probe nach abgelaufener Expression gegenübergestellt. Es wurden je 1 ml Probe vor (-IPTG) und nach (+IPTG) Induktion dem Überexpressionsansatz entnommen. Es erfolgte zunächst ein Frier-Tau-Zyklus, welcher dem Aufbrechen der Bakterienzellen diente. Anschließend wurde das Bakterienpellet an einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (RT, 2 min, 14000 rpm). Das Pellet wurde in 400 µl TCP-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Es kam zu einer elektrophoretischen Untersuchung gleicher Mengen der Proben.

---

<b>TCP-Puffer:</b>	50 mmol/l Tris HCl <sub>pH 7,5</sub>
	10 mmol/l MgCl <sub>2</sub>
	1 mmol/l MnCl <sub>2</sub>

---

### 3.2.4. Aufarbeitung der überexprimierten Proteine

#### LHCP

Die Bakterienpellets aus 3.2.2 (800 ml Kultur) wurden in 30 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> mit 24 mg DTT versetzt und durch Vortexen und im Ultraschallbad resuspendiert. Zur besseren Aufarbeitung der Inclusion bodies (IBs) wurden 22 µl DNase I-Lösung zugegeben, gründlich gemischt und ca. 15 min. inkubiert. Die Zellyse erfolgte mittels eines Ultraschallstabs. Die Suspension wurde zu diesem Zweck in 40 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min unter Eiskühlung Ultraschallstößen ausgesetzt (50% duty cycle, Intensität (output control) 5). Es bietet sich an, die Bakteriensuspension hin und wieder durch Invertieren zu mischen. Es folgte eine Zentrifugation der Bakteriensuspension. Die Einstellungen gelten auch für alle folgenden Zentrifugationsschritte (4 °C, 5 min, 8000 rpm im Rotor JA 20). Das zunächst erhaltene Lysatpellet enthält die LHCP-IBs sowie weitere unlösliche Bestandteile der Zelldebris. Das Pellet wurde zunächst mit 16 ml Detergentienpuffer versetzt, vollständig resuspendiert und anschließend wieder zentrifugiert. Das Pellet wurde weiter in 8 ml Tritonpuffer resuspendiert und bei 4 °C üN in einem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine weitere Zentrifugation. Die nunmehr weitestgehend weißen IBs wurden erneut einem 8 ml Tritonwaschschritt unterzogen und umgehend zentrifugiert. Entsprechende Schritte wiederholten sich mit 2 Waschgängen 4 ml Trispuffer. Das Endpellet wurde in Trispuffer resuspendiert und nach Messung der Konzentration bei -18 °C gelagert.

---

<b>Detergentien-</b>	1% (w/v) Na-Desoxycholat	<b>Tritonpuffer:</b>	0,5% (w/v) Triton-X-100
<b>puffer:</b>	1% (w/v) Triton-X-100		20 mmol/l Tris HCl <sub>pH7,5</sub>
	200 mmol/l NaCl		1 mmol/l EDTA
	20 mmol/l Tris HCl <sub>pH7,5</sub>	<b>Trispuffer:</b>	50 mmol/l Tris HCl <sub>pH7,5</sub>
	10 mmol/l β-Mercaptoethanol		1 mmol/l EDTA
	2 mmol/l EDTA		

<b>DNase I-Stamm-</b>	
<b>lösung:</b>	5 mg/ml

---

#### cpSRP-Proteine

Die Bakterienpellets aus 3.2.2 wurden mit 10 ml Lysispuffer pro 1g Feuchtpellet versetzt und bis zur vollständigen Resuspendierung gevortext sowie im Ultraschallbad behandelt. Die Suspension wurde in

## Methoden

---

40 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Mittels Ultraschallstab wurde die Zellyse durchgeführt. Die Zentrifugenröhrchen wurden dabei auf Eis gelagert um eine zu große Erwärmung zu vermeiden. Die Ultraschallbehandlung (50% duty cycle; Intensität (output control): 4) erfolgte in 4 x 1 min Schritten, zwischendurch wurde die Bakteriensuspension invertiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt des Lysats (4° C, 15 min, 15000 rpm im JA 20). Der Protein-enhaltene Überstand wurde dekantiert und zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

---

**Lysispuffer:**        300 mmol/l NaCl  
                          50 mmol/l HEPES  
                          2 mmol/l  $\beta$ -Mercaptoethanol  
                          → pH Einstellung auf 8,0 (mit KOH)

---

### 3.2.5. Protein- und Pigmentquantifizierung

Die Proteinquantifizierung wurde auf 2 verschiedene Varianten durchgeführt: 1. Die exakte Methode der fotometrischen Proteinkonzentrationsbestimmung. Diese wurde im Rahmen der LHCP-, der His-cpSRP43-Quantifizierung sowie der Konzentrationsbestimmung der cpSRP-Komplexe durchgeführt. Die Konzentration des Zielproteins wird dabei anhand der spezifischen  $OD_{280}$  bestimmt. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen As Tyrosin und Tryptophan. Bei bekanntem Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) kann mit der ermittelten Extinktion ( $E$ ) und dem Lambert Beer'schen Gesetz ( $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ ; mit  $c$  = Konzentration;  $d$  = Schichtdicke) die Konzentration errechnet werden. Voraussetzung dazu ist, dass das Protein möglichst homogen aufgereinigt ist, da Fremdproteine durch ihren Extinktionsbeitrag zur Verfälschung der spezifischen Konzentration führen. 2. Ist eine Aufreinigung nicht möglich, wurde die Proteinkonzentration nach einer elektrophoretischen Auftrennung anhand des Coomassie-Signals abgeschätzt.

Es wurde ebenso im Rahmen der Chloroplasten- bzw. Stromaextraktion eine fotometrische Pigmentquantifizierung vorgenommen.

#### 3.2.5.1. Fotometrische Konzentrationsbestimmung

##### LHCP

Die IB-Suspension wurde zunächst gut gevortext, ehe 10  $\mu$ l entnommen und zu 990  $\mu$ l  $A_{280}$ -Puffer gegeben wurden. Die Proben wurden 2 min gekocht. Neben 3 Parallelproben wurde als Referenz 10  $\mu$ l Trispuffer in 990  $\mu$ l  $A_{280}$ -Puffer ebenfalls gekocht. Nach Abkühlen der Proben wurden Absorptionsspektren von 200-500 nm aufgenommen. Dies dient der Erkennung unspezifischer Absorption/Lichtstreuung in der Probe, welche ggf. bei der Konzentrationsbestimmung beachtet wurde. Aus der Extinktion bei 280 nm wurde die IB-Konzentration bestimmt:



**0,1 OD<sub>280nm</sub> = 53 µg/ml LHCP.**

---

<b>A<sub>280</sub>-Puffer:</b>	2% SDS
	10 mmol/l Tris HCl <sub>pH 6,8</sub>
	1 mmol/l β-Mercaptoethanol

---

#### cpSRP43/(54M-)cpSRP-Komplex

Aufgereinigtes und entsalztes Protein bzw. Proteinkomplexe wurden mit HEPES-Puffer verdünnt. Neben 3 Parallelproben wurde eine Referenz angesetzt. Es wurden Absorptionsspektren von 200-500 nm aufgenommen. Aus der Extinktion bei 280 nm wurde die Proteinkonzentration mithilfe des spezifischen Extinktionswertes  $\epsilon$  nach Lambert-Beer errechnet.

---

$\epsilon$ (cpSRP43) = 61880 l/mol·cm <sup>-1</sup>	<b>HEPES-Puffer:</b>	300 mmol/l NaCl
$\epsilon$ (cpSRP) = 73340 l/mol·cm <sup>-1</sup>		50 mmol/l HEPES
$\epsilon$ (54M-cpSRP) = 61880 l/mol·cm <sup>-1</sup>		2 mmol/l β-Mercaptoethanol
		→ pH Einstellung auf 8,0 (mit KOH)

---

#### Pigmentquantifizierung

Im Rahmen der Chloroplastenaufreinigung musste unmittelbar vor der Lyse der Chlorophyllgehalt fotometrisch bestimmt werden (vgl. 3.2.1.2). Es wurde eine 1:1000 bzw. 1:500 Verdünnung in 80% Aceton hergestellt. Von dieser Lösung wurde ein Spektrum von 750-400 nm aufgenommen, wobei die Extinktionswerte bei  $E = 663,6$  nm und  $E = 646,6$  entscheidend waren. Die Berechnung des Chlorophyllgehalts erfolgte nach Porra et al., 1989:

$$\text{Chlorophyll a } [\mu\text{g/ml}] = (12,25 \cdot E_{663,6}) - (2,55 \cdot E_{646,6})$$

$$\text{Chlorophyll b } [\mu\text{g/ml}] = (20,31 \cdot E_{646,3}) - (4,91 \cdot E_{663,6})$$

#### **3.2.5.2. Proteinbanden-Abschätzung**

##### cpSRP-Proteine im Bakterienlysat

Im Zusammenhang mit cpSRP-Komplexbildungen aus Bakterienlysat (siehe 3.2.7) war aufgrund des hohen Fremdproteinanteils keine fotometrische Konzentrationsbestimmung möglich. Im Falle der Proteine (His-)cpSRP54M konnte diese auch aufgrund der Abwesenheit von Tyrosin und Tryptophan in der Primärsequenz nicht durch eine OD<sub>280nm</sub>-Messung erfolgen. In beiden Fällen wurde die Proteinkonzentration anhand des Coomassie-Signals der Proteinbanden nach einer elektrophoretischen Auftrennung abgeschätzt. Als Referenz zur besseren Abschätzung können definierte Proteinmengen von z.B. BSA-Protein parallel aufgetrennt werden.

### Natives cpSRP im SE

Die Konzentrationsbestimmung von nativem cpSRP aus der Aufarbeitung aus 3.2.1.2 erfolgte durch eine Blotabschätzung des cpSRP43-/cpSRP54-Signals im Vergleich zu bekannten Mengen von rekombinantem Protein. Definierte Volumina von SE (i.d.R. 20 oder 40  $\mu$ l) sowie definierte Mengen von rekombinantem aufgereinigtem cpSRP-Komplex (i.d.R. 20, 50, 100, 200 ng) wurden elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.3.1.2). Es folgte ein Blot sowie die standardmäßigen Folgeschritte der Antikörperdetektion (siehe 3.3.2). Nach der Anfärbung der Banden wurde das native Signal mit den verschiedenen Intensitäten des Signals von rekombinantem Protein verglichen und die Konzentration abgeschätzt.

### 3.2.6. Metallaffinitätschromatographie

Die Metallaffinitätschromatographie ist eine Methode zur spezifischen Aufreinigung His<sub>6</sub>-tag tragender Proteine. Die verwendete „Chelating sepharose fast flow“ besteht im Wesentlichen aus einer Agarose-Matrix, welche mit Iminodiacetat-(IDA-)Linkern verknüpft ist. Dieser 3-zählige Ligand komplexiert Ni<sup>2+</sup> sowie andere zweiwertige Kationen. Die restlichen Koordinationsstellen der Nickelionen stehen für die Interaktion mit exponierten aromatischen Imidazolringen von Histidinresten zur Verfügung. Tryptophan- sowie Cysteinreste können prinzipiell auch binden, ihre Bindungsaffinität ist jedoch geringer als die des Histidins.

#### 3.2.6.1. Anbindung der cpSRP-Proteine/-Komplexe an die Ni-Säule

Sämtliche Nickel-Säulen Aufreinigungen wurden im Batch-Verfahren durchgeführt. Dies war notwendig, da die Bakterienlysate sehr viskos waren und zudem die Batch-Anbindung eine homogene Verteilung der His<sub>6</sub>-tag Proteine im gesamten Säulenvolumen sicherstellt. Die Vorbereitung der Säule sowie die Regeneration der Säule wurden standardmäßig wie bei Richter (2010) durchgeführt. Es fanden Aufreinigungen von His-cpSRP43 allein bzw. in Komplexbildungsansätzen mit cpSRP54(M) sowie die Aufreinigung von His-cpSRP54M statt. Anhand des Gelbildes wurde zunächst eine Konzentrationsabschätzung des Zielproteins im Bakterienlysat vorgenommen. Es kamen im Falle der Einzelaufreinigungen von His-cpSRP43 und His-cpSRP54M pro 3 mg Protein zum Einsatz. Die Vorgehensweise im Zusammenhang mit Komplexbildungsansätzen wird unter 3.2.7 näher erläutert. Die in 5 ml bzw. 20 ml BioRad Kartuschen äquilibrierte Ni-Säule wurde jeweils mit wenigen Millilitern Bakterienlysat des jeweiligen Proteins herausgespült und in Zentrifugenröhrchen mit dem restlichen LySAT vereint. Die Anbindung erfolgte im Batch-Verfahren bei 4° C üN langsam rotierend im Drehrad.

### 3.2.6.2. Aufreinigung der cpSRP-Proteine im Batch-Verfahren

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte zunächst in mehreren Waschschrritten mit Imidazol-haltigem Waschpuffer. Der Waschpuffer enthielt dabei relativ geringe Konzentrationen von Imidazol, um unspezifisch an die Ni-Säule gebundene Proteine abzulösen. Die Waschschrritte erfolgten im Batch-Verfahren. Die Ni-Säule wurde in jedem Schritt zunächst zentrifugiert (4 °C, 2 min., 1000 x g) und der jeweilige Überstand vorsichtig mit einer Pipette bis auf wenige Millimeter über der Säule abgezogen. Es wurden jeweils 2 Säulenvolumen (SV) entsprechender Imidazol-Waschpuffer zugegeben, die Zentrifugenröhrchen verschlossen und ausgiebig invertiert. Anschließend folgte eine erneute Zentrifugation der Säule. Der letzte Waschgang (Ausnahme: Batchelution, siehe 3.2.6.3) wurde nach vollständiger Resuspendierung der Ni-Säule in eine BioRad Kartusche gefüllt und der Überstand abtropfen lassen. Es wurden 2 unterschiedliche Waschmodi angewendet:

- (A) 4-5 Waschschrritte mit isokratisch 40 mmol/l Imidazol-Waschpuffer
- (B) 4-5 Waschschrritte mit graduell ansteigend 40-70 mmol/l Imidazol-Waschpuffer

Die Fraktionen wurden aufbewahrt und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

---

<b>cpSRP Ni-Säulen-</b>	300 mmol/l NaCl
<b>Waschpuffer:</b>	50 mmol/l HEPES
	40 mmol/l -70 mmol/l Imidazol
	2 mmol/l $\beta$ -Mercaptoethanol
	→ pH Einstellung auf 8,0 (mit KOH)

---

### 3.2.6.3. Elution der cpSRP-Proteine von der Ni-Säule

Es wurden im Rahmen der cpSRP-Volllängenkomplexbildung/-aufreinigung mehrere Methoden der Ni-Säulen Elution angewendet. Dies waren: 1. Chromatographische Elution mit isokratischem Elutionspuffer (Standardelution); 2. Chromatographische Gradientenelution; 3. Batchelution. Die Intention der alternativen Elutionsmethoden war die Vermeidung einer transienten Aufkonzentrierung in der Elutionsfront bei Ablösung von cpSRP-Volllängenkomplex von der Ni-Säule. Von einer solchen ist bei der isokratischen Elution mit 300 mmol/l Imidazol Elutionspuffer auszugehen. Im Zusammenhang mit der Aufreinigung von Einzelproteinen (His-cpSRP43, His-cpSRP54M) sowie im Fall des 54M-Transitkomplexes wurde jedoch jeweils nur die Standardelution durchgeführt.

#### Standardelution

Die Standardelution erfolgte chromatographisch mit isokratischem 300 mmol/l Imidazol Elutionspuffer. Zunächst wurden 0,3 SV Vorelution aufgefangen. Dieses Säulenvolumen entspricht dem Ausschlussvolumen, in welchem noch nicht mit der spezifischen Elution des Zielproteins zu

## Methoden

---

rechnen ist. Die Hauptelution erfolgte mit 2 x 1 SV Elutionspuffer und wurde getrennt aufgefangen. Die Fraktionen wurden nach dem Auffangen bis zur weiteren Verwendung kühl gelagert.

### Gradientenelution

Die Gradientenelution erfolgte chromatographisch mit graduell ansteigender Konzentration des Imidazols im Elutionspuffer. Es ging eine Vorelution mit 0,3 SV 100 mmol/l Imidazol-Elutionspuffer voraus. Die Hauptelution erfolgte im ersten Elutionsschritt mit insgesamt 1 1/3 SV Elutionspuffer nach folgendem Muster: 1/3 SV 100 mmol/l Imidazol → 1/3 SV 200 mmol/l Imidazol → 2/3 SV 300 mmol/l. Diese Fraktionen wurden gepoolt. Es schloss sich ein zweiter Elutionsschritt mit 1 SV 300 mmol/l Imidazol Elutionspuffer an. Die Fraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung kühl gelagert.

### Batchelution

Im Falle der Batchelution wurde der letzte Waschschrift nicht in BioRad Kartuschen gefüllt. Die Elution erfolgte mit insgesamt 3 x 1 SV 300 mol/l Imidazol Elutionspuffer. Nach jeder Zugabe von Elutionspuffer wurde die Ni-Säule in Zentrifugenröhrchen durch Invertieren und Vortexen ausgiebig resuspendiert und anschließend zentrifugiert (4° C, 2 min, 1000 x g). Der Überstand wurde so gut wie möglich ohne das Aufziehen von Ni-Säule mit einer Pipette abgezogen. Die Fraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung kühl gelagert.

---

<b>cpSRP Ni-Säulen-</b>	300 mmol/l NaCl
<b>Elutionspuffer:</b>	300 mmol/l bzw. 100/ 200 mmol/l Imidazol
	50 mmol/l HEPES
	2 mmol/l β-Mercaptoethanol
	→ pH Einstellung auf 8,0 (mit KOH)

---

### 3.2.7. (54M-)cpSRP-Komplexbildung

Die Volllängenprotein-Komplexbildung bzw. 54M-cpSRP-Komplexbildung wurde jeweils in Verbindung mit der Ni-Säulenbindung/-aufreinigung durchgeführt. Es wurde der His<sub>6</sub>-tag des cpSRP43 zur spezifischen Aufreinigung des Komplexes genutzt. Chlorplastidäres SRP54(M) trägt selbst keinen „tag“ und „bindet“ nur an die Säule durch spezifische Komplexbildung mit dem His-cpSRP43. Um eine quantitative Komplexbildung sicher zu stellen, muss ein Überschuss von cpSRP54(M) zugegeben werden. Es wurden 2 Varianten der cpSRP-Volllängenkomplex-Kopplung durchgeführt:

#### Standard-Batch-Kopplung

Grundlegend wurde die Methode wie schon unter 3.2.6.1 beschrieben, durchgeführt. Die Komplexbestandteile wurden zunächst durch Vereinigung der einzeln überexprimierten

Bakterienlysate aus 3.2.4 zusammengeführt. Bei cpSRP-Volllängenkomplex-Kopplungen sowie der 54M-cpSRP-Kopplung erfolgte die Vereinigung in 40 ml-Zentrifugenröhrchen so, dass standardmäßig ein molarer Überschuss des cpSRP54(M) von  $1,5 \geq x \leq 2$  gewährleistet war. Die Bakterienlysate wurden zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Konzentrationen entsprechend 3.2.5.2 abgeschätzt. In anderen Kopplungen bei einem bis zu 4 fach molaren cpSRP54-Überschuss wurde dieser durch Einbringen eines entsprechend großen Lysatvolumens erreicht. Die Vereinigung mit der Ni-Säule geschah wie unter 3.2.6.1 beschrieben. Die Bindungsdichte des Volllängen-Komplexes auf der Nickel-Säule wurde direkt durch das Verhältnis Säulenvolumen zu His-cpSRP43-Protein gesteuert und lag zwischen 0,3-2 mg/ml. Im Falle des 54M-cpSRP-Komplexes wurde ein Verhältnis von ~2 mg/ml Nickel-Säule gewählt. Die Anbindung erfolgte im Batch-Verfahren bei 4° C üN langsam rotierend im Drehrad.

### Säulenkopplung

Bei der Säulenkopplung wurde der His-cpSRP43 zunächst im Batch-Verfahren mit einer Bindungsdichte von 0,4 mg Protein/ml Ni-Säule an die Säule gebunden (vgl. 3.2.6.1). Der Ansatz wurde direkt in 20 ml BioRad Kartuschen gegeben und der Überstand abtropfen lassen. Anschließend wurde ein 4-facher molarer Überschuss des cpSRP54-Lysats chromatographisch auf die Säule aufgetragen. Das dazu benötigte Lysatvolumen wurde nach und nach aufgetragen und der Durchfluss aufgefangen. Es schlossen sich entsprechende Wasch- und Elutionsschritte (vgl. 3.2.6.2/3.2.6.3) an.

### **3.2.8. Entsalzung und Umpufferung der aufgereinigten Proteine**

Die Ni-Säulen aufgereinigten Proteine(-komplexe) wurden standardmäßig entsalzt, d.h. nach der Elution in Imidazol-freie Umgebung gebracht. Dies ist auch insbesondere aus Gründen der exakten fotometrischen Konzentrationsbestimmung notwendig, da Imidazol einen Beitrag zur OD<sub>280</sub> liefert. Es wurden dazu Zeba Spin desalting columns, 7K MWCO der Firma Pierce mit 5 ml oder 10 ml Säulenvolumen verwendet. Diese besitzen eine Ausschlussgröße von 7 kDa und sind geeignet um niedermolekulare Substanzen von Proteinen abzutrennen. Neben der Entsalzung wurden die Gelfiltrationseinheiten zur Umpufferung von 54M-Transitkomplexen in (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer benutzt. Dies wurde im Zusammenhang mit alternativen Aufkonzentrierungsversuchen durch Lyophilisation notwendig. Die Prozedere liefen in beiden Fällen gleich ab: Die „spin columns“ wurden in 40 ml Zentrifugenröhrchen gesteckt. In jedem Zentrifugationsschritt (4 °C, 2 min, 1000 x g) wurde die in der bzw. auf der Säulenmatrix befindliche Flüssigkeit/Puffer abzentrifugiert und es wurden erneut 1/2 SV Flüssigkeit/Puffer aufgetragen.

Die in 20% Ethanol gelagerten Säulen wurden von diesem zunächst befreit. Es folgte die Äquilibration mit 2-3 SV Zielpuffer. Von der aufzureinigenden Probe wurde ebenso max. 1/2 SV aufgetragen. War der Probenauftrag kleiner, folgte ein weiterer Auftrag von Zielpuffer so, dass mit dem Probenauftrag addiert 1/2 SV insgesamt appliziert wurde. Untersuchungen zum Elutionsverhalten

## Methoden

---

hatten gezeigt, dass innerhalb des ersten halben Säulenvolumens > 95% des Zielproteins eluierte. In diesen Fraktionen war noch nicht von niedermolekularen Bestandteilen auszugehen. Es schloss sich die Waschung der Säule mit 2-3 SV H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> an. Zur Lagerung/Konservierung wurde 1 SV 20% Ethanol aufgetragen, die Säulen anschließend verschlossen und in Laborflaschen gelagert.

---

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer:** 200 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
→ pH-Einstellung auf 8,0 (mit AcOH)

---

### 3.2.9. Proteinaufkonzentrierung

Die Proteinaufkonzentrierung erfolgte i.d.R. mit 10 kDa bzw. 30 kDa Amicon-Röhrchen (Amicon Ultra MW 10/30, Millipore). Diese Einheiten haben eine Cellulosemembran, die Moleküle unterhalb der Ausschlussgrenze passieren lässt, größere Moleküle werden zurückgehalten und aufkonzentriert.

Amicon-Röhrchen wurden in passende Zentrifugenröhrchen gesteckt. Vor der Verwendung wurden zwecks Äquilibration 2-3 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte (auch die der Proben-Aufkonzentrierung) erfolgten bei 4 °C, variierende Zeit, 6000 rpm im Rotor: 1015). Die Dauer der Zentrifugation wurde immer dem zu erreichenden Aufkonzentrierungsfaktor angepasst. Zur Reinigung wurden die Amicons kurz mit Wasser und Seife und anschließend mit ausreichend H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gespült. Die Lagerung erfolgte schließlich in 20% Ethanol.

#### 3.2.9.1. Lyophilisation

Die Gefriertrocknung ist eine Methode, flüchtige Substanzen aus einer Lösung mitunter vollständig zu sublimieren. Somit stellt sie eine Möglichkeit der Aufkonzentrierung dar.

Die Lyophilisation kam im Rahmen von Aufkonzentrierungen des 54M-Transitkomplex zum Einsatz. Um eine entsprechende Flüchtigkeit der Puffersubstanzen gewährleisten zu können sowie die Aufkonzentrierung von Salz zu verhindern, wurden die Komplexe zunächst in 200 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer umgepuffert und anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit perforiertem Deckel gegeben. Nach Einfrieren der Proben mittels flüssigem N<sub>2</sub> wurden die in Rundkolben gelegt und so an den Lyophilisator angeschlossen. Die Gefriertrocknung lief bei 1,03 mbar.

### 3.2.10. Chaperon-LHCP-Komplexbildung

Es wurden in dieser Arbeit 3 verschiedene Typen von Chaperon-LHCP-Komplexen hergestellt: 1. cpSRP43-LHCP-Komplexe, 2. Vollängen Transitkomplexe (cpSRP-LHCP), 3. 54M-Transitkomplexe. Der LHCP wurde jeweils nur in vorgelöster Form zu seinem Chaperon gegeben. Es wurden dazu 2 unterschiedliche Varianten der LHCP-Solubilisierung gewählt, die im Wesentlichen

auch die Komplexbildungsmethode identifizierten. Dabei handelte es sich um die „Detergenz-Standard-Methode“ mit Verwendung von SDS-solubilisiertem LHCP sowie die „Urea-Methode“ mit Verwendung von Harnstoff-gelöstem LHCP. Die Reaktionen liefen im Wesentlichen in HEPES-Puffer (vgl. 3.2.5.1) ab. Darüberhinaus führte die Kooperationspartnerin [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] eine dritte Variante der cpSRP43-LHCP-Komplexbindung durch. Die „Detergenz-Adsorptionmethode“ wird der Vollständigkeit wegen auch beschrieben.

#### „Urea-Methode“

LHCP-IBs (Variante: C79S oder C79Sh) wurden mit einer Proteinkonzentration von 1-1,5 mg LHCP/ml (= 40-60  $\mu\text{mol/l}$ ) in 8 mol/l Harnstoffpuffer gelöst. Dazu wurden die IBs aus der Stammlösung direkt in den Puffer verdünnt (Pipettenspitze muss beim Pipettieren von IBs abgeschnitten sein). Der Lösungsvorgang erfolgte im auf 60 °C erwärmten Ultraschallbad für 1 h. Da die Ultraschallübertragung in Glas- besser als in Kunststoffgefäßen funktioniert, wurden standardmäßig Corex-Röhrchen verwendet, welche zudem mit Parafilm verschlossen wurden um die Verdampfung des Puffers möglichst gering zu halten. Zur Abtrennung von nicht gelöstem LHCP folgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur (RT), 20 min, 18000 rpm im Rotor JA 20. Der Überstand wurde abgezogen und die Konzentration per Gelelektrophorese bestätigt (bei vollständiger Lösung) oder neu abgeschätzt.

Chaperonlösung (cpSRP43) wurde so vorgelegt und ggf. zuvor mit HEPES-Puffer verdünnt, dass nach Zugabe eines entsprechenden Volumens Urea-gelöster LHCP äquimolare Endkonzentrationen (4-6,6  $\mu\text{mol/l}$ ) beider Proteine vorhanden waren. Die Zugabe erfolgte unter gründlichem Vortexen. Die Endkonzentration des Harnstoffs lag in allen Ansätzen  $\leq 1\text{mol/l}$ , so dass die Verdünnung der LHCP-Stammlösung nie kleiner 8 war. In entsprechenden Ansätzen mit Zusatzagenzien (z.B. Detergentien) wurden diese noch vor der Zugabe des LHCP so aus einer Stammlösung verdünnt, dass deren Endkonzentration im Ansatz der 1/2-, 1- oder 2-fachern CMC des jeweiligen Detergenzes entsprach. Das Endvolumen (i.d.R. 500  $\mu\text{l}$  für analytische Proben oder 1500  $\mu\text{l}$  bei Aufkonzentrierung) wurde ggf. durch Zugabe von HEPES-Puffer erreicht. Die Inkubation wurde im Drehrad (20-30 rpm) bei RT für 15 min durchgeführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C, 15 min, 18000 rpm im Eppi-Rotor: 1195. Der Überstand wurde entnommen und optional entsprechend 3.2.9 aufkonzentriert. Er stand anschließend zur weiteren Untersuchung zur Verfügung.

---

**Harnstoffpuffer:** 8 mol/l Harnstoff  
20 mmol/l HEPES  
→pH-Einstellung auf 8,0 (mit KOH)

---

### „Standard-Detergenz-Methode“

Die Kopplungen wurden in aller Regel mit einer äquimolaren Konzentration der Kopplungsbestandteile durchgeführt. Die LHCP-IBs wurden in der Menge für die gewünschte Kopplungsendkonzentration (7-100  $\mu\text{mol/l}$ ) aus der Stammlösung entnommen. Das Aliquot wurde kurz (RT, 1 min, 10000 rpm Tischzentrifuge) anzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 5% SDS aufgenommen (1/25 des gewünschten Gesamtvolumens) und durch 2 min Kochen gelöst. Es folgte die Zugabe einer äquimolaren Menge Chaperonlösung (cpSRP43, cpSRP, 54M-cpSRP) sowie ggf. die Beimengung weiterer Zusatzagenzien (z.B. 80% Glycerin, 2 mol/l Saccharose, 1 x molarer Überschuss mit cpSRP54M). Es wurde schließlich mit HEPES-Puffer auf 0,5% SDS aufgefüllt und der Ansatz bei RT, 15 min, 20 rpm im Drehrad bewegt. Es folgte die Zugabe von weiterem HEPES-Puffer bis auf 6/7 des Gesamtvolumens ( $\approx 0,24\%$  SDS) und weiteren 30 min Inkubationszeit (RT, 20 rpm im Drehrad).

Den Ansätzen wurden 1/7 Endvolumen 0,5 mol/l KCl zugegeben. Die KDS-Fällung erfolgte im 1. Schritt zunächst im Temperaturgradienten (20 °C – 10 °C, über ca. 15 min, 600 rpm im Eppendorf Thermoschüttler). Es wurde nachfolgend zentrifugiert (4 °C, 15 min, 18000 rpm im Eppi-Rotor: 1195) und der Überstand entnommen. Dieser wurde für weitere 15 min auf Eis platziert und schließlich ein zweites Mal (gleiche Zentrifugationsbedingungen) zentrifugiert. Der Überstand wurde optional entsprechend 3.2.9 aufkonzentriert. Er stand zur weiteren Untersuchung zur Verfügung.

### „Detergenz-Adsorptionsmethode“

Diese Methode wurde von der Arbeitsgruppe Schünemann (Ruhr-Universität, Bochum) durchgeführt. Es erfolgten zunächst die Schritte wie oben bis zu einer SDS-Konzentration von 0,2% SDS (Endvolumen erreicht). Anschließend wurden dem Ansatz 3x Calbiosorbs zur Entfernung des Detergenzes durch Adsorption zugegeben. Der Calbiosorbs-Wechsel kann durch Abziehen des Überstands und Pipettieren zu neuen vorgelegten Polystyrolkugeln erfolgen. Der letzte Überstand wurde chromatographisch auf 0,2-0,3 ml äquilibrierte Ni-Säule gegeben und nach Ablauf mit 30 ml(!) Ni-Säulen-Waschpuffer (20 mmol/l Imidazol; vgl. 3.2.6.2 ) gewaschen. Das hohe Puffervolumen diente der restlosen Entfernung des Detergenzes. Es folgte die Elution mit isokratischem Elutionspuffer (300 mmol/l Imidazol; vgl. 3.2.6.3). Dabei wurde insgesamt mit 2,5 SV eluiert. Der Durchlauf stand zur weiteren Untersuchung zur Verfügung.

#### **3.2.10.1. Modifizierte Chaperon-LHCP-Komplexbildungen**

Die „modifizierten“ Transitkomplexbildungen fanden nicht in Standard-HEPES-Puffer statt, sondern in Stromaextrakt (SE) bzw. es wurde SE direkt als Quelle für natives cpSRP genutzt. In  $\text{N}_2$  gelagertes SE (vgl. 3.2.1.2) wurde  $\text{üN}$  auf Eis aufgetaut und zur Entfernung von mutmaßlich verbliebenen Thylakoidmembranfragmenten vor der Verwendung zentrifugiert (4 °C, 25 min, 18000 rpm im Eppi-



Rotor: 1195). Der Überstand wurde mit einer Pipette abgezogen und konnte eingesetzt werden. Im Zusammenhang mit Kopplungen in SE wurde standardmäßig Urea-solubilisierter LHCP eingesetzt.

#### Kopplung von nativem cpSRP mit rekombinantem LHCP

Die Kopplung von rekombinantem, Urea-solubiliertem LHCP mit nativem cpSRP erfolgte im Rahmen der SE-Aktivitätstests. Es wurden 40 µl SE mit bekannter Konzentration vorgelegt und eine äquimolare Menge bzw. ein doppelter stöchiometrischer Überschuss LHCP zugegeben. Die Zugabe erfolgte unter gründlichem Vortexen. Die Endkonzentration des Harnstoffs lag in allen Ansätzen  $\leq$  1 mol/l. Anschließend wurden die Ansätze bei RT, 30 min, 100 rpm im Orbitalschüttler inkubiert. Gleichzeitig angesetzte Negativproben enthielten 40 µl 20 mmol/l Tris-HCl<sub>pH 8,0</sub> und gleiche Mengen von LHCP. Alle Ansätze wurden nach der Inkubation bei 4 °C, 15 min, 18000 rpm im Eppi-Rotor: 1195 zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Pelletfraktion wurde in 20 µl 2% SDS aufgenommen und durch Vortexen und Ultraschall resolubilisiert. Alle Proben wurden vollständig einer elektrophoretischen Auftrennung unterzogen.

#### Kopplung von rekombinanten Proteinen in SE

SE wurde ggf. zunächst in 10 kDa Amicons aufkonzentriert (vgl. 3.2.9) und Chaperonlösung äquimolar ( im Falle des 54M-cpSRP) bzw. im 4-fachen molaren Überschuss (im Falle des cpSRP) dazu gegeben. Es folgte die Zugabe von Urea-solubiliertem LHCP mit einer Endkonzentration von 0,35 µmol/l (cpSRP) bzw. 7 µmol/l (54M-cpSRP). Die Zugabe erfolgte unter gründlichem Vortexen. Die Endkonzentration des Harnstoffs lag in allen Ansätzen  $\leq$  1 mol/l. Anschließend wurden die Ansätze bei RT, 30 min, 100 rpm im Orbitalschüttler inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C, 15 min, 18000 rpm im Eppi-Rotor: 1195. Der Überstand wurde abgenommen und stand zur weiteren Untersuchung zur Verfügung.

#### **3.2.11. LHCP-Labeling**

Elektronen-paramagnetische Resonanz (EPR-)Spektroskopie (vgl. 3.3.5) erforderte im Vorfeld zwecks kovalenter Einbringung von paramagnetischen Elektronen die Ankopplung des Sulfhydrylgruppenspezifischen 3-(2-Iodacetamido)-PROXYLs (IAA-PROXYL; vgl. 2.7). Es wurde zunächst die entsprechende LHCP-Mutante mit einer Konzentration von 1 mg/ml (40 µmol/l) durch 2 min Kochen in Solubilisierungspuffer gelöst. Nach Erkalten der Lösung wurde das Reduktionsmittel TCyEP (in DMF gelöst) mit einer Endkonzentration von 2 mmol/l zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 2 h im Drehrad. Anschließend wurde IAA-PROXYL (in DMSO gelöst) mit einer Endkonzentration von 0,8 mmol/l (bzw. 20-fachen stöchiometrischen Überschuss pro Sulfhydrylgruppe) zugegeben und die Lösung bei 37 °C üN im Drehrad inkubiert. Der überschüssige Spinmarker wurde am darauffolgenden Tag durch essigsaurer Acetonfällung und ethanolische Waschschrirte entfernt.

**Solubilisierungspuffer:** 0,5% (w/v) LDS  
20 mmol/l NaP<sub>i</sub>-Puffer<sub>pH 7,0</sub>

---

### 3.2.12. Essigsäure Acetonfällung von Proteinen

Den Ansätzen aus 3.2.11 wurde das 2,3fache Volumen an 100% Aceton beigemischt sowie 1/10 Endvolumen 100 mmol/l Essigsäure. Die Mischung wurde kräftig gevortext und mindestens 1 h auf Eis, ggf. auch bei -18 °C, gelagert. Die ausgefallenen Proteine wurden anschließend bei 4 °C, 15 min, 15000 rpm im Eppi-Rotor:1195 zentrifugiert. Für die folgenden Zentrifugationsschritte gelten auch diese Angaben. Es folgten abwechselnd Waschung sowie ausgiebige Resuspendierung in 70% eiskaltem Ethanol und erneute Zentrifugation. Die Waschschritte wurden 4 mal wiederholt und das finale Pellet mind. 10 min zur vollständigen Entfernung des Ethanols an der Luft getrocknet. Es erfolgte die Zugabe und eine Resuspendierung in Tris-Puffer (vgl. 3.2.4). Diese Methode, statt der direkten Solubilisierung in Detergenz-haltigem Puffer, erwies sich als besser geeignet im Hinblick auf eine schnelle und vollständige Resolubilisierung des Ethanolpellets. Die Lagerung der IAA-PROXYL-gelabelten LHCP-Mutanten erfolgte bei -18 °C im Dunkeln.

## 3.3. Analytisch biochemische Methoden

### 3.3.1. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Molekülen, insbesondere von Proteinen. Gleichzeitig dient vor allem die denaturierende PAGE durch Co-Applikation geeigneter Referenzproteine zur Molekulargewichtsbestimmung (vgl. 2.3). Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einem polymerisiertem Gel aus Acrylamid (Polyacrylamid), welches kontinuierlich (Gradientengel) oder diskontinuierlich (Sammel- und Trenngel) aufgebaut ist. Aufgetragene Proteine wandern unter dem Einfluss eines elektrischen Felds, wobei eine Nettoladung der Proteine die Voraussetzung liefert. Im Falle der denaturierenden PAGE mit SDS-Zugabe verleiht das anionische Detergenz durch Assoziation an das Protein diesem unabhängig von seiner spezifischen Zusammensetzung und seiner Größe eine nahezu gleiche Ladungsdichte. Der laufgeschwindigkeitsbestimmende Faktor bildet dann nur noch die Molekülgröße des Proteins. Bei der nativen Elektrophorese (colourless native (CN-) PAGE oder auch blue native (BN-)PAGE) erfährt das Protein nur im zweiten Fall durch Assoziation des relativ schwachen Detergenzes Coomassie Blau eine negative Ladungsmodifizierung. Im Fall der CN-PAGE ist die Eigenladung des Proteins bei gegebenem pH-Wert entscheidend für das Laufverhalten. In beiden Fällen bleibt prinzipiell die Konformation des Proteins erhalten. Für die Wanderung der Proteine durch das Polyacrylamidnetz ist nicht nur die Molekülgröße, sondern auch

die Konformation der Proteine entscheidend. In der nativen Elektrophorese kann auch die Integrität von Proteinkomplexen erhalten bleiben.

### 3.3.1.1. Herstellung der Polyacrylamidgele

Die verwendeten Polyacrylamidgele für die denaturierende PAGE setzten sich aus einem Sammel- und Trenngel zusammen (Laemmli, 1970). Die Variation des Anteils von Acrylamid/Bisacrylamid in den unterschiedlichen Gelbereichen führt zu einem unterschiedlichen Vernetzungsgrad. Je höher der Anteil an den Polymerisationskomponenten, desto engmaschiger wird das Gel. Es wurde in dieser Arbeit mit 15%-Gelen (bezogen auf die Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration im Trenngel) gearbeitet. Die Herstellung erfolgte gemäß dem für die großen Gießkammern üblichen Standardverfahren. Die Zumischung von Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) startet die Polymerisationsreaktion, weshalb die Zugabe unmittelbar vor dem Gießvorgang startet. Das Aufgießen des Sammelgels erfolgte 45 min nach dem Einfüllen des Trenngels. Die weitere Polymerisation erfolgte dann für mind. eine weitere Stunde bei RT. Die Gele wurden danach bei 4 °C gelagert.

**Tabelle 3.1: Zusammensetzung der 15% PAA-Gele**

Chemikalie	Trenngel 15%	Sammelgel
<b>Acrylamid/Bisacrylamid (30%:1%)</b>	<b>27,4 ml</b>	<b>6 ml</b>
<b>Tris-HCl<sub>pH8,8</sub> (1 mol/l)</b>	<b>22,6 ml</b>	<b>---</b>
<b>Tris-HCl<sub>pH 6,8</sub> (1 mol/l)</b>	<b>---</b>	<b>5,2 ml</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub></b>	<b>1,8 ml</b>	<b>23,4 ml</b>
<b>Glycein (80% - v/v)</b>	<b>3,4 ml</b>	<b>5 ml</b>
<b>APS 10%</b>	<b>0,4 ml</b>	<b>0,2 ml</b>
<b>TEMED</b>	<b>0,026 ml</b>	<b>0,02 ml</b>

Es handelte sich bei den Polyacrylamidgelen für die native PAGE um kommerzielle 4-16% Bis-Tris-Gradientengele von Life technologies (genaue Bezeichnung: NuPAGE®Novex®4-16% Bis-Tris protein gels, 1,0 mm, 10 well).

### 3.3.1.2. Denaturierende PAGE

Die Gelektrophorese wurde in einer Vertikalanlage durchgeführt. Nach Einspannen des Gels wurde der Kathodenraum vollständig mit SDS-Laufpuffer befüllt. Dabei wurden die Geltaschen mit Laufpuffer ausgewaschen. Der Anodenraum wurde ebenso bis ca. zur Hälfte mit SDS-Laufpuffer befüllt. Die Proben wurden je nach zu erwartender bzw. bekannter Konzentration in unterschiedlichen Volumina aufgetragen. Von Gelfiltrationsfraktionen wurden hingegen standardmäßig 40 µl aufgetragen

## Methoden

---

(Nachladen erforderlich, siehe weiter unten). Alle Proben wurden mit 1/4 Endvolumen 3-4 x Sparmix versetzt und kurz gemixt. Anschließend folgte ein 2-minütiger Kochschritt, um die Proben restlos zu denaturieren. Nach dem Abkühlen wurden in einem 1. Schritt 25-30 µl Probe in die Geltaschen gefüllt. Ebenso wurden je nach weiterer Verarbeitung entweder 5 µl Protein-Test-Mixture 6 (SDS-PAGE) oder 3 µl PageRuler-/Broad Range-Marker (Blot) appliziert. War weitere Probe vorhanden, wurde nachgeladen. Dazu liefen die Proben zunächst bei 80 V für ca. 10 min ein. Es ist wichtig, dass bei dem zweiten Auftrag die zuerst applizierte Probe die Geltasche noch nicht vollständig verlassen hat, ansonsten entstehen Doppelbanden. Nach der zweiten Applikation wurde die Elektrophorese für weitere 20 min bei 80 V betrieben. Waren die Proben vollständig ins Sammelgel eingelaufen und im Bereich des Übergangs zum Trenngel, wurde die Laufspannung auf 180 V erhöht. Die Elektrophorese wurde, sobald die Bromphenolblau-Lauffront am unteren Gelrand angekommen war, abgebrochen.

---

<b>3-4 x Sparmix:</b>	24% (v/v) Glycerin	<b>SDS-Laufpuffer:</b>	0,1% (w/v) SDS
	4% (w/v) SDS		192 mmol/l Tris
	1,4 mol/l β-ME		25 mmol/l Glycin
	100 mmol/l Tris-HCl <sub>pH 6,8</sub>		0,5 mmol/l EDTA
	0,4 mmol/l Bromphenolblau		

---

### 3.3.1.3. Native PAGE

Die native PAGE wurde für Auftrennungsversuche von Transitkomplexansätzen verwendet. Es kamen sowohl blue native (BN-) als auch colourless native (CN-)PAGE zur Anwendung. Beide Methoden verliefen nach gleichem Grundschema. In beiden Fällen wurden 4-16% Bis-Tris-Gradientengele verwendet. Nach dem Entfernen des Kamms war es bei diesen Gelen wichtig die Geltaschen zunächst mit Nativ-Laufpuffer auszuspülen. Anschließend wurden diese in die Elektrophoresekammer (XCell SureLock™ Mini-Cell) eingespannt und (im Falle der CN-PAGE) der Kathodenraum mit 200 ml, der Anodenraum mit 600 ml kaltem Nativ-Laufpuffer befüllt. Im Falle der BN-PAGE wurde dem Laufpuffer des Kathodenraums 0,002% Coomassie zugefügt; der Laufpuffer des Anodenraums war „Coomassie-frei“. Die Kammer wurde in Eisbehälter positioniert, um eine Erwärmung während des Laufes zu verhindern. Es wurden jeweils 16 µl Probe mit 1/4 Endvolumen (≈ 5,5 µl) Nativ-Ladepuffer vermischt und die Probe vorsichtig in Geltaschen pipettiert. Es wurden gleichzeitig 6 µl „Native Marker“ als Molekulargewichtsreferenz in eine Geltasche appliziert (vgl. Abbildung 2.2). Die Elektrophorese verlief kontinuierlich bei 100 V und wurde abgebrochen, sobald die Ponceau S-Lauffront am unteren Gelrand angekommen war. Im Falle der BN-Page waren direkt blaue Banden erkennbar, trotzdem erfolgte eine zusätzliche Anfärbung mit Coomassie G250.

<b>Nativ-Laufpuffer:</b> 50 mmol/l BisTris 50 mmol/l Tricin (0,002%) Coomassie (→ pH 6,8)	<b>Nativ-Ladepuffer:</b> 10% (w/v) Glycerol 0,001% Ponceau S 50 mmol/l BisTris 50 mmol/l NaCl → pH-Einstellung auf 7,2 (mit 6 mol/l HCl)
--	---

---

#### 3.3.1.4. Proteinvisualisierung

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde Coomassie G250-Lösung verwendet. Dieses blaue Pigment hat einen sauren Charakter und lagert sich bevorzugt an basische Seitenketten von Proteinen an. Die Assoziation erfolgt dabei nahezu proportional zur vorhandenen Proteinmenge.

Die Gele wurden direkt nach der Elektrophorese den Gelkassetten entnommen und in Gerdaboxen gelegt. Es wurden ca. 50 ml Coomassie-Lösung zugegeben und die Gele für mindestens 20 min auf einem Orbitalschüttler (~80 rpm) inkubiert. Anschließend folgte die Entfärbung von unspezifisch im Gel eingelagertem Coomassie. Zunächst wurde 1. Entfärber für ca. 1-2 h zugegeben. Dieser wurde abgegossen und anschließend 2. Entfärber zugegeben. Die Entfärbung lief so lange, bis der Hintergrund der Gele möglichst Coomassie-frei war.

<b>Coomassie-Lösung:</b> 0,125% (w/v) Serva Blue 40% (v/v) Ethanol 7% (v/v) Essigsäure	<b>1. Entfärber:</b> 10% (v/v) Ethanol 7% (v/v) Essigsäure  <b>2. Entfärber:</b> 10% (v/v) Essigsäure
--	--

---

#### 3.3.1.5. Trocknung der Gele

Zwecks Archivierung wurden die Gele unter Schutzfolie getrocknet und eingeschweißt. Es wurden die mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> abgspülten Gele zwischen gequollener Cellophanfolie eingelegt. Die Gele wurden schließlich für 30-45 min auf dem Geltrockner unter Erwärmen und im Vakuum eingeschweißt.

#### 3.3.2. Westernblot

Der Westernblot oder immunospezifischer Nachweis hat gegenüber der Coomassie-Detektion 2 grundlegende Vorteile: 1. Der Nachweis ist um ein Vielfaches sensitiver als die Detektion mit Coomassie; 2. Es handelt sich um einen spezifischen Nachweis, welcher ein zielgerichtetes Protein detektiert. Somit ist eine immunospezifische Detektion besonders geeignet, wenn ein relativ schwaches Signal bei einem gleichzeitig starken Hintergrund exklusiv nachgewiesen werden soll. Dies

## Methoden

---

war bei allen Arbeiten mit SE der Fall. Stromaextrakt besitzt eine große Fülle unterschiedlicher löslicher Proteine, von denen insbesondere die RuBisCO eine sehr hohe Abundanz zeigt und zudem eine gleiche Laufhöhe (große Untereinheit der RuBisCO) wie das cpSRP54 aufweist. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass nativer cpSRP-Komplex ca. 1/1000 des Gesamt-Stromaproteins ausmacht. Beide Umstände machten einen immunologischen Nachweis im Zusammenhang mit SE unumgänglich.

Einem Blot ging grundsätzlich eine Standard-Elektrophorese voran. Im Zusammenhang mit nachgeschalteten Blots wurde immer ein „prestained marker“ (vgl. Abbildung 2.1). verwendet. Dieser zeigte am Ende des Blots bei Erscheinen auf der Nitrocellulosemembran die erfolgreiche Übertragung an. Bei dem verwendeten Reportersystem handelt es sich um eine Alkalische Phosphatase, welche nach Zugabe der Chemikalien 5-Brom-4-chlor-3-inoxylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) eine Farbreaktion katalysiert. Die Proteinbanden können optisch detektiert werden.

### 3.3.2.1. Proteinübertragung mittels Semidry-Blots

Zur Vorbereitung wurden pro Blot 4 große (Abmessungen: 10,5 x 7,5 cm) und 4 kleine (Abmessungen: 8,5 x 5,5 cm) Filterpapiere sowie Nitrocellulosemembran (Abmessungen: 8,5 x 5,5 cm) in Blotpuffer für 15 min inkubiert. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zugefügt und ebenso für 10 min in Blotpuffer inkubiert. Es folgte ein spezifischer Aufbau in der Semidry-Anlage von der Unterseite (Anode) aus beschrieben:

Große Filterpapiere → Nitrocellulosemembran → Gel → Kleine Filterpapiere

Um sicherzustellen, dass keine Luftblasen in dem Sandwich eingeschlossen sind, wurde mit einer Pasteurpipette mehrmals darüber „gewalzt“. Überschüssiger Puffer auf der Anodenoberfläche wurde entfernt. Anschließend wurde die Kathode aufgesetzt. Die Übertragung lief jeweils bei RT, 45 min und einer Spannung von 15 V. Die Übertragung des „prestained marker“ zeigte eine erfolgreiche Übertragung an.

---

**Blotpuffer:** 0,0375% (w/v) SDS  
20% Methanol  
48 mmol/l Tris  
39 mmol/l Glycin

---

### 3.3.2.2. Antikörper Inkubation von LHCP und cpSRP-Proteinen

Es kam im Rahmen des Western Blottings zum Nachweis von LHCP, cpSRP43 sowie cpSRP54. Der Nachweis der Proteine funktionierte grundlegend nach der gleichen Methode, es gab nur kleine Unterschiede bei der genauen Ausführung und der Wahl der Blockierungs- und Waschpuffer.

#### cpSRP43 und cpSRP54

Die immunologische Detektion dieser beiden Proteine erfolgte i.d.R. synchron, d.h. der jeweilige Blot wurde zeitgleich mit zwei Antikörpern inkubiert. Die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen des Blots erfolgte mit 10% (w/v) Magermilchpulver in TBST-Lösung. Dazu wurden der aus dem Semidry-Blot entnommenen Nitrocellulosemembran 30-40 ml der „Blockier-TBST-Lösung“ in einer sauberen Gerdabox zugegeben und für 1 h bei ~80 rpm auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Antikörperserum in 5 ml „Blockier-TBST-Lösung“ in Plastikfolien eingeschweißt. Dazu wurden beide Antikörper folgendermaßen zu den 5 ml pipettiert:

**cpSRP43-Antikörper: 1:1000 Verdünnung in „Blockier-TBST-Lösung“**

**cpSRP54-Antikörper: 1:500 Verdünnung in „Blockier-TBST-Lösung“**

Die Plastikfolien wurden zusammen mit Murmeln in Gerdaboxen gelegt und bei 4 °C, üN bei 200 rpm auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Am nächsten Tag folgten 3 Waschschrte à 10 min mit je 20-30 ml frischer TBSTT-Lösung sowie 1 Waschschrte à 10 min mit 20-30 ml TBST-Lösung. Die Blots wurden anschließend mit sekundärem Antikörper-(Anti-Rabbit) in 5 ml Blockier-TBST-Lösung in Plastikfolien eingeschweißt.

**Anti-Rabbit (2.)-Antikörper: 1:2500 Verdünnung in Blockier-TBST-Lösung.**

Der Inkubationsvorgang erfolgte ebenso mit Murmeln in Gerdaboxen, allerdings bei RT, 1 h und 200 rpm auf dem Orbitalschüttler. Es folgten 3 TBST-Waschschrte wie oben und zuletzt ein Waschschrte mit 20-30 ml TBS-Puffer.

<b>TBS-Lösung:</b>	150 mmol/l NaCl	<b>TBST-Lösung:</b>	0,3% (w/v) Tween-20
	10 mmol/l Tris-HCl <sub>pH 7,5</sub>		150 mmol/l NaCl
			50 mmol/l Tris-HCl <sub>pH 7,5</sub>
<b>TBSTT-Lösung:</b>	0,1% (w/v) TX-100		
	0,025% (w/v) Tween-20	<b>Blockiermittel:</b>	10% (w/v) Magermilch-
	250 mmol/l NaCl		pulver
	10 mmol/l Tris-HCl <sub>pH 7,5</sub>		

#### Antikörper:

Anti43: Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen. Dieser ist gegen das Volllängenprotein gerichtet und wurde von der AG Schünemann, Ruhr-Universität Bochum bereitgestellt. Das Lyophilisat wurde in 250 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst.

## **Methoden**

---

Anti54: Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen. Dieser ist gegen die M-Domäne des Proteins gerichtet und wurde von der AG Schünemann, Ruhr-Universität Bochum bereitgestellt. Das Lyophilisat wurde in 250 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst.

Anti-Rabbit-IgG: Kommerzieller Antikörper aus der Ziege von Cellsignaling Technology, Cambridge UK. Der Antikörper ist mit Alkalischer Phosphatase konjugiert.

### LHCP

Der immunologische Nachweis des LHCP erfolgte immer separat. Die verwendeten Puffer entsprachen in ihrer Zusammensetzung den in der oberen Anleitung beschriebenen. Die Blockierung erfolgte allerdings mit 3% (w/v) BSA-Protein in TBS-Lösung. Die Methode verlief hier entsprechend der zuvor für cpSRP43/cpSRP54-Blots beschriebenen. Der Blot wurde anschließend mit Antikörper in 5 ml 1,5% (w/v) BSA-TBS-Lösung in Plastikfolien eingeschweißt.

#### **LHCP-Antikörper: 1:2500 Verdünnung in 1,5% (w/v) BSA-TBS-Lösung**

Die Inkubation erfolgte zusammen mit Murmeln in Gerdaboxen bei 4 °C, üN und 200 rpm auf dem Orbitalschüttler. Am nächsten Tag wurden 3 Waschschrte à 10 min mit je 20-30 ml frischer TBSTT-Lösung sowie 1 x Waschschrte à 10 min mit 20-30 ml TBS-Lösung durchgeführt. Die Blots wurden anschließend mit sekundärem Antikörper (Anti-Rabbit) in 5 ml 1,5% (w/v) BSA-TBS-Lösung in Plastikfolien eingeschweißt.

#### **Anti-Rabbit (2.)-Antikörper: 1:2500 Verdünnung in 1,5% (w/v) BSA-TBS-Lösung**

Der Inkubationsvorgang erfolgte ebenso mit Murmeln in Gerdaboxen, allerdings bei RT, 1 h und 200 rpm auf dem Orbitalschüttler. Die Waschschrte entsprachen den obigen.

### Antikörper

Anti-LHCP: Laborintern als SA 7430 *Anti-Lhcb 1* bezeichnet. Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen. Dieser ist gegen das Volllängenprotein gerichtet. Es liegen 50 µl-Aliquots vor, welche bei -80° C gelagert werden.

#### **3.3.2.3. Antikörper-Visualisierung**

Die TBS-gewaschenen Blots aus 3.3.2.2 wurden mit 10 ml BCIP/NBT-Substratlösung inkubiert. BCIP und NBT wurden dazu in Alkalischer Phosphatase (AP)-Puffer gelöst. Dies erfolgte solange auf dem Orbitalschüttler, bis deutliche Banden erkennbar waren. Überschüssige Substratlösung wurde abgegossen, die Blots mit H<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich an der Luft getrocknet.



<b>AP-Puffer:</b>	100 mmol/l NaCl 100 mmol/l Tris-HCl <sub>pH9,5</sub> 5 mmol/l MgCl <sub>2</sub>	<b>BCIP/NBT-Substrat- lösung:</b>	33 µl 5% (w/v) BCIP in H <sub>2</sub> O 66 µl 5% (w/v) NBT in 70% DMF → in 10 ml AP-Puffer
-------------------	---	---------------------------------------	--

### 3.3.3. Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Gelpermeations- bzw. auch Gelfiltrationschromatographie ist eine Methode um Moleküle, im Speziellen Proteine, verschiedener Größe aufzutrennen. Die Auftrennung geschieht über eine Glykanmatrix, welche Poren unterschiedlicher Größe besitzt. Kleine Proteine dringen in diese Poren ein; folglich steht solchen Verbindungen das gesamte Säulenvolumen zur Verfügung. Je größer die Proteine, desto eher werden diese durch die Gelporen diskriminiert und desto weniger Säulenvolumen steht ihnen zur Verfügung. Die Folge ist eine schnellere Elution durch die Säulenmatrix. Der hydrodynamische Radius der Proteine stellt den entscheidenden Auftrennungsparameter dar. Dieser kann in erster Näherung mit dem Molekulargewicht gleichgesetzt werden. Da jede Gelfiltrationssäule abhängig von ihrem Säulenmaterial einen linearen Auftrennungsbereich in einem spezifischen Molekulargewichtsbereich besitzt, kann die Methode auch zur Abschätzung des Molekulargewichts, abhängig von dem Elutionsverhalten einer Spezies angewendet werden.

In dieser Arbeit kamen zwei analytische Säulentypen (10/30) zur Verwendung: (A) eine Superdex 200 mit einem Ausschlussvolumen von ~1300 kDa und einem linearen Auftrennungsbereich von 600-10 kDa, (B) eine Superose 6 mit einem Ausschlussvolumen von 40 MDa und einem linearen Auftrennungsbereich von 5000-5 kDa. Die Säulen hatten ein identisches Matrixvolumen von 24 ml und wurden auf die gleiche Art und Weise bedient. Dabei waren die Säulen in dem BioRad „BioLogic HR“- Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-System zwischen dem Probeninjektionsventil und der Detektionseinheit (OM-II UV Optics Module and Conductivity Flow Cell) positioniert.

#### Grundlegende Laufparameter

Alle GPC-Läufe wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Laufparametereinstellung erfolgte mit der Software „BioLogic HR“. Dabei betrug die Flussrate mit isokratischem GPC-Laufpuffer in allen Eichungs- sowie Probenläufen 0,5 ml/min. Alle Laufpuffer (auch Waschpuffer) wurden vor Verwendung durch eine 0,2 µm Polyamid-Membran filtriert. Sowohl bei Eich- als auch Probenläufen wurden je ein Gesamtvolumen von 30 ml über die Säule laufen lassen. Bei Probenläufen wurde der Durchlauf fraktioniert aufgefangen (Fraction Collection). Um eine Synchronisierung zwischen Chromatogramm und aufgefangener Probe sicherzustellen, wurde ein „Delay Volume“ bestimmt. Dieses Volumen entspricht dem Schlauchvolumen zwischen UV-Detektormesszelle und „Auto

## Methoden

---

Sampler“-Ausgang. Ansonsten wurde der Durchlauf verworfen. Tabelle 3.2 zeigt die Laufprotokolle für GPC-Probenläufe sowie GPC-Eichläufe.

### **Tabelle 3.2: Laufprotokolle für GPC-Probenläufe und GPC-Eichläufe.**

Die Laufprotokolle wurden mithilfe der „BioLogic HR“-Software des BioRad-FPLC-Systems geschrieben.

Fraction Collection	→ Collect All in 1 window; Fraction Size: 0,5 ml; Start: 7→18 ml; Delay Volume: 0,3 ml
UV-Lamp	→ Turn on
UV Detector	→ Set Zero Baseline
Load/Inject Sample	→ Volume: 5 ml; Flowrate: 0,5 ml/min; Composition: 100% Buffer A
Isocratic Flow	→ Volume: 25 ml; Flowrate: 0,5 ml/min; Composition: 100% Buffer A
UV-Lamp	→ Turn off

---

<b>GPC-Laufpuffer:</b>	300 mmol/l NaCl
	50 mmol/l HEPES
	2 mmol/l DTT
	→pH-Einstellung auf 8,0 (mit KOH)

---

### **3.3.3.1. GPC-Eichung**

Zur Größenkalibrierung der Säulen wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten Eichproteine für die Gelfiltrationschromatographie in einem Molekulargewichtsbereich von 2000 kDa (Blue Dextran) bis 17 kDa (Myoglobin) verwendet. Für den linearen Auftrennungsbereich der Säulen gilt eine Proportionalitätsbeziehung zwischen dem dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts und dem Elutionsvolumen eines Proteins. Die Auftragung beider Werte in einem Diagramm ergab eine Geradengleichung, welche zur Größenermittlung der Proben diente. Die Eichung wurde regelmäßig in Abständen von 3-4 Monaten wiederholt. Es ergaben sich leichte Schwankungen im Elutionsverhalten der Proteine. Die in den Ergebnissen dargestellten GPC-Läufe mit den entsprechenden Molekulargewichtsangaben beziehen sich jeweils immer auf die aktuellste Eichung. Für die Eichung wurden 500 µl einer 1 mg/ml Lösung der jeweiligen Eichproteine in GPC-Laufpuffer hergestellt. Es folgte anschließend ein Zentrifugationsschritt bei RT, 10 min, 14000 rpm (Tischzentrifuge). Der Überstand wurde abgezogen und auf die Säule aufgetragen. In der Regel wurde die Eichung gleichzeitig für 2 Proteine mit verhältnismäßig großem Unterschied im Elutionsvolumen (z.B. Thyroglobulin und BSA) durchgeführt.

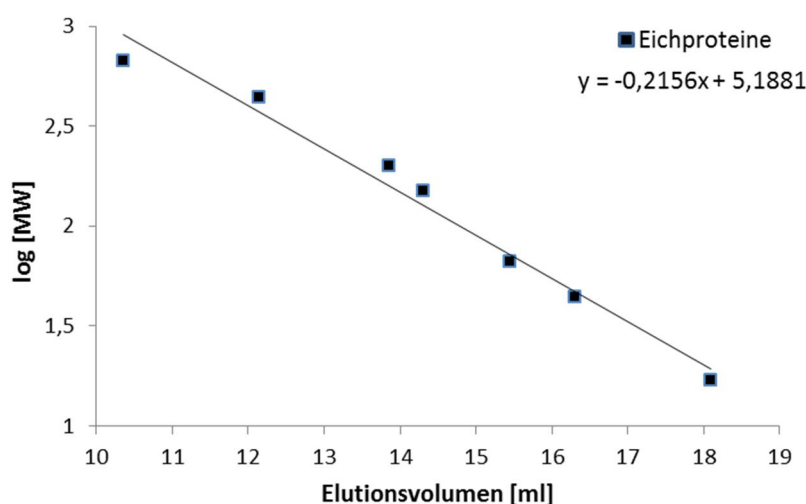
Superdex 200

Im Falle der Superdex 200 wurde Blue Dextran (2000 kDa) nur zur Ermittlung des Ausschlussvolumens (8,6 ml) eingesetzt. Die anderen Eichproteine wurden zur Erstellung der Eichgeradengleichung verwendet.

**Tabelle 3.3: Eichung der Superdex 200 (10/30).**

Die Tabelle zeigt den dekadischen Logarithmus (log) des Molekulargewichts (MW) der Proteine sowie das jeweilige Elutionsvolumen.

Protein	MW [kDa]	log [MW]	Elutionsvolumen [ml]
Thyroglobulin	669	2,83	10,35
Apoferritin	443	2,65	12,15
$\beta$ -Amylase	200	2,30	13,85
Alkohol-Dehydrogenase (ADH)	150	2,18	14,3
Serumalbumin-Rind (BSA)	66	1,82	15,45
Ovalbumin	42,8	1,65	16,3
Myoglobin	17	1,23	18,1



**Abbildung 3.1: Eichgerade und Geradengleichung für die Superdex 200.** Die einzelnen Eichproteinpunkte sind Tabelle 3.3 zu entnehmen.

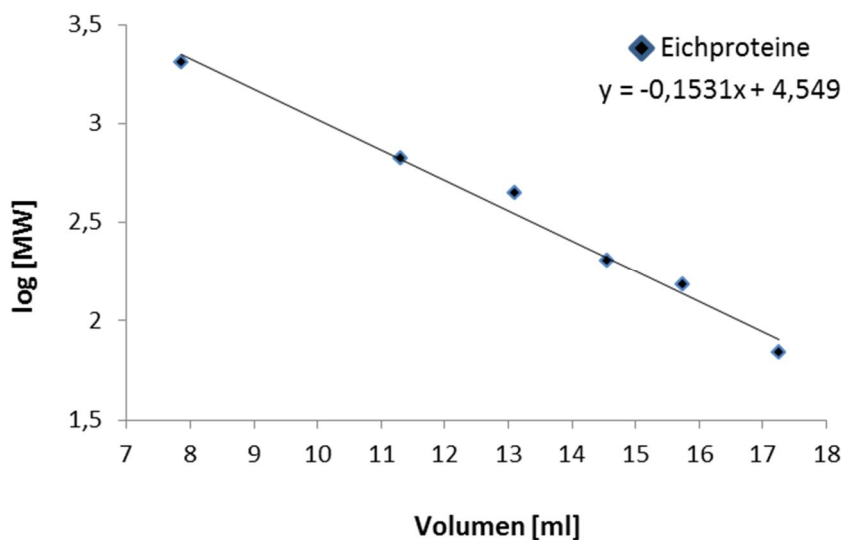
Superose 6

Im Falle der Superose 6 wurde alle Eichproteine von Blue Dextran (2000 kDa) bis BSA (66 kDa) zur Ermittlung der Eichgeradengleichung mit einbezogen. Eine Ermittlung des Ausschlussvolumens erfolgte nicht separat.

**Tabelle 3.4: Eichung der Superose 6 (10/30)**

Die Tabelle zeigt den dekadischen Logarithmus (log) des Molekulargewichts (MW) der Proteine sowie das jeweilige Elutionsvolumen.

Protein	MW [kDa]	log [MW]	Elutionsvolumen [ml]
Blue Dextran	2000	3,30	7,85
Thyroglobulin	669	2,83	11,3
Apoferritin	443	2,65	13,1
β-Amylase	200	2,30	14,55
Alkohol-Dehydrogenase (ADH)	150	2,18	15,75
Serumalbumin-Rind (BSA)	66	1,82	17,25



**Abbildung 3.2: Eichgerade und Geradengleichung für die Superose 6.**  
 Die einzelnen Eichproteinpunkte sind Tabelle 3.4 zu entnehmen.

### 3.3.3.2. GPC-Probenlauf

Alle auf die Gelfiltrationssäulen aufgetragenen Proben wurden, vor der Applikation bei 4 °C, 15 min, 18000 rpm im Eppi-Rotor:1195 zentrifugiert. Es wurden je nach Proteinkonzentration 5-20 µl als GPC-Auftragreferenz („Load“) zurückgehalten und wiederum je nach Proteinkonzentration verschiedene Volumina (200-500 µl) in eine 500 µl-Injektionsschleife des BioRad-FPLC-Systems eingespritzt. Der Lauf erfolgte wie unter 3.3.3 beschrieben. Für die nachfolgende gelelektrophoretische Untersuchung zur Bestimmung der Proteinzusammensetzung wurden diejenigen 0,5 ml-Fractionen innerhalb des Auffangfensters von 7-18 ml verwendet, welche entsprechend dem UV<sub>280 nm</sub>-Chromatogramm Proteininhalt zeigten. Nach jedem Probenlauf wurden mindestens 15 ml GPC-Laufpuffer (≈ 0,65 SV) über die Säule eluiert, ehe ein neuer Auftrag stattfand.

### 3.3.3.3. GPC-Waschläufe

GPC-Waschläufe erfolgten in regelmäßigen Abständen, um aggregiertes Protein bzw. sonstige Verunreinigungen von der Säule zu waschen. Alternativ wurde immer dann gewaschen, wenn der Druck auf den Säulen gegenüber dem gewöhnlichen Arbeitsdruck stark anstieg. Für Waschvorgänge wurden die Säulen immer in umgedrehter Richtung (im Vergleich zu normalen Arbeitsläufen) betrieben. Standardmäßige Waschgänge erfolgten mit 50 ml (= 2 SV) 2% SDS (Laufprotokoll aus Tabelle 3.2 so modifiziert, dass Gesamtvolumen von „Load/Inject Sample“ + „Isocratic Flow“ 50 ml betrug). Die Läufe erfolgten bei Raumtemperatur, um SDS-Ausfällung (bei niedrigen Temperaturen) zu verhindern. Anschließend folgte eine Waschung mit mindestens 200 ml (= 8 SV) H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> üN, um das Detergenz restlos zu entfernen. Nach Wenden in die korrekte Arbeitsrichtung wurde die Säule mit 50 ml GPC-Laufpuffer äquilibriert. Alternativ wurde auch mit 25 ml (= 1 SV) 1 mol/l NaOH gewaschen und dieses mit mindestens 75 ml (= 3 SV) H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> entfernt. Die Flussraten über die Säule wurden bei den Waschgängen mitunter dem Säulendruck angepasst und betrugen teilweise nur 0,3-0,4 ml/min.

### 3.3.4. Densitometrische Stöchiometriebestimmung

Die Densitometrie ist eine Methode zur quantitativen Messung der Farbdichte. Dabei wird die Farbintensität pro Flächeneinheit bestimmt. Coomassie-gefärbte und möglichst vollständig Hintergrund-entfärbte Gele wurden zunächst im VersaDoc™ Imaging System 3000 hochauflösend fotografiert. Da die Quantität des Proteins und die Coomassie-Assoziation (zumindest in einem großen Bereich) proportional sind, kann eine Farbintensitätsmessung direkt mit der vorhandenen Proteinmenge gleichgesetzt werden. Die Gelbandenauswertung erfolgte anschließend mittels des Programms Quantity One 4.3.0. Die Auswertung wurde durch eine Mischung aus digitaler Gelbandenerkennung und ggf. manueller Korrektur vorgenommen. Es wurde zunächst das „Volume Contour Tool“ zur digitalen Festlegung der Proteinbande benutzt. Mithilfe dieses „Tools“ kann eine Grenze um den äußersten Rand einer Proteinbande gebildet werden. Beim Anklicken und dem Ziehen des Cursors über die Bande (von innen nach außen) werden all die Farbpixel mit in die Begrenzung aufgenommen, die mindestens der Intensität desjenigen Pixels entsprechen, über dem sich der Cursor gerade befindet. Eine manuelle Korrektur zum Editieren der Proteinbandengrenze wurde immer dann vorgenommen, wenn sich offensichtliche Inhomogenitäten in den Gelen zeigten, d.h., wenn „Farbsignal“ als nicht von Proteinen stammend gewertet werden konnte. Um generell unspezifischen Hintergrund und dessen Beitrag zu eliminieren, wurde immer die Option „Local Background Substraction“ gewählt. Bei dieser Methode wird die Durchschnittsintensität der Pixel im „1-Pixel-Gürtel“ um die zuvor gemachte Gelbandenbegrenzung berechnet und von jeder Pixelintensität innerhalb der Begrenzung abgezogen. Die letztliche „Farbmenge“, welche proportional zur Proteinmenge ist, kann in folgender Formel ausgedrückt werden:

### Farbmenge ( $\sim$ Proteinmenge) = Pixelanzahl x Farbintensität – Hintergrund

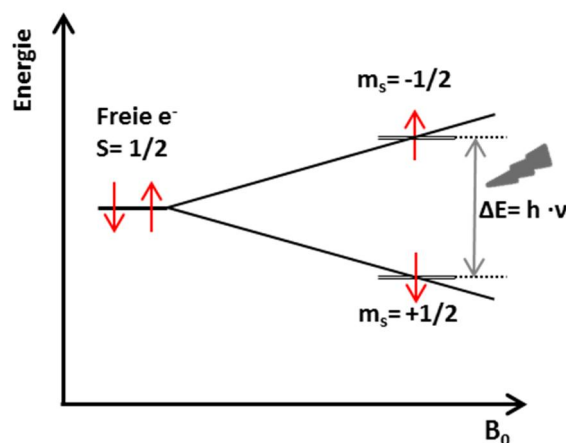
Alle einzelnen Proteinbanden der „Eichung“ als auch der zu vermessenden Proben wurden mindestens 3 mal unabhängig auf diese Weise vermessen und ein entsprechender Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt. Die zu vermessenden Proben entstammten verschiedenen Chaperon-LHCP-Kopplungen, welche nach GPC-Läufen fraktioniert gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden.

#### 3.3.4.1. Densitometrie-Eichung

Eine densitometrische Bestimmung der Intensitätsverhältnisse eines unbekanntes Verhältnisses kann nur dann gemacht werden, wenn eine entsprechende Referenz existiert. Um eine solche Referenz zu erhalten wurden eingewogene Mengen von cpSRP43- und LHCP-Protein in den stöchiometrischen Verhältnissen 1:2, 1:1 sowie 2:1 nach standardmäßiger Auftrennung in 15% PAA-Gelen densitometrisch ausgewertet (vgl. 0). Die dazu verwendeten Stammlösungen von Proteinen wurden zunächst bis nahe an die Homogenität aufgereinigt. Um ein statistisch abgesichertes Ergebnis für die densitometrischen Intensitätsverhältnisse bei bekannter Stöchiometrie der Proteine zu erhalten, wurde jedes der oben genannten Proteinverhältnisse insgesamt 6 mal auf ein Gel appliziert und jede einzelne Coomassie-gefärbte Bande nach erfolgter Hintergrundentfärbung mind. 3 mal unabhängig voneinander densitometrisch ausgewertet.

#### 3.3.5. Elektronen-paramagnetische Resonanz (EPR-)Spektroskopie

Die EPR-Spektroskopie ermöglicht die Strukturanalyse von Feststoffen sowie Molekülen in Lösung. Die Voraussetzung für EPR-spektroskopische Vermessungen ist das Vorhandensein von ungepaarten (paramagnetischen) Elektronen. Diese erfahren in einem magnetischen Feld eine Aufspaltung ihres ursprünglichen Energieniveaus und richten sich entweder parallel oder antiparallel zu diesem aus. Die Energieaufspaltung  $\Delta E$  ist abhängig von der Stärke des magnetischen Feldes. Dieser Vorgang wird als Zeeman-Effekt bezeichnet.



Die Absorption oder die Emission elektromagnetischer Resonanzstrahlung im Mikrowellenbereich hebt das freie Elektron entweder in den höheren Energiezustand oder lässt diesen in den energieärmeren Zustand relaxieren. Die Relaxationszeit ist dabei abhängig von der chemischen Umgebung. Eine Umgebung mit einem geringen magnetischen Moment führt zu einer Verlängerung der Relaxationszeit und verbessert das EPR-Signal. Es werden bei der EPR-Spektroskopie mehrere Messungen nacheinander durchgeführt, da das Signal:Rausch-Verhältnis proportional mit der Quadratwurzel von Einzelmessungen zunimmt.

EPR-Messungen können spezifisch zur Distanzmessung von definierten Positionen im Protein genutzt werden. Dazu wird die „double electron electron resonance“ (DEER-)Methode verwendet. Es werden 2 freie Elektronenspins in das Protein durch „site directed spin labeling“ eingeführt. Diese paramagnetischen Elektronen haben im Grundzustand die gleiche Ausrichtung. Wird einer der beiden Spins (puls spin) durch elektromagnetische Strahlung in ein höheres Energieniveau gehoben, ändert sich für den anderen Spin (observer spin) die magnetische Umgebung. Diese Dipol-Dipol-Interaktion ist proportional zu  $1/r^3$ , wobei  $r$  der Distanz zwischen den Spins entspricht. In diesem Zustand kann je nach Interaktionsstärke eine charakteristische Absorption gemessen werden, welche zu den Primärdaten führt. Die genaue Distanz zwischen den Spins kann durch eine Fourier-Transformation und eine Tikhonov-Regularisation berechnet werden. Sind hingegen mehr als 2 Spins in unmittelbarer Umgebung ( $\leq 8$  nm), was z.B. infolge von Aggregation spin-gelabelter Proteine der Fall sein kann, können die Daten nicht mehr sinnvoll interpretiert werden. Ein isolierter Spin bzw. Spins mit größerer Entfernung als  $\sim 10$  nm führen hingegen zu keinem Signal in DEER-Messungen. Somit können solche Messungen mit Einfach-Spinmarkierung als Aggregationskontrolle genutzt werden.

Die DEER-EPR-Messungen wurden von Dr. Yevhen Polyhach und Tona von Hagens an der ETH Zürich (Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Gunnar Jeschke) durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei 50 Kelvin und wurden in einem modifiziertem Q-Band Spektrometer (34 GHz) durchgeführt. DEER-Daten wurden ebenfalls von Dr. Yevhen Polyhach mithilfe des Programms „DEER-Analysis“ ausgewertet und zur Verfügung gestellt.

Die Probenvorbereitung umfasste das LHCP-Spin labeling (vgl. 3.2.11) sowie die entsprechende Chaperon-LHCP-Kopplung. Alle für die EPR-Proben verwendeten Proteinpuffer wurden mit  $D_2O$  angesetzt. Entsprechend verwendete Proteine (z.B. 54M-cpSRP-Komplex) wurden zuvor mithilfe von Amicons in  $D_2O$ -„Analogpuffer“ überführt. Ebenso wurde für die entsprechenden GPC-Läufe  $D_2O$ -haltiger GPC-Laufpuffer verwendet. Es wurden 57  $\mu$ l der entsprechenden Proben nach Fertigstellung sofort mit 13  $\mu$ l 80% deuteriertem Glycerin (Endkonzentration: 15%) vermischt und mit einer Hamilton-Spritze in EPR-Röhrchen gefüllt. Diese wurden umgehend in flüssigem  $N_2$  tiefgefroren.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung des chloroplastidären Signalerkennungspartikels (cpSRP)

Alle im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse beinhalten als grundlegenden Baustein den chloroplastidären Signalerkennungspartikel (cpSRP). Die Proteine dieses Heterodimers, bestehend aus den Untereinheiten cpSRP43 als hinreichender Solubilisierungsfaktor sowie cpSRP54 als Co-Solubilisierungsfaktor für das light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein (LHCP) können rekombinant in Bakterienzellen exprimiert werden. Die entsprechenden Gensequenz-tragenden Plasmide mit N-terminal His<sub>6</sub>-tag tragendem maturem cpSRP43 sowie „tag“-freien cpSRP54 wurden freundlicherweise von der AG Schünemann, Bochum bereitgestellt. Darüber hinaus wurden Deletionsmutanten des cpSRP54 verwendet. Aufgrund des Fehlens der N-terminalen sowie der G-Domäne wurden diese Konstrukte, die nur den C-terminalen Methionin-reichen Teil des Proteins beinhalten, als cpSRP54M („tag“-frei) bzw. His-cpSRP54M (N-terminaler His<sub>6</sub>-tag) bezeichnet. Auch diese Plasmide wurden aus der AG Schünemann aus Bochum erhalten.

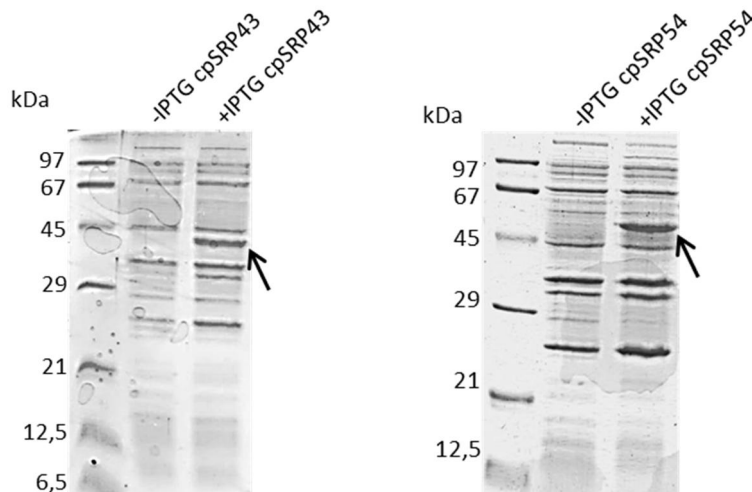
#### 4.1.1. Überexpression und Aufarbeitung der cpSRP-Komponenten

##### 4.1.1.1. Überexpression und Totalproteinanalyse der cpSRP-Komponenten

Die Überexpression von cpSRP43, cpSRP54 sowie dessen Deletionsderivaten geschah standardmäßig in Rosetta(DE3)-Zellen. Insbesondere bei Vollängen-cpSRP54 zeigte sich ein deutlich besseres Überexpressionsverhalten, wenn das Zielprotein-tragende Plasmid unmittelbar vor der Überexpression frisch in Rosetta-Zellen transformiert wurde. Im Zusammenhang mit cpSRP43 sowie den Deletionsvarianten des cpSRP54 wurden immer Transformationsplatten, welche nicht älter als 4 Wochen waren, für eine Überexpression verwendet.

Abbildung 4.1 zeigt die Totalproteinanalysen von cpSRP43 und cpSRP54. Erwartungsgemäß treten in der Gelbahn mit induziertem Ansatz (+IPTG) die zusätzlichen Gelbanden des überexprimierten Zielproteins auf (Pfeile). Die überexprimierte His<sub>6</sub>-tag Variante des cpSRP43 besitzt eine Masse von 36,8 kDa, läuft jedoch in der denaturierenden Gelelektrophorese apparent etwas höher und zeigt sich kurz unterhalb der 45 kDa-Markerbande. Die überexprimierte Version des cpSRP54 besitzt eine molekulare Masse von 52,3 kDa.

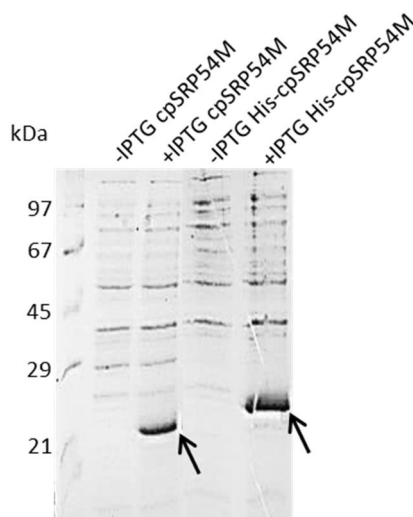




**Abbildung 4.1: Bakterienlysate Überstand der Einzelüberexpressionen von cpSRP43 und cpSRP54.**

SDS-PAGE. Es erfolgte eine Totalproteinanalyse nach Standardprotokoll. Anschließend wurden je 20  $\mu$ l Probe mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt. Die Induktion mit IPTG erfolgte über einen Zeitraum von 4 h.

Im Fall der Totalproteinanalyse von cpSRP54M (21,5 kDa) zeigt sich im induzierten Ansatz eine deutliche Proteinbande knapp über 21 kDa. Im His-cpSRP54M ist der His<sub>6</sub>-tag N-terminal durch die Aminosäuresequenz Gly-Ser-Ser-[His<sub>6</sub>-tag]-Ser-Gln-Asp-Pro flankiert. Das Protein besitzt eine molekulare Masse von 23 kDa. Der +IPTG-Ansatz zeigt entsprechend zwischen der 21 kDa- und 29 kDa-Markerbande ein deutliches Proteinsignal. Es ist erkennbar, dass sich trotz des geringen Molekularmassenunterschieds die Proteine im 15% PAA-Gel sehr gut auftrennen lassen.



**Abbildung 4.2: Totalproteinanalyse von cpSRP-54M und His-cpSRP54M.**

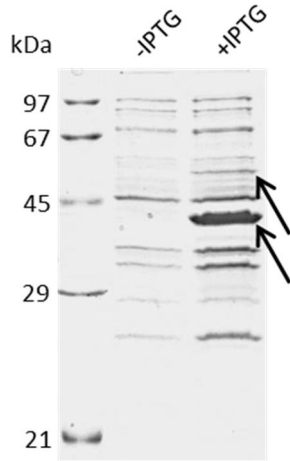
SDS-PAGE. Es erfolgte eine Totalproteinanalyse nach Standardprotokoll. Anschließend wurden je 20  $\mu$ l Probe mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt. Die Induktion mit IPTG erfolgte über einen Zeitraum von 4 h.

#### 4.1.1.2. Überexpression und Totalproteinanalyse einer cpSRP-Coexpression

Die Vektoren *pETDuet-1* (cpSRP43-Gen tragend) sowie *pCOLADuet-1* (cpSRP54-Gen tragend) lassen sich in *E.coli*-Zellen des Stammes Rosetta (DE3) cotransformieren. Voraussetzung für eine Cotransformation zweier Plasmide in *E.coli*-Zellen ist das Vorhandensein verschiedener Selektionsmarker sowie unterschiedliche „origin of replication“ (ORI). Beides ist für die Vektoren

## Ergebnisse

*pETDuet-1* sowie *pCOLADuet-1* gewährleistet. Kulturen wurden in Anwesenheit der Antibiotika Ampicillin (*pETDuet-1*), Chloramphenicol (*pRARE* in Rosetta) sowie Kanamycin (*pETCOLA-1*) angezogen.



**Abbildung 4.3: Totalproteinanalyse der co-überexprimierten Proteine cpSRP43 und cpSRP54.**

SDS-PAGE. Je 1 ml vor (-) und nach (+) IPTG-Induktion des Überexpressionsansatzes wurden zentrifugiert. Das Pellet in 400  $\mu$ l TCP-Puffer aufgenommen und je 20  $\mu$ l mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt.

Abbildung 4.3 zeigt, dass die Coexpression der beiden cpSRP-Komponenten zwar prinzipiell möglich ist, doch ergibt sich eine stark unterschiedliche Expressionsrate. Dieses Ergebnisse bestätigten jene zur Co-Überexpression aus Bochum (AG Schünemann). Chloroplastidäres SRP43 tritt im induzierten Ansatz deutlich hervor (unterer Pfeil). Chloroplastidäres SRP54 erscheint hingegen nur sehr schwach. Die Gene beider Proteine sind mit den Duet-Vektoren auf Plasmiden mit jeweils 2 multiple cloning sites (MCS) untergebracht und daher zur biscistronischen Expression befähigt. Jedoch konnte auch in diesem Fall ein starkes Ungleichgewicht in der Expressionsrate zu Gunsten des cpSRP43 beobachtet werden (Mündliche Mitteilung von [REDACTED]).

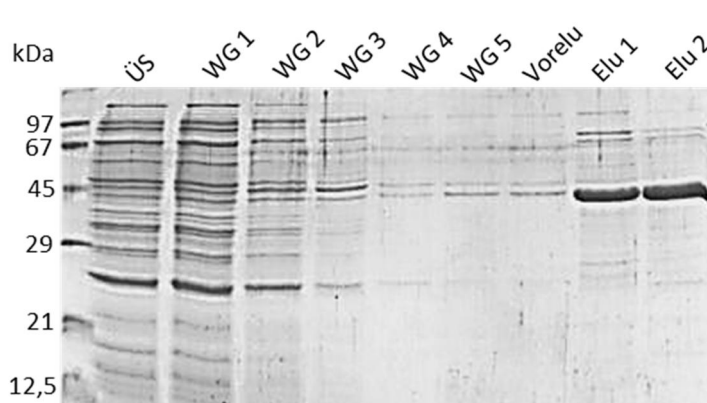
### 4.1.1.3. Metallaffinitätschromatographische Aufreinigung His<sub>6</sub>-tag tragender cpSRP-Einzelkomponenten

Als His<sub>6</sub>-tag Varianten der cpSRP-Komponenten lagen His-cpSRP43 und His-cpSRP54M vor. Generell erfolgte die Nickel-Sepharose-Anbindung aufgrund der starken Viskosität des Zellysatsüberstands immer im Batch-Verfahren. Ebenso wurden die Waschschrte im Batch durchgeführt.

#### 4.1.1.3.1. Metallaffinitätschromatographische Aufreinigung des His-cpSRP43

Im Zusammenhang mit der Aufreinigung von His-cpSRP43 wurden verschiedene Waschmuster getestet: Verwendung von isokratischem Waschpuffer (40 mmol/l Imidazol) sowie linear ansteigendem Waschpuffer in Bezug auf die Imidazolkonzentration (40-70 mmol/l). Letztere Variante

erbrachte jedoch keinen signifikanten Vorteil für das Aufreinigungsergebnis. Abbildung 4.4 zeigt eine Aufreinigung mit isokratischen 40 mmol/l Imidazolwaschschritten.



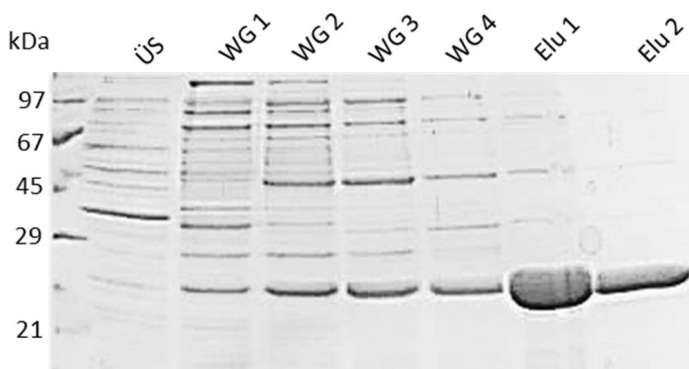
**Abbildung 4.4: Elutionsprofil einer Ni-Säulen-Aufreinigung von cpSRP 43.**

SDS-PAGE. Es wurden je 20 µl der Aufarbeitungsfractionen mit ¼ Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt. Die Anbindung an die Säule erfolgte ausgehend von dem Bakterienlysat-Überstand im Batch-Verfahren üN drehend bei 4°C. ÜS = Überstand nach Anbindung. WG 1-4 = Batch-Waschgänge; WG 5 = chromatographischer Waschgang. Vorelu, Elu 1, Elu 2 = chromatographische Elution mit 300 mmol/l Imidazol.

Die Elutionsfraktionen zeigen, dass das Zielprotein nahezu quantitativ aufgereinigt werden kann. In der Regel eluierte His-cpSRP43 nahezu vollständig innerhalb zwei Säulenvolumina (SV) mit Hochimidazolpuffer (300 mmol/l) von der Ni-Säule. Die Elutionsfraktionen wurden im Nachhinein standardmäßig in imidazolfreie Umgebung umgepuffert. Gelelektrophoretische Untersuchungen der Fraktionen von Entsalzungen mit spin desalting columns (Ausschlussgröße: 7 kDa) zeigten, dass im direkten Durchlauf nach Probenauftrag bzw. in einem nachgeschalteten Elutionsschritt (mit dem 1 fachen Probenvolumen) >95% des Proteins zurückgewonnen werden konnten.

#### 4.1.1.3.2. Metallaffinitätschromatographische Aufreinigung des His-cpSRP54M

Die Aufreinigung von His-cpSRP54M wurde mit einem wie oben beschrieben linear ansteigendem Imidazolgradienten durchgeführt. Das Zielprotein eluierte schon deutlich in den Waschfraktionen (Abbildung 4.5). Jedoch muss hier beachtet werden, dass die Beladungskapazität der Ni-Säule stärker ausgenutzt wurde als bei obig gezeigter cpSRP43-Aufreinigung. Die Elutionsfraktionen zeigen nahezu bis zur Homogenität aufgereinigtes cpSRP54M



**Abbildung 4.5: Elutionsprofil einer Ni-Säulenaufarbeitung des His-cpSRP54M.**

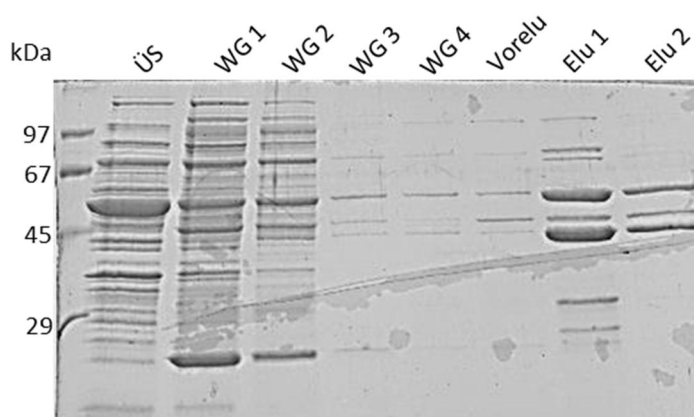
SDS-PAGE. Es wurden je 20 µl der Aufarbeitungsfractionen mit ¼ Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt. ÜS = Überstand. WG 1-4 = Waschgänge, Waschmuster: Ansteigend von 40-70 mmol/l Imidazol. Elu 1, Elu 2 = Elution mit 300 mmol/l Imidazol,

### 4.1.1.4. Metallaffinitätschromatographische Aufreinigung und Kopplung der cpSRP-Komplexspezies

Im Laufe der Arbeit wurde mit zwei verschiedenen cpSRP-Komplexspezies gearbeitet: Dies war zunächst cpSRP-Volllängenkomplex, in späteren Abschnitten kam (cpSRP54M)-cpSRP-Komplex (kurz: 54M-cpSRP) zum Einsatz. In beiden Fällen war jeweils die cpSRP54-Komponente „tag“-frei, cpSRP43 hingegen stets mit N-terminalem His<sub>6</sub>-tag ausgestattet. Für die Kopplung zwischen beiden cpSRP-Volllängenproteinen existiert keine bekannte Bindungskonstante. Holdermann et al., 2012 beschreiben jedoch die Dissoziationskonstante zwischen einem synthetischen (RRKR-)Decamer-Peptid, welches das spezifische Bindemotiv des cpSRP54 repetitiv enthält und Volllängen-cpSRP43 mit 0,4 µmol/l. Nur im Falle einer erfolgreichen Komplexbildung des cpSRP54(M) an His-cpSRP43, ist ersteres in den Elutionsfraktionen der Ni-Säulenaufreinigung enthalten. Um eine möglichst quantitative cpSRP-Kopplung zu gewährleisten und das Auftreten von freiem His-cpSRP43 zu vermeiden, wurde stets ein Überschuss von cpSRP54(M) bei der Kopplung verwendet (3.2.7). Dabei diente ausgehend von den Überständen der Bakterienlysate, welche zuvor in 15%-PAA-Gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, eine Proteinbandenabschätzung der Ermittlung des jeweiligen Zielproteingehalts. Entsprechend wurden die Volumina bei der Vereinigung so gewählt, dass immer ein Überschuss des cpSRP54(M) garantiert war.

#### 4.1.1.4.1. Metallaffinitätschromatographische Aufreinigung von Volllängen-cpSRP

Abbildung 4.6 zeigt eine cpSRP-Volllängenkomplex Aufreinigung. In der Überstandsfraction sowie in den ersten beiden Waschgängen sieht man zwischen der 45 kDa- und der 67 kDa-Markerbande deutlich den Überschuss von cpSRP54 eluieren. Die Elutionsfraktionen zeigen beide Komponenten des cpSRP-Komplexes. Jedoch wirkt die cpSRP43-Bande in diesen überrepräsentiert. Somit ist von freiem cpSRP43 in den Elutionsfraktionen auszugehen.



**Abbildung 4.6: Elutionsprofil einer Ni-Säulen Aufreinigung von rekombinantem Volllängen-cpSRP.**

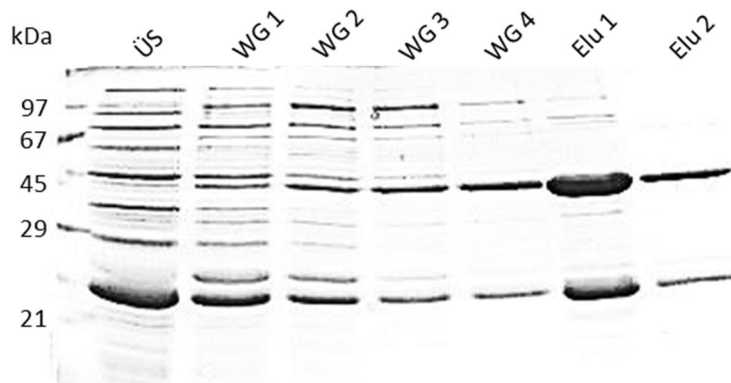
SDS-PAGE. Es wurden je 20 µl der Aufarbeitungsfractionen mit ¼ Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt. Die Bindungsdichte wurde auf das His<sub>6</sub>-Tag tragende cpSRP43 bezogen und betrug ~0,4 mg/ml Ni-Säule. ÜS = Überstand nach Anbindung. WG 1-4 = Chromatographische Waschgänge mit isokratisch 40 mmol/l Imidazol. Vorelu, Elu 1, Elu 2 = Chromatographische Elution mit 300 mmol/l Imidazol.

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, dass die Komplexkonzentration auf der Ni-Säule einen entscheidenden Einfluss auf das Oligomerisierungsverhalten des cpSRP-Komplexes hat (siehe

4.1.2.3). In der hier gezeigten Aufreinigung betrug die Konzentration bezogen auf das His<sub>6</sub>-Tag tragende cpSRP43 ~0,4 mg/ml (= 10,9 µmol/l). Dies wäre bei vollständiger Absättigung mit cpSRP54 auch die entsprechend potentielle Komplexkonzentration. Einerseits stellt diese Beladungsdichte der Ni-Säule eine „Schwellenkonzentration“ im Oligomerisierungsverhalten des Komplexes dar, andererseits konnte bei dieser relativen geringen Kopplungskonzentration trotz großem cpSRP54-Überschuss nie eine vollständige Absättigung des cpSRP43 beobachtet werden.

#### 4.1.1.4.2. Metallaffinitätschromatographische Aufreinigung von (cpSRP54M)-cpSRP-Komplex

Im Falle des 54M-cpSRP-Komplexes wurde bei der Kopplung auf gleiche Weise, wie zuvor erläutert, verfahren. Da zwischenzeitliche Aufreinigungen im Zusammenhang mit isokratischen Waschpufferschritten etwas schlechtere Aufreinigungsergebnisse zeigten, wurde im gezeigten Fall nochmals ein linear steigender Waschgradient (40-70 mmol/l Imidazol) getestet. Auch im Zusammenhang mit dem 54M-cpSRP-Komplex konnte bei höher konzentrierten Imidazolwaschschritten eine Vorelution mit Komplex beobachtet werden. Die Elutionsschritte zeigten jedoch nahezu bis zur Homogenität aufgereinigten Komplex.



**Abbildung 4.7: Elutionsprofil einer Ni-Säulen Aufarbeitung von 54M-cpSRP-Komplex.**

SDS-PAGE. Es wurden je 20 µl der Aufarbeitungsfractionen mit ¼ Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt. ÜS = Überstand. WG 1-4 = chromatographische Waschgänge; Waschmuster: Ansteigend von 40-70 mmol/l Imidazol. Elu 1, Elu 2 = chromatographische Elution mit 300 mmol/l Imidazol.

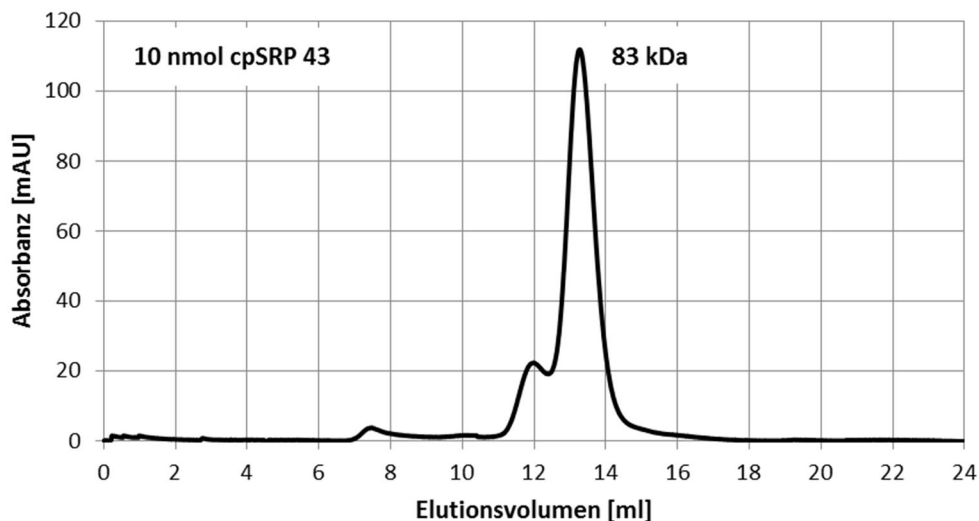
#### 4.1.2. Gelfiltrationschromatographische Charakterisierung des cpSRP

Die gelfiltrationschromatographische Untersuchung spielte für die Charakterisierung/Beschreibung des Oligomerisierungsverhaltens der cpSRP-Komponenten bzw. der cpSRP-Komplexe eine entscheidende Rolle. Anders als zu Beginn der Arbeit angenommen, ergab sich, dass insbesondere Vollängen-cpSRP-Komplex oligomerisierungsempfindlich ist. Im Zusammenhang mit späteren Transitzkopplungsansätzen ist es jedoch mitunter entscheidend, nicht-oligomerisierten cpSRP zu erzeugen. In diesem Zusammenhang wurden neben cpSRP-Vollängenkomplexen ebenso freies cpSRP43 sowie 54M-cpSRP-Komplex gelfiltrationschromatographisch auf ihre Mono- bzw. Polydispersität bzw. ihr apparentes Laufverhalten getestet. Die verschiedenen Gelfiltrationsläufe wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Laufe der Dissertation aufgenommen. Es zeigte sich immer wieder ein leicht verändertes Laufverhalten der Säulen, weshalb sie regelmäßig neu geeicht

wurden (vgl. hierzu 3.3.3.1). Die Berechnung der mittleren apparenten Molekulargewichte (MW) beruhte jeweils immer auf der zu diesem Zeitpunkt vorliegenden aktuellsten Eichung.

### 4.1.2.1. Gelfiltrationschromatographische Untersuchung von freiem cpSRP43

Es wurde aufgereinigtes und entsalztes cpSRP43 auf eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Abbildung 4.8 zeigt, dass freies His-cpSRP43 mit einem theoretischen Molekulargewicht von 36,8 kDa monodispers bei einem apparenten MW von 83 kDa eluierte. Trotz des mehr als doppelt so hohen apparenten Laufverhaltens des Proteins gegenüber seinem tatsächlichen MW handelt es sich um frei eluierendes monomeres cpSRP43 (siehe Diskussion 5.1.1). Die starke Abweichung liegt in der Proteingeometrie begründet. cpSRP43 wird als ein lang gestrecktes Protein mit einer Längenausdehnung von  $\sim 120\text{\AA}$  und einem Durchmesser von  $40\text{\AA}$  beschrieben (Jaru Amporpan et al., 2010). Ein Gelauftrag des Gelfiltrationseeluats wurde in diesem Zusammenhang nicht vorgenommen. Im Zusammenhang mit freiem cpSRP43 gab es zu keinem Zeitpunkt Hinweise auf ein konzentrationsabhängiges Oligomerisierungsverhalten.



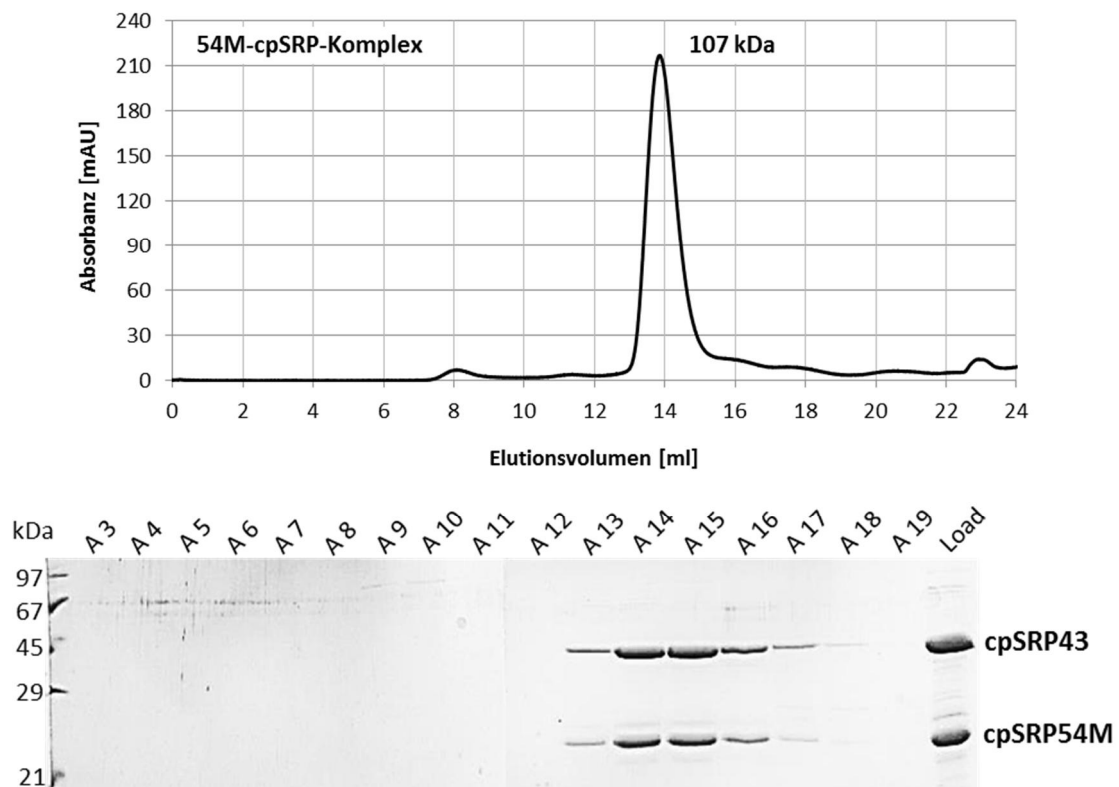
**Abbildung 4.8: Superdex 200 Gelfiltrationslauf des aufgereinigten cpSRP43.**

Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramm. Es wurden 10 nmol Ni-Säulen aufgereinigtes und entsalztes cpSRP43 auf eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Die UV-Detektion erfolgte bei 280 nm.

### 4.1.2.2. Gelfiltrationschromatographische Untersuchung des (cpSRP54M)-cpSRP-Komplex

Es wurden aufgereinigter und entsalzter cpSRP-Komplex mit cpSRP54M (N-terminal deletierter cpSRP54) auf eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Entsprechend dem höher apparenten Laufverhalten des freien cpSRP43 ist auch für den Komplex ein deutlich von seinem theoretischen MW (58,3 kDa) abweichendes Laufverhalten zu erwarten. Das Chromatogramm in Abbildung 4.9 zeigt, dass der 54M-cpSRP-Komplex bei einem mittleren apparenten Molekulargewicht von 107 kDa eluierte. Auch im Zusammenhang mit 54M-cpSRP-Komplex konnte nie ein konzentrationsabhängiges

Oligomerisierungsverhalten beobachtet werden. Die auf ein 15% PAA-Gel applizierten Gelfiltrationsfraktionen lassen in Abbildung 4.9 erkennen, dass die Absättigung des His-cpSRP43 mit einem Überschuss von cpSRP54M in der Kopplung quantitativ verlief, da auch in den späten Fraktionen nahezu kein frei eluierendes cpSRP43 zu erkennen ist. Die Intensität der Gelbanden der Komplexkomponenten zueinander erscheint in jeder Elutionsfraktion konstant. Somit ist von einer definierten Stöchiometrie des Komplexes auszugehen. Unter Einbezug des apparenten MW des cpRP43 zeigt die 107 kDa-Bande monodispers binäre Komplexe (1:1).



**Abbildung 4.9: Superdex 200 Gelfiltrationslauf einer 54M-cpSRP-Komplexbindung.**

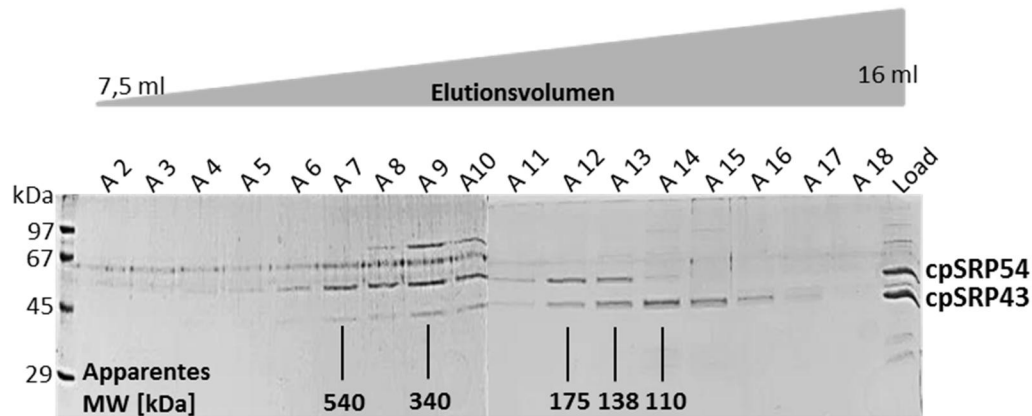
Oben: Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramm. Es wurden 500  $\mu$ l aufgereinigter und entsalzter 54M-cpSRP-Komplex auf eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten. Unten: SDS-PAGE. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 8,0 – 16,5 ml (A3 – A19) wurden untersucht. Jeweils 20  $\mu$ l Fraktion sowie 10  $\mu$ l Load wurden mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt.

#### 4.1.2.3. Konzentrationsabhängiges Oligomerisierungsverhalten des cpSRP-Volllängenkomplex

Erkenntnisse und Einblicke in die molekularen Eigenschaften des cpSRP-(Volllängen-)Komplexes sind unabdinglich und Voraussetzung für das Verständnis der Eigenschaften des Transitkomplexes. Insbesondere in später beschriebenen Transitkomplexbindungen mit Urea-solubilisiertem LHCP, bei welchen es im Verlauf der Aufarbeitung nicht zu einer De- und Renaturierung der Komplexe (vgl. im Gegensatz dazu Transitkomplexbindung nach Detergenz-Standard-Methode) kommt, ist die initiale Konstitution der cpSRP-Komplexe entscheidend. Im Laufe der Arbeit stellte sich heraus, dass diese sehr stark von der Komplexkonzentration im Kopplungsansatz bzw. bei Aufreinigung auf der Ni-Säule

## Ergebnisse

abhängig ist. Es zeigte sich eine mit steigender Konzentration sukzessiv zunehmende Oligomerausbildung des cpSRP-Komplexes. Wie schon unter 4.1.1.4 erwähnt, erfolgte die Konzentrationsbestimmung der Komplexkomponenten (Bakterienlysatüberstand) für die Kopplung durch Abschätzung aus einem Auftrag auf ein 15%-PAA-Gel. Dies muss im Hinblick auf die Fehleranfälligkeit bzw. die genaue Verlässlichkeit der Konzentrationsangaben beachtet werden. Abbildung 4.10 zeigt einen Gelfiltrationslauf einer cpSRP-Kopplung mit einer Ni-Säulenkonzentration von ~0,4 mg/ml bezogen auf das His<sub>6</sub>-tag tragende cpSRP43 (Aufreinigung siehe Abbildung 4.6).



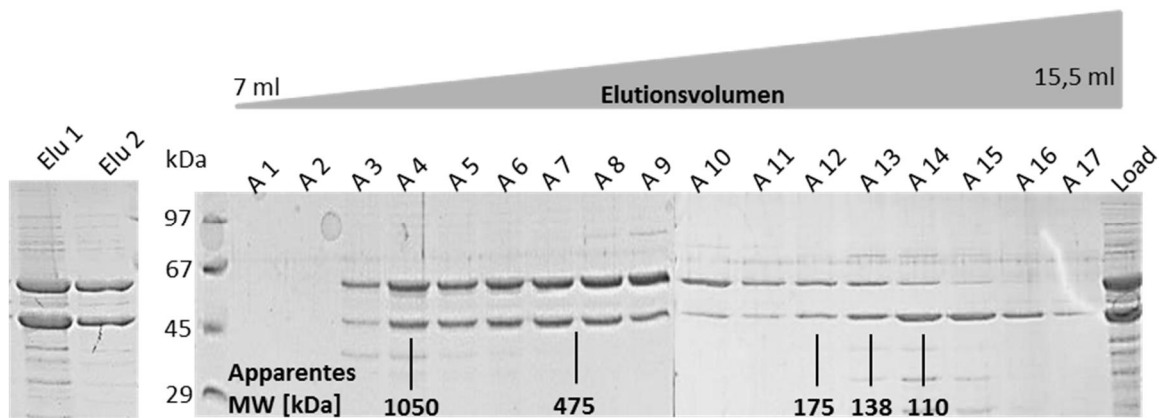
**Abbildung 4.10: Gelfiltrationslauf der Aufarbeitung von rekombinantem Vollängen-cpSRP (0,4 mg/ml).** SDS-PAGE. Es wurden 300  $\mu$ l Elu 1 aus Abbildung 4.6 ohne weitere Behandlung auf eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten. Fraktionssammlung zwischen 7,5-16 ml (A2-A18) Elutionsvolumen. Jeweils 45  $\mu$ l Fraktion sowie 10  $\mu$ l Load wurden mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt.

In den Fraktionen A6 bis A10, was einem apparenten MW von 750-300 kDa entspricht sind sowohl Gelbanden des cpSRP54 als auch schwache Gelbanden des cpSRP43 zu erkennen. Die cpSRP54-Bande ist in diesen Fraktionen deutlich überrepräsentiert, weshalb hier nicht von einem definierten Komplex auszugehen ist (vgl. Diskussion 5.1.2). In den Fraktionen A11 (sehr schwach) und A12 sind beide Banden des Komplexes vorhanden. cpSRP54 erscheint intensiver. Diese Intensitätsrelation konnte „empirisch“ als äquimolares Verhältnis der beiden Komplexkomponenten (siehe z.B. Abbildung 4.11/Abbildung 4.12 und vgl. Diskussion 5.1.3) ermittelt werden. Fraktion A13 zeigt schon ein augenscheinlich gleiches Intensitätsverhältnis. Ab A14 eluiert schließlich freies cpSRP43. Für A11-A13 ist die Elution von definierten cpSRP-Komplexen anzunehmen. In A13 ist die cpSRP43-Bande aufgrund der einsetzenden Elution freien cpSRP43s etwas überrepräsentiert. Das mittlere MW des cpSRP-Vollängenkomplex liegt bei ~155 kDa. Unter Berücksichtigung des abweichenden Laufverhaltens von freiem cpSRP43 ist von binären cpSRP-Komplexen auszugehen. Trotz eines massiven Überschusses von cpSRP54 im Kopplungsansatz (vgl. Abbildung 4.6) wurde keine Absättigung des His-cpSRP43 erreicht.

Wird die Komplexbildung bei einer höheren Konzentration und die Ni-Säulenaufreinigung bei ~0,8 mg/ml bezogen auf das His-cpSRP43 durchgeführt, zeigt sich ein signifikant anderes



Elutionsverhalten der Komplexe (siehe Abbildung 4.11). Im linken Gelausschnitt sind die Elutionsfraktionen der Ni-Säulenaufreinigung gezeigt. Der Gelfiltrationslauf dieser Elution zeigt den cpSRP-Komplex, welcher sich nahezu über den gesamten Auftrennungsbereich der Säule erstreckt.

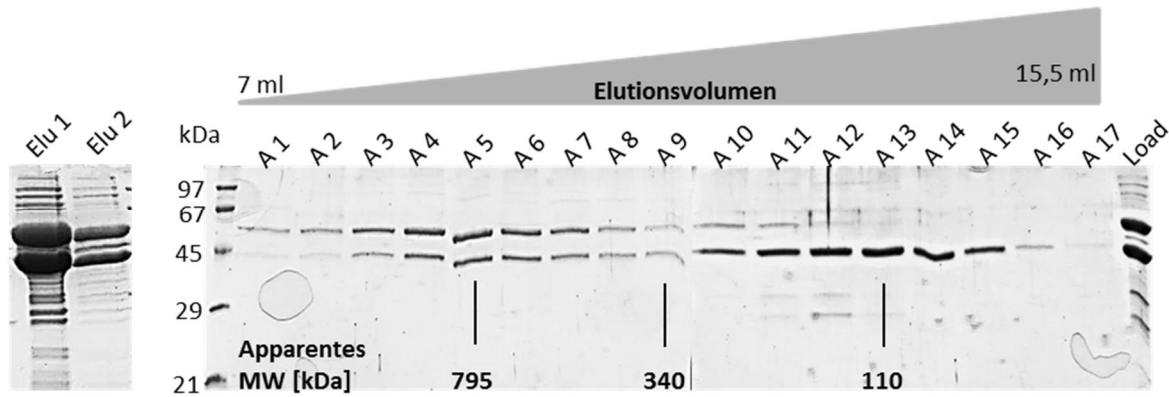


**Abbildung 4.11: Elutionsfraktionen/Gelfiltrationslauf einer Ni-Säulenaufreinigung von rekombinantem Vollängen-cpSRP (0,8 mg/ml).**

SDS-PAGE. Links: Ni-Säulenelutionsfraktionen einer cpSRP-Kopplung. Die Beladungsdichte wurde auf das His<sub>6</sub>-Tag tragende cpSRP43 bezogen und betrug ~0,8 mg/ml Ni-Säule. Es wurden 20 µl der Elutionsfraktionen mit ¼ Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt. Elu 1, Elu 2 = Chromatographische Elution mit 300 mmol/l Imidazol. Rechts: Superdex 200 Gelfiltrationslauf. Es wurden 500 µl Elu 1 ohne weitere Aufarbeitung auf die Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten. Fraktionssammlung zwischen 7-15,5 ml Elutionsvolumen. Zu jeweils 40 µl Fraktion sowie 20 µl Load wurde ¼ Endvolumen Auftragsmix gegeben und in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt.

Die Fraktionen mit einem apparenten MW von >1000–475 kDa (Fraktion A3–A8) zeigen ein konstantes Intensitätsverhältnis der beiden Gelbanden in jeder Fraktion. Das cpSRP54-Signal tritt dabei deutlich stärker auf. Es ist von einem definierten Komplex auszugehen. Der Komplex muss entsprechend seines apparenten hochmolekularen Laufverhaltens oligomerisiert vorliegen. Insbesondere Fraktion A9/A10 zeigen hingegen cpSRP54 tendenziell überrepräsentiert. Die Fraktionen mit einem apparenten MW von 190 – 125 kDa (A12-A13) zeigen schließlich einen im Vergleich zum Gesamtkomplex sehr geringen Anteil von potentiell binärem cpSRP. Geringe Mengen von frei eluierendem His-cpSRP43 folgen.

Eine noch höhere Konzentration bei der Aufreinigung von ~2 mg Komplex/ml Ni-Säule führt schließlich zu einer vollständigen Oligomerisierung der Komplexe. Abbildung 4.12 zeigt, dass die Komplexe bei einem apparenten MW von >1000–380 kDa (A3 – A8) mehr oder weniger stöchiometrisch definiert von der Säule eluieren. Im Ansatz befand sich ein moderater Überschuss von „tag“-freiem cpSRP54, dennoch lassen die späteren Fraktionen einen hohen Gehalt von frei eluierendem His-cpSRP43 erkennen. Somit ist eine vollständige Absättigung des Proteins auch bei höheren Kopplungskonzentrationen nach dieser Methode nicht möglich.



**Abbildung 4.12: Elutionsfraktionen/Gelfiltrationslauf einer Ni-Säulenaufarbeitung von rekombinatem Vollängen-cpSRP (2 mg/ml).**

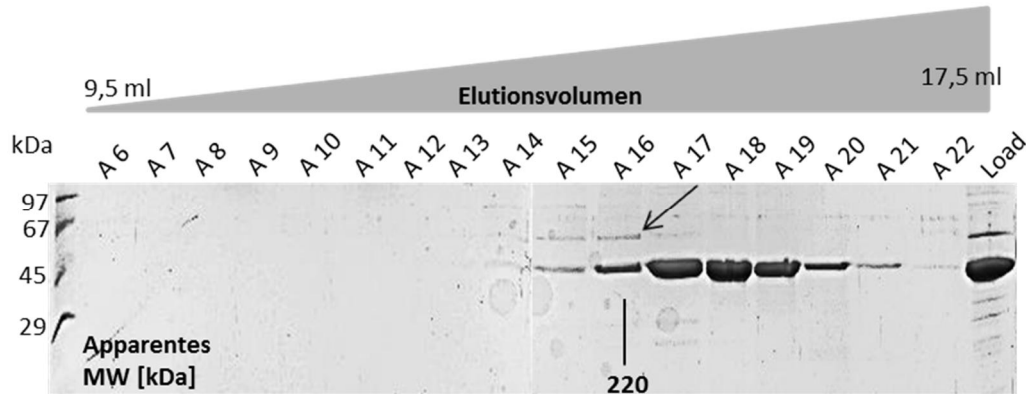
SDS-PAGE. Links: Ni-Säulenelektionsfraktionen einer cpSRP-Kopplung. Die Beladungsdichte wurde auf das His<sub>6</sub>-Tag tragende cpSRP43 bezogen und betrug >2 mg/ml Ni-Säule. Es wurden 20 µl der Elutionsfraktionen mit ¼ Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt. Elu 1, Elu 2 = Elutionsfraktionen (vgl. Abbildung 4.11). Rechts: Superdex 200 Gelfiltrationslauf. Es wurden 200 µl Elu 1 auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten. Fraktionssammlung zwischen 7-15,5 ml Elutionsvolumen. Zu jeweils 20 µl Fraktion sowie 10 µl Load wurde ¼ Endvolumen Auftragsmix gegeben und in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt.

Um mittels der Standardkopplungsmethode, die lediglich die Vereinigung der Bakterienlysate aus Einzelüberexpression mit gleichzeitiger Ni-Säulen-Anbindung vorsieht, dennoch eine vollständige Absättigung des cpSRP43 zu erreichen, wurden auch Kopplungsansätze mit einem 4 fach stöchiometrischen cpSRP54-Überschuss durchgeführt (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Die Konzentration auf der Ni-Säule betrug dabei 0,5 mg/ml bezogen auf das His-cpSRP43. Es zeigte sich bei der gelfiltrationschromatographischen Auftrennung tatsächlich eine vollständige Absättigung des cpSRP43. Gleichzeitig traten jedoch ausschließlich oligomerisierte Komplex zwischen >1000–475 kDa auf. Diese Komplexe zeigten in jeder Elutionsfraktion einen augenscheinlichen Überschuss von cpSRP54. Es konnte bei diesen hochmolekularen Komplexen nicht von einer 1:1-Stöchiometrie ausgegangen werden und somit von unspezifischer Aggregation (vgl. Diskussion 5.1.3).

#### 4.1.2.4. Gelfiltrationschromatographische Untersuchung des co-exprimierten cpSRP-Vollängenkomplexes

Trotz der in 4.1.1.2 Überexpression und Totalproteinanalyse einer cpSRP-Coexpression vorgestellten ungleichen Expressionsrate bei *E.coli*-Coexpression der Komplexkomponenten wurde der Überexpressionsansatz mittels einer Ni-Säulenaufreinigung vollständig aufgearbeitet. Die 1. Ni-Säulenelektion zeigte dabei neben einem erwartungsgemäß starken cpSRP43-Signal ein schwaches Signal von „tag“-freiem cpSRP54, was eine Komplexbindung anzeigte. Die betreffende Elution wurde auf eine Superose 6 Gelfiltrationssäule aufgetragen. In Abbildung 4.13 ist zu erkennen, dass das mittlere apparente MW des *in vivo*-gebildeten Komplexes bei 220 kDa (Fraktion A16) liegt. Der deutlich erkennbare Überschuss von cpSRP43 in dieser Fraktion ist auf schon frei eluierendes cpSRP43 zurückzuführen. Trotz der Abweichung von ~70-80 kDa im Vergleich zum mittleren MW

von potentiell binärem cpSRP-Volllängenkomplex aus den „*in vitro*“-Komplexbildungen (vgl. 4.1.2.3) kann auch hier von potentiell binären Komplexen ausgegangen werden. Die Superose 6 Säule besitzt mit 5000-5 kDa einen sehr großen Auftrennungsbereich. Entsprechend groß wirkt sich eine geringfügige Verschiebung des Elutionsvolumens auf das apparente MW aus.



**Abbildung 4.13: Superose 6 Gelfiltrationslauf einer cpSRP-Coexpression.**

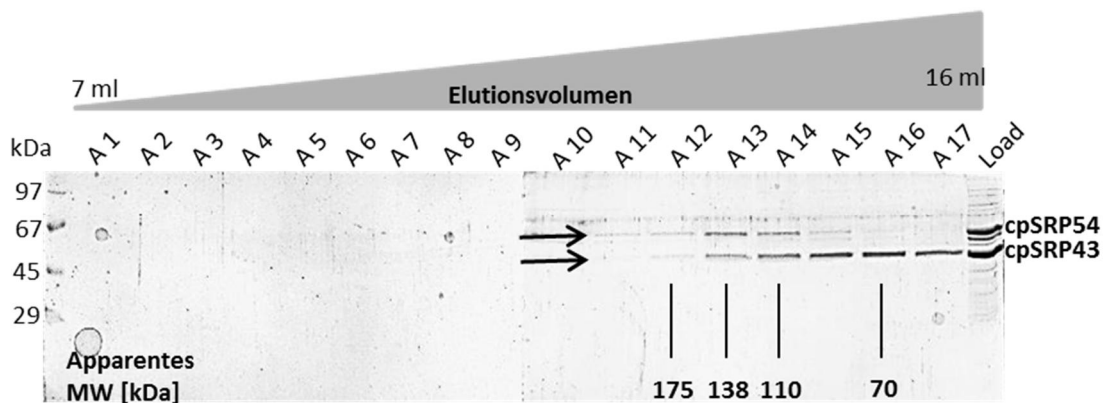
SDS-PAGE. Es wurden 200  $\mu$ l Elu 1 auf eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten. Fraktionsammlung zwischen 9,5 – 17,5 ml (A6 – A22). Jeweils 40  $\mu$ l Fraktion sowie 5  $\mu$ l Load wurden mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix versetzt und in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt.

#### 4.1.3. Optimierungsversuche der cpSRP-Komplexbildung

In den vorangegangenen Kapiteln kristallisierten sich bezüglich des cpSRP-Komplexes zwei unerwünschte Nebeneffekte (Konzentrationsabhängige Oligomerisierung und eine nicht-quantitative Komplexbildung) heraus. Im Zuge der Optimierung sollte eine Kopplungsmethode etabliert werden, die verlässlich und reproduzierbar monodispers binäre cpSRP-Komplexe erzeugt. Dies war in den vorgestellten Ergebnissen mit einer niedrigen Kopplungskonzentration bzw. Konzentration bei der Ni-Säulen-Aufreinigung (0,4 mg/ml) nur bedingt möglich. Neben den hier vorgestellten Ergebnissen (siehe 4.1.2.3) zeigten andere Kopplungen bei dieser Konzentration einen deutlich höheren Anteil von hochmolekular laufenden oligomerisierten Komplexen. Es kann angenommen werden, dass weniger die eigentliche Kopplungskonzentration, sondern eher die „Aufkonzentrierung“ während der Elution von der Ni-Säule, als kritisch und womöglich Oligomerisierungs-fördernd anzusehen ist. Alternative Elutionsmethoden statt der standardmäßig durchgeführten chromatographischen Elution mit isokratischem Elutionspuffer sollten getestet werden. Diese Methode sollte aber auch gleichzeitig eine möglichst vollständige Absättigung des His-cpSRP43 und somit eine quantitative Komplexbildung sicherstellen.

### 4.1.3.1. Alternative Elutionsmethoden des cpSRP bei der metallaffinitätschromatographischen Aufreinigung

Als alternative Elutionsmethoden bei der Ni-Säulenaufreinigung wurden zum einen eine Elution im Batch-Verfahren, zum anderen eine Gradientenelution herangezogen. Beide Methoden schlossen im Gegensatz zur chromatographischen Elution mit isokratischem Puffer eine transiente „Aufkonzentrierung“ auf der Säule aus. In beiden Fällen betrug die Ni-Säulenkonzentration 0,3 mg cpSRP43/ml Ni-Säule. Es wurden Batchelution sowie Gradientenelution nach dem gleichen Muster gewaschen und zeigten bis auf eine nicht identifizierte Fremdproteinbande (Bande im Load in Abbildung 4.14 erkennbar) kurz unterhalb des cpSRP54 Signals eine ansonsten bis zur Homogenität erzielte Aufreinigung. Abbildung 4.14 zeigt das Ergebnis des Gelfiltrationslaufs der cpSRP-Kopplung mit Gradientenelution. Es waren keine hochmolekularen cpSRP-Signale zu erkennen. Fraktion 11 (sehr schwach) – Fraktion 14 zeigen die Elution der cpSRP-Komponenten. Die Intensitätsverhältnisse lassen wieder auf einen definierten Komplex schließen. Die Zunahme des cpSRP43 Signals in A14 ist mit der einsetzenden Elution von freiem Protein zu erklären. Das mittlere apparente MW des Komplexes liegt bei ~140 kDa, was für binären cpSRP-Komplex spricht. Jedoch zeigte sich ebenfalls ein sehr hoher Anteil von freiem unkomplexiertem cpSRP43.



**Abbildung 4.14: Superdex 200 Gelfiltrationslauf einer cpSRP-Kopplung (Gradientenelution).**

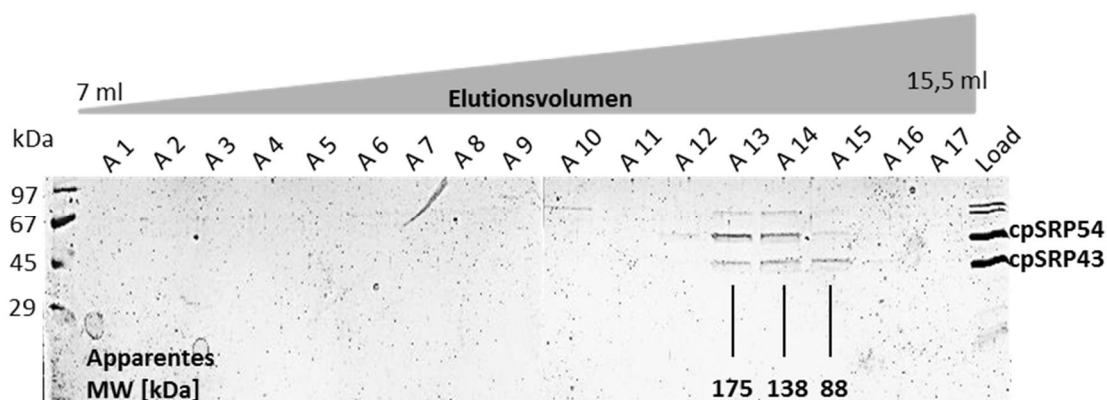
SDS-PAGE. Es wurden 500  $\mu$ l Elution 1 der Ni-Säulenaufreinigung ohne weitere Aufarbeitung auf eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten. Fraktionssammlung zwischen 7-15,5 ml Elutionsvolumen (A1 – A17). Jeweils 40  $\mu$ l Fraktion sowie 20  $\mu$ l Load wurden mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt.

Der Gelfiltrationslauf der Kopplung mit Batchelution erbrachte das gleiche Ergebnis (Daten hier nicht gezeigt).

### 4.1.3.2. Alternative Kopplungsmethode des cpSRP-Komplexes

Es zeigte sich im Vorfeld, dass einerseits die Standard-Kopplungsmethode (Vereinigung der einzelüberexprimierten Bakterienlysate) mit einem moderaten Überschuss von cpSRP54 gegenüber „tag“-tragendem cpSRP43 nicht zu einer quantitativen Bildung des Komplexes führt, andererseits deuteten Versuche unter Verwendung von sehr großen Überschüssen von cpSRP54 auf eine stärkere

Tendenz des Komplexes zur Oligomerisierung bzw. zur unspezifischen Aggregation hin. Generell konnte beobachtet werden, dass cpSRP54-Lösungen mit hoher Konzentration schlecht kontrollierbar sind. Das Protein zeigte dann insbesondere mit fortschreitender Lagerung trotz Zugabe von Reduktionsmittel die Tendenz „klebrig“ zu sein, d.h. die Anfälligkeit zur Aggregation. Eine alternative Kopplungsmethode des cpSRP wurde darin gesehen, His-cpSRP43 vorab an eine Ni-Säule zu binden. Eine quantitative Absättigung sollte durch chromatographischen Auftrag eines 4-fach stöchiometrischen Überschusses von cpSRP54 (Bakterienlysatsüberstand) erzielt werden. Der chromatographische Auftrag bot auch den Vorteil, dass aufgrund einer nicht vorhandenen Volumenbeschränkung dieses vorab verdünnt werden konnte. Es wurde eine Proteinkonzentration von 0,3-0,4 mg His-cpSRP43/ml Ni-Säule mit anschließender Gradientelution gewählt.



**Abbildung 4.15: Superdex 200 Gelfiltrationslauf einer cpSRP-Kopplung (Säulenkopplung).**

SDS-PAGE. Es wurden 500  $\mu$ l Elution 1 der Ni-Säulenaufreinigung ohne weitere Aufarbeitung auf eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten. Fraktionssammlung zwischen 7-15,5 ml Elutionsvolumen (A1 – A17). Jeweils 40  $\mu$ l Fraktion sowie 20  $\mu$ l Load wurden mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt.

Abbildung 4.15 zeigt den Gelfiltrationslauf oben beschriebener Säulenkopplung. Der 1. Elutionsschritt enthielt eine geringere Proteinkonzentration und zeigte nur schwache Proteinsignale. Nichtsdestotrotz sollten die Ergebnisse signifikant sein und lassen den cpSRP-Komplex bei einem mittleren apparenten MW von  $\sim$ 155 kDa erkennen. Es existiert keine hochmolekular laufende oligomerisierte cpSRP-Spezies und der Anteil von freiem cpSRP43 (Fraktion A15) ist sehr gering.

Das oben gezeigte Ergebnis bei cpSRP-Säulenkopplung konnte im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden, jedoch wurde dabei keine höhere Proteinkonzentration bei der Ni-Säulenaufreinigung als 0,3–0,4 mg/ml Ni-Säule bezogen auf das His<sub>6</sub>-tag tragende cpSRP43 getestet. Es kann also nicht gesagt werden, inwiefern diese Methode auch geeignet ist um monodispers binären Komplex mit höheren Endkonzentrationen zu erzeugen. Wurden hingegen die so gewonnenen cpSRP-Komplexe in Amicon-Einheiten aufkonzentriert, zeigten sich wiederum hochmolekular laufende und deshalb oligomerisierte cpSRP-Komplexspezies. Dennoch wird deutlich, dass die chromatographische Komplexbildung die potenteste Methode hinsichtlich einer quantitativen cpSRP-Kopplung darstellt.

Darüberhinaus ist die graduelle Elution der isokratischen Elution für die verlässliche Erzeugung von ausschließlich niedrigmolekular laufenden Komplexen überlegen.

Es soll zum Abschluss dieses Unterkapitels erwähnt werden, dass cpSRP-Kopplungen in Stromaextrakt-Umgebung durchgeführt wurden (vgl. auch 4.5). Nachdem bekannt war, dass rekombinant erzeugter Komplex zur Oligomerisierung tendiert, konnte gemutmaßt werden, dass natives Stromaextrakt u.U. einen noch nicht näher in der Literatur beschriebenen Faktor beinhaltet, der den Komplex potentiell vor Oligomerisierung schützen könnte. Schünemann et al. (1998) beschreiben die stromale Form des cpSRP als eine bei einem apparenten MW von 200 kDa laufende Spezies. Dies stimmt gut mit den rekombinanten nicht-oligomerisierten binären Komplexen bei niedriger Kopplungskonzentration überein. Nichtsdestotrotz wurde eine Kopplung, die von Beginn der Bakterienlyse der Komplexkomponenten bis zum Ni-Säulen Elutiospuffer ausschließlich in „reinem Stromaextrakt-Puffer“ durchgeführt wurde, gelfiltrationschromatographisch untersucht (Ergebnisse nicht gezeigt). Es wurde dazu eine chromatographische Elution mit isokratischem Puffer durchgeführt. Die „Aufreinigungskonzentration“ betrug ~0,3 mg/ml Ni-Säule. Neben niedrig molekular laufenden Komplexen (~150 kDa) zeigte sich ein beträchtlicher Teil an oligomerisierter cpSRP-Spezies. Dieses Ergebnis zeigte, dass Stromaextrakt keinen mindernden Oligomerisierungseffekt auf rekombinantes cpSRP besitzt.

## 4.2. LHCP in Assoziation mit seinem nativen Chaperon cpSRP43

Lange Zeit wurde angenommen, dass für die Solubilisierung von LHCP die zwei im Stroma von Chloroplasten befindlichen Proteine cpSRP43 sowie cpSRP54 benötigt werden (Schünemann et al. 1998). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit dieser rekombinant exprimierten Faktoren ausreichend ist um das hydrophobe Membranprotein in wässriger Umgebung in der Abwesenheit von chaotropen Substanzen oder Detergentien quantitativ in Lösung zu halten. Nahezu zeitgleich konnten Falk und Sinning, 2010 sowie Jaru-Ampornpan et al., 2010 vor kurzem zeigen, dass rekombinantes cpSRP43 alleine in der Lage ist vorgelösten LHCP in Lösung zu halten. Ebenso konnten beide Gruppen nachweisen, dass cpSRP43 selbst frisch in wässriger Umgebung aggregierten LHCP zu resolubilisieren vermag. Jaru-Ampornpan konnten darüber hinaus im Zusammenhang mit Fluoreszenz-Anisotropie Messungen, die die Komplexbildung zwischen einerseits LHCP und cpSRP-Komplex, andererseits LHCP und cpSRP43 maßen, keinen signifikanten Unterschied in den apparenten Dissoziationskonstanten der Komplexe feststellen. Chloroplastidäres SRP43 ist somit alleine in der Lage LHCP im gleichen Maße wie der cpSRP-Komplex zu binden und in Lösung zu halten. Zu Beginn dieser Arbeit wurde aus diesem Grund auch zunächst nur mit cpSRP43-LHCP-Komplex gearbeitet. Die Stöchiometrie des sich bildenden Komplexes muss mit 1:1 angenommen werden. Tatsächlich wird diese in der Literatur im Hinblick auf Vollängenproteine nicht explizit gezeigt, doch konnten Stengel et al., 2008 die Interaktion zwischen cpSRP43 und seinem Cargoprotein als hochspezifisch darstellen. Die Autoren zeigten, dass ein synthetisches sogenanntes L18-Peptid, welches einer Sequenz im LHCP zwischen der Transmembranhelix (TMH) 2 und 3 entspricht mit einer 1:1 Stöchiometrie an cpSRP43 bindet. Im Hinblick auf die Interaktion des cpSRP43 mit den hydrophoben TMHs existiert außer Cain et al, 2011 keine Studie, die eine solche zeigen konnte. Cain et al. belegen eine Interaktion zwischen dem N-Terminus der TM3 des LHCP und dem cpSRP43. Sie entwarfen in Bezug auf diese Ergebnisse und röntgenkristallographischer Daten des cpSRP43 ein Modell, in dem die TM3 in eine molekulare „Rinne“ des cpSRP43 bindet und somit von dem Chaperon mehr oder weniger abgeschirmt wird. Diese Befunde lassen für einen definierten cpSRP43-LHCP-Komplex also nur eine 1:1-Stöchiometrie zu. Tatsächlich wurde ein solcher binärer cpSRP43-LHCP-Komplex noch nie explizit in der Literatur beschrieben. Dieser sollte ein theoretisches MW von ca. 62 kDa haben.

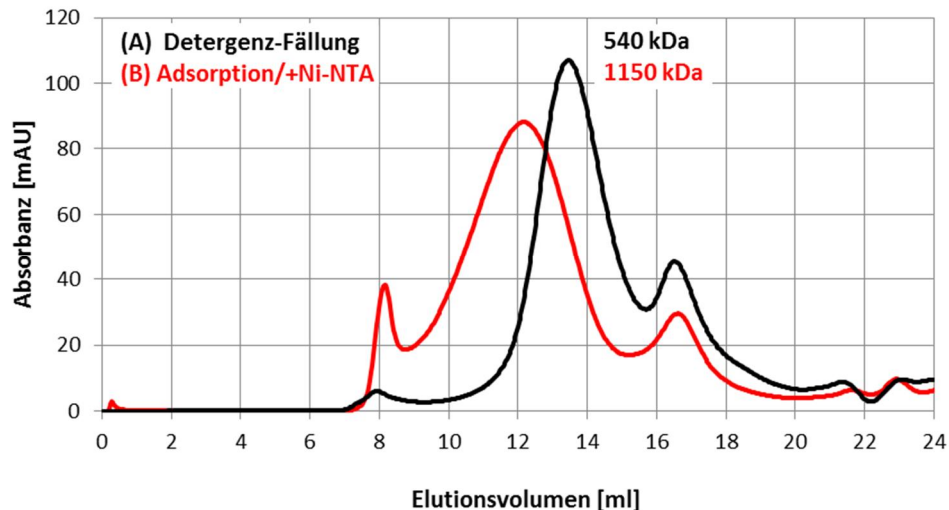
Vorgestellte Studien im Zusammenhang mit Transitkomplex (cpSRP-LHCP-Komplex) bzw. cpSRP43-LHCP-Komplex nutzten zwecks Komplexbildung Urea-vorgelösten LHCP, welcher zu vorgelegtem cpSRP bzw. cpSRP43 zugegeben wurde. Neben diesen „Urea-Ansätzen“ zur Komplexbildung wurden weitere Kopplungsmethoden ausgehend von SDS-solubiliertem LHCP unternommen. Diese Methode wurde von der AG Schünemann, Bochum (im Speziellen: ██████████) etabliert. Die Ergebnisse dieses Unterkapitels zum cpSRP43-LHCP-Komplex wurden in Arbeitsteilung mit der AG Schünemann erhalten. Bei den Studien zur Charakterisierung des cpSRP43-

LHCP-Komplexes wurde eine Doppelstrategie verfolgt: 1. Eine Komplexbildung mit Urea-solubilisiertem LHCP (Urea-Methode); 2. Komplexbildung mit SDS-vorsolubilisiertem LHCP (Detergenz-Standard-Methode). Alle vorgestellten Ergebnisse zu Komplexen nach Urea-Methode wurden durch den Autoren selbst generiert, viele der „SDS-Ansätze“ stammen von der AG Schünemann. Sofern es sich im Folgenden um entsprechend zur Verfügung gestellte Ergebnisse handelt, ist dies gekennzeichnet. Es wird deutlich, dass die Detergenz-Standard-Methode hinsichtlich der im Folgenden beschriebenen Bemühungen zur Verminderung der Komplexbildung bzw. -aggregation überlegen war. Jedoch hat diese Methode gleichzeitig den Nachteil, dass die Detergenzentfernung lediglich auf einem Fällungsschritt durch zugesetzte Kaliumionen in der Kälte beruht. Ein Verbleiben von Restmengen von SDS kann deshalb nicht ausgeschlossen werden (siehe Diskussion 5.2.3). Folglich kann ein Einfluss des Detergenz auf die Komplexstruktur nicht vollständig ausgeschlossen werden. Bei Ansätzen nach der Urea-Methode wurde hingegen der in 8 mol/l Harnstoff vorgelöste LHCP mindestens um den Faktor 8 im Kopplungsansatz verdünnt. Somit konnte ein chaotroper Effekt des Ureas ausgeschlossen werden.

### **4.2.1. Einfluss der Komplexbildungsmethode auf den Oligomerisierungsgrad des cpSRP43-LHCP-Komplexes**

Die zunächst vorgestellten Ergebnisse wurden in der AG Schünemann, Bochum erhalten. Bei der Verwendung von SDS als Solubilisierungsmittel für den LHCP ergibt sich das Problem, dass dieses einen stark denaturierenden Einfluss auf die Proteine ausübt und somit nach Möglichkeit vollständig aus dem Komplexbildungsansatz entfernt werden sollte. Zur Entfernung des Detergenz wurden 2 Methoden getestet: (A) eine als Detergenz-Standard-Methode bezeichnete Entfernung des Dodecylsulfats (DS) mittels Kaliumioneneintrag (K) und Fällung als KDS in der Kälte, (B) eine als Detergenz-Adsorptionsmethode bezeichnete zweistufige Entfernung des Dodecylsulfats mittels Polystyrolkugeln und anschließender Waschung auf einer Ni-Säule mit detergentfreiem Puffer.





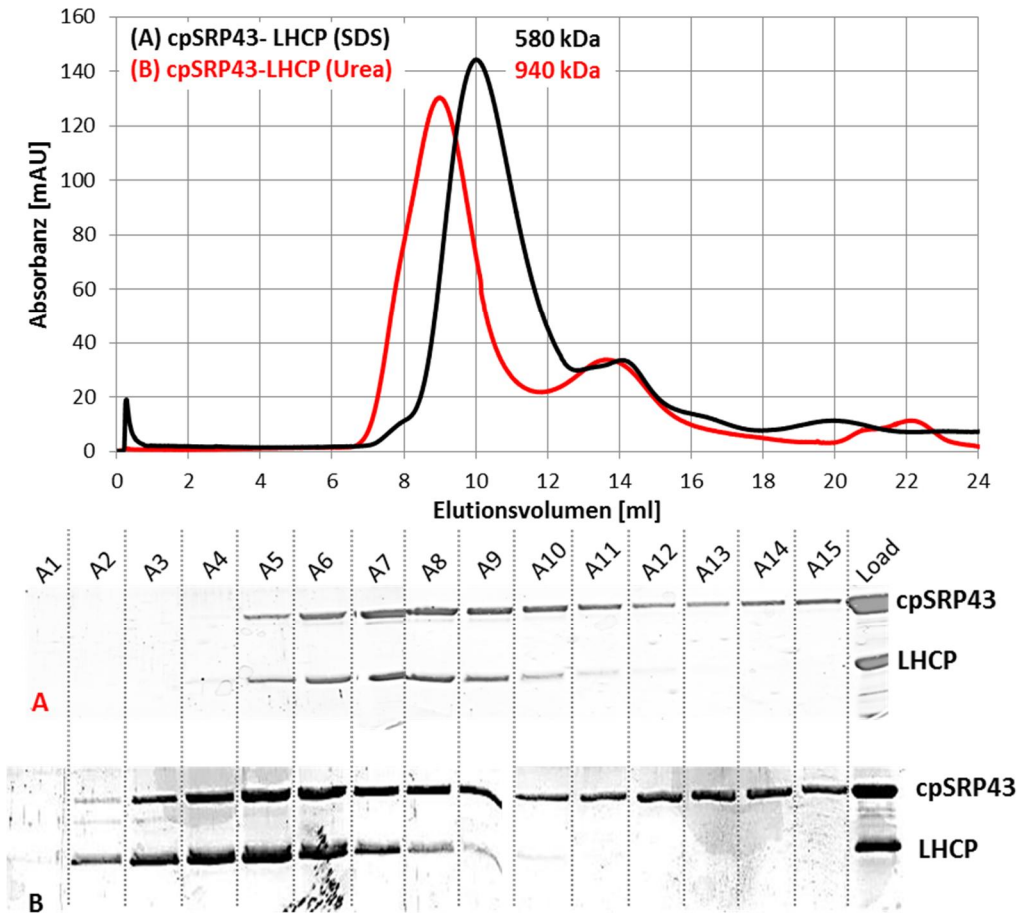
**Abbildung 4.16: Einfluss der Komplexbildungsmethode auf die Komplexgröße des cpSRP43-LHCP-Komplexes.**

Superose 6 Gelfiltrationschromatogramme. Es wurden je 500  $\mu$ l cpSRP43-LHCP Komplex auf die Säule aufgetragen. Im Adsorption/+Ni-NTA (B)-Ansatz wurden His-cpSRP43 und LHCP mit einer Komplexkonzentration von 27  $\mu$ mol/l gekoppelt (vgl. 3.2.7). Der Detergenz-Fällungs- (A)-Ansatz wurde entsprechend der Detergenz-Standard-Methode ohne Ni-NTA Anbindung hergestellt. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten. Daten verändert nach [REDACTED]

Abbildung 4.16 zeigt eine Gegenüberstellung der Gelfiltrationsläufe beider Komplexbildungsmethoden. Es zeigen sich im Falle des (B)-Ansatzes drei Peaks; im Falle des (A)-Ansatzes 2 Peaks. Das absolute Maximum der Chromatogramme konnte durch Auftrag des fraktionierten Gelfiltrationseluats auf eine SDS-PAGE als cpSRP43-LHCP-Komplex identifiziert werden (Ergebnisse im Anhang gezeigt). Die Intensitäten der Proteinsignale (d.h. cpSRP43-Signal zu LHCP-Signal) innerhalb einer Fraktion zeigen dabei über den jeweils kompletten Elutionsbereich des Komplexes ein relativ konstantes Verhältnis. Es ist also hier potentiell von der Ausbildung definierter cpSRP43-LHCP-Komplexe auszugehen. Es ergibt sich jedoch bezüglich des mittleren apparenten MWs ein großer Unterschied zwischen den gebildeten Komplexen. Beide liegen deutlich über dem berechneten MW, welches potentiell binärer Komplex haben sollte. Für einen binären cpSRP43-LHCP-Komplex wäre ein apparentes MW von  $\sim$ 105 kDa zu vermuten gewesen. Die Komplexe aus Methode (B) zeigen hingegen ein mittleres apparentes MW von 1150 kDa; solche nach Methode (A) eines von 540 kDa. Es ist somit von einer oligomerisierten Komplexspezies auszugehen. Hierbei fällt die Oligomerisierung im Ansatz (B) deutlich stärker als im Ansatz (A) aus. Die Peaks bei jeweils einem Elutionsvolumen von  $\sim$ 15,5 ml entsprechen frei eluierendem cpSRP43.

Oben vorgestellte Methode der Detergenzentfernung (A) wurde zum Vergleich der sich bildenden cpSRP43-LHCP Komplexspezies einer Komplexbindung mit Urea-vorsolubiliertem LHCP gegenüber gestellt (Ergebnisse vom Autor). In beiden Fällen wurden Komplexbindungsansätze mit einer Endkonzentration von 20  $\mu$ mol/l mittels eines Gelfiltrationslaufs charakterisiert. Die Löslichkeit des Membranproteins in Urea ist mit  $\sim$ 1,5 mg/ml (=60  $\mu$ mol/l) limitiert. Aus diesem Grund wurde, um

eine ausreichende Verdünnung des Harnstoffs im Kopplungsansatz zu gewährleisten, die eigentliche Komplexbildung bei 6,6  $\mu\text{mol/l}$  durchgeführt und anschließend 3-fach auf 20  $\mu\text{mol/l}$  aufkonzentriert.



**Abbildung 4.17: Einfluss der Komplexbildungsmethode auf die cpSRP43-LHCP-Komplexgröße.**

Oben: Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramm. Es wurden je 500  $\mu\text{l}$  20  $\mu\text{mol/l}$  cpSRP43-LHCP-Komplex auf die Säule aufgetragen. Im Urea-Ansatz lief die Komplexbildung zunächst bei einer Proteinkonzentration von  $\sim 6,6 \mu\text{mol/l}$  (Ureaendkonzentration: 0,8 mol/l) ab und wurde nachfolgend 3 x aufkonzentriert. Im SDS-Ansatz lief die Komplexbildung direkt bei einer Proteinkonzentration von 20  $\mu\text{mol/l}$  ab (Detergenz-Standard-Methode). Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten. Unten: SDS-PAGE. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 7 – 13,5 ml (A1 – A15) wurden untersucht. **A** zeigt den SDS-Ansatz. Es wurden jeweils 30  $\mu\text{l}$  Fraktion sowie 10  $\mu\text{l}$  Load mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt. **B** zeigt den Urea-Ansatz. Es wurden jeweils 35  $\mu\text{l}$  Fraktion sowie 10  $\mu\text{l}$  Load mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt.

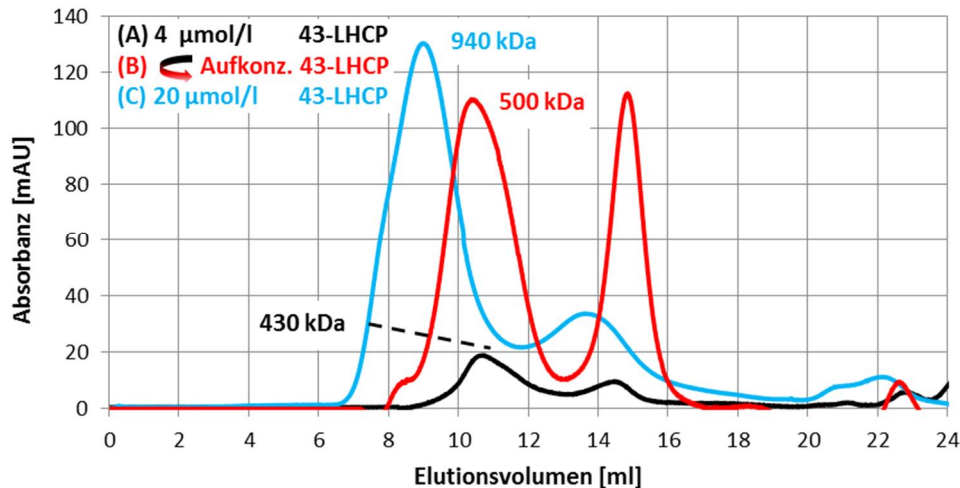
Abbildung 4.17 ist zu erkennen, dass es sich bei den Maxima der Elutionschromatogramme jeweils um cpSRP43-LHCP-Komplexe handelt (vgl. SDS-PAGE). Das mittlere apparente MW des cpSRP43-LHCP-Komplexes des Detergenz-Ansatzes liegt bei 580 kDa (Elutionsvolumen: 10 ml; Fraktion A8/A9); das des Urea-Ansatzes bei 940 kDa (Elutionsvolumen: 9 ml / Fraktion A5/A6). Es können auch bei Verwendung von Urea-solubilisiertem LHCP keine potentiell binären Komplexe gebildet werden. Vielmehr zeigt die so entstehende Komplexspezies einen höheren Oligomerisierungsgrad als solche nach Detergenz-Standard-Methode. Die LHCP-Banden des Urea-Ansatzes zeigen darüberhinaus bis Fraktion A6 eine visuelle Überrepräsentation im Vergleich zum cpSRP43 Proteinsignal, was für nicht-intakte Komplexe spricht (vgl. Diskussion 5.2.1). Untersuchungen

bezüglich der Stöchiometrie des cpSRP43-LHCP-Komplexes sind in 4.2.5 aufgeführt. Das bei ca. 14 ml Elutionsvolumen lokal auftretende Maximum entspricht jeweils frei eluierendem cpSRP43.

Die Gegenüberstellungen zeigen, dass die Komplexkopplungsmethode einen signifikanten Einfluss auf die sich bildende Komplexspezies hat. Alle hier getesteten standardmäßigen Kopplungsmethoden erzeugen eine oligomerisierte cpSRP43-LHCP-Komplexspezies, wenn auch mit unterschiedlichem Oligomerisierungsgrad.

#### **4.2.2. Einfluss der Kopplungskonzentration auf den Oligomerisierungsgrad des cpSRP43-LHCP-Komplexes**

Der Einfluss der Kopplungskonzentration auf den Oligomerisierungszustand wurde im Zusammenhang mit Komplexen, die mit Urea-vorsolubilisiertem LHCP erzeugt wurden, getestet. Abbildung 4.18 zeigt die Gelfiltrationsläufe zweier verschiedener Urea-Ansätze. Ansatz (C) wurde bei 6,6  $\mu\text{mol/l}$  Komplexkomponenten gekoppelt und um den Faktor 3 aufkonzentriert. Ansatz (A) wurde bei einer Proteinkonzentration von 4  $\mu\text{mol/l}$  gekoppelt. (B) ist die 6 fache Aufkonzentrierung des Ansatzes (A). Die Fraktionierung aller Läufe bestätigte jeweils die Elution von cpSRP43-LHCP-Komplex im ersten Peak der Chromatogramme ((A): 10,75 ml; (B): 10,45 ml; (C): 9,1 ml). Der zweite Peak zeigt die Elution von freiem cpSRP43. Das mittlere apparente MW der bei 4  $\mu\text{mol/l}$  gebildeten Komplexe liegt bei 430 kDa. Die Aufkonzentrierung (6x) führte zu einer geringen Verschiebung in den hochmolekularen Bereich (500 kDa). Im Gegensatz dazu zeigt der Ansatz der 6,6  $\mu\text{mol/l}$  Kopplung, welcher nachträglich um den Faktor 3 aufkonzentriert wurde ein deutlich höheres apparentes MW (930 kDa). Zu diesem Ansatz wurde keine Probe der nicht-aufkonzentrierten Kopplung untersucht. Die Gelfiltrationsläufe wurden innerhalb der Arbeit zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Die Molekulargewichtsberechnung erfolgte jedoch mit der jeweilig aktuellsten Größeneichung der Gelfiltrationssäule. Aus diesem Grunde sind die apparenten Molekulargewichte direkt miteinander vergleichbar. Es kann daraus geschlossen werden, dass die Aufkonzentrierung nur einen moderaten Einfluss auf die Komplex-Oligomerisierung ausübt. Insbesondere die initiale Konzentration der Proteinkomponenten im Komplexbildungsansatz scheint den Oligomerisierungsgrad stark zu beeinflussen.



**Abbildung 4.18: Einfluss der Konzentration im Kopplungsansatz auf die cpSRP43-LHCP-Komplexgröße.** Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramm. Es wurden je 500  $\mu$ l 4  $\mu$ mol/l bzw. 20  $\mu$ mol/l cpSRP43-LHCP Komplex auf die Säule aufgetragen. Die Komplexbildung erfolgte in beiden Ansätzen ausgehend von Urea-vorsolubisiertem LHCP. Im 20  $\mu$ mol/l Ansatz lief die Komplexbildung zunächst bei einer Proteinkonzentration von  $\sim$ 6,6  $\mu$ mol/l ab und wurde nachfolgend 3 x aufkonzentriert. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten.

#### 4.2.3. Einfluss von Detergentien auf den Oligomerisierungsgrad des cpSRP43-LHCP-Komplexes

Wie unter 4.2 bereits vorgestellt ist für den LHCP keine Interaktion der TM1 und TM2 bei Anbindung an sein Chaperonmolekül cpSRP43 bekannt. Lediglich für die TM3 existiert nach Cain et al., 2011 ein Modell, in welchem diese hydrophobe Sequenz mehr oder weniger durch das Chaperon vor der wässrigen Umgebung abgeschirmt wird. Da im Zusammenhang mit frisch aufgearbeitetem cpSRP43 nie ein Oligomerisierungsverhalten beobachtet werden konnte und aufgrund des überstöchiometrischen Vorhandenseins von LHCP in cpSRP43-LHCP-Komplexen (unspezifische LHCP-Aggregation; siehe Ergebnisse Densitometrie -4.2.5- und Diskussion 5.2.1), kann davon ausgegangen werden, dass hydrophobe Interaktionen zwischen im Komplex nicht abgeschirmten hydrophoben Sequenzen des LHCP für die Oligomerisierung bzw. unspezifische LHCP-Aggregation verantwortlich waren. Entsprechend wurde ein „Screening“ einer Vielzahl (nicht-)ionischer, zwitterionischer sowie steroidal Detergentien durchgeführt um ihren potentiellen Oligomerisierungs-/Aggregations-mindernden Einfluss zu testen. Dazu zählten: Laurylmaltosid (LM), Octylglucosid (OG), Triton-X-100 (TX-100), Deriphat 160C, SDS, Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid (LDAO), Desoxycholat sowie 3-[3-(Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propan sulfonat (CHAPS). Der Einfluss dieser Detergentien wurde unter, bei und oberhalb ihrer kritischen Mizellären Konzentration (CMC) getestet. Vorab kann schon gesagt werden, dass keines der Detergentien in der Lage war, die cpSRP43-LHCP-Komplexspezies zu vereinzeln und somit potentiell binären Komplex zu erzeugen. In Tabelle 4.1 wird vorab der

grundlegende Einfluss der Detergentien zusammenfassend dargestellt. Eine detailliertere Beschreibung ist nachfolgend den Unterkapiteln zu entnehmen.

**Tabelle 4.1: Einfluss getesteter Detergentien auf den cpSRP43-LHCP-Komplex.**

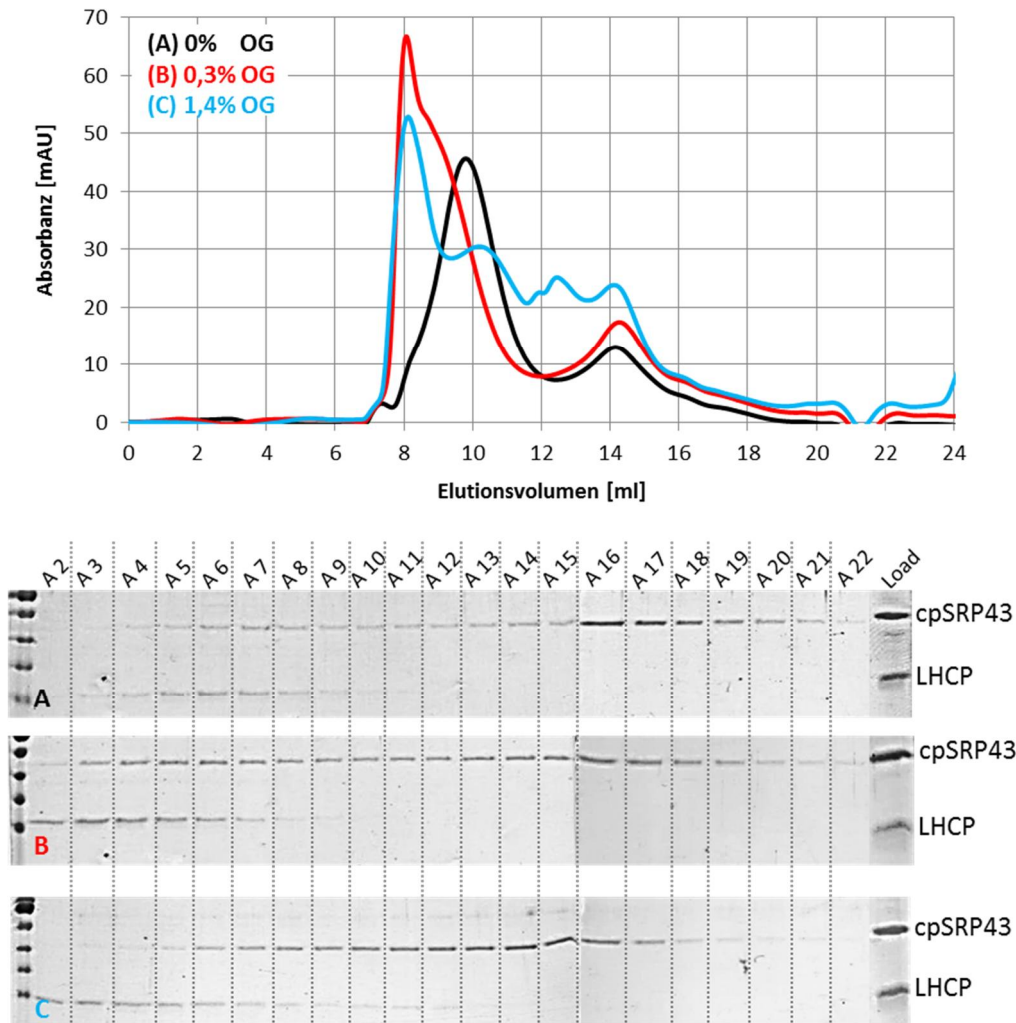
Zusammenfassung der Effekte verschiedener Detergentien bei Anwesenheit in Kopplungsansätzen von cpSRP43 und LHCP. Die Komplexbindung erfolgte nach Detergenz-Standard-Methode bzw. nach Urea-Methode.

Detergenz	LM	OG	TX-100	Deriphat	LDAO	SDS	CTAB	CHAPS	Desoxycholat
Oligomerisierungs-mindernd				(X)					
Komplexstabilitäts-/Oligomerisierungs-fördernd	X								X
Komplexintegritäts-störend		X		X		X			
Keinen Effekt			X		X		X	X	

Bei der Untersuchung des Einflusses von Detergentien auf den Oligomerisierungsgrad des cpSRP43-LHCP-Komplexes wurden einzelne Tenside nur für eine der beiden Methoden (Urea- bzw. Detergenz-Standard-Methode) getestet. Es kann aber hier angenommen, dass sich der potentielle Einfluss eines Detergenzes auf die Komplexstruktur unabhängig von dessen „Bildungsvorgeschichte“ in gleichem Maße auswirkt. Die Ergebnisse in diesem Unterkapitel wurden auch in Zusammenarbeit mit der AG Schünemann, Bochum erhalten. Entsprechend in Bochum erhaltene Ergebnisse werden folgend gekennzeichnet.

#### 4.2.3.1. Einfluss von nicht-ionischen Detergentien auf die Integrität/ den Oligomerisierungsgrad des cpSRP43-LHCP-Komplexes

Detergentien sind aufgrund ihrer amphiphilen Struktur in der Lage insbesondere hydrophobe Wechselwirkungen zu beeinflussen bzw. zu stören. Sie können sowohl über ihren hydrophoben Kohlenwasserstoffbereich als auch über ihren hydrophilen Kopfgruppenbereich nicht-kovalent mit Proteinen interagieren. Dabei können sie aber auch eine denaturierende Wirkung entwickeln und die Integrität eines Proteins bzw. Proteinkomplexes zerstören. Die nicht-ionischen Detergentien LM, OG und TX-100 zeigten dabei unterschiedliche Auswirkungen auf den cpSRP43-LHCP-Komplex. Der Einfluss der Detergentien LM und OG wurde in der [REDACTED] getestet. Die Komplexbindung erfolgte nach Detergenz-Standard-Methode.



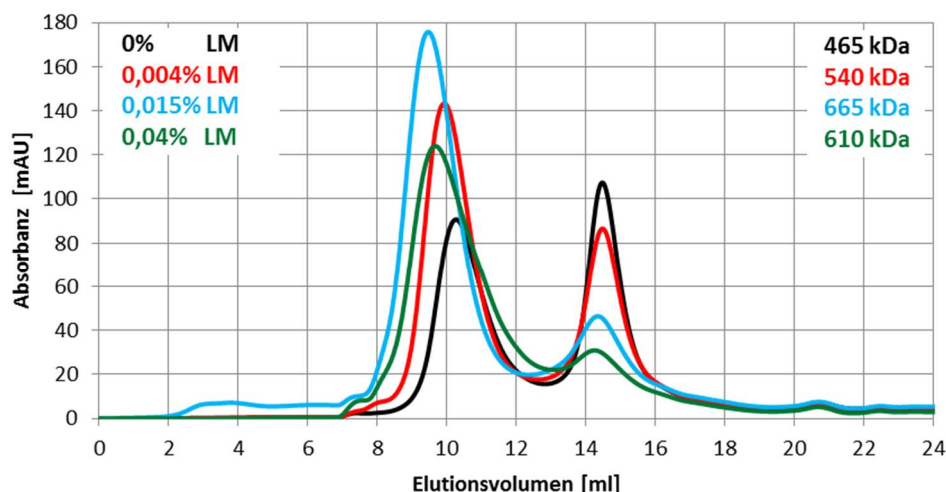
**Abbildung 4.19: Einfluss des Detergenz Octylglucosids auf den cpSRP43-LHCP-Komplex.**

Oben: Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramme. Es wurden je 500  $\mu$ l cpSRP43-LHCP Komplex auf die Säule aufgetragen. Die Komplexe wurden nach Detergenz-Standard-Methode bei einer Konzentration von 9  $\mu$ mol/l hergestellt. Den verschiedenen Ansätzen wurde zusätzlich im Komplexbildungsansatz kein, 0,3% (=1/2 x CMC) bzw. 1,4% (= 2 x CMC) Octylglucosid zugesetzt. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten. Unten: SDS-PAGE. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 7,5 – 18 ml (A2 – A22) wurden untersucht. **A** zeigt den cpSRP43-LHCP Kopplungsansatz nach Detergenz-Standard-Methode. **B** zeigt den cpSRP43-LHCP Kopplungsansatz mit 0,3% OG Zusatz. **C** zeigt den cpSRP43-LHCP Kopplungsansatz mit 1,4% OG Zusatz. Es wurden von jeder Fraktion 10  $\mu$ l sowie 5  $\mu$ l Load auf ein 12% PAA-Gel aufgetragen. Daten verändert nach [REDACTED]

Abbildung 4.19 zeigt die Fraktionierung der Gelfiltrationsläufe in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von OG. Die CMC dieses Detergenz liegt bei 0,7%. Die zugesetzten Mengen von OG waren  $\frac{1}{2}$  x CMC (=0,3%), 1 x CMC (=0,7%) (nicht gezeigt) sowie 2 x CMC (=1,4%). Als Referenz diente detergentfreier Kopplungsansatz mit einem Elutionspeak des Komplexes bei einem mittleren apparenten MW von 570 kDa (= 9,8 ml Elutionsvolumen). Die gelelektrophoretische Auftrennung des Gelfiltrations-Eluats zeigt schon in detergentfreier Umgebung (Gel A) ein leicht unbeständiges Intensitätsverhältnis der Proteinbanden zueinander im Elutionsbereich A3–A9. Besonders die früh eluierenden Fraktionen (A3–A5) zeigen ein überrepräsentiertes LHCP-Signal. Das bedeutet, dass diese cpSRP43-LHCP-Komplexe partiell nicht-intakte Komplexe (Komplexe mit

unspezifisch aggregiertem LHCP) zeigen. Im Falle des Ansatzes mit 0,3% OG-Zusatz zeigt sich jedoch im Chromatogramm ein noch stärker verändertes Elutionsverhalten mit einer Erhöhung des Elutionspeaks auf 1000 kDa (= 8,1 ml Elutionsvolumen). Gel B zeigt ein noch inkonstanteres Elutionsverhalten der Komplexproteine bzw. Intensitätsverhältnis der Proteinbanden. Die Tatsache, dass die Intensitätsverhältnisse der Proteinsignale von Fraktion zu Fraktion variieren, schließt einen definierten Komplex aus. Der 1,4% OG-Ansatz schließlich zeigt ein nahezu unabhängiges Elutionsverhalten der Komplexproteine. Es wird ersichtlich, dass OG schon bei geringen Konzentrationen einen denaturierenden Effekt auf den cpSRP43-LHCP-Komplex besitzt. OG scheint die nicht-kovalente Wechselwirkung innerhalb des cpSRP43-LHCP-Komplexes zu stören, was zu einem Zerfall dieses führt.

In gleicher Weise wurde LM (CMC = 0,008%) als nicht-ionisches Detergenz auf seinen Einfluss auf den cpSRP43-LHCP-Komplex getestet. Die Kopplungen fanden bei LM-Konzentrationen bis zu der 5 x CMC (=0,04%) des Detergenzes statt.



**Abbildung 4.20:** – Einfluss des Detergenz Laurylmaltosid auf den cpSRP43-LHCP-Komplex.

Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramm. Es wurden je 500 µl cpSRP43-LHCP Komplex auf die Säule aufgetragen. Die Komplexe wurden nach Detergenz-Standard-Methode bei einer Konzentration von 19 µmol/l hergestellt. Den verschiedenen Ansätzen wurde zusätzlich im Komplexbildungsansatz kein, 0,004% (=1/2 x CMC), 0,015% (=2 x CMC) bzw. 0,04% (= 5 x CMC) Laurylmaltosid zugesetzt. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten. Daten verändert nach [redacted] Bochum.

Abbildung 4.20 zeigt, dass auch die Komplexansätze mit höheren Konzentrationen von LM relativ gleichbleibende Elutionschromatogramme zeigen. Die Fraktionierung des Gelfiltrationseluats zeigte über den gesamten Elutionsbereich der Komplexe ein relativ konstantes Intensitätsverhältnis der Proteinbanden zueinander. Dies gilt auch für solche, die bei der 5 x CMC-Konzentration von LM gekoppelt wurden (Daten nicht gezeigt). Die jeweils bei einem Elutionsvolumen von ca. 14,5 ml eluierende Spezies entspricht freiem cpSRP43. Die ersten Peaks zeigen die jeweiligen Elutionspeaks der Komplexe. Bei Betrachtung der mittleren MWs wird deutlich, dass mit zunehmender Konzentration von LM das apparente MW der Komplexe um bis zu 200 kDa steigt (vgl.

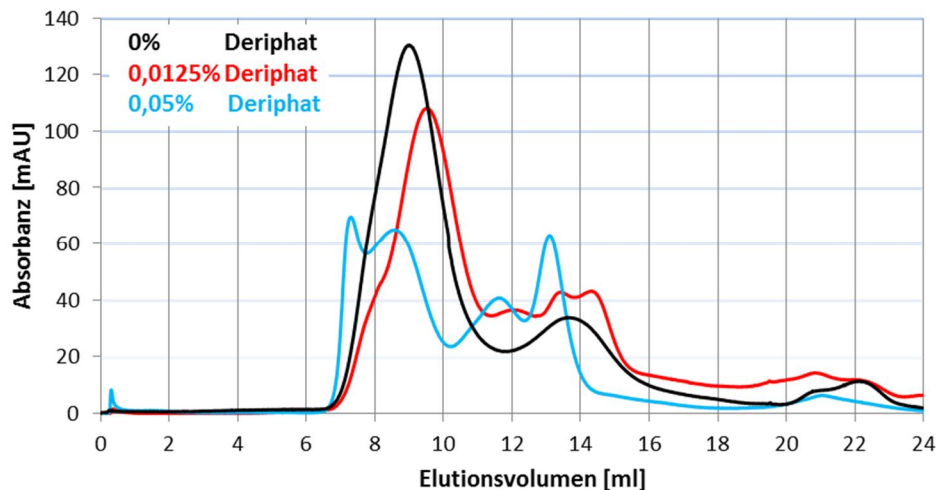
detergenzfreier Ansatz zu 0,015% LM-Ansatz). Gleichzeitig bleibt jedoch das apparente MW des frei eluierenden cpSRP43 konstant. Die sich daraus ergebenden Schlussfolgerungen sollen später diskutiert werden (vgl. Diskussion 5.2.5). Ebenso ist aus Abbildung 4.20 noch erkennbar, dass der Anteil des sich bildenden Komplexes vom detergenzfreien Ansatz (hellblau Kurve) bis zum 0,015% LM-Ansatz (violette Kurve) steigt (Absorbanzanstieg von 90 mAU auf 175 mAU). LM besitzt nach gezeigten Ergebnissen also einen Komplex-stabilisierenden Effekt, der gar mit einer Komplexvergrößerung einhergeht.

Wie schon im Eingang dieses Kapitels erwähnt, wurde der Einfluss eines Detergenzes jeweils nur für eine der beiden Komplexbildungsmethoden getestet. Anders als die in Bochum gemachten Kopplungen wurden die eigens durchgeführten Komplexbildungsansätze zum Testen des Detergenzeinflusses mit Urea-vorsolubilisiertem LHCP durchgeführt. Es wurde in diesem Zusammenhang das nicht-ionische Detergenz TX-100 getestet. Es zeigte sich hier im Vergleich zu detergenzfreien Ansätzen mit steigender Detergenzkonzentration keine Auswirkung auf den Komplex, d.h. das mittlere apparente MW der Komplexe sowie deren Einzelproteinzusammensetzung (SDS-PAGE) blieb konstant (Daten im Anhang gezeigt). Zusammenfassend ist zu sagen, dass das Spektrum der getesteten nicht-ionischen Detergentien von einem auf die Komplexintegrität störenden bis hin zu einem potentiell Komplex-stabilisierenden Einfluss reichte. Keines der Detergentien war jedoch in der Lage eine Minderung der Komplexoligomerisierung spezifisch herbeizuführen.

### 4.2.3.2. Einfluss von ionischen Detergenzien auf die Integrität / den Oligomerisierungsgrad des cpSRP43-LHCP-Komplexes

Als ionische Detergentien wurden die anionischen Tenside Natrium-N-lauryl- $\beta$ -iminodipropionate (Deriphat) und SDS, das kationische Detergenz CTAB sowie das zwitterionische Detergenz LDAO getestet. Alle Komplexbildungsansätze wurden nach Urea-Methode hergestellt. LDAO (CMC = 2 mmol/l) sowie CTAB (CMC = 1 mmol/l) zeigten auch bei 2 x CMC-Konzentration keinen Einfluss auf den Oligomerisierungsgrad sowie die Integrität der Komplexe. Die Integrität des Komplexes blieb erhalten. Im Falle des SDS deuteten schon solche Komplexe, welche bei der  $\frac{1}{2}$  CMC-Konzentration gekoppelt wurden, auf den Verlust ihrer Integrität hin.





**Abbildung 4.21: Einfluss des Detergenz Deriphats auf den cpSRP43-LHCP-Komplex.**

Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramm. Es wurden je 500  $\mu\text{l}$  20  $\mu\text{mol/l}$  cpSRP43-LHCP Komplex auf die Säule aufgetragen. Die Komplexe wurden mit Urea-vorsolubilisiertem LHCP zunächst bei einer Proteinkonzentration von  $\sim 6,6$   $\mu\text{mol/l}$  (Ureaendkonzentration: 0,8 mol/l) hergestellt und nachfolgend 3 x aufkonzentriert (=20  $\mu\text{mol/l}$ ). Den verschiedenen Ansätzen wurde im Komplexbildungsansatz kein, 0,0125% (=1/2 x CMC) bzw. 0,05% (= 2 x CMC) Deriphat zugesetzt. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten

Abbildung 4.21 zeigt die Gelfiltrationsläufe der Komplexbindungen bei verschiedenen Konzentrationen von Deriphat. Wie schon aus den Gelfiltrationschromatogrammen erkennbar, bestätigten die SDS-Gele des fraktioniert aufgefangenen Eluats den Verlust der Komplexintegrität (Daten hier nicht gezeigt). Die Komplexe bei Zusatz der halben CMC-Konzentration von Deriphat (=0,0125%) ließen noch mehr oder weniger definierte Komplexe vermuten, deren mittleres apparentes MW mit 730 kDa um 200 kDa unter den „detergenzfreien Komplexen“ lag. Die Komplexe aus der Kopplung mit 2 x CMC (=0,05%) hingegen deuten auf Grund unbeständiger Intensitätsverhältnisse der Proteinbanden innerhalb der Fraktionen auf einen Verlust ihrer Integrität hin.

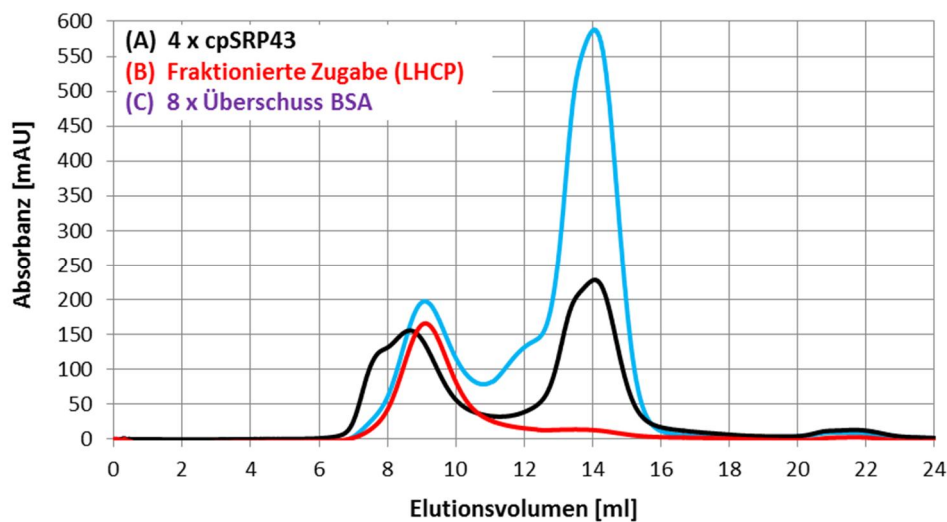
Darüber hinaus wurden ebenfalls die steroidalen und ionischen Detergenzien CHAPS (Autor selbst) sowie Desoxycholat XXXXXXXXXX getestet. Die entsprechende Auswirkung auf die Komplexe ist Tabelle 4.1 zu entnehmen.

#### 4.2.4. Alternative Kopplungszusätze/Kopplungsvariationen zur Verminderung des Oligomerisierungsgrades

Die unspezifische Wechselwirkung zwischen den cpSRP43-LHCP-Komplexen, welche mutmaßlich zu der beobachteten Oligomerisierung führte, sollte wie schon oben beschrieben, potentiell eher hydrophober Natur sein. Neben Detergentien existieren noch weitere Substanzen, welche Interaktionen hydrophober Bereiche mindern können. So wird z.B. Arginin in der Literatur als potentes niedermolekulares „Chaperon“ beschreiben (Lyutova et al., 2007). Arakawa et al. 2003 erklären den Proteinaggregations-hemmenden Effekt von Arginin mit einer direkten Interaktion der

## Ergebnisse

Aminosäure mit dem Protein. Im Zusammenhang mit einem stabilisierenden bzw. Oligomerisierungsverhindernden Effekt von Arginin wurden Komplexbindungen in der [REDACTED] unternommen. Es zeigt sich jedoch, dass schon bei geringer Zugabe (50 mmol/l) der Aminosäure sich Komplexe mit höherem apparenten MW bildeten. Arginin-Zugabe hat nach diesen Daten ähnlich wie z.B. LM sogar einen Komplex-stabilisierenden bzw. einen Oligomerisierungs-fördernden Einfluss. Darüber hinaus konnte Werwie (Dissertation 2013) beobachten, dass BSA-Protein einen stabilisierenden Einfluss auf LHCII-Trimere ausübt. Es zeigte sich, dass der Verbleib von LHCII-Trimeren in detergentenfreier Umgebung umso größer war, je mehr BSA-Protein zugegeben wurde. Somit könnte BSA auch im Zusammenhang mit cpSRP43-LHCP-Komplex möglicherweise einen Oligomerisierungs-vermindernden Einfluss ausüben.



**Abbildung 4.22: Einfluss verschiedener Komplexbildungsvariationen auf den cpSRP43-LHCP-Komplex.**

Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramme. Es wurden je 500  $\mu$ l 20  $\mu$ mol/l cpSRP43-LHCP Komplex auf die Säule aufgetragen. Die Komplexe wurden alle mit Urea-vorsolubilisiertem LHCP angesetzt. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten. In **A** wurden cpSRP43 (~26  $\mu$ mol/l) mit LHCP (6,6  $\mu$ mol/l) im stöchiometrischen Verhältnis 4:1 für die Komplexbildung zusammengegeben. In **B** wurde zunächst cpSRP43 mit 10  $\mu$ mol/l vorgelegt. LHCP wurde insgesamt in 10 Schritten bis zu einer äquimolaren Konzentration zugegeben. In **C** wurden die Komplexe mit einer Endkonzentration von 6,6  $\mu$ mol/l unter einer gleichzeitigen Anwesenheit von ~50  $\mu$ mol/l BSA hergestellt.

Abbildung 4.22 zeigt die Gelfiltrationsläufe verschiedener Komplexbindungen. Es wurden Kopplungen mit Zusatz eines 8 fachen Überschusses von BSA unternommen. Darüber hinaus wurden Kopplungsvariationen mit einem 4 fachen Überschuss von cpSRP43 bzw. eine Kopplung mit einer schrittweisen Zugabe von Urea-gelöstem LHCP durchgeführt. In Tabelle 4.2 sind die mittleren apparenten MW der Komplexe bzw. des frei eluierenden cpSRP43 zu sehen. BSA als Kopplungszusatz bzw. die verschiedenen Kopplungsvariationen hatten keinen Effekt auf den Oligomerisierungszustand der sich bildenden cpSRP43-LHCP-Komplexe.

**Tabelle 4.2: Einfluss verschiedener Komplexbildungsvariationen auf den cpSRP43-LHCP-Komplex.**

Apparente Molekulargewichte entsprechend des Elutionsvolumens im jeweilig maximalen Peak. Die Identifizierung der Peaks als 1) cpSRP43-LHCP und 2) cpSRP43 wurde anhand eines Gelauftrags des fraktionierten Eluats vorgenommen.

Peak #	4 x cpSRP43	Fraktionierte Zugabe (LHCP)	8 x Überschuss BSA
1) cpSRP43-LHCP	<1000 kDa	920 kDa	900 kDa
2) cpSRP43	82 kDa	89 kDa	-----

Jedoch zeigte insbesondere die elektrophoretische Auftrennung der Gelfiltrationsfraktionen aus der Kopplung mit schrittweiser Zugabe von LHCP ein verändertes Bild (Daten im Anhang gezeigt). Das Intensitätsverhältnis der cpSRP43-Bande und LHCP-Bande innerhalb jeder Fraktion des Elutionsbereichs deutete nach visueller Abschätzung eher auf eine 1:1-Stöchiometrie des gebildeten Komplexes hin als dies bei der Vielzahl anderer nach Urea-Methode hergestellter Komplexe der Fall war. Das bedeutet, dass hier eine definierte Kopplung im Sinne von stöchiometrischen Komplexen (1:1) zu vermuten ist. Im Hinblick auf das apparente MW der Komplexe, zeigten diese jedoch auch unspezifische Oligomerisierung (definierter Einzelkomplexe) – (vgl. dazu Diskussion 5.2.1).

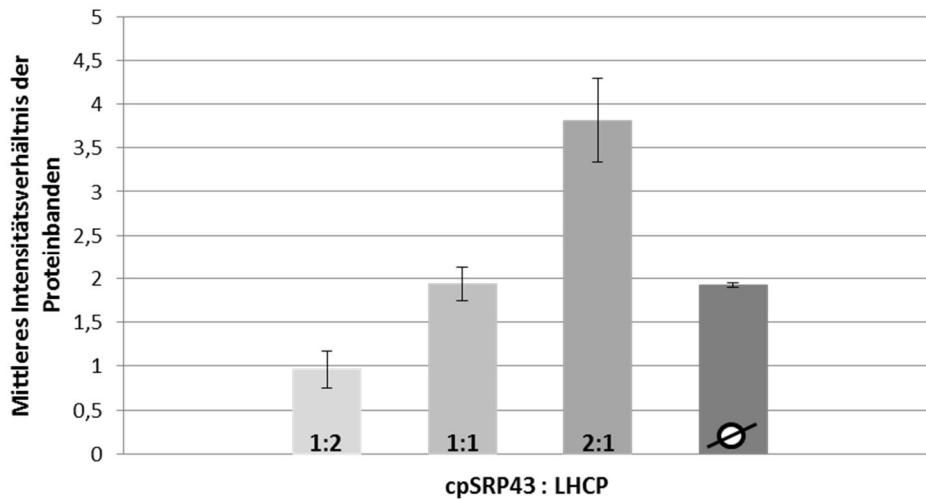
#### 4.2.5. Densitometrischer Ansatz zur Bestimmung der Stöchiometrie im cpSRP43-LHCP-Komplex

Alle gelfiltrationschromatographisch untersuchten Komplexbindungen wurden standardmäßig fraktioniert aufgefangen und per denaturierendem Gel auf ihren Proteingehalt untersucht. Die in 4.2 erwähnte Literatur bezüglich der Bindungsverhältnisse im cpSRP43-LHCP-Komplex beschreibt einen spezifisch definierten Komplex mit einer 1:1-Stöchiometrie. Wie jedoch insbesondere schon in 4.2.1 erwähnt, zeigten besonders nach Urea-Methode hergestellte Komplexe eine potentielle Überrepräsentation der LHCP- im Vergleich zur cpSRP43-Bande. Im Rahmen der Diplomarbeit von Antonia Schad (Diplomarbeit, Februar 2014) wurde mittels eines densitometrischen Ansatzes die Komplexzusammensetzung näher beleuchtet.

##### 4.2.5.1. Bestimmung der densitometrischen Intensitätsverhältnisse bei bekannter cpSRP43 bzw. LHCP-Menge

Eine densitometrische Bestimmung der Intensitätsverhältnisse eines unbekanntes Verhältnisses kann nur dann gemacht werden, wenn eine entsprechende Referenz existiert. Um eine solche Referenz zu erhalten, wurden eingewogene Mengen von cpSRP43 und LHCP Protein in den stöchiometrischen Verhältnissen 1:2, 1:1 sowie 2:1 nach standardmäßiger Auftrennung in 15% PAA-Gelen densitometrisch ausgewertet (vgl. 3.3.4). Um ein statistisch abgesichertes Ergebnis für die densitometrischen Intensitätsverhältnisse bei bekannter Stöchiometrie der Proteine zu erhalten, wurde jedes der oben genannten Proteinverhältnisse insgesamt 6 mal auf ein Gel appliziert und die

Coomassie-gefärbten Banden nach erfolgter Hintergrundfärbung per Software densitometrisch ausgewertet. In Abbildung 4.23 ist das Ergebnis der Auswertungsreihe zu sehen. Zur Berechnung des Mittelwertes (ganz rechter Balken) wurden alle Intensitätsverhältnisse auf eine 1:1-Stöchiometrie normiert. Bei äquimolarem Auftrag von cpSRP43 und LHCP ist die Farbdichte nach Coomassie G250 Anfärbung um den Faktor 1,93 intensiver als die des LHCP.



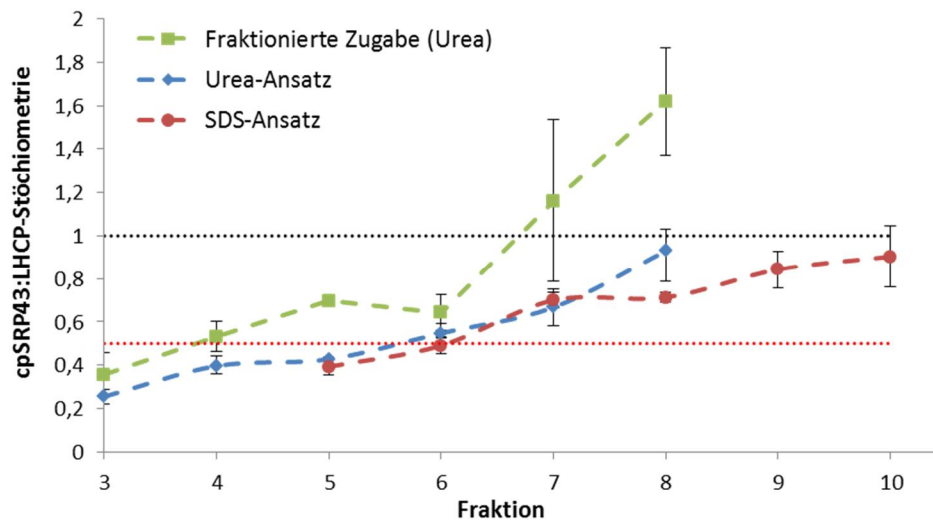
**Abbildung 4.23: Intensitätsverhältnis der Farbdichten von cpSRP43 und LHCP (Coomassie gefärbt).**

Es wurden je 6 Proben eingewogener Molmengen verschiedener Stöchiometrie cpSRP43 : LHCP (= 1:2, 1:1, 2:1) mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix vermengt und auf 15% PAA-Gele aufgetragen. Nach Coomassie G250 Färbung und einer vollständigen Hintergrundfärbung wurde eine densitometrische Auswertung mit der Quantity One Software (BioRad) durchgeführt. Verändert nach AS.

#### 4.2.5.2. Stöchiometriebestimmung im cpSRP43-LHCP-Komplex

Es erfolgte eine densitometrische Auswertung ausgewählter Komplekkopplungen. Es soll erwähnt werden, dass diese Methode zur Stöchiometriebestimmung fehleranfällig ist und daher die Ergebnisse unter Vorbehalt zu sehen sind. Zwar konnten im Rahmen der Farbdichten-Intensitätsbestimmung (vgl. 4.2.5.1) eingewogener Molmengen von cpSRP43 und LHCP nur relativ kleine Abweichungen vom Mittelwert (vgl. Fehlerbalken in Abbildung 4.23) festgestellt werden, doch ergaben sich für die densitometrische Intensitätsbestimmung in den Fraktionen eines Gelfiltrationslaufs schwierigere Bedingungen. Insbesondere ein mitunter diffuses Laufverhalten der Proteinbanden, macht es im Programm Quantity One (Biorad) schwer, definierte Bandengrenzen festzulegen. Außerdem ist davon auszugehen, dass es bei der Geltaschenbeladung (die Geltaschen wurden auf Grund relativ großer Volumina immer nachgeladen) mitunter zu Unterschieden im exakt applizierten Volumen gekommen ist. Nichtsdestotrotz sind die vorgestellten Ergebnisse insofern signifikant, als dass sie das molare cpSRP43-LHCP Verhältnis in erster Linie innerhalb einer Fraktion vorstellen sollen. Es wurden die nach verschiedenen Methoden hergestellten Komplexe aus Abbildung 4.17 sowie die Komplexe aus der fraktionierten Zugabe von Urea-gelösten LHCP (siehe 4.2.4) untersucht. Es erfolgte eine mehrmalige voneinander unabhängige densitometrische Auswertung (mindestens 3 mal pro

Proteinbande). Anschließend wurde das Intensitätsverhältnis auf die sich ergebende apparente Stöchiometrie umgerechnet.



**Abbildung 4.24: Stöchiometrien des cpSRP43-LHCP-Komplexes.**

Die in 15% PAA-Gelen aufgetrennten Gelfiltrationsfraktionen verschiedener cpSRP43-LHCP-Kopplungen wurden densitometrisch ausgewertet. Nach Coomassie G250-Anfärbung und vollständiger Hintergrundentfärbung wurde jede Proteinbande unabhängig voneinander mindestens 3 mal mit der Software Quantity One (BioRad) auf ihre Farbdichte untersucht. Es wurde jeweils mit der „Local Background Substraction“ als Korrektur gearbeitet (vgl. 3.3.4). Die Stöchiometrien wurden unter Bezug auf 4.2.5.1 ermittelt. Urea-Ansatz = 20  $\mu\text{mol/l}$  cpSRP43-LHCP; SDS-Ansatz = 20  $\mu\text{mol/l}$  cpSRP43-LHCP (beide in Abbildung 4.17; Fraktionierte Zugabe (Urea) = 20  $\mu\text{mol/l}$  cpSRP43-LHCP aus 4.2.4 (SDS-PAGE im Anhang).

Abbildung 4.24 zeigt den „Verlauf“ der apparenten Stöchiometrien in jeder Gelfiltrationsfraktion der Komplexe. Es zeigt sich, dass die Komplexe einen deutlich molaren Überschuss von LHCP beinhalten. Urea-Ansatz sowie SDS-Ansatz zeigen tendenziell einen ähnlichen Verlauf. Jedoch weisen die „SDS-Komplexe“ einen niedrigeren relativen Gehalt von LHCP auf. Die am höchst molekularen „SDS-Komplexe“ haben einen ca. 2,5 fachen LHCP-Überschuss. Im Gegensatz dazu weisen die am höchst molekularen „Urea-Komplexe“ einen fast 4 fachen LHCP-Überschuss auf. Im Elutionspeak des Urea-Ansatzes (Fraktion 5 mit apparentem MW = 940 kDa) zeigt sich ein cpSRP43:LHCP-Verhältnis von 0,4; im SDS-Ansatz (Fraktion 7 mit apparentem MW = 580 kDa) ein Verhältnis von 0,7. Es wird also hier der visuelle Eindruck einer stärkeren LHCP-Überrepräsentation im Falle der nach Urea-Methode hergestellten Komplexe deutlich bestätigt. Die jeweils niedrigst molekularen Komplexe beider Ansätze zeigen ein nahezu 1:1-Verhältnis. Die unterschiedlichen Stöchiometrien sprechen eindeutig für eine polydisperse Mischung verschiedener Komplexspezies. Der Elutionspeak der Komplexe bei fraktionierter LHCP-Zugabe liegt apparent bei einem MW von 880 kDa (Fraktion 5). Das cpSRP43:LHCP-Verhältnis beträgt 0,7. Auch im Rahmen der Diplomarbeit von Antonia Schad (Februar 2014) wurde ein tendenziell positiver Effekt bei fraktionierter Zugabe des LHCP bei der Komplexbildung mit cpSRP43 beobachtet.

### 4.3. Vollängen-Transitkomplex

Nativ, also im Stroma von Chloroplasten, wird der über die Chloroplastenhüllmembran inserierte mature LHCP von cpSRP in Lösung gehalten. Dieser ternäre Komplex, welcher das hydrophobe Membranprotein in einem Insertions-kompetenten Zustand hält, wird als Transitkomplex bezeichnet. Payan und Cline (1991) konnten mithilfe von nicht-denaturierender Gelelektrophorese ohne die genaue Kenntnis über das chloroplastidäre Signalerkennungsprotein eine lösliche stromale Spezies des LHCP bei einem Molekulargewicht von 120 kDa nachweisen. Diese apparente Masse würde gut mit einem ternären Transitkomplex mit einer theoretischen Masse von 113 kDa übereinstimmen. Abgesehen von Payan und Cline existiert jedoch bezüglich der genauen Stöchiometrie bzw. der molekularen Masse des Transitkomplexes keine weitere Studie.

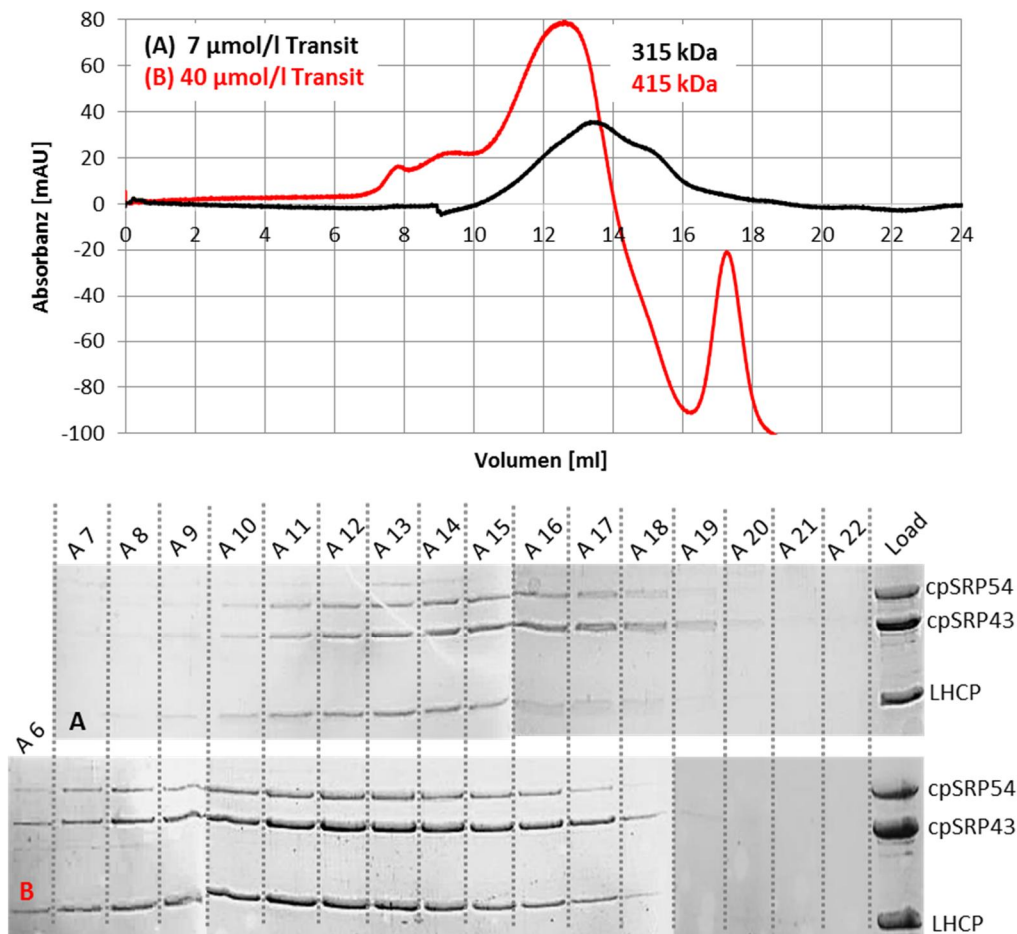
In diesem Kapitel sollen die Versuche rund um die Transitzkopplungen mit Vollängen-cpSRP vorgestellt werden. Wie schon aus den Versuchen zu dem cpSRP43-LHCP-Komplex bekannt war (vgl. 4.2.1), ist die Detergenz-Standard-Methode der Urea-Methode hinsichtlich der Komplexkopplung überlegen. Im Zusammenhang mit Vollängen-Transitkomplex ergab sich darüber hinaus die Problematik, dass zu Beginn der Arbeiten noch nicht die Konzentrations-abhängige Oligomerisierung des cpSRP-Komplexes (vgl. 4.1.2.3) bekannt war. Es wurde anfangs nur mit vor-oligomerisiertem cpSRP-Komplex gearbeitet. Hinsichtlich der sich bildenden Transitzkomplexe musste also bei der Kopplung nach Urea-Methode in gleicher Weise mit oligomerisierten Transitzkomplexen gerechnet werden. Solche Transitzkomplexe mit cpSRP, welcher vorab schon ein mittleres apparentes MW von ~800 kDa zeigte (vgl. Abbildung 4.12), liefen bei Gelfiltrationschromatographischer Auftrennung im Ausschlussvolumen der Superdex 200 und somit bei > 1300 kDa (Daten hier nicht gezeigt). Insofern wurde nachfolgend im Rahmen der Transitzkomplekkopplung nur die Detergenz-Standard-Methode verwendet. In dieser Methode führt der initiale Inkubationsschritt bei mindestens 0,5% SDS im Ansatz ohnehin zu einer Denaturierung der Proteine. Erst während der Detergenzentfernung im KDS-Fällungsschritt sollten die Komplexe neu rekonstituieren. Entsprechend sollte der Vor-Oligomerisierungsgrad des cpSRPs vernachlässigbar sein.

#### 4.3.1. Aufkonzentrierung/ Kopplungskonzentration des Transitkomplexes

Bezüglich der Minimierung des Oligomerisierungszustandes des cpSRP43-LHCP-Komplexes zeigte sich, dass eine Aufkonzentrierung des Komplexes ausgehend von einer niedrigen Kopplungskonzentration gegenüber einer initialen hohen Kopplungskonzentration überlegen ist (vgl. 4.2.2). Entsprechendes wurde für den Vollängen-Transitkomplex getestet.

#### 4.3.1.1. Einfluss der Aufkonzentrierung auf den Oligomerisierungszustand des Transitkomplexes

Die Transitkomplexbindung erfolgte zunächst bei 7  $\mu\text{mol/l}$  Endkonzentration der Komplexproteine nach Detergenz-Standard-Aufarbeitung. Ein Aliquot des Ansatzes wurde zwecks gefiltrationschromatographischer Untersuchung abgezogen und der Rest in Aufkonzentrierungseinheiten um den Faktor 6 auf 40  $\mu\text{mol/l}$  Komplexkonzentration eingengt. Abbildung 4.25 zeigt das Superose 6 Gelfiltrationschromatogramm sowie die Untersuchung der Eluatfraktionen im denaturierenden Gel.



**Abbildung 4.25: Einfluss der Aufkonzentrierung auf den Transitkomplex.**

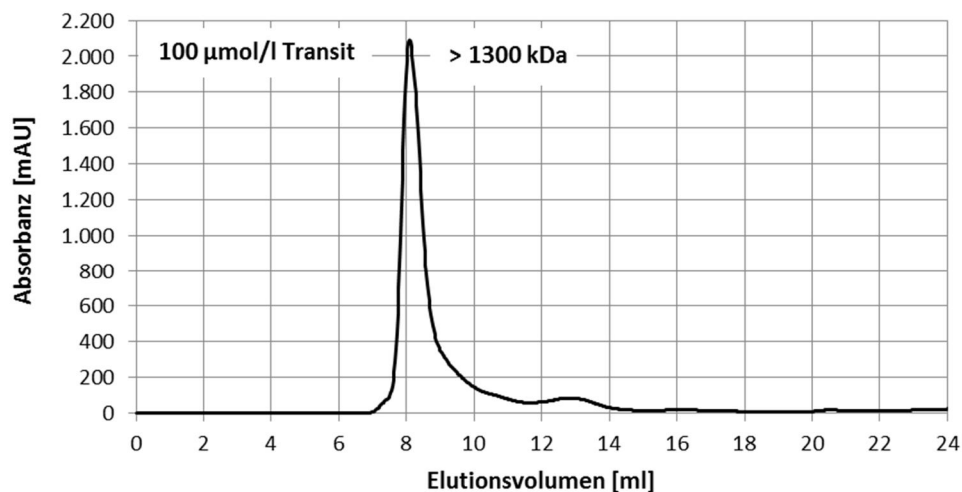
Oben: Superose 6 Gelfiltrationschromatogramme. 7  $\mu\text{mol/l}$  Transitkomplexbindung nach Detergenz-Standard-Methode. 6 x Aufkonzentrierung des Kopplungsansatzes mit 10 kDa Amicons auf 40  $\mu\text{mol/l}$ . Es wurden je 500  $\mu\text{l}$  Transitkomplexbindung auf eine Superose 6 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten zwischen 7-18 ml Elutionsvolumen. Unten: SDS-PAGE. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 9,5 – 18 ml (A6– A22) wurden untersucht. Jeweils 40  $\mu\text{l}$  Fraktion (in A) bzw. 15  $\mu\text{l}$  (in B) wurden mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix gemischt und in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt. In der ganz rechten Bahn wurden 20  $\mu\text{l}$  Load (A) bzw. 5  $\mu\text{l}$  Load (B) appliziert.

Beide Gelfiltrationsläufe zeigen eine sehr ausgedehnte Basispeakbreite. Die SDS-PAGE des 7  $\mu\text{mol/l}$  Ansatzes (A) bestätigt, dass der Transitkomplex über einen sehr weiten Molekulargewichtsbereich von 800 kDa (A8 – sehr schwache einsetzende Proteinbanden) bis mindestens 100 kDa (A 15) eluiert. Ab A16 (< 80 kDa) scheint nur noch cpSRP bzw. anschließend freies cpSRP43 zu eluieren. Das mittlere apparente Molekulargewicht der Komplexe liegt bei 315 kDa und weicht somit signifikant von dem zu erwartenden MW eines ternären Komplexes ab. Unter Berücksichtigung des apparenten

Laufverhaltens von mutmaßlich binärem cpSRP-Komplex bei ~150 kDa (vgl. Abbildung 4.15) sollte ternärer Volllängen-Transitkomplex bei ca. 175 kDa zu erwarten sein. Außerdem deutet der breite Elutionspeak auf die Präsenz verschieden stark oligomerisierter Komplexspezies (Polydispersität) hin. Im Falle der aufkonzentrierten Komplexe zeigt sich eine noch größere Verteilung der Transitkomplexe, welche in einem MW-Bereich von >1300 kDa (A6) bis 80 kDa (A17) mit einem mittleren apparenten Molekulargewicht von 415 kDa von der Säule eluieren. Es kann nicht gesagt werden, weshalb das Chromatogramm plötzlich in eine negative Absorption abfällt, ebenso wurde der Inhalt des bei ca. 17 ml auftretenden Peaks nicht gelelektrophoretisch untersucht. Es können aus der Verbreiterung der Basispeakbreite hin zu einer früher einsetzenden Elution zwei Schlussfolgerungen gezogen werden: 1. Die Aufkonzentrierung löst (partiell) eine fortschreitende Oligomerisierung der Komplexe aus; 2. Bei der Aufkonzentrierung bildet sich eine noch größere Heterogenität der Komplexspezies aus.

### 4.3.1.2. Einfluss der Kopplungskonzentration auf den Oligomerisierungsgrad des Transitkomplexes

Die hier aufgeführten Ergebnisse wurden in der [REDACTED] (unveröffentlicht) gewonnen. Es erfolgte eine Transitkomplexbindung nach Detergenz-Standard-Methode bei einer Kopplungskonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  mit anschließender Auftrennung auf einer Superdex 200 Gelfiltrationssäule.



**Abbildung 4.26: Einfluss der Kopplungskonzentration auf den Transitkomplex.**

Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramm. Transitkomplexbindung bei 100  $\mu\text{mol/l}$ . Es wurden 500  $\mu\text{l}$  Transitkomplexbindung auf eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Verändert nach [REDACTED]

Die sich bildenden Transitkomplexe zeigen eine sehr schmale Basispeakbreite. Das mittlere apparente MW liegt im Ausschlussvolumen der Säule bei > 1300 kDa. Das heißt, eine Transitkomplexbindung bei hoher initialer Konzentration der Proteinkomponenten führt zu einer starken Oligomerisierung. Es wurde keine systematische Größenbestimmung der Komplexe bei verschiedenen Kopplungskonzentrationen vorgenommen, jedoch zeigte sich im weiteren Verlauf der Arbeit, dass schon eine

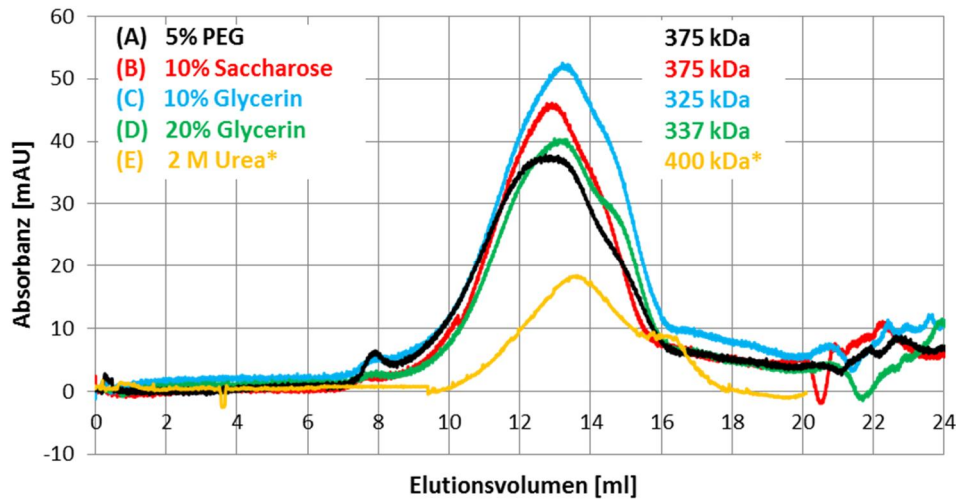


Erhöhung auf lediglich 10  $\mu\text{mol/l}$  Proteinkonzentration eine Vergrößerung des mittleren apparenten MWs um ca. 100 kDa nach sich zog. Konzentrationen unterhalb von 7  $\mu\text{mol/l}$  schienen jedoch nicht zu einer weiteren Minimierung des Oligomerisierungsgrades zu führen. Dieses Ergebnis bestätigte die Kopplungskonzentrations-abhängige Oligomerisierung, die auch schon im Rahmen des cpSRP43-LHCP-Komplexes festgestellt wurde. Im letzteren Fall tauchte diese jedoch insbesondere bei Kopplungen mit Urea-gelöstem LHCP auf.

#### 4.3.2. Einfluss von potentiellen Proteinaggregationhemmern auf den Oligomerisierungsgrad des Transitkomplexes

Bestimmte Cosolventen und darunter insbesondere die Polyole wie z.B. Saccharose oder Glycerin besitzen einen Proteinstabilitäts-vermittelnden Effekt. Der „Wirkmechanismus“ wird von Timasheff et al. (1993) als ein osmolytischer Effekt beschrieben. Die polyolen Osmolyte sind von der Proteinoberfläche ausgeschlossen. Kim et al. (2003) postulieren, dass dieser Ausschluss von der Proteinoberfläche zu einer Erhöhung des chemischen Potentials führt. Und zwar umso stärker je mehr Proteinoberfläche exponiert ist. Nach Le Chatelier und dem Prinzip des kleinsten Zwangs sollte demnach die Zugabe von osmolytisch aktiven Cosolventen dazu führen, dass die Proteine einen möglichst kompakten Zustand einnehmen. Somit wird ein in aller Regel mit Expansion verbundener denaturierter Zustand unwahrscheinlicher und die Tendenz zur Aggregation schon in der Entstehung gemindert.

Es wurden folgende potentielle Aggregationshemmer getestet: Glycerin, Saccharose, Polyethylenglycol (PEG) sowie Urea. Die Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen den Kopplungen gleich zu Beginn während der SDS-Inkubationsphasen zugesetzt. Alle im Zusammenhang mit dem cpSRP43-LHCP-Komplex getesteten Agenzien (u.a. Detergenzien, Arginin, Hochsalz), die keinen Einfluss hinsichtlich einer Minderung des Oligomerisierungsverhaltens zeigten, wurden im Rahmen der Transitkomplekkopplung nicht mehr eingesetzt. In Abbildung 4.27 sind die Gelfiltrationsläufe der Superose 6 Säule zu den entsprechenden Transitkomplekkopplungen zu sehen. Die entsprechende gelelektrophoretische Auftrennung der Gelfiltrationsfraktionen bestätigte, dass es sich bei den Elutionspeaks um Transitkomplex handelt (Daten im Anhang gezeigt). Es zeigt sich ein einheitliches Bild mit wiederum sehr ausgedehnten Basispeakbreiten der Chromatogramme. Tatsächlich liegt die Peak-Halbwertsbreite in keinem der Chromatogramme unter 3,6 ml (10% Saccharose). Im Vergleich dazu eluiert z.B. das Gelfiltrationsmarkerprotein Apoferritin, welches eine Masse von 443 kDa und somit ungefähr vergleichbar zu den mittleren apparenten Molekularmassen der Transitkomplexe ist, monodispers mit einer Peak-Halbwertsbreite von 1,2 ml auf der gleichen Superose 6 Säule. Dies deutet auf eine polydisperse Zusammensetzung der sich bildenden Transitkomplexe hin. Bezüglich ihres mittleren apparenten Molekulargewichtes zeigen die getesteten Cosolventen keinen Einfluss auf die sich bildenden Transitkomplexe (vgl. 4.3.1.1).



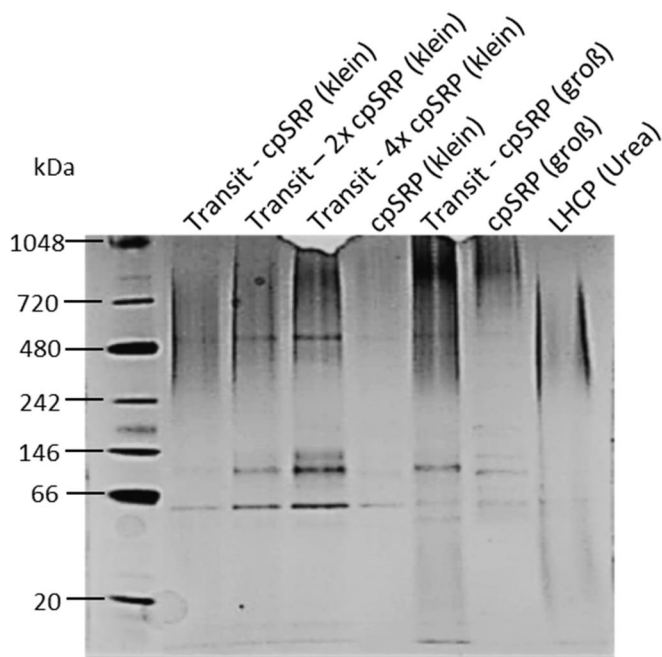
**Abbildung 4.27: Einfluss von potentiellen Proteinaggregationshemmern auf den Transitkomplex.**

Superose 6 Gelfiltrationschromatogramme. 7  $\mu\text{mol/l}$  Transitkomplexbindung mit entsprechender Endkonzentration von potentiellen Proteinaggregationshemmern. Es wurden je 500  $\mu\text{l}$  Transitkomplexbindung auf eine Superose 6 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten. \*= Der Gelfiltrationslauf der Transitkopplung mit 2 mol/l Urea wurde zu einem Zeitpunkt mit anderer zugrundeliegender Größeneichung der Superose 6 durchgeführt. UV-Detektion bei 280 nm.

#### 4.3.3. Visualisierung von Vollängen-Transitkomplex in nativer Gelelektrophorese

Bei einer nativen Elektrophorese wird die Konformation eines Proteins bzw. eines Proteinkomplexes in der Regel erhalten. Somit ist es prinzipiell möglich auch Proteinkomplexe gelelektrophoretisch aufzutrennen und zu visualisieren. Eine gelelektrophoretische Auftrennung von Transitkomplex hätte außerdem den Vorteil, dass sie gegenüber der Gelfiltration, die eine nachgeschaltete denaturierende Elektrophorese notwendig macht, deutlich zeitsparender ist. Es wurde zunächst eine Blue Native PAGE (BN-PAGE) durchgeführt, d.h. der Kathodenpuffer enthielt 0,002% Coomassie G250. Coomassie assoziiert an das Protein und verleiht ihm wegen seiner beiden dissoziierten Sulfonsäuregruppen eine negative Nettoladung. Somit gewährleistet es die elektrophoretische Mobilität des Proteins im elektrischen Feld. Coomassie ist aber auch gleichzeitig aufgrund seiner amphiphilen Struktur ein (schwaches) Detergenz. Die Auftrennung der Transitkomplexansätze in 4-16% Gradientengelen zeigte keine distinkten Banden, sondern größtenteils nur hochmolekularen Proteinschmier, so dass von einem Zerfall der Komplexe auszugehen war. Voraussetzung für die elektrophoretische Mobilität von Proteinen im Falle der colourless native (CN-)PAGE ist eine negative Nettoladung des Protein(komplexes). Zwar liegt der isoelektrische Punkt (pI) von cpSRP54 bei 9,1, jedoch weisen cpSRP43 mit 4,34 und LHCP mit 4,98 einen deutlich sauren pI auf, weshalb der Transitkomplex selbst bei dem pH-Wert von 6,8 (Kathodenpuffer) netto negativ geladen vorliegen sollte. Im Folgenden wurde eine CN-PAGE ohne jeglichen Zusatz von Detergenz durchgeführt. Es wurden dabei aufgrund der geringen Volumina für die Proben Transitkopplungen nach Urea-Methode durchgeführt und es kam zum Einsatz verschieden charakterisierter cpSRP-Komplexe. Für die in Abbildung 4.28 gezeigten Proben wurde cpSRP aus einem 0,4 mg/ml Kopplungsansatz (Bezeichnung:

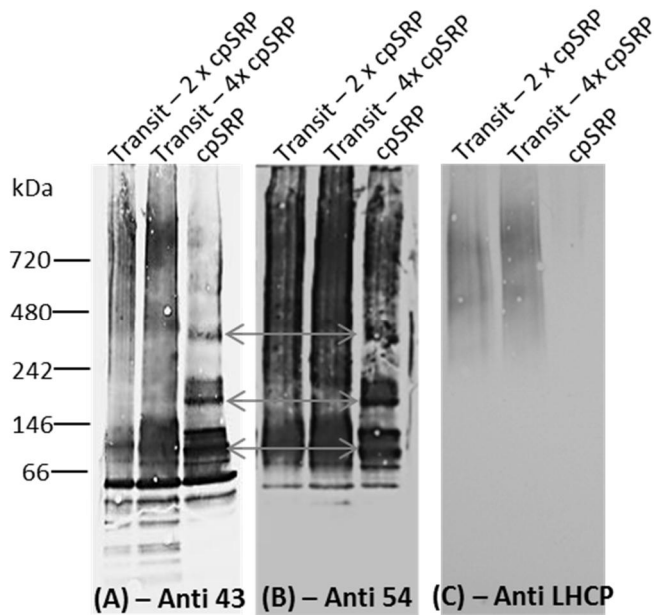
„klein“; vgl. Abbildung 4.10) bzw. solcher aus einem 0,8 mg/ml Kopplungsansatz (Bezeichnung: „groß“; vgl. Abbildung 4.11) verwendet. Außerdem wurde als Referenz jeweils freier cpSRP-Komplex sowie eine LHCP-Referenz mit aufgetragen.



**Abbildung 4.28: Auftrennung von Transitkopplungen/cpSRP-Komplex in einer nativen PAGE.**

Es wurden verschiedene aufbereitete cpSRP-Komplexe mit Urea-vorsolubilisiertem LHCP bzw. freier cpSRP-Komplex mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen NATIVE Sample Buffer vermischt und auf ein 4-16% Bis-Tris-Gradientengel aufgetragen. Als Anoden-/Kathodenpuffer wurde Bis-Tris-Tricin-Puffer verwendet. Die Elektrophorese lief für 2 h bei 100 V unter Eiskühlung. cpSRP (SE) = In Stromaextrakt aufgearbeiteter cpSRP; cpSRP (klein) = cpSRP aus 0,4 mg/ml Ni-Säulenaufarbeitung stammend; cpSRP (groß) = cpSRP aus 0,8 mg/ml Ni-Säulenaufarbeitung stammend. 2 x/ 4 x = stöchiometrischer Überschuss von cpSRP zu LHCP; LHCP (Urea) = 3  $\mu$ g Urea-gelöster LHCP. Ganz links wurden 6  $\mu$ l NATIVE Marker appliziert.

Wie gut erkennbar ist, zeigen der Komplex bzw. die Proteine bei konventioneller Elektrodenanordnung (Anode unten) elektrophoretische Mobilität. Jedoch zeigt der Proteinschmier, dass die Komplexe bei der Auftrennung größtenteils zerfallen. Es sind lediglich Proteinbanden etwas unter 66 kDa sowie in den meisten Ansätzen zwischen 66 und 146 kDa zu erkennen (Gelbahnen: 3,4,6 und 7). Außerdem tritt knapp über 480 kDa eine Proteinbande auf (Gelbahn: 3,4 und 6). Die applizierte LHCP-Referenz lässt wie erwartet im hochmolekularen Bereich einen Proteinschmier erkennen. Das hydrophobe Membranprotein aggregiert in detergentzfreier Umgebung. Innerhalb der Reihe der Transitkopplungen mit niedermolekularem cpSRP-Komplex („klein“) nimmt der hochmolekulare Proteinschmier nicht in dem Maße zu wie der Gehalt an überschüssig zugesetztem freien cpSRP. Dies spricht also gegen den Zerfall des cpSRP-Komplexes in diesem Bereich des Gels. Gleichzeitig nimmt aber die Intensität der Bande kurz unterhalb 146 kDa zu, was auf deren Ursprung von cpSRP-Komplex hindeuten könnte. Gelbahn 7 (hochmolekularer cpSRP) zeigt im oberen Bereich des Gels einen deutlich erkennbaren Proteinschmier. Es kann daraus geschlossen werden, dass die schon in der Gelfiltration zwischen 500-1000 kDa detektierten cpSRP-Komplexe im Gel zerfallen. Um eine bessere Identifizierung der erkennbaren Proteinbanden zu bekommen, wurde die CN-PAGE unter Verwendung von ausschließlich „kleinem“ cpSRP wiederholt, geblottet und anschließend mit den Antikörpern der drei Transitkomplexproteine untersucht. Abbildung 4.29 zeigt die Blots der nativen Auftrennung.



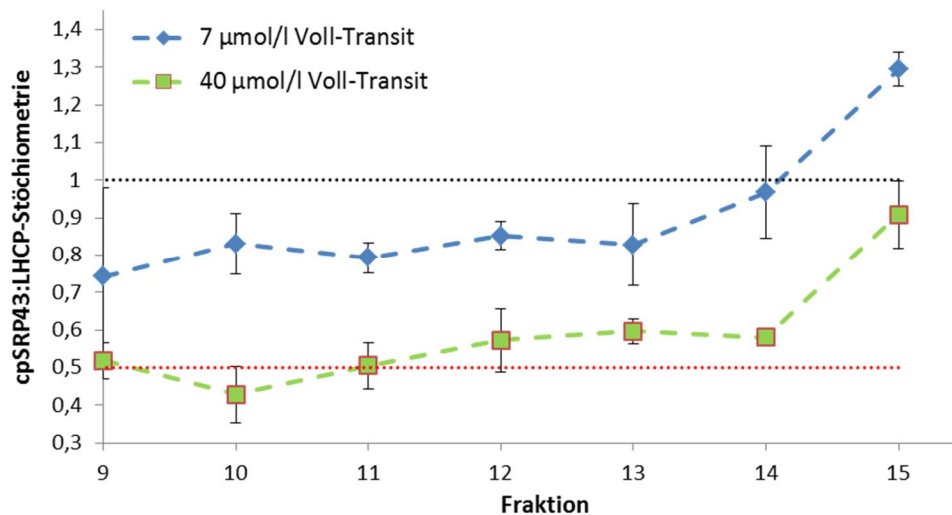
**Abbildung 4.29: Immunoblot von Transitkopplungen/cpSRP-Komplex nach Auftrennung in nativer PAGE.**

Es wurden Transitkomplexansätze mit 2 x bzw. 4 x stöchiometrischen Überschuss von cpSRP aus einer 0,4 mg/ml Ni-Säulenaufarbeitung bzw. nicht-gekoppelter cpSRP-Komplex nach CN- PAGE (vgl. Abbildung 4.28) auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Es folgten Standardblockung und Inkubation mit (A) – cpSRP43-Antikörper, (B) – cpSRP54-Antikörper sowie (C) - LHCP-Antikörper. Es folgten weitere Standardaufarbeitungsschritte.

Zunächst wird deutlich, dass der Transitkomplex im Gel völlig zerfällt, da der Anti-LHCP-Blot (C) lediglich einen hochmolekularen Schmier zeigt. Ebenso ist im Fall des Anti54-Blots (B) Signal über den kompletten Molekulargewichtsbereich erkennbar, dies fällt im Fall des Anti43-Blots nicht so stark aus. Hinsichtlich des Bandenmusters stechen außer in (A) unterhalb von 66 kDa keine distinkten Banden heraus. Bei erwähnter Bande sollte es sich um monomeres cpSRP43 handeln. Die Bahnen, in welchen freies cpSRP aufgetragen wurde, lassen in (A) und (B) spezifische Banden erkennen (durch Pfeile indiziert). Insbesondere findet sich in beiden Blots eine Doppelbande zwischen 66 und 146 kDa. Diese konnte schon -wenn auch nicht als Doppelbande- in Abbildung 4.28 erkannt werden. Es kann angenommen werden, dass es sich bei diesen in beiden Blots und auf gleicher Laufhöhe auftretenden Banden um nicht-zerfallene cpSRP-Komplexe handelt. Es würde sich dann um Komplexe unterschiedlicher Oligomerisierung bzw. unterschiedlicher Konformation handeln. Dennoch zeigt der massive cpSRP54-Schmier an, dass auch der Großteil des cpSRP-Komplexes während der CN-PAGE zerfällt (vgl. dazu Diskussion 5.2.6).

#### 4.3.4. Stöchiometriebestimmung im Vollängen-Transitkomplex

In gleicher Weise zu 4.2.5 wurde auch für Vollängen-Transitkomplex eine densitometrische Stöchiometriebestimmung für das Verhältnis von cpSRP43 zu LHCP bestimmt. Die Stöchiometrie-verhältnisse dieser beiden Proteine werden auch im Vollängenkomplex als entscheidend betrachtet, da das Membranprotein in erster Linie spezifisch mit dem cpSRP43 wechselwirkt. Die Stöchiometrie zu cpSRP54 wurde außer Acht gelassen. Es wurden die Gele aus Abbildung 4.25 jeweils 3 x unabhängig voneinander densitometrisch ausgewertet. Der entsprechende Mittelwert der Bandenintensitäten wurde mithilfe von 4.2.5.1 (Referenz) in eine cpSRP43:LHCP-Stöchiometrie umgerechnet.



**Abbildung 4.30: Stöchiometrien des Vollängen-Transitkomplexes.**

Die in 15% PAA-Gelen aufgetrennten Gelfiltrationsfraktionen der Vollängentransitkomplex-Ansätze wurden densitometrisch ausgewertet. Nach Coomassie G250-Anfärbung und vollständiger Hintergrundfärbung wurde jede Proteinbande unabhängig voneinander jeweils 3 mal mit der Software Quantity One (BioRad) auf ihre Farbdichte untersucht. Es wurde jeweils mit der „Local Background Substraction“-Methode als Korrektur gearbeitet

In Abbildung 4.30 ist der Verlauf der Stöchiometrien eines 7 µmol/l sowie eines aufkonzentrierten Transitkomplexansatzes (40 µmol/l) zu sehen. Es wird deutlich, dass die Komplexe des aufkonzentrierten Ansatzes eine signifikant andere cpSRP43-LHCP-Zusammensetzung zeigen. Im 7 µmol/l Transitkomplex ist die Zusammensetzung in den Fraktionen 9-14 (apparentes MW =733-254 kDa) zwischen cpSRP43 und LHCP mit ~0,8 relativ konstant. Der Anstieg in Fraktion 14 und 15 ist sicherlich mit der beginnenden Elution von freiem cpSRP-Komplex zu erklären. Die Aufkonzentrierung des Ansatzes um den Faktor 6 führt zu einer Verschiebung der cpSRP43:LHCP-Stöchiometrie zu 0,5-0,6. Die Komplexe enthalten also einen relativ höheren Anteil von LHCP. Jedoch bleibt auch hier die Zusammensetzung über die Fraktionen tendenziell konstant. Im Vergleich zu den cpSRP43-LHCP-Komplexen aus Abbildung 4.25 ist bei den Vollängen-Transitkomplexen eine deutliche Tendenz hin zu einer definierten 1:1-Stöchiometrie zu erkennen (vgl. Diskussion 5.2.1)

### 4.4. Transitkomplex mit deletiertem cpSRP54M

Wie schon unter 4.1 erwähnt, kam neben Vollängen-cpSRP54 auch deletiertes cpSRP54M, welches freundlicherweise von der [REDACTED] bereitgestellt wurde, zum Einsatz. Das deletierte Protein enthält nur die letzten 195 Aminosäuren des Methionin-reichen C-terminalen Endes. Funke et al. (2005) konnten zeigen, dass eine 10 Aminosäuren lange Sequenz kurz vor dem C-terminalen Ende des cpSRP54 die spezifische Interaktionsstelle mit cpSRP43 darstellt. In 4.1.2.2 ist dargestellt, dass cpSRP-Komplex mit cpSRP54M (54M-cpSRP-Komplex) als ein monodispers binärer Komplex mit einem apparenten MW von 107 kDa bei Gelfiltrationchromatographischer Auftrennung vorliegt. Im Gegensatz zu Vollängen-cpSRP zeigte dieser Komplex nie Anzeichen einer konzentrationsabhängigen Oligomerisierung. Auch im Zusammenhang mit 54M-cpSRP-Komplex wurde u.a. eine Transitkomplexbildung mit Urea-gelöstem LHCP unternommen. Die sich bildenden Transitkomplexspezies zeigten ein mittleres apparentes Molekulargewicht von ~550 kDa. Da binärer 54M-cpSRP-Komplex jedoch ein mittleres apparentes MW von 107 kDa (Superdex 200) zeigte, ist für einen ternären Transitkomplex ein MW von ~135 kDa zu erwarten. Folglich war bei den Transitkomplexen nach Urea-Methode von einer oligomerisierten Spezies auszugehen. Die folgend dargestellten Ergebnisse wurden alle nach Detergenz-Standard-Methode gewonnen.

#### 4.4.1. Einfluss der Aufkonzentrierung auf Transitkomplex mit cpSRP54M

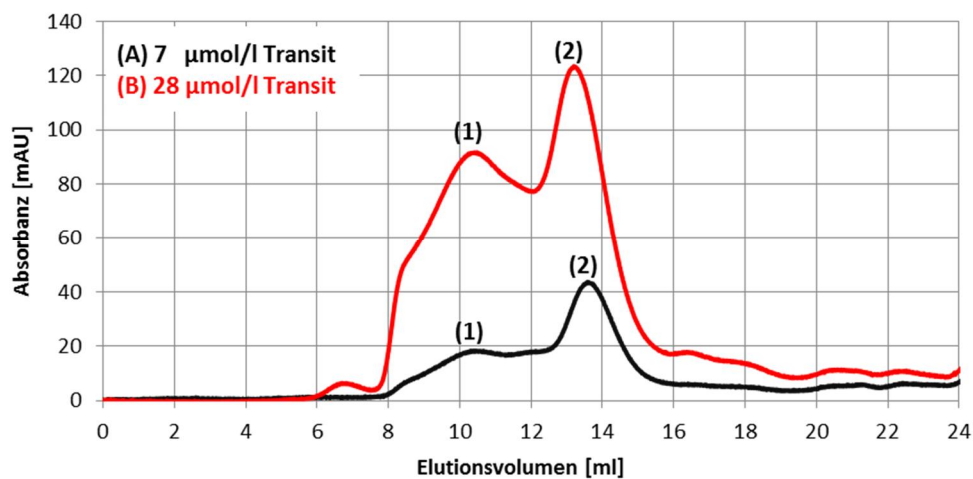
Auch im Zusammenhang mit 54M-Transitkomplex wurde zunächst getestet wie der Komplex auf eine Aufkonzentrierung reagiert. Aus der [REDACTED] gab es die Information, dass sich der Transitkomplex mit deletiertem cpSRP54M bei initial hoher Kopplungskonzentration gleich zu Vollängen-Transitkomplex verhält und Komplexe > 1300 kDa bildet, die im Ausschlussvolumen der Superdex 200 laufen. Es wurde eine äquimolare Komplexbildung (7  $\mu\text{mol/l}$ ) zwischen 54M-cpSRP-Komplex und His-tag freiem LHCP durchgeführt. Ein Aliquot wurde zwecks Gelfiltrationschromatographischer Untersuchung entnommen, der Rest wurde um den Faktor 4 auf 28  $\mu\text{mol/l}$  aufkonzentriert. In Abbildung 4.31 sind die Chromatogramme der Transitzkopplungen zu sehen. Es zeigen sich jeweils 2 lokale Peaks bzw. im Fall des 7  $\mu\text{mol/l}$  Ansatzes eher eine Absorptionsschulter (1). Tabelle 4.3 weist die zu den Peaks gehörigen apparenten Molekulargewichte aus.

**Tabelle 4.3: Einfluss der Aufkonzentrierung auf Transitkomplex mit cpSRP54M.**

Apparente Molekulargewichte entsprechend des Elutionsvolumens im jeweilig maximalen Peak. Alle Peaks (1) und (2) beinhalten cpSRP43, LHCP sowie cpSRP54M in unterschiedlichen Anteilen. Die Identifizierung der Peaks wurde anhand eines Gelauftrags des fraktionierten Eluats vorgenommen.

Peak #	7 $\mu\text{mol/l}$ Transit	28 $\mu\text{mol/l}$ Transit
(1)	500 kDa	520 kDa
(2)	107 kDa	140 kDa

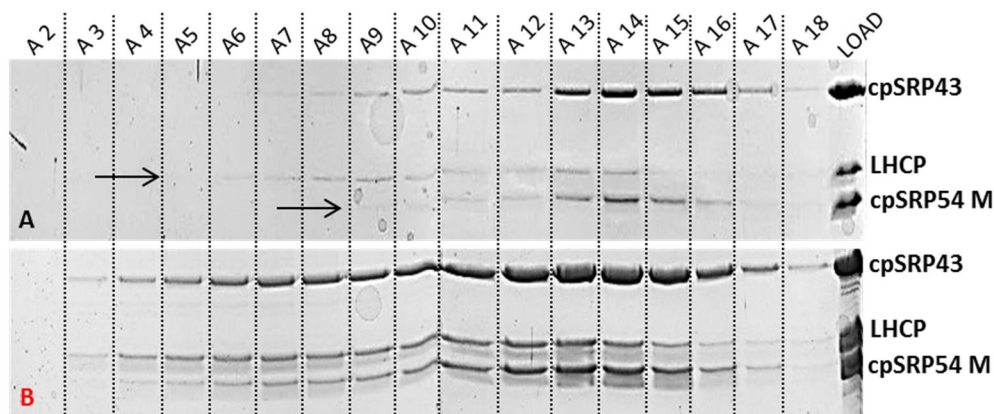
Die Peaks zeigen im Vergleich nahezu keine Veränderung und treten bei dem gleichen apparenten Molekulargewicht in Erscheinung. Im Unterschied zu Abbildung 4.25 (Aufkonzentrierung von Vollängen-Transitkomplex) ist zudem keine Verbreiterung der Basispeakbreite zu erkennen.

**Abbildung 4.31: Einfluss der Aufkonzentrierung auf Transitkomplex mit cpSRP54M.**

Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramme. Es wurden je 500  $\mu\text{l}$  54M-Transitkomplex auf die Säule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml-Schritten. **A:** Transitkopplung mit 7  $\mu\text{mol/l}$  54M-cpSRP-Komplex und 7  $\mu\text{mol/l}$  LHCP. **B:** Der Ansatz aus A wurde in 10 kDa Amicons 4 x auf eine Endkonzentration von  $\sim 28$   $\mu\text{mol/l}$  aufkonzentriert.

Daraus kann geschlossen werden, dass während der Aufkonzentrierung die Zusammensetzung der Komplexe (Dispersität) konstant bleibt. Es kommt mutmaßlich nicht zu einer fortschreitenden Oligomerisierung. Anhand der gelelektrophoretischen Auftrennung (Abbildung 4.31) wird deutlich, dass Peak (1) mit einem apparenten MW von 520 kDa (Fraktion A8/A9) zumindest im Fall des 28  $\mu\text{mol/l}$  Ansatzes alle Proteine des Transitkomplexes enthält. Im Fall des 7  $\mu\text{mol/l}$  Ansatzes zeigen diese Fraktionen kein cpSRP54M-Signal. Der aufkonzentrierte Ansatz weist Peak (2) mit einem apparenten MW von 140 kDa (Elutionsvolumen: 13,2 ml) etwas früher auf als der 7  $\mu\text{mol/l}$ -Ansatz mit einem apparenten MW von 107 kDa (Elutionsvolumen: 13,5 ml). Die Fraktionen von Peak (2) zeigen alle Komponenten des Transitkomplexes. Jedoch ist in diesen späten Fraktionen eine Überrepräsentation der cpSRP-Komponenten augenscheinlich. Es kann vermutet werden, dass neben potentiell Transitkomplex freier 54M-cpSRP-Komplex eluierte. Dies ist insbesondere im 7  $\mu\text{mol/l}$ -Ansatz in den Fraktionen A15/A16 (kein LHCP-Signal) ersichtlich. Es ist anzunehmen, dass der

wahre Elutionspeak des 54M-Transitkomplexes etwas früher ist, als das Chromatogramm tatsächlich anzeigt. Durch die Überlagerung der Elution beider Spezies zeigt die Amplitude das Elutionsmaximum von freiem 54M-cpSRP-Komplex bei 107 kDa an (vgl. Abbildung 4.31). Aus dem Gel (Abbildung 4.32) ist erkennbar, dass der Elutionspeak des 54M-Transitkomplexes in den Fraktionen A13/A14 (intensivstes LHCP-Signal) bei einem apparenten MW von ~140 kDa liegt. Der 28  $\mu\text{mol/l}$ -Ansatz zeigt den Elutionspeak des 54M-Transitkomplexes in Fraktion A12/A13 bei einem apparenten MW von ~175 kDa. Darüber hinaus ist erkennbar, dass die Basispeakbreite der Elution des Transitkomplexes sehr breit ist. Diese Tatsache lässt auch hier auf eine insgesamt heterogene Zusammensetzung mit unterschiedlichen Oligomerisierungsgraden des Komplexes schließen.



**Abbildung 4.32: Einfluss der Aufkonzentrierung auf Transitkomplex mit cpSRP54M (2).**

SDS-PAGE. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 7,5 – 16 ml (A2 – A18) wurden auf einem 15% PAA-Gel untersucht. **A** zeigt den 7  $\mu\text{mol/l}$ -Kopplungsansatz. Es wurden je 40  $\mu\text{l}$  Fraktion sowie 15  $\mu\text{l}$  Load aufgetragen. **B** zeigt den auf 28  $\mu\text{mol/l}$  aufkonzentrierten Kopplungsansatz. Es wurden je 20  $\mu\text{l}$  Fraktion sowie 7,5  $\mu\text{l}$  Load aufgetragen. Allen Proben wurde vor Auftrag  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix beigemischt.

#### 4.4.2. Stöchiometrischer Überschuss von 54M-cpSRP-Komplex bzw. cpSRP54M-Spezies

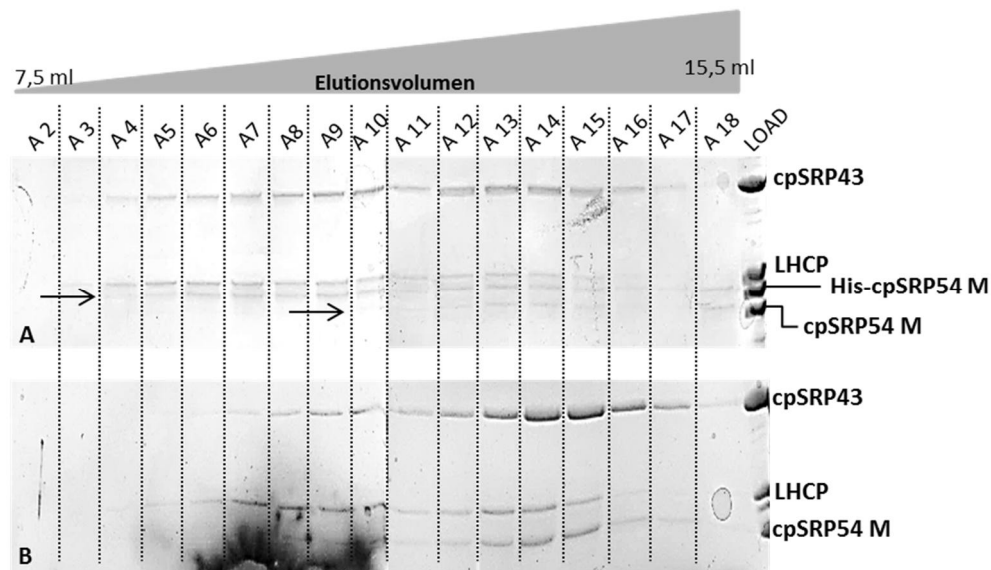
In 4.4.1 wird deutlich, dass die Kopplung mit 54M-cpSRP-Komplex hinsichtlich der Generierung von potentiell ternären Komplexen bzw. der Minimierung des Oligomerisierungsgrades gegenüber der Kopplung von Vollängen-Transitkomplex überlegen ist. Es sind 2 prinzipielle Erklärungen denkbar: 1. Die Wechselwirkung des cpSRP54M mit LHCP ist ausreichend für eine bessere Abschirmung exponierter hydrophober Sequenzen des Membranproteins. Diese wurden im Vorfeld mutmaßlich für die beobachtete Oligomerisierung verantwortlich gemacht. In Abbildung 4.31 ist zu erkennen, dass insbesondere die frühen Fraktionen (A5-A7/A8) mit potentiell oligomerisierten LHCP-Komplexspezies kein cpSRP54M-Signal bzw. ein „unterrepräsentiertes“ Signal zeigten. Somit könnte eine Erhöhung des cpSRP54M-Anteils u. U. auch die Bildung von potentiellen ternären Komplexen noch erhöhen. 2. Vollängen-cpSRP54M trug im Vorfeld selbst zur Oligomerisierung bei. Tritt dies im Zusammenhang mit cpSRP54M nicht auf, wäre die N-Domäne sowie die G-Domäne des Proteins als potentiell oligomerisierungs-/aggregationsanfällig bzw. -auslösend identifiziert. In diesem Fall sollte eine Erhöhung des cpSRP54M im Kopplungsansatz keinen Effekt zeigen. Zu Beginn wurde ein doppelt stöchiometrischer Überschuss von 54M-cpSRP-Komplex bzw. von aufgereinigtem His-



cpSRP54M verwendet. Als LHCP-Variante für die Kopplungen wurde standardmäßig His-tag freier C79S verwendet.

#### 4.4.2.1. Überschuss von 54M-cpSRP-Komplex bzw. His-cpSRP54M in Kopplungsansätzen

Die Transitzkopplungen mit einem 2-fach molaren Überschuss von 54M-cpSRP-Komplex bzw. His-cpSRP54M wurden bei einer „effektiven Transitzkomplekonzentration“ von 7  $\mu\text{mol/l}$  durchgeführt (siehe Abbildungsunterschrift).



**Abbildung 4.33: Einfluss eines Überschusses von 54M-cpSRP-Komplex bzw. His-cpSRP54M auf 54M-Transitzkomplex.**

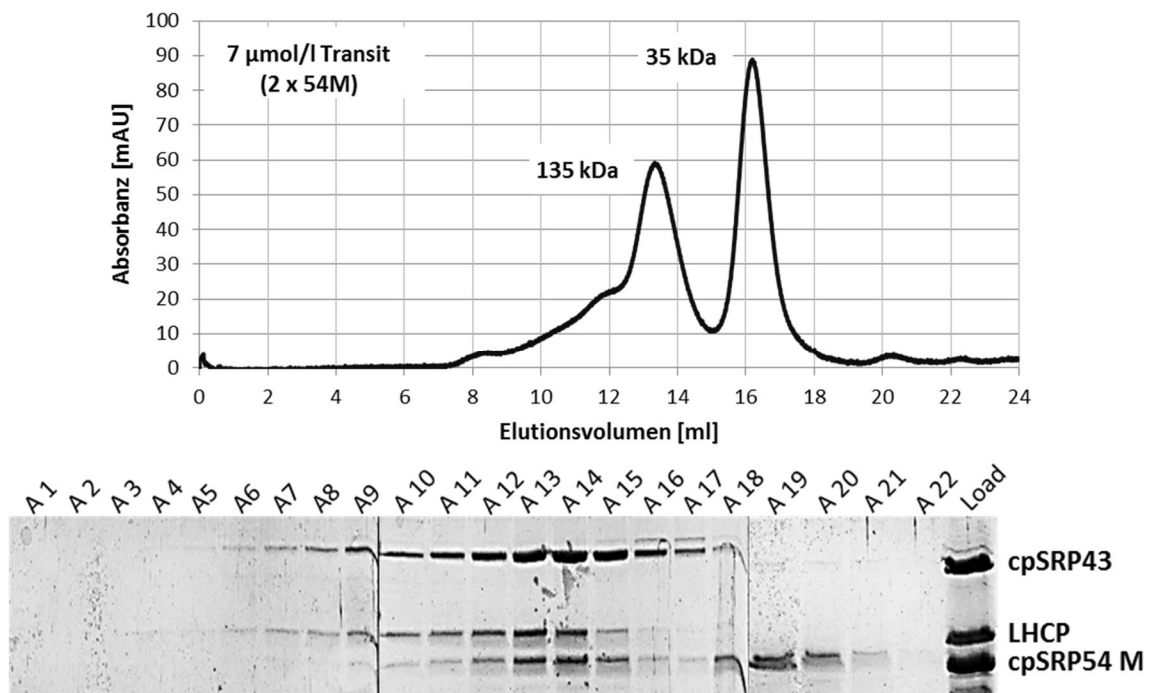
SDS-PAGE. 500  $\mu\text{l}$  Transitzkopplungsansatz wurden auf eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 7,5 – 16 ml (A2 – A18) wurden untersucht. Es wurden jeweils 40  $\mu\text{l}$  Fraktion sowie 15  $\mu\text{l}$  Load mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix vermischt und auf ein 15% PAA-Gel aufgetragen. **A** : Transitzkopplung mit 7  $\mu\text{mol/l}$  54M-cpSRP-Komplex, 7  $\mu\text{mol/l}$  LHCP und 7  $\mu\text{mol/l}$  freiem His-cpSRP54M. **B**: Transitzkopplung mit 14  $\mu\text{mol/l}$  54M-cpSRP-Komplex und 7  $\mu\text{mol/l}$  LHCP.

Abbildung 4.33 zeigt die Fraktionierung der Superdex 200 Gelfiltrationsläufe. Es wird deutlich, dass im Fall der Kopplung mit His-cpSRP54M einerseits die Elutionsbreite des Komplexes deutlich zunimmt, andererseits der Anteil an spät-eluierendem Transitzkomplex (A12-A14) abnimmt. Sehr auffällig ist, dass sich das zugesetzte His-cpSRP54M im Gegensatz zu seinem „tag“-freien Homolog exklusiv in den hochmolekularen Fraktionen (A4-A8) zeigt. „Tag“-freies Protein erscheint erst schwach ab Fraktion A10. Es wurden gleichzeitig in der [REDACTED] Versuche unter Verwendung einer C-terminal tragenden His<sub>6</sub>-tag Variante des LHCPs (C79Sh) durchgeführt. Diese zeigte im Vergleich zu späteren Parallelproben mit „tag“-freiem LHCP (C79S) deutlich ineffizientere Bindung an den 54M-cpSRP-Komplex bzw. führte zu aggregierten Transitzkomplexen. Bei diesen Versuchen handelte es sich um äquimolare Kopplungen der Transitzkomplexkomponenten (schriftliche Mitteilung von [REDACTED]). Es kann deshalb vermutet werden, dass der His-tag unabhängig von seiner genauen Position einen negativen Einfluss auf die Kopplung besitzt (vgl.

Diskussion). Darüber hinaus zeigt Abbildung 4.33 im Falle des 2-fach molaren Überschusses von 54M-cpSRP-Komplex (B) zwar einen deutlichen Anteil des LHCPs in den spät eluierenden Fraktionen A12-A15, gleichzeitig ist aber auch der Anteil in den früh eluierenden Fraktionen hoch (A5-A10 – Fraktionen mit einem apparenten MW von 950 – 300 kDa). Es liegt in diesen Fraktionen augenscheinlich kein definiertes stöchiometrisches Verhältnis zwischen LHCP- und cpSRP43-Bande vor.

### 4.4.2.2. Überschuss von cpSRP54M in Kopplungsansätzen

Freies cpSRP54M wurde vor der Zugabe in Kopplungsansätze ausgehend von Bakterienlysat einer Teilaufreinigung bzw. Umpufferung in Standard-cpSRP-Puffer unterzogen. Dazu wurde cpSRP54M-Bakterienlysat auf eine präparative Gelfiltrationssäule aufgetragen und das Eluat nachfolgend wieder aufkonzentriert. Abbildung 4.34 zeigt den Gelfiltrationslauf sowie die zugehörige SDS-PAGE der Transitkomplekxkopplung. Es treten zwei lokale Peaks bei einem Elutionsvolumen von 13,2 ml (= apparentes MW von 135 kDa) in Fraktion A13 sowie bei 16,1 ml (= apparentes MW von 35 kDa) in Fraktion A19 auf. Letzterer Peak kann als freies cpSRP54M im Gel identifiziert werden (Fraktionen A18-21). Erstes Maximum beinhaltet alle Komponenten des Transitkomplexes. Der Elutionsverlauf des cpSRP43 sowie des cpSRP54M ab Fraktion A15, welche wenig LHCP-Signal zeigt, deutet wieder darauf hin, dass der Elutionspeak eine Überlagerung von teilweise freiem 54M-cpSRP-Komplex und Transitkomplex darstellt.



**Abbildung 4.34: Einfluss eines Überschusses von cpSRP54M bei der Transitkomplekxkopplung.**  
Oben: Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramme. Es wurde eine Transitkopplung mit 7 µmol/l 54M-cpSRP-Komplex, 7 µmol/l LHCP sowie weitere 7 µmol/l freies cpSRP54M durchgeführt und 500 µl auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Unten: SDS-PAGE. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 7 – 18 ml (A1 – A22) wurden auf einem 15% PAA-Gel untersucht. Es wurden vor Auftrag je 40 µl Fraktion sowie 20 µl Load mit ¼ Endvolumen Auftragsmix gemischt.

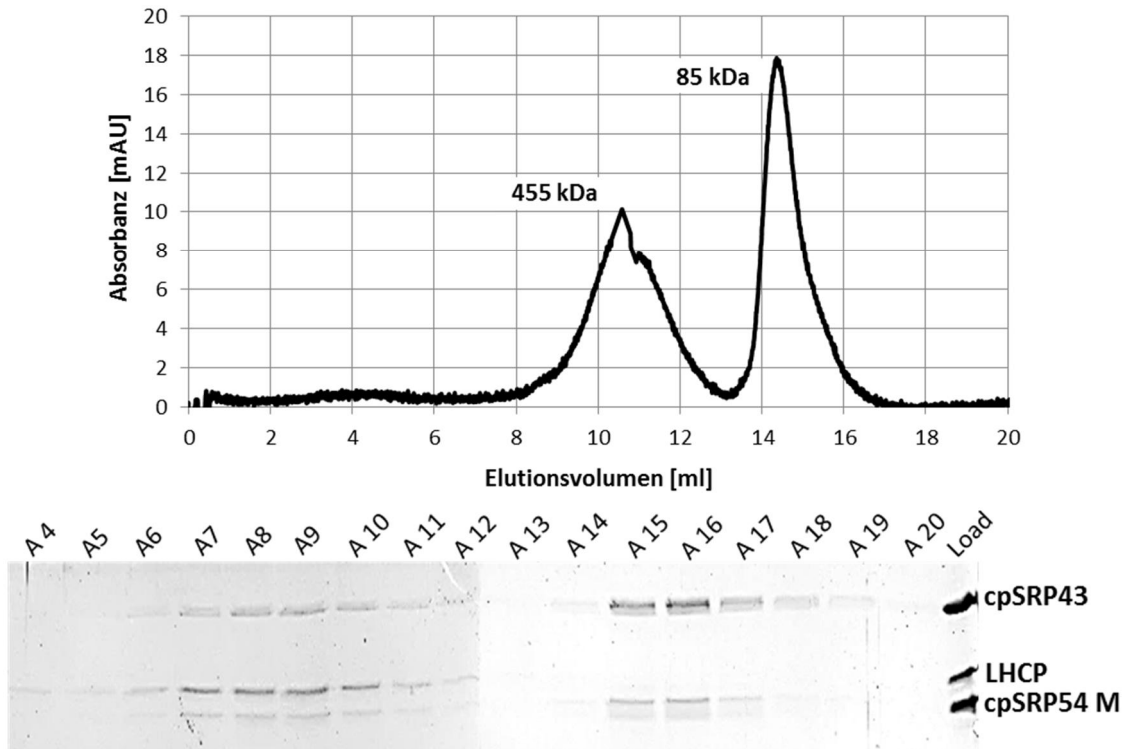
Schon der Chromatogrammverlauf weist im Vergleich zu dem des äquimolaren Ansatzes in Abbildung 4.31 (7  $\mu\text{mol/l}$ -Ansatz) einen im Bereich bis 12 ml Elutionsvolumen deutlich flacheren Verlauf auf. Der Gelauftrag der Fraktionen bestätigt, dass deutlich weniger LHCP bzw. Komplexspezies aus cpSRP43 und LHCP in diesen hochmolekularen Fraktionen eluiert. Eine densitometrische Auswertung über alle LHCP-Banden ergab, dass sich 61% des Gesamtproteins in den Fraktionen A11-A15 und somit apparent  $< 240$  kDa befinden. Der Zusatz eines 1 fach stöchiometrischen Überschusses von freiem cpSRP54M scheint eine signifikante Verminderung von hochmolekularen LHCP-Komplexspezies zu bringen. Gleichzeitig wird auch deutlich, dass diese nicht völlig unterdrückt wird. Es treten weiterhin oligomerisierte Komplexe (A6-A9) auf, die wiederum trotz Überschusses von cpSRP54M im Ansatz kein solches Signal zeigen. Es wurden im Folgenden Kopplungsansätze mit einem 3-4 fachen stöchiometrischen Überschuss von freiem cpSRP54M durchgeführt. Diese zeigten jedoch im Vergleich zu Abbildung 4.34 hinsichtlich der Verteilung des LHCP auf die hochmolekularen bzw. niedermolekularen Fraktionen ein gar schlechteres Ergebnis. Ein noch größerer Überschuss von cpSRP54M brachte außerdem auch keine Absättigung der früh eluierenden cpSRP43-LHCP-Spezies. Darüber hinaus wurde ein 10  $\mu\text{mol/l}$ -Ansatz mit 1 fach stöchiometrischem Überschuss von cpSRP54M durchgeführt. Dieser zeigte bei einer densitometrischen Auswertung über alle LHCP-Banden 54% des Gesamtproteins in den Fraktionen A11-A15. Die Versuche mit höher konzentrierten Komplexkopplungen wurden nicht wiederholt. Somit kann nicht genau gesagt werden, inwiefern die Erhöhung des oligomerisierten Komplexanteils signifikant ist.

#### 4.4.3. **Alternative Aufkonzentrierungsversuche**

Eine Aufkonzentrierung der Transitkomplexansätze war deshalb relevant, da die Komplexe für EPR-spektroskopische Messungen verwendet werden sollten. Nach einer mündlichen Mitteilung des Kooperationspartners der ETH, Zürich (Dr. Yevhen Polyhach) ist es für solche Messungen hinsichtlich der Sensitivität des dort verwendeten Q-Band EPR-Spektroskops wünschenswert eine effektive „spin-label“ Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  in der Probe zu haben. Unter Berücksichtigung, dass „spin-label“-Markierungen des LHCP mit einer  $\sim 80\%$  Markierungseffizienz ablaufen, bedeutet, dass die eigentliche Transitkomplexkonzentration optimalerweise  $> 12,5$   $\mu\text{mol/l}$  sein sollte. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration direkt im Kopplungsansatz wurde aus den in 4.4.2.2 geschilderten Gründen nicht in Betracht gezogen. Eine Anreicherung nach erfolgter Komplexkopplung, wie sie in 4.4.1 dargestellt ist, zeigte hingegen auch  $\sim 50\%$  des LHCP-Signals in hochmolekularen Fraktionen. Aufkonzentrierungen von Ansätzen mit einem Überschuss von freiem cpSRP54M zeigten ähnliche Ergebnisse. Folglich sollte nach einer Aufkonzentrierungsmöglichkeit gesucht werden, die einen möglichst geringen Oligomerisierungseffekt zeigt.

### 4.4.3.1. Anreicherung spät eluierender Fraktionen der Gelfiltration

Eine Gelfiltration führt dazu, dass die auf die Säule aufgetragene Probe stark verdünnt wird. Die Konzentrationen spät eluierender Fraktionen mit potentiellen ternären Transitkomplexen müssten also erneut aufkonzentriert werden um auf eine für EPR-Messungen genügende hohe Proteindichte zu kommen. Es wurden zu diesem Zweck die Gelfiltrationsfraktionen (Superdex 200) A12-A15 eines Kopplungsansatzes (mit 1 x Überschuss von cpSRP54M) vereint und um den Faktor 8 in Amicon-Röhrchen eingengt.



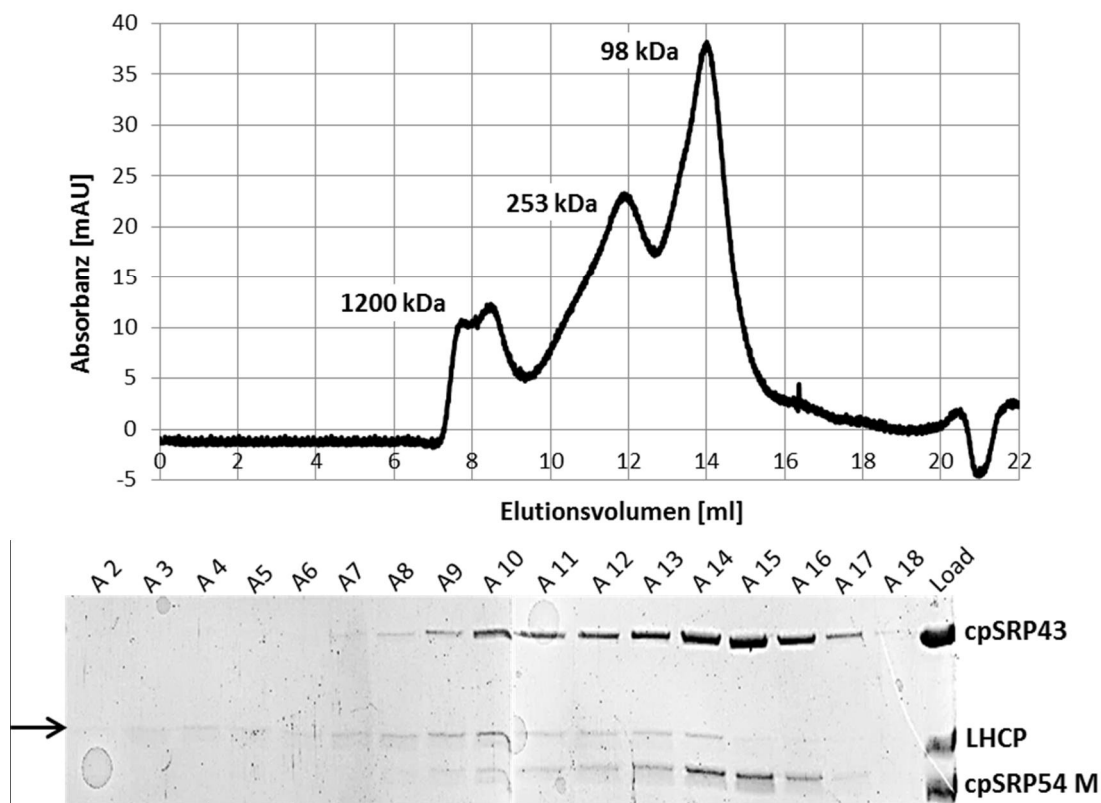
**Abbildung 4.35: Charakterisierung von aufkonzentriertem niedermolekularem cpSRP54M-Transitkomplex.**

Oben: Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramm. Es wurden aus einem 7  $\mu\text{mol/l}$  Transitkopplungsansatz (1 facher Überschuss von freiem cpSRP54M) die niedermolekularen Fraktionen 12-15 (MW-Bereich: 200-100 kDa) gepoolt und mit einer Endkonzentration von 15% Glycerin versetzt. Es folgte eine 8 fache Aufkonzentrierung in 30 kDa Amicons. 250  $\mu\text{l}$  wurden anschließend auf die Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Unten: SDS-PAGE. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 8,5 – 17 ml (A4 – A20) wurden auf einem 15% PAA-Gel untersucht. Es wurden vor Auftrag zu 45  $\mu\text{l}$  jeder Fraktion sowie 10  $\mu\text{l}$  Load  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix gegeben.

In Abbildung 4.36 sind im Gelfiltrationschromatogramm zwei lokale Peaks zu erkennen. Die zugehörige SDS-PAGE zeigt, dass der erste Peak mit einem mittleren apparenten MW von 455 kDa das LHCP-Signal beinhaltet. Dies bedeutet, dass alle im ersten Gelfiltrationslauf noch spät eluierenden mutmaßlich ternären Transitkomplexe im Aufkonzentrierungsschritt oligomerisierten. Außerdem zeigt sich das LHCP-Signal insbesondere im Vergleich zu der cpSRP43-Bande deutlich zu intensiv. Es ist von unstöchiometrischen Komplexen auszugehen.

#### 4.4.3.2. Anreicherung durch Lyophilisation

Die Lyophilisation setzt voraus, zumindest sofern eine starke Anreicherung von Puffersubstanzen oder Salz vermieden werden soll, dass eine flüchtige Puffersubstanz eingesetzt wird. Es bot sich Ammoniumcarbonat an, welches in einer Konzentration von 0,2 mol/l eingesetzt wurde. Zunächst wurde getestet, ob dieser Puffer eine Auswirkung auf die Transitkomplexbildung hat. Es zeigte sich in einem äquimolaren Kopplungsansatz kein Unterschied im Vergleich zum Standard-cpSRP-Puffer (HEPES-Puffer). Das heißt, die Verteilung des LHCP-Signals zwischen hochmolekularem und niedermolekularem Signal blieb konstant (vgl. Abbildung 4.31). 700 µl des 7 µmol/l-Kopplungsansatzes wurden anschließend um den Faktor 2,3 im Lyophilisator eingengt.

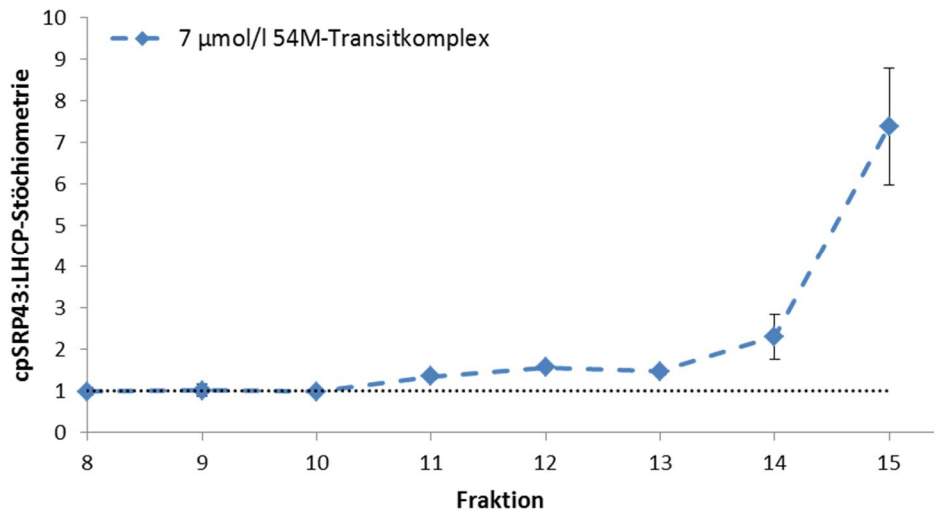


**Abbildung 4.36: Einfluss der Aufkonzentrierung durch Lyophilisation auf cpSRP54M-Transitkomplex.**  
 Oben: Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramm. Es wurden 7 µmol/l 54M-cpSRP-Komplex mit 7 µmol/l LHCP in 0,2 mol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Puffer gekoppelt. Die Transitkomplexe wurden anschließend in flüssigem  $\text{N}_2$  eingefroren und für 2 h bei einem Druck von  $p = 1,03$  mbar lyophilisiert. Die Probe wurde nachfolgend auf Eis aufgetaut und 300 µl (= 2,3 fache Aufkonzentrierung) auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Unten: SDS-PAGE. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 7,5 – 16 ml (A2 – A18) wurden auf einem 15% PAA-Gel untersucht. Es wurden vor Auftrag zu 40 µl jeder Fraktion sowie 10 µl Load  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix gegeben.

In Abbildung 4.36 sind drei lokale Peaks im Elutionschromatogramm zu sehen. Die zugehörige SDS-PAGE zeigt, dass sich das LHCP-Signal von 7,5-14 ml (A2-A14) verteilt. Der Elutionspeak bei 11,9 ml (A10) mit einem apparenten MW von 253 kDa enthält dabei das stärkste LHCP-Signal. Hier zeigt sich wiederum nahezu kein cpSRP54M. Besonders die Tatsache, dass in den frühen Fraktionen (A2-A7) schon schwach LHCP nachgewiesen wird, gleichzeitig aber kein cpSRP-Protein deutet darauf hin, dass der Komplex im Laufe der Lyophilisation denaturierte.

### 4.4.4. Stöchiometriebestimmung im 54M-Transitkomplex

Wie schon für den cpSRP43-LHCP-Komplex sowie den Vollängen-Transitkomplex wurde auch im Falle des 54M-Transitkomplexes eine densitometrische Stöchiometriebestimmung des cpSRP43 zu LHCP vorgenommen. Es gilt das schon in 4.2.5 gesagte. Die hier vorgestellte densitometrische Bestimmung erfolgte mit dem in Abbildung 4.35 gezeigten Ansatz (7  $\mu\text{mol/l}$  Transitkomplex mit 1 x Überschuss von cpSRP54M).



**Abbildung 4.37: Stöchiometrie des 54M-Transitkomplexes.**

Die in 15% PAA-Gelen aufgetrennten Gelfiltrationsfraktionen des 54M-Transitkomplex-Ansatzes wurden densitometrisch ausgewertet. Nach Coomassie G250-Anfärbung und vollständiger Hintergrundentfärbung wurde jede Proteinbande unabhängig voneinander jeweils 3 mal mit der Software Quantity One (BioRad) auf ihre Farbdichte untersucht. Es wurde mit der „Local Background Subtraction“-Methode als Korrektur gearbeitet. Die Stöchiometrien wurden unter Einbezug auf 4.2.5.1 ermittelt.

Abbildung 4.37 zeigt die Stöchiometrieverhältnisse zwischen cpSRP43 und LHCP im Verlauf der Elution des Komplexes. Es zeigt sich bezogen auf die betrachteten Proteine eine relativ konstante Zusammensetzung des Komplexes mit 1:1. Erst ab Fraktion 14 mit einem apparenten MW von 123 kDa zeigt sich eine starke Überrepräsentation des cpSRP43. Dies ist mit der einsetzenden Elution von freiem 54M-cpSRP-Komplex zu erklären.

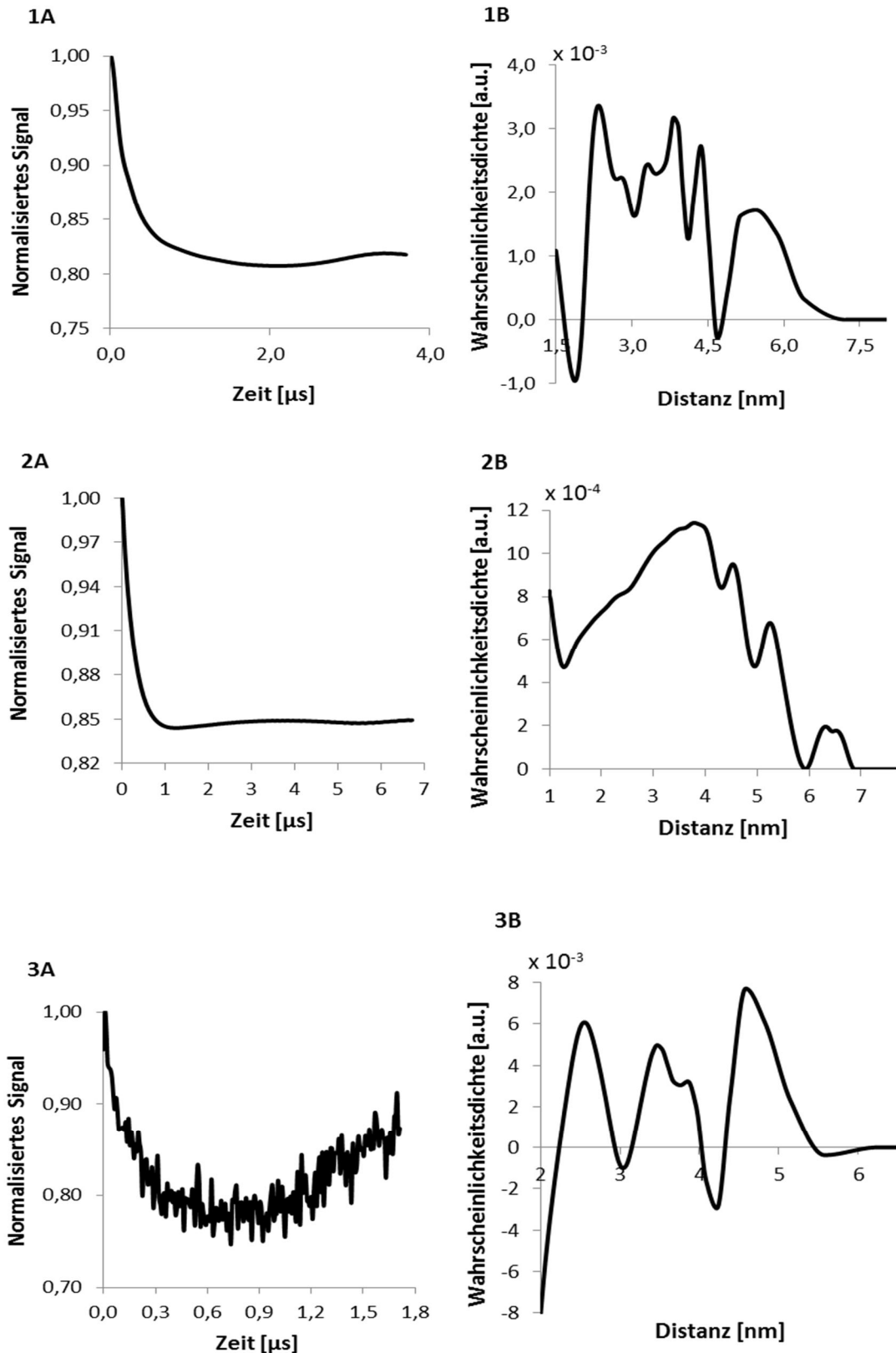
### 4.4.5. EPR-spektroskopische Vermessung des cpSRP54M-Transitkomplexes

Die Kopplungsvariante mit einem 1 x Überschuss von freiem cpSRP54M stellte sich als effektivste Methode zur Generierung potentiell ternärer Transitkomplexe heraus (vgl. 4.4.2.2). Diese Proben zeigten ~ 60% des LHCP-Signals in späten Fraktionen (ab A11), deren apparentes MW < 240 kDa war. Es konnte für den ternären 54M-Transitkomplex (apparentes MW ~135 kDa) ab dieser Fraktion (bzw. ab diesem apparenten MW) mit einer einsetzenden Elution des ternären Komplexes gerechnet werden. Gleichzeitig sollte unterhalb dieses apparenten MW nicht mehr mit der Elution von oligomerisierten Spezies zu rechnen sein. Diese Proben boten eine Möglichkeit EPR-spektroskopische Messungen vorzunehmen. Eine grundlegende Voraussetzung für diese physikalische Messmethode ist

die Präsenz von weitestgehend vereinzelt spin-markierten Proteinen, zumindest sofern diese nicht in symmetrischer Anordnung (z.B. LHCII-Trimere) zueinander orientiert sind. Bei double electron electron resonance (DEER)-EPR-Messungen können Distanzen zweier paramagnetischer Zentren (Einführung durch Markierung mit proteinreaktivem paramagnetischem „spin-label“) in einem Molekül gemessen werden. Multi-spin Systeme mit stark variierenden Distanzen der paramagnetischen Zentren in Folge von unspezifischer Proteinaggregation liefert hingegen nicht-interpretierbare Ergebnisse und können somit auch als indirekte Aggregationskontrolle eingesetzt werden (vgl. auch Diskussion 5.2.7).

#### **4.4.5.1. EPR-Vermessung von Total-Transitkomplexansätzen**

Prinzipiell wurden DEER-EPR-Messungen mit dem Ziel der Distanzmessung innerhalb des im 54M-Transitkomplex gebundenen spin-markierten LHCP durchgeführt. Es wurde zum einen die Doppelcysteinmutanten S59C/V90C mit Markierungsstellen für IAA-PROXYL am Anfang und Ende der TMH1 des LHCP verwendet. Diese Mutante könnte potentiell den Grad der Ausbildung der hydrophoben  $\alpha$ -Helix und somit einer beginnenden Sekundärstrukturausbildung anzeigen. Als weitere Mutante wurde S106C/S160C verwendet. Die 106er Position ist im LHCII) luminal direkt hinter der amphiphilen  $\alpha$ -Helix zwischen TMH1 und TMH2 positioniert. Die 160er Position liegt stromal orientiert und taucht leicht in die Membranphase ein. Beide Positionen kommen sich im gefalteten Zustand des Komplexes im Gegensatz zu ihrer weiten Distanz in der Aminosäuresequenz relativ nahe. Als Aggregationskontrollen wurden die Mutanten V90C sowie S106C verwendet. Sowohl Markierung mit IAA-PROXYL als auch die spätere Transitkomplexbildung mit 1 x molaren Überschuss von cpSRP54M wurde für alle Proben in gleicher Weise durchgeführt. Die Kopplung erfolgte bei 7  $\mu\text{mol/l}$  Konzentration der Transitkomplexbestandteile. Ein Aliquot jedes Ansatzes wurde per Gelfiltrationslauf auf dessen Zusammensetzung untersucht. Es ergab sich prinzipiell ein sehr ähnliches Elutionsverhalten der gebildeten 54M-Transitkomplexe wie in Abbildung 4.34 gezeigt (Ergebnisse im Anhang gezeigt). Die Chromatogramme wiesen jedoch jeweils einen kleinen zusätzlichen lokalen Peak bei 408 kDa (S106C-54M-Transit) bzw. 335/345 kDa (S59C/V90C-54M-Transit sowie V90C-54M-Transit) auf. Die SDS-PAGEs der fraktionierten Gelfiltrationseluat zeigen jedoch bei allen Proben ~ 60% des LHCP-Signals in den späten Fraktionen ab A11 (siehe Anhang). Für die EPR-Proben wurde der (ursprüngliche) Total-Transitkopplungsansatz verwendet.



**Abbildung 4.38: DEER-EPR Messungen von 54M-Transitkomplexen.**

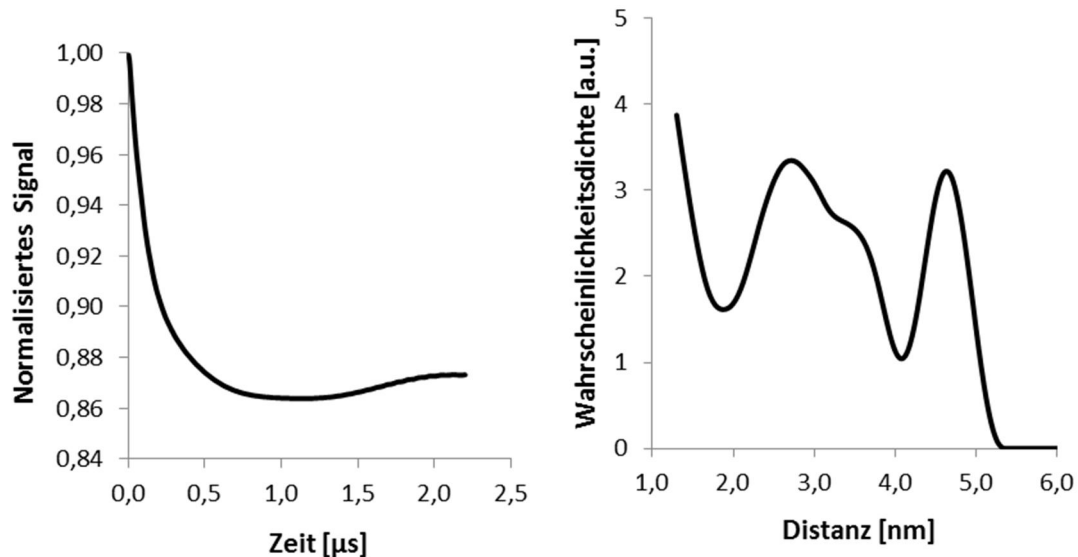
54M-Transitkomplexe mit einer effektiven Konzentration von 4-5  $\mu\text{mol/l}$  von IAA-PROXYL markiertem LHCP-Mutanten wurden im Q-Band EPR-Spektrometer vermessen. **A:** Primäre EPR-Daten; **B:** Distanzverteilungen. **1:** V90C-54M-Transitkomplex; **2:** S59C/V90C-54M-Transitkomplex; **3:** S106C-54M-Transitkomplex.



In Abbildung 4.38 sind die Ergebnisse der DEER-EPR-spektroskopischen Vermessung zu sehen. Die Abklingkurven (Normalisiertes Signal) der Transitkomplexe mit Einfachcysteinmutante (Aggregationskontrollen) deuten auf eine Spin-Spin-Interaktion hin, da sie keinen Abfall entsprechend einem 3D-Hintergrund (einfache exponentielle Funktion) zeigen (mündliche Mitteilung von Dr. Yevhen Polyhach, ETH Zürich). Sofern keine Spin-Spin Wechselwirkung stattfindet, wie es bei tatsächlich ternären Komplexen mit vereinzelt LHCPs sein sollte, hätte jedoch aber gerade dies der Fall sein müssen. Die aus den primären Daten abgeleiteten Distanzverteilungen zeigen für die Einzelscysteinmutanten breite Spektren. Es ist bei diesen Proben durchaus möglich, dass der aggregierte Anteil an Transitkomplexen (~40%), welcher schon aus den Gelfiltrationsläufen bekannt war, für dieses Signal verantwortlich ist (mündliche Mitteilung Dr. Yevhen Polyhach). Es wurde bei der Spin-Markierung der LHCP-Mutanten keine Spinmarkierungseffizienz ermittelt. Wäre diese bekannt gewesen, hätte eine ungefähre Quantifizierung des Aggregationsanteils bzw. des Oligomerisierungsgrads ermittelt werden können. Jedoch bestätigen die EPR-Daten, dass der Anteil an potentiell Aggregationssignal in der Probe S106C-54M-Transitkomplex relativ höher war als in der V90C-54M-Transitkomplex Probe. Somit kann gesagt werden, dass die Interpretation der Gelfiltrationsdaten den tendenziellen Grad der Aggregation schon ganz gut widerspiegelt. Aufgrund des Aggregationssignals der Einfachcysteinmutanten kann die Probe S59C/V90C-54M-Transitkomplex nicht interpretiert werden. Aus gleichem Grund wurde davon abgesehen, die Probe S106C/S160C-54M-Transitkomplex zu vermessen. Es kann aufgrund dieser Ergebnisse (EPR-spektroskopische Messungen) weder die Hypothese tatsächlich existierender ternärer Transitkomplexe eindeutig widerlegt noch entscheidend unterstützt werden. Der Hintergrund vom oligomerisiertem bzw. aggregiertem Material überlagert das potentiell spezifische Signal ternärer Transitkomplexe.

#### 4.4.5.2. EPR-Vermessung einer Gelfiltrations-gereinigten Fraktion eines Transitkomplexansatzes

Es wurde die Probe V90C-54M-Transitkomplex mit einem einfachen Überschuss von cpSRP54M gelfiltrationsgereinigt und die spät-eluierende Fraktion A15 – Elutionspeak des Transitkomplexes- mit einem mittleren apparenten Molekulargewicht von 143 kDa (Ergebnisse im Anhang gezeigt) als EPR-Probe verwendet. Diese späte Fraktion sollte entsprechend ihres Elutionsverhaltens die Cysteinmutante V90C nur in vereinzelter Form, also gebunden in einem ternären 54M-Transitkomplex enthalten. Eine DEER-EPR-spektroskopische Vermessung sollte also kein Signal liefern. Diese Einzelfraktion des Gelfiltrationslaufs wies nach Abschätzung aus der SDS-PAGE eine Konzentration von 1,5  $\mu\text{mol/l}$  PROXYL-markierten LHCP auf.



**Abbildung 4.39: DEER-EPR Messung einer Gelfiltrationsfraktion von 54M-Transitkomplex.**

54M-Transitkomplexe mit einer effektiven Konzentration von  $\sim 1,5 \mu\text{mol/l}$  von IAA-PROXYL markiertem LHCP-Mutanten wurden Fraktion 15 (mittleres apparentes MW von  $\sim 143 \text{ kDa}$ ) eines Superdex 200 Gelfiltrationslaufs einer 54M-Transitkomplexe mit 1 fachem Überschuss von cpSRP54M wurde im Q-Band EPR-Spektrometer vermessen. Die effektive Konzentration der PROXYL-IAA markierten (LHCP) V90C-Mutanten betrug  $\sim 1,5 \mu\text{mol/l}$ .

Auch die gelfiltrationsgereinigte Transitkomplexfraction aus Abbildung 4.39 zeigt keinen reinen exponentiellen Abfall des Signals in der Abklingkurve (Normalisiertes Signal). Es ist also auch hier von gewissen Spin-Spin-Interaktion auszugehen. Entsprechend ergibt sich eine ähnliche breite Distanzverteilung wie bei der gleichen LHCP-Mutante aus Abbildung 4.38 (Total-Transitkomplexansatz). Jedoch unterscheiden sich die Modulationstiefen signifikant voneinander: Die V90C-Probe aus 4.4.5.1 zeigt eine von 0,2. Im Fall der gereinigten Probe beträgt diese nur noch 0,13 (siehe Normalisiertes Signal). Obwohl die Probe nicht Signal-frei ist, zeigt sich relativ weniger Aggregationssignal. Die DEER-EPR-Messungen unterstützen die Idee von reinen ternären Transitkomplexen nicht vollständig, widersprechen diesen aber auch nicht (mündliche Mitteilung von Dr. Yevhen Polyhach, ETH Zürich). Insgesamt war es aber aufgrund des noch zu hohen Anteils von oligomeren Komplexspezies im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich Distanzmessungen im Transitkomplex-gebundenen Zustand des LHCP durchzuführen. Der potentielle Gegensatz zwischen Gelfiltrationsdaten und EPR-Ergebnissen, besonders im Hinblick auf die hier zuletzt vorgestellten Ergebnisse, soll Gegenstand der Diskussion sein.

#### 4.5. Natives cpSRP / Transitkomplex mit nativem cpSRP

Payan und Cline konnten schon 1991 eine lösliche Spezies stromalen LHCPs nachweisen. Sie zeigten anhand nativer Gelelektrophorese, dass bei einer Inhibierung der Thylakoidinsertion eine stromale Spezies des LHCPs bei einer apparenten Molekularmasse von 120 kDa im nativen Gel migrierte. Eine stromale Spezies aus rekombinantem radioaktiv-markiertem LHCP, welcher in intakte Chloroplasten inseriert wurde, zeigte die gleiche elektrophoretische Mobilität. Li et al. (1994) konnten cpSRP54, welches das Homolog zu cytosolischem SRP54 darstellt, als Bestandteil des stromalen Komplexes identifizieren. Schünemann et al. (1998) konnten schließlich das Chloroplasten-exklusive cpSRP43 als weiteren Bestandteil der nunmehr als Transitkomplex bezeichneten stromalen Spezies identifizieren. Weitere stromale Faktoren, welche für die Solubilisierung des Membranproteins in Stroma notwendig sind, konnten nicht nachgewiesen werden. Die Daten zur molekularen Masse des Transitkomplexes (120 kDa) von Payan und Cline stimmen gut mit einem potentiellen ternären Komplex der Proteinkomponenten überein. Neben dieser Studie existieren in der Literatur hingegen keine weiteren Angaben bezüglich der genauen stöchiometrischen Zusammensetzung. Lediglich Schünemann et al. (1998) konnten bei der Gelfiltrationschromatographischen Untersuchung von Stromaextrakt (SE) nativen cpSRP-Komplex bei einem apparenten Molekulargewicht von 200 kDa detektieren. Die Motivation, Stromaextrakt und somit natives cpSRP als molekulares Chaperon für rekombinanten LHCP zu verwenden, erwuchs aus zwei Gründen: 1. Wie in Kapitel 4.1 dargestellt wurde, zeigte rekombinanter Vollängen-cpSRP ein ausgeprägtes Oligomerisierungsverhalten. Zwar existieren mit Schünemann et al. und Groves et al. (2001) Paper, welche keine oder zumindest keine solche ausgeprägte Oligomerisierung beschreiben, dennoch sollte dies im nativen System überprüft werden. 2. Wie die letzten Kapitel zeigten, ist cpSRP-Komplex alleine in der Lage, LHCP quantitativ zu solubilisieren. Gleichzeitig zeigten die vorangegangenen Kapitel jedoch auch ein mehr oder weniger intensives Oligomerisierungsverhalten des rekombinanten Transitkomplexes. Hinsichtlich des letzten Punktes existierten in der Literatur keine Angaben. Transitkomplexansätze mit stromalem Extrakt sollten deshalb klären, ob u.U. stromale Faktoren die Vereinzelung der Komplexe stimulieren, respektive die Oligomerisierung verhindern.

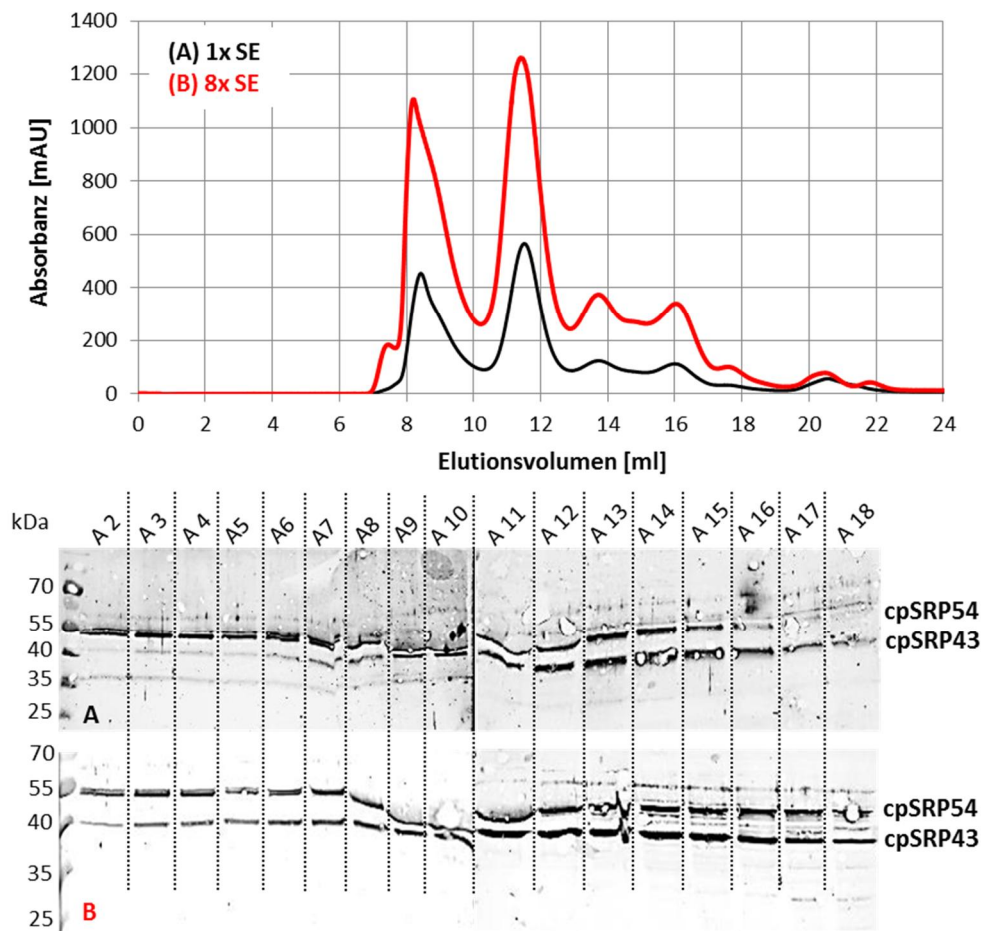
Da Stromaextrakt eine Vielzahl verschiedener löslicher Proteine beinhaltet, machte dies die Verwendung von Antikörpern gegen cpSRP43 und cpSRP54 als Nachweis notwendig. Beide Antikörper wurden dankenswerter Weise von der [REDACTED] bereitgestellt. Es handelte sich dabei um polyklonale Antikörper aus Kaninchen. Die Gewinnung von stromalem Extrakt erfolgte aus 8-11 Tage alten Erbsenpflanzen. Dieser frühe Zeitpunkt kurz nach der Ergrünung der Pflanzen, bei welchem die Primärblätter noch nicht vollständig entfaltet waren, sollte einen hohen Anteil von nativem cpSRP im Stromaextrakt gewährleisten. Tatsächlich konnten keine signifikanten Unterschiede in der Ausbeute von nativem cpSRP abhängig von der Wachstumsphase (Zeitraum des Wachstums: 8-11 Tage) festgestellt werden. Auswertungen des Anteils von cpSRP-Protein im

Vergleich zum Totalprotein des Stromaextraktes ergeben, dass dieses  $\sim 1/1000$  des Totalproteins des Stromaextraktes ausmacht. Es konnten cpSRP-Ausbeuten einer Konzentration von wenigen ng/ $\mu$ l isoliert werden. Nähere Daten zur Quantifizierung des Stromaextrakts sind in der Diplomarbeit von Antonia Schad (2014) nachzulesen.

### 4.5.1. Charakterisierung von nativem cpSRP

Die standardmäßige Lagerung von isoliertem Stromaextrakt erfolgte in flüssigem N<sub>2</sub>. Es konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass der damit verbundene Frier-Tau-Zyklus keinen erkennbaren Unterschied auf das Fraktionsverhalten des nativen cpSRP bei Gelfiltration verursacht. In Abbildung 4.40 ist ein Gelfiltrationslauf (Superdex 200) eines 1 x sowie eines 8 x aufkonzentrierten Stromaextraktes zu sehen. Die analogen Chromatogramme weisen einen Stroma-spezifischen Verlauf mit 2 lokalen Peaks auf. Ersterer tritt bei einem Elutionsvolumen von 8,3 ml nahezu im Ausschlussvolumen der Säule auf. Das zweite Maximum läuft bei 11,4 ml mit einem apparenten MW von  $\sim 500$  kDa. Der Peak zeigt die Elution der RuBisCO. Somit konnte auch von der Integrität des SE ausgegangen werden. Erst die geblohteten Gelfiltrationsfraktionen können die Fraktionierung des cpSRP43 sowie cpSRP54 nach immunodetektischer Aufarbeitung sichtbar machen. In A (1 x SE) zieht sich das cpSRP54-Signal nahezu über den kompletten Molekulargewichtsbereich von  $> 1000$  kDa (A2) – 80 kDa (A15). cpSRP43-Signal taucht sehr schwach in den frühen Fraktionen auf. Die hauptsächliche Elution setzt ab einem apparenten MW von 500 kDa (Fraktion A8) ein. Die Fraktionen A8-A10/A11 sind aufgrund der Coelution der RuBisCO und deren hoher Abundanz etwas verzerrt. Die Fraktionen A11-A14/A15 mit einem apparenten MW von 300–80 kDa zeigen die Coelution der beiden cpSRP-Komponenten. Nativer cpSRP-Komplex sollte somit ein mittleres apparentes MW von  $\sim 200$  kDa haben. Diese Masse deckt sich direkt mit dem von Schünemann et al. (1998) beobachteten MW. Es wird aber auch deutlich, dass der native cpSRP über einen sehr breiten Bereich eluiert (500-80 kDa), weshalb höchstwahrscheinlich nicht von einer monodispersen nativen Komplexspezies auszugehen ist. Das hochmolekulare cpSRP54-Signal (A2-A6) entstammt höchstwahrscheinlich nicht dem cpSRP-Komplex, sondern stellt stromales ribosomal-gebundenes 54er Protein dar (siehe Diskussion 5.2.8).

In B (8 x SE) ist prinzipiell ein gleiches Elutionsverhalten zu erkennen. Jedoch nehmen die Signale (insbesondere das cpSRP43) in den hochmolekularen Fraktionen (vgl. A6-A8) mit einem apparenten MW von 500–800 kDa relativ stärker zu. Nichtsdestotrotz läuft der Hauptteil des Komplexes weiterhin in den spät-eluierenden Fraktionen. Es kann aufgrund dieser Aufkonzentrierungsversuche geschlossen werden, dass auch nativer cpSRP bei Aufkonzentrierung tendenzielles Oligomerisierungsverhalten zeigt.



**Abbildung 4.40: Einfluss der Aufkonzentrierung von Stromaextrakt auf natives cpSRP.**

Oben: Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramme. Das SE stammte aus der Aufarbeitung von 11 Tage alten Erbsenpflanzen. Die Lyse der gewaschenen Chloroplasten erfolgte bei einer Konzentration von 1,5 mg Chlorophyll/ml Suspension. Abzogener Überstand wurde nach Lagerung in flüssigem N<sub>2</sub> vor Auftrag auf die Säule erneut bei 18000 rpm (Hettich-Kühlzentrifuge) 10 min zentrifugiert. Die Aufkonzentrierung des SE erfolgte mit 10 kDa Amicons. Es wurden 500 µl 1 x SE bzw. 200 µl 8 x aufkonzentriertes SE auf die Säule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Unten: Immunoblot mit Anti43-/Anti54-Antikörper der Superdex 200 Gelfiltrationsfraktionen. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 7,5 – 16 ml (A2 – A18) wurden auf einem 15% PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Standardblockung. Es erfolgte eine Inkubation mit Anti43- sowie Anti54-Antikörper. Weitere Standardaufarbeitungsschritte. **A** zeigt den Immunoblot der Gelfiltrationsfraktionen von 1x SE. **B** zeigt den Immunoblot der Gelfiltrationsfraktionen von 8 fach aufkonzentriertem SE.

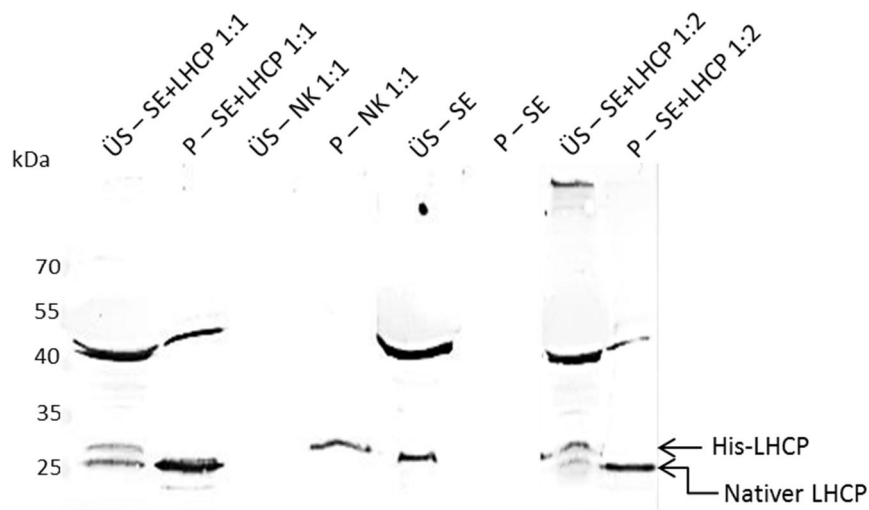
Dem in Abbildung 4.40 verwendeten SE wurde vor Auftrag auf die Gelfiltrationsssäule (Laufpuffer enthält 2 mmol/l β-ME) kein zusätzliches Reduktionsmittel zugegeben. Es konnte vermutet werden, dass u.U. eine Oxidation mit Ausbildung von Disulfidbrücken für das teilweise hochmolekulare Laufverhalten des Komplexes verantwortlich ist. Ebenso könnten vielleicht Salzbrücken in dem durch den Lysepuffer verdünnten SE zu einer artifiziellen Oligomerisierung geführt haben. 1 x SE mit Zusatz von 100 mmol/l β-ME sowie solches mit 100 mmol/l β-ME und 500 mmol/l NaCl wurde anschließend ebenfalls auf dessen Fraktionierung in der Gelfiltration untersucht. Es zeigten sich in den Blots keine signifikanten Unterschiede. In beiden Fällen setzte ab Fraktion A8 (= 500 kDa) die Elution von cpSRP43 ein. Es konnte auch hier von einem gewissen Anteil oligomerisierter cpSRP-Komplexe ausgegangen werden.

### 4.5.2. Transitkomplexbindung in Stromaextrakt

Es standen zu Beginn der Arbeiten mehrere Strategien zur Auswahl, den Einfluss von Stromaextrakt auf die Transitkomplexbindung zu testen. Zum einen war dies die Bindung von rekombinantem LHCP mit nativem cpSRP. Zu diesem Zweck sollte im Vorfeld zunächst die generelle Aktivität des nativen cpSRP nachgewiesen werden. Zum anderen sollte überprüft werden, ob die Bindung von rekombinanten Transitkomplexkomponenten in SE ein anderes Oligomerisierungsverhalten der Komplexe im Vergleich zu den klassischen *in vitro*-Versuchen zeigt. Im Zusammenhang mit Bindungen in SE wurden stets Urea-vorsolubilisierter LHCP verwendet.

#### 4.5.2.1. Aktivitätstest von nativem cpSRP

Nativer cpSRP ist dann aktiv, wenn er rekombinanten zugesetzten LHCP in Lösung halten kann. Für die vorgestellten Aktivitätstests wurde standardmäßig in flüssigem N<sub>2</sub> gelagertes SE verwendet. Im Vorfeld wurde eine Konzentrationsbestimmung des nativen cpSRP mittels eines Immunoblots durchgeführt. Die Signale des nativen cpSRP definierter Volumina SE wurden mit gleichzeitig aufgetragenen bekannten Mengen von rekombinanten cpSRP verglichen. Aufgrund der Bandenintensitäten wurde eine Konzentrationsabschätzung vorgenommen. Es wurden äquimolare bzw. überstöchiometrische Mengen von rekombinantem LHCP zu vorgelegtem SE gegeben. Die Überstände (ÜS) sowie die Pellets (P) der Ansätze wurden mit gleichzeitig durchgeführten Negativkontrollen (vorgelöster LHCP in 20 mmol/l Pufferlösung) verglichen. Abbildung 4.41 zeigt die untersuchten Proben auf einem mit LHCP-Antikörper inkubierten Blot. Es treten insgesamt vier verschiedene Banden auf. Die Bande kurz überhalb von 40 kDa kann als Stromaextrakt-spezifisch beschrieben werden, da sie außer in den Transitkomplexproben auch im ÜS des reinen SE (Bahn ÜS-SE) auftritt. Weitere 2 Banden treten bei bzw. knapp überhalb von 25 kDa auf. Die untere zeigt sich ebenso im reinen SE; die obere im Pellet der Negativkontrolle (Bahn 4). Da zur Bindung rekombinantes His-LHCP eingesetzt wurde, kann die obere Bande als solches identifiziert werden. Das untere Signal stellt nativen LHCP dar, der bei der Aufarbeitung im SE verblieb (siehe Diskussion). Der rekombinante LHCP ist wegen seines His<sub>6</sub>-tags ca. 600 Da schwerer als wildtypischer LHCP und wird deshalb in den 15% Gelen von diesem aufgetrennt. Da sich im Falle des äquimolaren SE-Ansatzes (Bahn 1+2) kein His-LHCP-Signal im Pellet zeigte, ist von einer quantitativen Solubilisierung und Aktivität des nativen cpSRP auszugehen.



**Abbildung 4.41: Aktivitätstest von nativem cpSRP.**

Immunoblot mit Anti-LHCP. 40  $\mu$ l Stromaextrakt (SE) wurden mit einer äquimolaren Menge (1:1) bzw. doppelten stöchiometrischen Überschuss (1:2) von Urea-solubilisiertem LHCP zusammen gegeben. Die Proben wurden bei RT und 100 rpm für 30 min. auf dem Schüttler inkubiert. Bei der entsprechenden Negativkontrolle (NK) wurde das SE durch 20 mmol/l Tris (pH 8,0) ersetzt. Es folgte eine Zentrifugation bei 15000 rpm (Hettich-Kühlzentrifuge) für 15 min. Der Überstand (ÜS) wurde abgezogen; das Pellet (P) in 20  $\mu$ l 2% SDS rückgelöst. Die Fraktionen wurden nach Zugabe von  $\frac{1}{4}$  Endvolumen 3-4 x Auftragsmix jeweils vollständig auf 15% PAA-Gele aufgetragen. Anschließend folgte ein Standardblotverfahren mit Inkubation von LHCP-Antikörper.

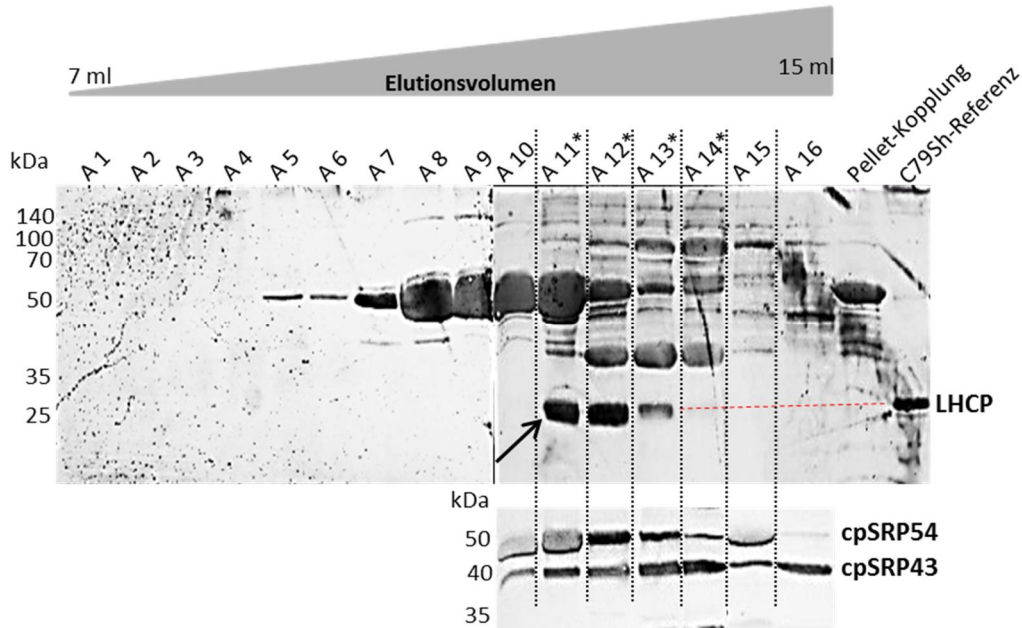
Bahn 7+8 (ÜS/P-SE+LHCP 1:2) zeigen den Überstand und das Pellet eines Ansatzes mit einem 2 x molaren Überschuss von rekombinantem LHCP. Es zeigt sich wiederum kein His-LHCP-Signal im Pellet. Jedoch tritt ein viertes LHCP-Signal am oberen Blotrand der ÜS-Fraktion auf. Nach Auftreten des nativen LHCP-Signals bei den Aktivitätstests wurde das konventionell aufgearbeitete SE vor der Verwendung immer nochmal zusätzlich hochtourig zentrifugiert. Es konnte jeweils ein grünes Pellet identifiziert werden und der Überstand verblieb nur noch sehr schwach grün. Es konnte danach kein natives LHCP im SE mehr nachgewiesen werden (vgl. Diskussion 5.2.8).

Die Ergebnisse des Aktivitätstests ließen die Interpretation der vollen Aktivität des nativen cpSRP zu. Es wurden im Anschluss äquimolare Transitkopplungen von nativen cpSRP mit rekombinantem LHCP durchgeführt und gelfiltrationschromatographisch untersucht. Die Kopplungen erfolgten bei einer Endkonzentration der Transitkomplexkomponenten von 0,35  $\mu$ mol/l. Das SE wurde dazu zunächst 3 x aufkonzentriert. Die Fraktionierung der Gelfiltrationsläufe ließ jedoch nahezu kein LHCP-Signal in den spät-eluierenden Fraktionen mit einem apparenten MW von  $\sim$ 225 kDa (wäre unter Annahme der LHCP-Vereinzelung im Transitkomplex aufgrund des Laufverhaltens von nativem cpSRP (200 kDa) anzunehmen) erkennen. Vielmehr zeigte sich LHCP-Signal am oberen Blotrand (entsprechend Abbildung 4.41– Bahn 7) in den hochmolekularen Fraktionen mit einem apparenten MW von  $>$  1000–750 kDa. Somit zeigten diese Ansätze zwar eine Aktivität im Sinne der generellen Solubilisierung des LHCP durch nativen cpSRP, dennoch war es im Rahmen der Verwendung von nativen cpSRP als Solubilisierungsfaktor nicht möglich LHCP tatsächlich in niedermolekularen Fraktionen entsprechend dem potentiellen Laufverhalten von ternärem Transitkomplex anzutreffen. Vielmehr zeigte sich das LHCP-Signal wie oben erwähnt in den hochmolekularen Fraktionen. Somit

## Ergebnisse

war von der Oligomerisierung der Komplexe oder auch einer unspezifischen Aggregation des LHCP auszugehen (vgl. Diskussion).

Entscheidend für die Transitkomplekkopplung von rekombinanten Komponenten war der Einsatz von nicht vor-oligomerisiertem Vollängen-cpSRP (vgl. 4.1.2.3), da dieser anders als in der Detergenz-Standard-Methode in Verbindung mit SE-Ansätzen im Verlauf der Methode nicht de- und wieder renaturiert wurde. Es wurde für die hier vorgestellte Kopplung cpSRP aus einer 0,4 mg/ml-Aufarbeitung (siehe Abbildung 4.10) verwendet.



**Abbildung 4.42: Transitkopplung von rekombinantem cpSRP mit rekombinantem LHCP in SE.**

Oben: Immunoblot mit Anti-LHCP. 3-fach in 10 kDa Amicons aufkonzentriertes SE wurde zur Entfernung von nativem LHCP bei 4°C, 15 min. bei 18000 rpm (Hettich-Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Rekombinanter cpSRP wurde in 4-fach stöchiometrischem Überschuss (Endkonzentration: 1,4 µmol/l) im SE vorgelegt und Urea-solubilisierter LHCP (C79Sh) in einer Endkonzentration von 0,35 µmol/l zugegeben. Es folgte eine Standardkopplung. Die Pelletfraktion der Kopplung wurde in 500 µl 2% SDS rückgelöst (Pellet-Kopplung). 500 µl des Überstands wurden auf die Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Die Fraktionen A11\*-A14\* wurden mit 10 kDa Amicons auf 1/5 des Ursprungsvolumens eingengt. Jeweils 40 µl jeder Fraktion bei einem Elutionsvolumen von 7-15 ml (A1 - A16) wurden auf einem 15% PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose geblottet. Standardblockung. Es erfolgte eine Inkubation mit Anti-LHCP-Antikörper. Weitere Standardaufarbeitungsschritte. Ganz rechte Bahn: 200 ng LHCP (C79Sh).  
Unten: Ablauf entsprechend oben. Immunoblot mit Anti-43- sowie Anti-54-Antikörper.

Die Kopplung erfolgte mit einem 4 x stöchiometrischen Überschuss von cpSRP-Komplex zu LHCP, welches in einer Endkonzentration von 0,35 µmol/l eingesetzt wurde. Das eingesetzte Stromaextrakt wurde zuvor 3 x aufkonzentriert. Die Motivation bestand darin, dass ein möglicherweise oligomerisierungsmindernder bzw. -verhindernder Faktor des SE nicht limitierend wirkt. In Abbildung 4.42 ist die Fraktionierung der Gelfiltration zu sehen. Trotz spezifischen immunochemischen Nachweises mit LHCP-Antikörper ist eine Vielzahl von Fremdsignalen erkennbar. Die große Untereinheit der RuBisCO (fettes Signal in A7 – A13 bei ~50 kDa) trat bei LHCP-Immunoblots immer wieder stark in Erscheinung. Die mit einem \*-markierten Fraktionen



wurden vor Auftrag auf das Gel 1:5 aufkonzentriert. Diese Fraktionen zeigen trotz standardmäßigen Blockens mit 3% BSA starke Kreuzsignale. Ein Grund für das starke (aber nicht generelle) Auftreten der Kreuzsignale ist sicherlich eine zu lang gewählte Anfärbezeit. Nichtsdestotrotz kann LHCP-Signal in den Fraktionen A11-A13 aufgrund der gleichen Laufhöhe mit einer C79Sh-Referenz (siehe rote Linie) identifiziert werden. Diese Fraktionen haben ein apparentes MW von 240-156 kDa. Synchron wurde ein Blot der Fraktionierung des cpSRPs vorgenommen. Es zeigt sich in den gleichen Fraktionen cpSRP-Komplex. Dessen Elution geht noch über die LHCP-haltigen Fraktionen hinaus (A14+A15). Hier sollte es sich um freies überschüssiges cpSRP handeln. Die Fraktionen A11+A12 zeigen alle Komponenten des Transitkomplexes. Darüber hinaus wies der eingesetzte rekombinante cpSRP aus Abbildung 4.10 ein mittleres apparentes MW von ~155 kDa auf. Folglich kann von potentiell ternärem Transitkomplex ausgegangen werden.

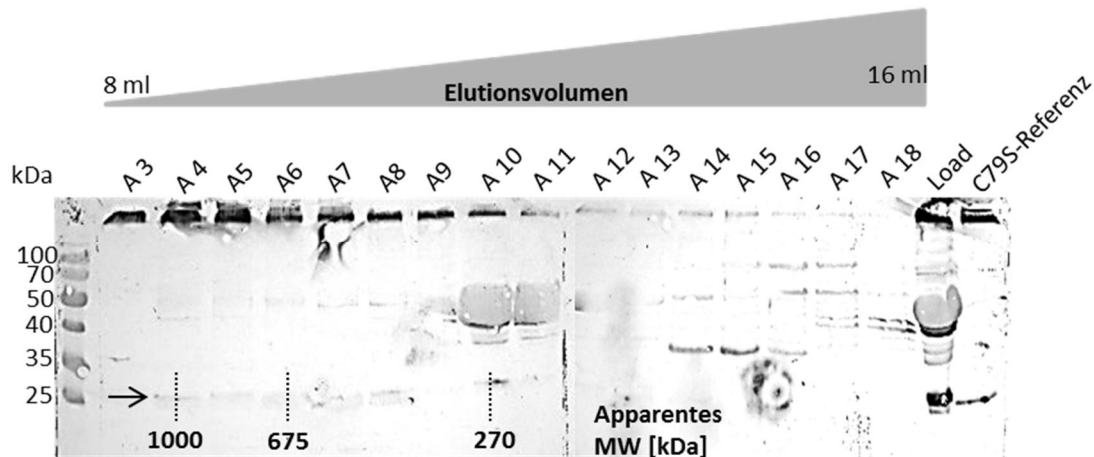
Im Folgenden wurden Transitzkopplungen mit rekombinanten Proteinen in SE bei höheren Konzentrationen durchgeführt. Ansätze mit einer Konzentration von 2-7  $\mu\text{mol/l}$  Komplex zeigten immer nur LHCP-Signal am oberen Blotrand (entsprechend Abbildung 4.41– Bahn 7) in den hochmolekularen Fraktionen  $> 1000$  kDa. Die oben gezeigten Ergebnisse konnten also bei höheren Konzentrationen der rekombinanten Transitzkomplexkomponenten in SE nicht reproduziert werden. Zudem wurden in diesem Rahmen ebenfalls Versuche zum Einfluss verschiedener Stromakonzentrationen unternommen. Es zeigte sich hierbei, dass eine Transitzkomplekkopplung in mehrfach aufkonzentriertem SE tendenziell sogar stärker oligomerisierte. Dieses Ergebnis widersprach den oben gezeigten Ergebnissen und soll später diskutiert werden. Detailliertere Angaben zum Einfluss verschiedener Stromakonzentrationen sowie Transitzkomplekkopplungen in SE bei höheren Konzentrationen finden sich in der Diplomarbeit von Antonia Schad (2014).

#### 4.5.2.2. Transitzkomplekkopplung von 54M-Transitzkomplex in Stromaextrakt

In 4.4 wurde beschrieben, dass die konventionelle Transitzkomplekkopplung mit 54M-cpSRP-Komplex hinsichtlich der Generierung potentieller ternärer Komplexe der Verwendung von Volllängen-cpSRP überlegen ist. Jedoch zeigten auch diese Komplexe ein insgesamt heterogene Zusammensetzung mit potentiell unterschiedlichen Oligomerisierungsgraden (vgl. 4.4.1). Es sollte dennoch eine 54M-Transitzkomplekkopplung in SE charakterisiert werden. Es wurde aufgrund der Ergebnisse aus 4.4.2.1 anders als zuvor His-tag freier LHCP eingesetzt. Die äquimolare Kopplung der Komponenten erfolgte entsprechend den Ansätzen in HEPES-Puffer bei einer Konzentration von 7  $\mu\text{mol/l}$ . Abbildung 4.43 zeigt die Fraktionierung der Gelfiltration. Es tauchen im Blot neben der RuBisCO (Fraktion A10/11) ein paar Fremdsignale auf (Fraktion A14-A17). Spezifisches LHCP-Signal findet sich auch hier ungewöhnlich am oberen Blotrand in den Fraktionen A3–A10 laufend. Diese Signale zeigen eine lösliche LHCP-Spezies mit einem apparenten MW bei  $\gg 1000$ -500 kDa. Die Tatsache, dass diese LHCP-Spezies nicht in das Trenngel einläuft, bedeutet, dass diese hochmolekulare Addukte auch bei

## Ergebnisse

Standardvorbehandlung mit SDS-PAGE Auftragspuffer bestehen bleiben. Der Pfeil indiziert in diesen Fraktionen bei 25 kDa ein schwaches Signal. Diese Laufhöhe entspricht C79S und kann als His-tag freies LHCP identifiziert werden. Es zeigt sich demnach eine minimale Fraktion des LHCP als monomolekulares Signal. Dieses „Fraktionierungs-, bzw. Laufverhalten in der SDS-PAGE konnte auch wiederholt von A. Schad (Diplomarbeit, 2014) beobachtet werden.



**Abbildung 4.43: Transitzkopplung von rekombinantem 54M-cpSRP-Komplex und LHCP in SE.**

Immunoblot mit Anti-LHCP. 3 fach in 10 kDa Amicons aufkonzentriertes SE wurde zunächst zur Entfernung von nativem LHCP bei 4°C, 15 min. bei 18000 rpm (Hettich-Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Rekombinanter 54M-cpSRP-Komplex wurde mit einer Endkonzentration von 7 µmol/l in SE vorgelegt und Urea-solubilisierter LHCP (C79S) in äquimolarer Konzentration zugegeben. Es erfolgte eine Standardkopplung. 500 µl des Überstands wurden auf die Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Jeweils 25 µl jeder Fraktion bei einem Elutionsvolumen von 8-16 ml (A3 - A18) sowie 20 µl Load wurden auf einem 15% PAA-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Standardblockung. Es erfolgte eine Inkubation mit Anti-LHCP Antikörper. Weitere Standardaufarbeitungsschritte. Ganz rechts: 200 ng LHCP (C79S).

Erstaunlicherweise zeigt der Load der Probe neben einem Anteil der hochmolekularen Spezies (oberer Blotrand) ein deutliches monomolekulares Signal bei 25 kDa. In gleicher Weise verhält es sich mit der C79S-Referenz, welche hingegen den Großteil des LHCP-Signals wieder am oberen Blotrand zeigt. Dieser Sachverhalt soll später diskutiert werden. Außerdem zeigt sich abgesehen von dem ungewöhnlichen Laufverhalten in der SDS-PAGE das gesamte LHCP-Signal sehr hochmolekular. Es muss also in jedem Fall zu einer massiven Aggregation des LHCP bzw. der Komplexe gekommen sein. Anders als in den analogen Ansätzen mit 54M-cpSRP zeigt sich kein potentielles Signal, was von ternärem 54M-Transitzkomplex ausgehen könnte.

## 5. Diskussion

### 5.1. Das chloroplastidäre Signalerkennungsprotein (cpSRP)

Die vorliegende Arbeit ist thematisch im Umfeld der Biogenese des light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein (LHCP) einzubetten. Das stark hydrophobe Membranprotein durchläuft bis zu seiner endgültigen Destination in der Thylakoidmembran mit dem Cytosol, dem periplasmatischen Zwischenraum der Chloroplastenhüllmembran sowie dem Stroma drei wässrige Kompartimente, die hinsichtlich seiner Integrität für eine effiziente Membraninsertion eine enorme Herausforderung darstellen. Das chloroplastidäre Signalerkennungsprotein cpSRP spielt in diesem Zusammenhang eine übergeordnete Rolle, da es nach der Translokation des LHCP in den Chloroplasten das Membranprotein in Lösung hält sowie die Proteinzielführung zur Thylakoide übernimmt. Der chloroplastidäre Komplex aus cpSRP und LHCP (Transitkomplex), welcher zusätzlich cpSRP-Rezeptor (cpFtsY) bindet, assoziiert an das Thylakoidtranslocon (Alb3). Vermutlich wird die eigentliche Proteinfaltung zum LHCII-Komplex bei der Freisetzung des Apoproteins in die Membran synchron mit der Pigmentbindung initiiert. Es kann aber u.U. schon für das cpSRP-gebundene LHCP eine Vorfaltung spekuliert werden. Eine Möglichkeit eine solche nachzuweisen stellt die EPR-Spektroskopie dar. Diese physikalische Methode setzt im speziellen Fall der LHCP-Konformationsvermessung im Chaperon-gebundenen Zustand eine Monomolekularisierung des Membranproteines voraus. Aufgrund der starken Oligomerisierungstendenz der LHCP-Chaperon-Spezies sowie der Anfälligkeit gegenüber unspezifischer Aggregation ergab sich als Kernaspekt dieser Arbeit die Charakterisierung der verschiedenen Komplexspezies. Es wurde nach verschiedenen Methoden der Optimierung, möglichst Komplexspezies mit monomolekularisiertem LHCP zu generieren, gesucht. Wider Erwarten konnte im Laufe der Arbeit auch in Verbindung mit Vollängen-cpSRP ein ausgeprägtes Oligomerisierungsverhalten detektiert werden. Da heterodimerer cpSRP-Komplex unbedingte Voraussetzung für einen ternären Transitkomplex sein sollte, wurden auch insbesondere im Zusammenhang mit der cpSRP-Komplexbildung zahlreiche methodische Optimierungen durchgeführt. Es soll zunächst eine Diskussion bezüglich des cpSRP-Komplexes sowie dessen Einzelproteine erfolgen.

#### 5.1.1. cpSRP43 zeigt anomales Verhalten in der Gelfiltrationschromatographie

Wie schon zuvor eingeführt, stand insbesondere das Oligomerisierungsverhalten der Komplexe bzw. auch der Einzelproteine im Fokus der Betrachtung. Zwei gängige Methoden dieses zu untersuchen, stellen die Gelfiltrationschromatographie (GFC) unter nativen Bedingungen oder alternativ die native Elektrophorese dar. In vorliegender Arbeit wurde insbesondere aus Verfügbarkeitsgründen sowie der Tatsache, dass sich cpSRP-Komplex als zu labil in der nativen Elektrophorese zeigte (vgl. 5.2.6), die

GFC verwendet. Desweiteren stellt die GFC eine geeignete Methode zur Determinierung der relativen Molekulargröße sowie zur Molekulargewichtsverteilung eines Proteins bzw. Proteinkomplexes dar (Lathé und Ruthven, 1956). Prinzipiell findet in der GFC jedoch eine Auftrennung nach dem Stokes-Radius (=hydrodynamischer Radius des gelösten Proteins;  $R_s$ ) statt (Le Maire et al. 1986). Tatsächlich kommt es in der Laborpraxis i.d.R. zu einer Gleichsetzung von molekularer Masse und hydrodynamischen Radius. Es muss jedoch klar sein, dass es sich potentiell um eine Idealisierung handelt, da aufgrund variierender Proteinformen sowie des unterschiedlichen Ausmaßes der Hydratation keine strikte Linearität zwischen  $R_s$  und MW besteht (Cabré und Canela, 1989). Es hat sich eine Größenkalibrierung mit potentiell „idealen“ Referenzproteinen etabliert. Wie in (M&M 3.3.3.1) erkennbar, zeigten sich bei der Größeneichung der Säule auch jeweils nur sehr geringe Abweichungen der Einzelwerte von der Regressionsgeraden. Somit kann die Größenkalibrierung der Gelfiltrationssäule als valide betrachtet werden.

Bei der rekombinanten Version des in dieser Arbeit verwendeten cpSRP43 handelt es sich um matures Wildtyp-Protein mit einer kurzen Elongation am N-Terminus. Der His<sub>6</sub>-tag ist durch 7 Aminosäuren flankiert (Met-Gly-Ser-Ser-[His<sub>6</sub>-tag]-Gln-Asp-Pro). Dadurch beträgt das relative MW des Translationsproduktes 36,8 kDa. Tatsächlich zeigte sich der Elutionspeak bei einem Superdex 200 GFC-Lauf monodispers bei apparent 83 kDa (vgl. Abbildung 4.8). Alle durchgeführten GFC-Läufe wurden unter nativen Bedingungen durchgeführt, bei welchen die Gesamtkonformation der Proteine bzw. potentieller Proteinkomplexe erhalten blieb. Somit lässt das detektierte Molekulargewicht zunächst auf ein cpSRP43-Dimer schließen. Tu et al., 1999 analysierten Chloroplastenstroma der *Arabidopsis thaliana*-Mutante *ffc 1-2*, welche eine cpSRP54 knock out-Mutante darstellt. Chloroplastidäres SRP43 eluierte in gleicher Weise wie rekombinantes cpSRP43 als ein 70 kDa-Protein. Die Autoren gehen deshalb von einem cpSRP43-Homodimer aus. Jonas-Straube et al., 2001 bestätigten mithilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems eine *in vivo*-Homodimerisierung des cpSRP43. Weitere Analysen zur Identifikation der Dimerisierungs-hervorrufenden Domänen ergab, dass Ank 3 und 4 die Interaktionsstellen darstellen. Entsprechend exprimierte Deletionsmutanten des cpSRP43 bestätigten in *in vitro*-Versuchen eine ausgeprägte Dimerisierungstendenz. Die Autoren zeigten in diesem Zusammenhang jedoch keinen weiteren Nachweis für ein entsprechendes *in vitro*-Dimerisierungsverhalten von Vollängen-cpSRP43. Groves et al., 2001 berichten in ihren Studien hingegen schließlich von rekombinantem cpSRP43, welches mit einem apparenten MW von 53 kDa von der Superdex 200 Säule eluiert und somit monomolekular vorliegen muss. Die Autoren verwendeten eine N-terminal His<sub>6</sub>-tag tragende Variante des cpSRP43. Der GFC-Lauf wurde mit salzhaltigem (0,3 mol/l) und reduktionshaltigem (2 mmol/l DTT) Puffer durchgeführt. Dies entspricht den Parametern, welche auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Es wird deutlich, dass die Faktenlage bezüglich des Oligomerisierungszustands des freien cpSRP43 nicht ganz klar ist. Dennoch wird mittlerweile allgemein akzeptiert, dass cpSRP43 monomolekular vorliegt und das Vollängenprotein kein intrinsisches Dimerisierungsverhalten zeigt.

Es stellt sich dennoch die Frage, wie das hochmolekulare Laufverhalten mit monomolekularem Protein vereinbar ist. Zur Klärung dieser Frage muss an obige Ausführung des Auftrennungsprinzips von Proteinen in der GFC entsprechend ihres hydrodynamischen Radius nochmal erinnert werden. Jaru-Amporpan et al., 2010 beschreiben mit Hilfe von „small angle X-ray scattering“ (SAXS)-Messungen die Globalstruktur des cpSRP43 als ein 120 Å „langes“ und 40 Å „breites“ Protein. Chloroplastidäres SRP43 bildet eine S-förmige Konformation aus, die weit entfernt von einer globulären Struktur ist. Entsprechend ist im Falle des cpSRP43 von einem potentiell nicht-idealen Retentionsverhalten in der GFC auszugehen. Ein zunehmender hydrodynamischer Radius führt zu einer vermehrten Diskriminierung durch die Poren einer Gelfiltrationsmatrix. Ein entsprechendes Protein eluiert dadurch früher von der Säule und „täuscht“ ein höheres MW vor.

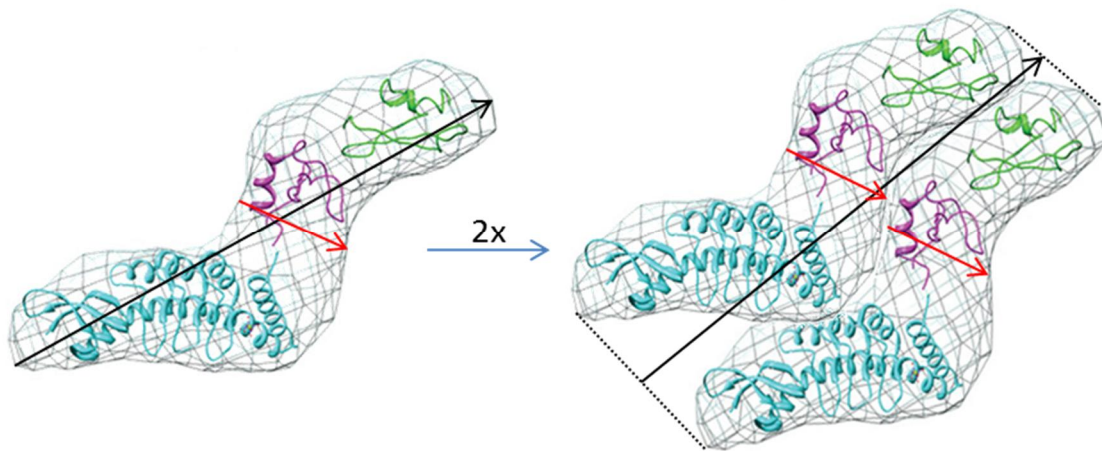
**Tabelle 5.1: Molekulare Massen und Stokes Radii von nativen GFC-Kalibrierungsproteinen.**

Die Tabelle ist verändert nach Cabré und Canela, 1989. a) Potschka, 1987; b) Frigon et al., 1983; c) Mantle, 1987

Protein	MW [kDa]	R <sub>s</sub> [nm]
Thyroglobulin	670 <sup>a</sup>	8,6 <sup>a</sup>
Ferritin	440 <sup>b</sup>	6,06 <sup>b</sup>
<b>Catalase</b>	<b>230<sup>a</sup></b>	<b>5,23<sup>a</sup></b>
<b>Albumin</b>	<b>67<sup>c</sup></b>	<b>3,55<sup>c</sup></b>
Ovalbumin	43,5 <sup>c</sup>	2,73 <sup>c</sup>
Myoglobin	17 <sup>c</sup>	2,08 <sup>c</sup>

Tabelle 5.1 zeigt die MW sowie die hydrodynamischen Radii verschiedener GFC-Eichproteine. Es handelt sich dabei um prinzipiell globuläre Proteine. Tatsächlich lässt sich das cpSRP43 aufgrund seiner Struktur nicht mit den oben gezeigten hydrodynamischen Radii vergleichen. Jedoch kann ein Eindruck gewonnen werden, wie sich das Molekulargewicht auf den hydrodynamischen Radius auswirkt. Würde man sich das cpSRP43 mit seinem apparenten Molekulargewicht von ~80 kDa als globuläres Protein vorstellen, läge sein hydrodynamischer Radius bei knapp überhalb 3,55 nm (Bezug zu BSA mit 67 kDa). Dies würde zumindest tendenziell ohne die Beachtung seiner Längenausdehnung in Übereinstimmung mit dem Durchmesser des cpSRP43 (4 nm) stehen. Würde man hinter der 80 kDa-Spezies ein Dimer vermuten, ergäbe sich folgendes Bild: Die „ankyrin repeats“ 3 und 4 wurden als potentielle Dimerisierungsdomänen beschrieben. Stellt man sich die Dimerisierung als ein Aneinanderlegen zweier cpSRP43-Monomere vor, würde die Längenausdehnung des Dimers gegenüber dem Monomer ungefähr gleich bleiben, der Durchmesser jedoch bei fast dem doppelten von  $\leq 8$  nm liegen (vgl. Abbildung 5.1). Bei einem solchen hydrodynamischen Radius sollte nach obiger Tabelle das apparente MW jedoch noch deutlich höher sein. Die Auftrennung von reinem cpSRP43 (Abbildung 4.8) zeigte einen kleinen Peak bei einem apparenten MW von 225 kDa. Catalase

besitzt eine molekulare Masse von 230 kDa sowie einen  $R_s$  von 5,23 nm. Dieser  $R_s$  entspricht bei weitem nicht dem doppelten des potentiellen  $R_s$  des Monomers, wäre aber für ein cpSRP43-Dimer sicherlich noch denkbar.



**Abbildung 5.1: SAXS-Rekonstruktion von Vollängen-cpSRP43.**

Die Abbildung ist verändert nach Jaru-Amporpan et al. 2010. In Türkis: CD1 – Ank4. In Pink: CD2. In Grün: CD3. → Längenausdehnung mit 12 nm, ↗ Sektioneller Durchmesser mit 4 nm. Es ist schematisch eine Zusammenlagerung von 2 cpSRP43 Molekülen gezeigt.

Es soll deutlich werden, dass dies prinzipiell nur Gedankenspiele auf der Grundlage der linearen Beziehung zwischen hydrodynamischen Radius und MW von mehr oder weniger geeigneten Referenzproteinen darstellt. Einerseits liefern diese recht plausibel eine Erklärung für das ungewöhnlich hochmolekulare GFC-Laufverhalten trotz monomolekularisiertem Zustands. Andererseits lassen sie einen dimerisierten Zustand mit entsprechendem apparenten Laufverhalten als sehr unwahrscheinlich erscheinen. Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass das in dieser Arbeit verwendete rekombinante cpSRP43 als Monomer vorlag. Das Protein zeigte ein nur sehr geringes potentielles Dimerisierungspotential.

### 5.1.2. Präparative Aspekte zur cpSRP-Komplexbildung

Falk et al., 2010 sowie Jaru-Amporpan et al., 2010 konnten nahezu gleichzeitig zeigen, dass cpSRP43 allein als hocheffizientes Chaperonmolekül für den LHCP fungiert. Dennoch bildet heterodimerer cpSRP-Komplex die funktionelle Chaperoneinheit im Stroma (Schünemann et al., 1998) und sollte so in dieser Arbeit eingesetzt werden. Die Standardkopplung von rekombinantem cpSRP-Komplex erfolgte durch Vereinigung der Bakterienlysatüberstände mit einem Überschuss von „tag“-freiem cpSRP54(M) zu His<sub>6</sub>-tag tragendem cpSRP43 um letzteres möglichst abzusättigen. Es wurden im Laufe der Arbeit 2 Varianten von cpSRP-Komplexen hergestellt: Zum einen war das cpSRP-Volllängenkomplex, zum anderen cpSRP-Komplex mit deletiertem cpSRP54M. Letzteres Protein ist völlig ausreichend für die Komplexbildung, da die Interaktion des cpSRP54 ausschließlich auf ein 10 AS langes Segment am C-terminalen Ende des Proteins beschränkt ist (Funke et al., 2005).

Kopplungen zwischen cpSRP43 und cpSRP54M, welche mit einem stöchiometrischen Überschuss von cpSRP54M durchgeführt wurden, zeigten eine vollständige Umsetzung zu 54M-cpSRP-Komplex (siehe Abbildung 4.9), d.h. es trat kein freies 43er Protein mehr auf. Im Falle der Kopplungen mit Vollängen-cpSRP54 und einem moderaten Überschuss von cpSRP54 (d.h.  $\leq 2$ fach) ergab sich ein anderes Bild (vgl. 4.1.2.3). Schon in den Ni-Säulen Elutionsfraktionen konnte aufgrund der Proteinbandenintensitäten von einem cpSRP43 Überschuss ausgegangen werden. GFC-Läufe bestätigten einen mehr oder weniger großen Anteil von frei eluierendem cpSRP43. Es wurde indes immer die Anwesenheit überschüssigen cpSRP54-Vollängenproteins im Überstand der Ni-Säulen-Batchkopplung bestätigt. Somit konnte spekuliert werden, dass womöglich aufgrund einer zu hohen Dissoziationskonstanten des Komplexes keine Absättigung des 43er-Proteins zu stande kommt. Das Massenwirkungsgesetz (MWG) einer Gleichgewichtsreaktion erfordert jedoch, dass bei einer Erhöhung der Eduktkomponenten die Reaktion stärker in Richtung der Produkte verschoben wird. Entsprechend sollte ein noch größerer stöchiometrischer Überschuss von cpSRP54 zu einer vollständigeren Komplexbildung führen. Tatsächlich zeigten standardmäßige Batchkopplungen mit einem 4 x stöchiometrischen Überschuss von cpSRP54 eine vollständige Absättigung des cpSRP43 (Ergebnisse nicht gezeigt). Dennoch wurde diese Methode der Komplexbildung aufgrund der Bildung von unstöchiometrischen Komplexen, welche ein sehr hochmolekulares Laufverhalten ( $\sim 800$  kDa) zeigten, nicht weiter verfolgt. Diese Komplexe zeigten im Speziellen ein zu vorangegangenen Kopplungen inverses Bild in GFC-Läufen: Zwar kam es zu einer vollständigen Absättigung des cpSRP43, jedoch enthielten die Komplexe deutlich überrepräsentiertes cpSRP54. Dies kann u.U. mit einer unspezifischen Oligomerisierung des cpSRP54 erklärt werden. Das Protein zeigte im Falle einer längeren Lagerung ohne die Anwesenheit von cpSRP43 immer wieder die Tendenz „klebrig“ zu werden, d.h. es oligomerisierte. Dies konnte auch in GFC-Läufen mit cpSRP54-Bakterienlysat und somit freiem Protein, welche ein stark polydisperses Laufverhalten mit oligomerisierten cpSRP54-Spezies zeigten, bestätigt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Hohe Konzentrationen des Proteins scheinen dies zusätzlich zu begünstigen.

Das oben beschriebene Verhalten der unvollständigen cpSRP-Komplexbildung bei moderatem cpSRP54 Überschuss, kann nicht mit der in der Literatur verfügbaren Dissoziationskonstanten des Komplexes erklärt werden. Es existieren zwar je nach betrachtetem Interaktionssystem sehr stark abweichende Angaben in Bezug auf die Dissoziationskonstante  $K_d$ , dennoch liegen diese allgemein sehr niedrig. Kathir et al. (2008) ermittelten für die CD2/cpSRP54<sub>pep</sub>-Interaktion mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) eine  $K_d$  von 1,06  $\mu\text{mol/l}$ . Sivaraja et al. (2005) betrachteten die Interaktion zwischen Vollängen-cpSRP54 mit der CD2 des cpSRP43 und konnten anhand von ITC-Messungen eine  $K_d$  von 190 nmol/l bestimmen. Hermkes et al. 2006 schließlich bestimmten die Dissoziationskonstante von Vollängen-cpSRP43 und deletiertem His-cpSRP54M auf 2,5 nmol/l. Die von den Autoren durchgeführten SPR-Messungen zeigten auch für die Deletionsmutante CD2/CD3 des cpSRP43 in Interaktion mit His-cpSRP54M eine mit 29,7 nmol/l ähnliche hohe  $K_d$ . Diese von

Hermkes et al. bestimmten Dissoziationskonstanten im einstelligen nanomolaren Bereich spiegeln schon Affinitäten wider, wie sie von guten Antigen-Antikörper-Interaktionen erreicht werden. In guter Übereinstimmung damit konnte bei der 54M-Transitkomplexbindung wie oben erwähnt eine vollständige Komplexbindung erwartet werden.

Es stellt sich die Frage, was nun die Ursache für die unvollständige Absättigung bzw. die nicht quantitativ ablaufende Komplexbindung im Zusammenhang mit Vollängen-cpSRP54 ist. Die erwähnten sehr niedrigen Dissoziationskonstanten schließen eine zu geringe Affinität der Proteine zueinander aus. Zwar existiert keine spezifische  $K_d$  für die Vollängen-Proteine, doch spricht die allgemeine Beobachtung, dass Protein-Peptid-Interaktionen relativ schwächer als Protein-Protein-Interaktionen sind (Wilkinson, 2008) gar für eine noch höhere  $K_d$  im Falle des Vollängenkomplexes. Es kann aber z.B. spekuliert werden, dass die Netto-Konzentration von intaktem cpSRP54, also solchem, welcher tatsächlich Komplexbildungsfähig war, deutlich geringer als die nominelle lag. In Verbindung mit bakterieller Proteinüberexpression ist es bekannt, dass mitunter nur ein geringer Anteil des exprimierten Proteins tatsächlich biologisch aktiv ist. Aggregations- bzw. oligomerisierungsanfällige Proteine sind bei den hohen Expressionsraten bzw. der sich ergebenden hohen Proteinkonzentration besonders gefährdet. Neben der schon oben geschilderten Oligomerisierungstendenz des cpSRP54 im Bakterienlysatüberstand, konnte beobachtet werden, dass cpSRP54-Bakterienlysatüberstände trotz standardmäßiger Überexpression und Lyse der Zellen teilweise kein cpSRP54-Protein im Überstand enthielten. Eine zu Beginn dieser Arbeit gemachte Untersuchung der unlöslichen Fraktion nach Bakterienlyse konnte in solch einem Fall keine genaue Aussage über die darin enthaltene Proteinspezies machen. Das Problem bestand in einem massiven Proteinschmier über den kompletten Laufbereich des Gels. Eine Totalproteinanalyse bestätigte in einem Ansatz jedoch die Expression von cpSRP54, trotzdem konnte kein Zielprotein im Überstand detektiert werden. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass in solchen Fällen Vollängen-cpSRP54 tatsächlich stark aggregierte. Die genaue Ursache konnte nicht aufgefunden werden. Da im Falle des cpSRP54M ein solches Verhalten nie beobachtet werden konnte, muss die Ursache jedoch in der NG-Domäne des cpSRP54 zu suchen sein.

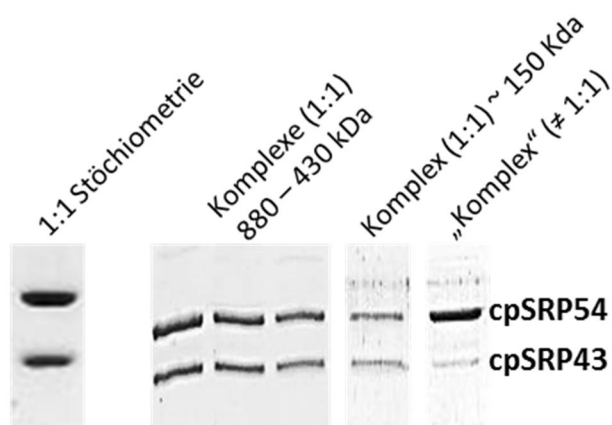
Als Alternativkopplung zwecks einer möglichst vollständigen Umsetzung zu Vollängen-cpSRP wurde das His<sub>6</sub>-tag tragende cpSRP43 an die Säule vorgebunden und die Komplexbindung chromatographisch mit einem 4 x stöchiometrischen Überschuss von cpSRP54 durchgeführt (Abbildung 4.15). Der GFC-Lauf offenbarte wiederum einen Teil freien cpSRP43s. Dieser fiel jedoch deutlich geringer aus als im Falle der Batchkopplung mit „moderatem“ cpSRP54-Überschuss. Bei Gültigkeit (und davon sollte auszugehen sein) der hohen Affinität der Proteine zueinander, wäre bei solch einem Überschuss absolut mit quantitativer Komplexbildung zu rechnen gewesen. Dass es bei diesem Überschuss in der chromatographischen Methode dennoch nicht so ist, deutet nochmals stark darauf hin, dass die Nettokonzentration an tatsächlich Komplexbildungsfähigem cpSRP54 wohl



deutlich geringer als die nominelle Totalkonzentration lag. Wie in Abbildung 4.15 jedoch deutlich wird, kam es bei dieser Variante der Komplexkopplung jedoch nicht zu einer Oligomerisierung der Komplexe.

### 5.1.3. Das Oligomerisierungsverhalten des cpSRP-Komplexes ist stark konzentrationsabhängig

Bevor in diesem Abschnitt auf das konzentrationsabhängige Oligomerisierungsverhalten des cpSRP-Volllängenkomplexes eingegangen wird, soll zunächst kurz der Fokus auf die Stöchiometrie der Komplexe gelegt werden. Diverse Studien belegen für die hochspezifische Interaktion zwischen cpSRP43 und cpSRP54 eine 1:1 Stöchiometrie (Groves et al., 2001; Kathir et al., 2008; Sivaraja et al. 2005). Außer Groves et al. arbeiteten die anderen Autoren jedoch nicht mit Volllängenprotein, sondern Deletionsmutanten. Es kam in dieser Arbeit im Zusammenhang mit dem cpSRP-Komplex nicht zu einer systematischen „Bestimmung“ der Stöchiometrie der Komplexspezies (vgl. im Gegensatz dazu Diskussion unter 5.2), da aufgrund der sich ergebenden Proteinsignalintensitäten nach GFC-Fraktionierung i.d.R. von äquimolar zusammengesetzten Komplexen ausgegangen werden konnte. Es war anzunehmen, dass bei einer 1:1-Stöchiometrie der cpSRP54 eine augenscheinlich stärkere Intensität nach Coomassie Anfärbung als das kleinere cpSRP43 ergibt. Eine entsprechende Referenz wurde von Groves et al., 2001 geliefert, welche eine GFC-Fraktionierung mit 1:1-Komplexen präsentieren (linke Bahn in Abbildung 5.2). Äquimolarität der Komplexbestandteile war gleichzeitig das Entscheidungskriterium, ob eine korrekte Komplexbildung bzw. intakte Komplexe gebildet wurden. Der intakte cpSRP-Komplex ist spezifisch aus 43/54er-Dimeren aufgebaut. Eine von der Äquimolarität der Komplexbestandteile abweichende Stöchiometrie spricht somit für unspezifische Aggregation.



**Abbildung 5.2: Stöchiometrie – Gegenüberstellung.**

Gezeigt sind jeweils GFC-Fractionen. Von links nach rechts: cpSRP-Komplex von Groves et al., 2001; cpSRP-Komplex aus 2 mg/ml Kopplung; Binärer cpSRP-Komplex aus 0,4 mg/ml Kopplung; Unstöchiometrischer cpSRP-Komplex aus 0,4 mg/ml Kopplung.

Abbildung 5.2 zeigt eine Gegenüberstellung verschiedener GFC-Fractionen mit hochmolekular sowie niedrigmolekular bzw. binärem cpSRP. Da die gezeigten hochmolekularen Komplexe (880-430 kDa) augenscheinlich ein gleiches relatives Intensitätsverhältnis wie die Referenz (links) zeigten, wurde auch bei diesen hochmolekularen Spezies von intakten (oligomerisierten) Komplexen ausgegangen. In

der fünften Gelbahn sind die Intensitätsverhältnisse des potentiell binären Komplexes (bei ~150 kDa) dargestellt, die in gleicher Weise als äquimolar und deshalb intakt anzusehen sind. Ganz rechts in Abbildung 5.2 ist eine Fraktion (~340 kDa) einer 0,4 mg/ml Kopplung zu sehen. Diese zeigt ein Beispiel für nicht intakte Komplexe, da eindeutig keine Äquimolarität der Komplexbestandteile erkennbar ist. Ähnliche relative Intensitätsverhältnisse zeigten die unter 5.1.2 erwähnten Komplexe aus Kopplungen mit einem 4-fach stöchiometrischen Überschuss von cpSRP54 (Standard-Batchkopplung). Deshalb wurde diese Methode aufgrund der Bildung unspezifisch aggregierter Komplexe nicht fortgeführt. Unstöchiometrische Komplexe mit augenfällig überrepräsentiertem cpSRP54 waren jedoch insgesamt relativ selten. Die weitere Diskussion in Bezug auf das konzentrationsabhängige Oligomerisierungsverhalten des cpSRP-Volllängenskomplexes bezieht sich nur auf potentiell intakte Komplexe.

Das ausgeprägte konzentrationsabhängige Oligomerisierungsverhalten des cpSRP-Volllängenskomplexes wurde erst im Laufe der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Zwar war schon relativ früh bekannt, dass bei der standardmäßigen Kopplung durch Vereinigung der separat überexprimierten Proteine und deren synchron durchgeführte Ni-Säulenaufreinigung hochmolekulare Komplexe (vgl. Abbildung 4.12) entstehen, doch spielte dies im Zusammenhang mit später durchgeführten Transitkomplekkopplungen nach Detergenz-Standard-Methode nur eine untergeordnete Rolle (siehe Diskussion 5.2.3). Wurde die Konzentration im Kopplungsansatz verringert, zeigten sich neben niedrigmolekularen Komplexen auch eine deutlich veränderte Dispersität der Komplexe. In der Kopplung mit einer Proteinkonzentration von > 2 mg/ml ist aufgrund des Elutionsprofils (Abbildung 4.12) eine vorwiegend monodisperse Komplexspezies mit einem mittleren apparenten MW von ~800 kDa zu erkennen. Unter Berücksichtigung, dass binärer cpSRP ein apparentes MW von 150 kDa zeigte, könnte es sich hier potentiell um Pentamer-oligomerisierte Komplexe handeln. Im Gegensatz dazu zeigten die Komplexe der ~0,8 mg/ml Kopplung eine eindeutig polydisperse Zusammensetzung. Trotz dieser Dispersität konnten die Komplexe aufgrund augenscheinlicher äquimolarer Komplexzusammensetzung über den kompletten MW-Bereich als intakte Komplexe angesehen werden. (vgl. Abbildung 4.11). Die Kopplung bei ~0,4 mg/ml schließlich zeigte im hochmolekularen Bereich (540–270 kDa) Komplexe mit stark überrepräsentiertem cpSRP54. Es ist dabei von unspezifisch aggregierten Komplexen auszugehen. Intakter binärer cpSRP zeigte sich zwischen 175-138 kDa (siehe Abbildung 4.10). Es wird deutlich, dass die Verringerung der Kopplungskonzentration einen eindeutigen Einfluss auf die Größenverteilung bzw. den vorherrschenden Oligomerisierungsgrad der Komplexe hatte. Ziel war es die Komplexbildung so zu optimieren, dass gezielt monodispers heterodimere cpSRP-Komplexe hergestellt werden können. In der vorliegenden Arbeit konnte unter bestimmten Voraussetzungen ein potentiell binärer cpSRP-Komplex mit einem apparenten MW von ~150 kDa gezeigt werden: Dies gelang eingeschränkt in Verbindung mit Standard Ni-Säulenkopplungen mit isokratischer Elution bei niedriger Kopplungskonzentration von  $\leq 0,4$  mg cpSRP43/ml Ni-Säule (vgl. Abbildung 4.10).

Komplexbildungen zeigten in diesen Fällen aber immer noch aggregierten nicht-intakten Komplex bzw. intakten, aber oligomerisierten Komplex. Die alternativen Elutionsmethoden der Batchelution bzw. Gradientenelution zeigten hingegen ausschließlich binären Komplex (vgl. Abbildung 4.14 / Abbildung 4.15) mit einem apparenten MW von 150 kDa. Das relative Molekulargewicht des rekombinant hergestellten cpSRP mit binärer Zusammensetzung sollte bei 89,1 kDa liegen. Die starke Abweichung von ~60 kDa ist insbesondere auf die strukturell bedingten Besonderheiten des cpSRP43-Laufverhaltens zurückzuführen (siehe 5.1.1). Auch im Zusammenhang mit co-exprimiertem cpSRP-Komplex, was jedoch aufgrund einer sehr schwachen Expressionsrate des 54er Proteins nur geringfügig möglich war, ist trotz des apparenten MWs von 220 kDa von potentiell binärem Komplex auszugehen. Um mittels der Standardkopplungsmethode, die lediglich die Vereinigung der Bakterienlysate aus Einzelüberexpressionen mit gleichzeitiger Ni-Säulenbindung vorsieht, dennoch eine vollständige Absättigung des cpSRP43 zu erreichen, wurden auch Kopplungsansätze mit einem 4-fach stöchiometrischen cpSRP54-Überschuss durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Konzentration auf der Ni-Säule betrug 0,5 mg/ml bezogen auf das His-cpSRP43. Es zeigte sich bei der Gelfiltrationschromatographischen Auftrennung tatsächlich eine volle Absättigung des cpSRP43. Es traten jedoch ausschließlich oligomerisierte Komplexe zwischen > 1000-475 kDa auf. Die Komplexe wiesen in jeder Elutionsfraktion einen augenscheinlichen Überschuss von cpSRP54 auf. Es konnte bei diesen hochmolekularen Komplexen nicht von einer 1:1-Stöchiometrie ausgegangen werden. Vielmehr ist hier unspezifische Aggregation anzunehmen.

Oben wurde erwähnt, dass die bei niedrigen Kopplungskonzentrationen aufgearbeiteten Komplexe einen überwiegend monodispers binären Zustand zeigten. Manche Aufarbeitungen, die ebenso bei einer Kopplungskonzentration von ~0,4 mg/ml durchgeführt wurden, zeigten neben binären Komplexen aber auch einen großen Teil oligomerisierter Komplexe. Tatsächlich scheint 0,4 mg/ml Kopplungskonzentration eine Schwellenkonzentration darzustellen, bei der die Komplexe beginnen zu oligomerisieren. Es ist davon auszugehen, dass es im Falle der isokratischen Ni-Säulenelution zu einer nicht beeinflussbaren transienten Aufkonzentrierung der Komplexe in der Elutionsfront kam. Dies stellte somit ein schwer zu kontrollierender Schritt während der Aufarbeitung dar. Als alternative Elutionsmethoden, die eine solche transiente Aufkonzentrierung umgehen, wurden die Gradienten- bzw. Batchelution getestet. Diese Kopplungen wurden ebenso bei 0,4 mg/ml durchgeführt, jedoch zeigten diese Aufarbeitungen nahezu keine oligomerisierte cpSRP-Spezies (siehe Abbildung 4.14; Abbildung 4.15). Insbesondere die Variante der cpSRP-Säulenkopplung, die schon die erfolgreichste Absättigung des vorgebundenen 43er Proteins gezeigt hatte, wies bei Gradientenelution keinerlei Signal über 175 kDa. Es wurde an dieser Stelle nicht ausgetestet, welche maximale Bindungsdichte auf der Ni-Säule erreicht werden kann, um im Falle der Säulenkopplung mit Gradientenelution noch ausschließlich monodispers binäre Komplexe zu erhalten. Der Nachteil dieser Elutionsmethode ergibt sich ganz klar in der Tatsache, dass die Elutionsfraktionen auf ein relativ großes Volumen verteilt werden und die Endkonzentrationen sehr gering ausfallen.

In Bezug auf die Literatur existiert keine direkte Beschreibung eines konzentrationsabhängigen Oligomerisierungsverhaltens. Chloroplastidäres SRP-Protein wird tatsächlich allgemein akzeptiert als Heterodimer in der Literatur angesehen. Es beschäftigen sich jedoch nur 2 Studien mit der stöchiometrischen Zusammensetzung des Komplexes: Schünemann et al., 1999 detektierten co-exprimierten cpSRP-Komplex mit Glutathion-S-Transferase (GST)-gekoppeltem cpSRP43 in GFC-Läufen bei einem apparenten MW von 255 kDa. Nativer cpSRP-Komplex aus *Arabidopsis* wurde gleichzeitig als 200 kDa-Spezies nachgewiesen. Die Autoren gingen ohne die Kenntnis der strukturellen Besonderheiten des cpSRP43 und den sich daraus ergebenden Konsequenzen für das Gelfiltrationsverhalten von einem cpSRP-Heterotetramer aus jeweils 2 Untereinheiten aus. Groves et al., 2001 hingegen konnten sowohl co-exprimiertes cpSRP als auch *in vitro*-gekoppelten cpSRP in Superdex 200 GFC-Läufen jeweils bei 120 kDa detektieren. Freies His-cpSRP43 lief bei einem apparenten MW von 53 kDa. Gleichzeitig durchgeführte Gleichgewichts-Ultrazentrifugationsläufe zeigten eine molekulare Masse des Komplexes bei 98 kDa. Diese Autoren gingen deshalb von einem heterodimeren Zustand des Komplexes aus. Beide Autoren geben keine Konzentrationsangaben für den cpSRP-Komplex an. Im Falle von Schünemann et al. ist außerdem nicht sicher, ob tatsächlich eine oligomerisierte cpSRP-Spezies (tetramerer Zustand) beobachtet wurde, oder ob die strukturellen Besonderheiten des cpSRP43 auch hier der Grund für das überschätzte MW eines binären Komplexes sein können. Letztlich kann jedoch festgehalten werden, dass es in dieser Arbeit unter bestimmten Bedingungen möglich war, binären cpSRP-Komplex zu erzeugen. Gleichzeitig konnte jedoch ein ausgeprägtes Oligomerisierungsverhalten intakter 43/54er Dimere zu hochmolekularen Strukturen beobachtet werden.

### 5.1.4. Der N-Terminus und die G-Domäne des cpSRP54 wirken potentiell oligomerisierungsauslösend

Das Volllängen-cpSRP54 weist klar definierte Unterdomeänen auf. Es existiert eine strukturell und funktionell gekoppelte NG-Domäne (N-Terminus und G-Domäne). Die M-Domäne bildet hingegen den C-terminalen Bereich und steht ungefähr im 90° Winkel räumlich getrennt zu dieser Einheit. Das Volllängenprotein zeigt insgesamt eine L-förmige Struktur, mit der NG-Domäne als langen Arm; der M-Domäne als kurzen Arm. Das cpSRP54 wechselwirkt wie zuvor schon erwähnt über das C-terminale Ende mit cpSRP43, weshalb cpSRP54M (die AS 371-564 des Volllängen-cpSRP54) zur Komplexbildung ausreicht. Im Laufe dieser Arbeit wurde sowohl mit Volllängen-cpSRP-Komplex als auch mit 54M-cpSRP-Komplex gearbeitet. Die 21,5 kDa lange M-Domäne zeichnet sich neben ihrem Methionin Reichtum durch einen sehr basischen Charakter ( $pI = 9,72$ ) aus. Im Gegensatz dazu besitzt die NG-Domäne des cpSRP54 einen  $pI = 6,05$ . Die Komplexbildung zwischen His-cpSRP43 und cpSRP54M (Standard-Batchkopplung) zeigte sowohl eine quantitative Kopplung als auch monodispers binäre Komplex mit einem apparenten MW von 107 kDa (vgl. Abbildung 4.9). Das theoretische MW des binären 54M-cpSRP-Komplexes liegt bei 58,3 kDa. Die Überschätzung des

apparenten MWs nach dem Elutionsverhalten bei der Gelfiltration sollte wieder auf die strukturellen Besonderheiten des cpSRP43 zurück zu führen sein. Es konnten nie höhere Oligomerisierungszustände des 54M-cpSRP-Komplex beobachtet werden. Somit scheint spezifisch die NG-Domäne des cpSRP54 die im Zusammenhang mit Volllängen-cpSRP beobachtete Oligomerisierung begünstigt bzw. ausgelöst zu haben.

Die Literatur bezüglich des cpSRP54 und insbesondere zu seinem besser beschriebenen cytosolischen Homolog SRP54 beschreibt keinen solchen Effekt. Jedoch können auf Grundlage der strukturellen Eigenschaften Vermutungen geäußert werden. Insbesondere die Interaktionsstudien des (cp)SRP54 mit cpFtsY bzw. cytosolischem FtsY können einen Hinweis auf eine intrinsisches Oligomerisierungsverhalten liefern. Es existiert keine Kristallstruktur des cpSRP54, sehr wohl aber eine des cytosolischen Homologs SRP54. Rosendal et al., 2003 zeigen die Kristallstruktur dieses Proteins aus dem Archaeon-Bakterium *Sulfolobus solfataricus*. SRP54 weist eine gleiche Struktur wie sein chloroplastidäres Homolog auf. Die M-Domäne interagiert dabei als Cargo-bindende (Zopf et al. 1990) und gleichzeitig als SRP-RNA bindende Einheit (Batey et al. 2000). *In vivo* interagiert SRP54 im Zuge des co-translationalen Transports hydrophober Proteine mit einer zweiten GTPase, sogenanntem FtsY (Keenan et al., 2001). Kogata et al., 1999 identifizierten eine dem bakteriellen FtsY homologen cpSRP-Rezeptor in Chloroplasten, cpFtsY. Hierbei handelt es sich um ein im murenen Zustand 32 kDa großes Protein, welches größtenteils an der Thylakoidmembran assoziiert vorliegt. Chandrasekar et al. (2007) lösten die Kristallstruktur des cpFtsY bei 2,0 Å auf. Interessanterweise zeigt das Protein eine zu (cp)SRP54 analoge Struktur: cpFtsY besteht ebenso aus einer N-Domäne sowie einer dicht daran gepackten G-Domäne. Tatsächlich gehören diese chloroplastidären Proteine in gleicher Weise wie ihre cytosolischen Vertreter zu einer einzigartigen Untergruppe in der GTPase Superfamilie (Keenan et al., 2001). Entscheidend für ihre physiologische Aufgabe, der Translokation hydrophober Proteine von der Erkennung einer Signalsequenz des ribosome nascent chain (RNC) Komplexes bis zur Freisetzung der naszierenden Proteine in ein Membrantranslocon, ist die Komplexbildung zwischen den Proteinen. Diese erfolgt vornehmlich, wenn beide Proteine im GTP-gebundenen Zustand vorliegen (Conolly und Gilmore, 1989). Eine effiziente Komplexbildung konnte jedoch nur beobachtet werden, wenn 4,5 S RNA an das bakterielle SRP54 gebunden war. Ohne die RNA verlief die Assoziation der Proteine zwar mit gleicher Gleichgewichtskonstanten, jedoch 400 x langsamer. Jaru-Amporpan et al., 2007 konnten für GTP-gebundenes chloroplastidäres SRP54 und cpFtsY gleiche hohe Assoziationsraten bestimmen. Die chloroplastidären Homologe sind jedoch nicht RNA-abhängig. Somit konnte gemutmaßt werden, dass die hohe Affinität zwischen den chloroplastidären SRP-GTPasen nicht Cofaktor-vermittelt, sondern intrinsisch vorhanden ist. Jaru-Amporpan et al., 2009 zeigten durch eine Gegenüberstellung der Komplexbildung zwischen Volllängen-cpSRP54 bzw. NG-cpSRP54 mit cpFtsY, dass ersteres eine ungefähr 100 x schnellere Assoziationskinetik zu seinem Komplexpartner zeigt. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die M-Domäne spezifisch die GTPase-Domäne hinsichtlich der Komplexbildung stimuliert.

Vorgestellte Studien zeigen also eindeutig ein intensives intrinsisches Komplexierungsverhalten der NG-Domäne des cpSRP54 mit dem heterologen Bindungspartner cpFtsY. Egea et al. 2004 lösten die Kristallstruktur des bakteriellen NG-SRP54·FtsY-Komplexes bei 1,9 Å auf. Es wird deutlich, dass die Proteine sowohl über die N-Domäne als auch insbesondere über die G-Domäne wechselwirken. Die Kontaktfläche zwischen den Komplexpartnern beträgt insgesamt 3200 Å<sup>2</sup>. Dabei bilden sie ein Quasi-2-fach-symmetrisches Heterodimer. Cytosolisches FtsY wechselwirkt über insgesamt 39 Reste mit 34 Resten des bakteriellen SRP54 und bildet dabei 21 Wasserstoffbrücken sowie 139 van-der-Waals Kontakte. Neben zahlreichen anderen Sequenzen interagieren spezifisch die in beiden Proteinen enthaltenen Motive ALLEADV der N-Domänen sowie DARGG im G-Domänen-Bereich miteinander.

Wie schon eingangs erwähnt, gibt es keine Studien bezüglich eines Homodimerisierungsverhaltens des (cp)SRP54. Im Hinblick auf das intensive heterologe Dimerisierungsverhalten zwischen cpSRP54 und cpFtsY und unter Berücksichtigung der in beiden Strukturen analogen Dimerisierungsmotive ist eine Homodimerisierung des cpSRP54 jedoch absolut denkbar. Ergo wäre damit ein dimerisierter Zustand des cpSRP-Volllängenkompleses also prinzipiell möglich. Tatsächlich wurde jedoch aber auch ein deutlich intensiveres Oligomerisierungsverhalten (bis zu Pentamer-oligomerisiertem cpSRP-Volllängenkomples) beobachtet. Somit muss noch eine über die potentielle „spezifische Dimerisierung“ des cpSRP54-Volllängensproteins „unspezifische“ Wechselwirkung eine Rolle gespielt haben. Letztere kann jedoch auch nur in Verbindung mit der NG-Domäne stehen. Da die Aufarbeitung des cpSRP-Kompleses in Gegenwart von 0,3 mol/l NaCl erfolgte, sind interionische Wechselwirkungen als potentiell unspezifische Wechselwirkungen nahezu ausgeschlossen und hydrophobe Interaktion geraten in den Fokus. Eine Betrachtung der AS-zusammensetzung lässt jedoch keine besondere Häufung hydrophober AS erkennen. Tatsächlich besitzt die NG-Domäne einen gleichen Anteil hydrophober AS wie die M-Domäne. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein potentielles Homodimerisierungspotential tendenziell in der NG-Domäne des cpSRP54 vorhanden ist. Die Bildung der beobachteten hohen Oligomerisierungsprodukte kann damit jedoch nicht erklärt werden. Ein „Beitrag“ des cpSRP43 ist schwer vorstellbar, da dies im Falle des 54M-cpSRP-Kompleses auch einen Einfluss hätte haben sollen. Freies cpSRP54 zeigte schon im Unterschied zu freiem cpSRP54M eine ausgeprägte Tendenz zur Oligomerisierung, weshalb spezifisch die NG-Domäne auch die Ursache für die mutmaßlich unspezifische Oligomerisierung darstellen sollte.

### 5.1.5. Eigenschaften von nativem cpSRP

Ziel der Isolation von nativem cpSRP war in erster Linie die Überprüfung, ob und inwiefern nativer cpSRP ebenso polydisperses Verhalten mit höher oligomerisierten Zuständen zeigt. Darüberhinaus sollte das Verhalten von nativem cpSRP in Transitkomplekxkopplungen bzw. ein möglicher Einfluss

von Stromaextrakt auf den Oligomerisierungszustand von Transitkomplexen getestet werden. Letztere Punkte werden an späterer Stelle diskutiert.

Die Stromaextraktion erfolgte aus der Aufarbeitung von Chloroplasten junger Erbsenblätter. Ziel war es einen Entwicklungszeitpunkt der Pflanze zu treffen, in welchem aufgrund der Differenzierung von Proplastiden zu Chloroplasten und deren Entwicklung zu murenen Plastiden die cpSRP-Konzentration möglichst hoch ist. Es ist davon auszugehen, dass in der Ergrünungsphase der Pflanzen aufgrund der Etablierung des photosynthetischen Systems in den sich bildenden Thylakoidmembranen die Konzentration von LHCP-Chaperon möglichst hoch sein sollte. Mullet, 1988 beschreibt den Entwicklungsprozess von Chloroplasten in Abhängigkeit von deren Größe, bzw. im Speziellen von deren Volumen. So können hinsichtlich der Volumenentwicklung eines Plastiden vier sich überschneidende Phasen beschrieben werden. Diese stehen in Korrelation mit dem Alter der Zelle. Nach dem Zellteilungsstopp kommt es in der Verzögerungsphase bzw. „lag-phase“ zunächst zu einer ca. 24-stündigen Zellstreckungsphase, in welcher die Anzahl der Plastiden pro Mesophyllzelle stark zunimmt, das Plastidenvolumen jedoch nahezu unverändert bleibt. Während dieser Phase steigt die transkriptionelle Aktivität der Plastiden jedoch schon stark an und die Akkumulation von Chlorophyll und Carotinoiden beginnt. Es folgt die Phase des „steady growth“. Diese ist gekennzeichnet durch eine starke Zunahme des Volumens des Plastiden, der Ausbildung der Thylakoidmembran und einer sehr hohen Neusyntheserate von Proteinen, welche an einer hohen Transkriptions- und Translationsaktivität erkennbar ist (Klein und Mullet, 1987). Diese Phase erstreckt sich über einen Zeitraum von 36-48 h. Anschließend folgt die „mature function“, während der das Plastidenvolumen konstant bleibt sowie der mRNA-Level und die Proteinneusyntheserate sinken. In der letzten Phase („senescence“) verkleinert sich das Plastidenvolumen in Folge katabolischer Prozesse.

Die Ernte der Erbsenpflanzen erfolgte 8-11 Tage nach der Aussaat. Dieser Zeitraum stellt eine 96 h-Phase rund um die Entfaltungsphase der Primärblätter der jungen Erbsenpflanzen dar. Nach dem von Mullet, 1988 vorgestellten Entwicklungsprozess sich differenzierender Mesophyllzellen bzw. Chloroplasten sollte dieser Zeitraum mit den Phasen hoher Syntheserate in den Chloroplasten zusammenfallen. Eine hohe Neubildungsrate von LHCP und dessen Insertion in die Thylakoidmembran setzt eine relativ hohe Konzentration von stromalen cpSRP voraus. Innerhalb dieses Zeitraums konnte jedoch kein signifikanter Unterschied des cpSRP-Gehalts festgestellt werden. Es konnte für unterschiedlich lang gewachsene Erbsenpflanzen innerhalb dieses Entwicklungszeitraumes jeweils ein cpSRP-Anteil am Total-Stromaprotein von  $\sim 1/1000$  bestimmt werden (Ergebnisse in Schad, Diplomarbeit 2014). Es wurden in diesem Rahmen jedoch nie Erbsenpflanzen älter als 11 Tage auf ihren Anteil an chloroplastidärem Signalerkennungsprotein untersucht. Somit kann nicht gesagt werden, wie sich der Gehalt mit zunehmendem Alterungsprozess der Pflanze entwickelt.

Im Mittelpunkt der Untersuchung des nativ-isolierten cpSRPs stand zunächst die Charakterisierung des Komplexes und der Vergleich mit rekombinatem Komplex. Die Fraktionierung des Erbsenstromas zeigte ein mittleres apparentes MW des nativen cpSRPs von ~150 kDa (vgl. Abbildung 4.40). Die GFC-Fractionen zeigen, dass sich neben der Hauptelution im Molekulargewichtsbereich zwischen 240-100 kDa auch noch im hochmolekularen Bereich bis zu 600 kDa potentieller Komplex (da Blotsignale beider cpSRP-Komponenten) findet. 54er Signal findet sich darüberhinaus bis ins Ausschlussvolumen (>1300 kDa) der Säule. Hierbei sollte es sich um Ribosomen-gebundenes cpSRP54 handeln. Dieses spielt in den co-translationalen cpSRP54-Transportweg eine Rolle. Die Ergebnisse stehen in recht guter Übereinstimmung mit Schünemann et al., 1998. Diese Autoren ermittelten beide Untereinheiten des nativen cpSRP aus Erbsenstroma bei einem mittleren MW von 200 kDa. Jedoch ist in dieser Studie nicht von höheren Oligomerisierungszuständen die Rede. Sehr wohl konnte doch cpSRP54-Signal im Ausschlussvolumen der GFC-Säule gefunden werden.

Mittels einer 8 x Aufkonzentrierung wurde getestet, ob nativer cpSRP tendenziell in ähnlicher Weise wie rekombinanter cpSRP zu einer konzentrationsabhängigen Oligomerisierung tendiert. Abbildung 4.41 macht deutlich, dass auch natives cpSRP bei Aufkonzentrierung hochmolekulareres Laufverhalten sowie ein polydisperseres Verhalten zeigte. Die Signale des cpSRP43 in den hochmolekularen Fraktionen oberhalb von 600 kDa nahmen relativ stärker zu als solche im Bereich zwischen 600-240 kDa. Gleichzeitig kam es zu einer relativen Abnahme des 43er Signals im Molekulargewichtsbereich zwischen 240-100 kDa. Es ist nicht ausgeschlossen, dass solche hochmolekularen Signale des Komplexes u. U. auf denaturiertes Protein zurückzuführen sind. Die Denaturierung könnte schon im Zuge des Frier-Tau-Zyklus des SE aufgetreten sein. Prinzipiell würde man dann jedoch nicht erst im Zuge der Aufkonzentrierung eine verstärkte Aggregation vermuten. Es kann also spekuliert werden, dass nativer cpSRP ähnliches Oligomerisierungsverhalten aufweist wie rekombinanter Komplex.

Es stellte sich jedoch die Frage, inwiefern die Stromaextraktion Artefakte erzeugen kann. Die hypoosmotische Lyse mit 10 mmol/l HEPES-KOH<sub>pH 8,0</sub> erzeugt eine signifikante Veränderung für das Stroma: Im Zuge der Lyse der Chloroplasten kommt es zu einer starken Verdünnung der Solutkonzentration. Es ist durchaus denkbar, dass gerade das cpSRP wegen seines ambivalenten Ladungsverhältnisses mit einem sauren cpSRP43 (pI = 4,34) und einem basischen cpSRP54 (pI = 9,01) in Folge interionischer Wechselwirkungen oligomerisieren könnte. Darüberhinaus könnten Oxidationsprozesse zu intermolekularen Disulfidbrücken führen. Um solche Effekte auszuschließen wurden Fraktionierungen von SE, welches längere Zeit in 0,5 mol/l NaCl, 0,1 mol/l β-ME bzw. beiden Agenzien inkubiert wurde, durchgeführt. Es zeigte sich in solchen GFC-Läufen eine gleichbleibende Fraktionierung des cpSRP (vgl. Abbildung 4.40).

Es ist zusammenfassend festzuhalten, dass im Rahmen dieser Arbeit der Hauptteil nativen cpSRPs als niedermolekulare Spezies bei ~150 kDa identifiziert werden konnte. Dies steht in direkter



Übereinstimmung mit dem MW von rekombinantem binärem cpSRP. Außerdem zeigt sich ebenso eine gute Übereinstimmung mit den Daten von Schönemann et al. 1998, welche eine 200 kDa Spezies detektierten. Andererseits zeigten sich im nicht-aufkonzentrierten SE auch schon höhermolekulare Addukte von potentiellen cpSRP-Komplexspezies. Natives cpSRP wies also auch ein gewisses Maß an Polydispersität auf. Dass es sich bei den höhermolekularen Komplexen um aggregierte(s) Protein/Komplexe in Folge von Denaturierung handelt, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Aufkonzentrierungen des SE deuten aber auf ein konzentrationsabhängiges Oligomerisierungsverhalten auch für natives cpSRP hin.

## **5.2. LHCP in Assoziation mit Solubilisierungs-vermittelndem cpSRP**

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen der Studien zur detergentfreien bzw. chaotropfreien Solubilisierung des stark hydrophoben LHCP-Apoproteins unterschiedliche cpSRP-Spezies als Löslichkeitsvermittler bzw. sich daraus ergebende Komplexe charakterisiert. Das in Chloroplasten einzigartig vorkommende cpSRP43 wirkt als hochspezifischer Löslichkeitsvermittler für den LHCP. Es konnte schon zu Beginn der Arbeit gezeigt werden, dass cpSRP43 bei äquimolarer Anwesenheit vorgelöstes Membranprotein allein quantitativ zu lösen vermag. Die funktionelle Einheit in den Chloroplasten der Streptophyten stellt jedoch der cpSRP-Volllängenkomples dar. Letztlich wurde der 54M-cpSRP-Komplex mit einer Deletionsmutante des 54er Proteins in seiner Assoziation mit dem LHCP charakterisiert. Es werden im Folgenden zunächst übergeordnete Diskussionsaspekte angesprochen, die im Wesentlichen alle Komplexspezies betrafen. In diesem Zusammenhang werden gleiche Tendenzen, aber auch die Unterschiede der untersuchten verschiedenen LHCP-assoziierten cpSRP-Spezies aufgezeigt. Aus Übersichtsgründen wird in den Unterkapiteln jeweils nur ein spezifischer Diskussionspunkt fokussiert. Bestimmte Aspekte werden deshalb in ihrer Gesamtheit erst durch Betrachtung aller Kapitel der allgemeinen Diskussion deutlich.

### **5.2.1. Die densitometrische Auswertung zeigt variable Komplexstöchiometrien**

Schon im Zusammenhang mit cpSRP wurde die Stöchiometrie als „Gütekriterium“ für intakte Komplexe herangezogen. In der Einleitung dieser Arbeit wurden die hochspezifische Bindungsdomäne des LHCP, die stromale L18-Sequenz, schon eingehend vorgestellt. Chloroplastidäres SRP43 und ein synthetisches L18-Peptid binden in einer 1:1-Stöchiometrie. Stengel et al., 2008 identifizierten die Tetrapeptidsequenz DPLG innerhalb der L18-Struktur als hochspezifische Bindungssequenz an das Tyrosin 204 des cpSRP43. Das Tetrapeptid legt sich um die Phenolseitenkette der aromatischen AS. Zudem konnte gezeigt werden, dass die beschriebene Struktur des DPLG-Motivs schon genau jener des fertig gefalteten Komplexes entspricht. Im LHCP II legt sich die Tetrapeptidsequenz um eine stromal gelegene Luteinkopfgruppe. Es existieren darüberhinaus keine expliziten Studien zur cpSRP43-LHCP-Stöchiometrie. Dennoch kann und wird, insbesondere

aufgrund der Spezifität der DPLG-Bindung und deren zu vermutender Relevanz für die Pigmentierung/Proteinfaltung, eine definierte 1:1-Stöchiometrie angenommen. Eine von diesem 1:1-Verhältnis abweichende Stöchiometrie des Komplexes sollte dementsprechend auf unspezifische Anlagerung bzw. Aggregation zurück zu führen sein. Die cpSRP43-LHCP Stöchiometrie wurde anders als das 43/54er Verhältnis systematisch untersucht.

Möglichkeiten die Stöchiometrie systematisch zu untersuchen, stellen z.B. die Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) (Turnbull und Daranas, 2003) sowie unter bestimmten Umständen die GFC sowie die native Elektrophorese dar. ITC war als Methode nicht verfügbar. Die Native Elektrophorese kam aus Labilitätsgründen des cpSRP-LHCP-Komplexes nicht in Betracht (vgl. 5.2.6). Die GFC konnte schließlich auch nicht direkt genutzt werden, da aufgrund des ungewöhnlichen Laufverhaltens des cpSRP43 eine eindeutige Beziehung zwischen MW und Komplexstöchiometrie nicht gegeben war. Die Bestimmung der Stöchiometrie erfolgte schließlich über eine densitometrische Auswertung der Proteinbandenintensitäten. Dabei handelte es sich um eine indirekte Methode, da zunächst ein Intensitätsverhältnis bei bekannter Stöchiometrie definiert werden muss. Das heißt, es wurden genau definierte Mengen bzw. Stöchiometrien der Zielproteine zunächst nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Coomassiefärbung densitometrisch ausgewertet und ein Intensitätsverhältnis bei gegebener Stöchiometrie definiert. Folgend konnte für die GFC-Fractionen von Komplexbildungsansätzen nach deren elektrophoretischer Auftrennung und Färbung eine apparente Stöchiometrie bestimmt werden. Es ergab sich bei Äquimolarität der Komplexbestandteile ein densitometrisches Intensitätsverhältnis cpSRP43:LHCP von 1,93. Die Standardabweichung betrug dabei nur 0,05. Wie erwartet, sollte also bei Äquimolarität der Proteine die cpSRP43-Bande deutlich intensiver, genauer gesagt fast doppelt so intensiv in Erscheinung treten wie die LHCP-Bande.

Mithilfe dieses Referenzwertes wurden verschiedene repräsentative Fraktionierungen der unterschiedlichen cpSRP-LHCP-Spezies untersucht. Zunächst wird sich auf cpSRP43-LHCP-Kopplungen (vgl. Abbildung 4.24) bezogen: Die hochmolekularen Komplexe mit 940 kDa (Urea-Methode) bzw. 580 kDa (Detergenz-Standard-Methode) besitzen einen überstöchiometrischen Anteil von LHCP. In beiden Fällen ist die Tendenz gleich: Je hochmolekularer die Komplexe, desto höher ist der relative LHCP-Gehalt. Im Falle der Urea-Ansätze liegt dieser Überschuss bei den hochmolekularsten Fraktionen > 1000 kDa bei bis zu dem 3,92 fachen LHCP über cpSRP43. Die Komplexe aus der Detergenz-Standard-Kopplung zeigen einen maximalen 2,55 fachen Überschuss von LHCP gegenüber cpSRP43. Es ist jedoch erkennbar, dass die Komplexe beider Herstellungsmethoden bei gleichem apparenten Molekulargewicht ein ungefähr identisches Verhältnis von LHCP zu cpSRP43 zeigen. Bei Betrachtung der Hauptelution (Elutionspeaks) erkennt man wiederum, dass die „Urea“-Komplexe im Peak (apparent bei 940 kDa) ein LHCP:cpSRP43-Verhältnis von 2,34 aufweisen (vgl. Abbildung 4.17 und Abbildung 4.24). Die „SDS“-Komplexe (apparent bei 580 kDa) hingegen ein Verhältnis LHCP:cpSRP43 von 1,43.

Was sagt dieses Ergebnis über cpSRP43-LHCP-Komplexbildungen aus? Es ist im Rahmen dieser Kopplungen aufgrund der starken Abweichung von einer 1:1-Stöchiometrie von unspezifischer Aggregation auszugehen. Neben den oben erwähnten Stöchiometrieverhältnissen (bei äquimolarer Kopplung) zeigten Variationen der Einzelproteinstöchiometrie (4 facher cpSRP43-/ 4 facher LHCP-Überschuss) darüberhinaus wechselnde Komplexstöchiometrien (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit muss ganz eindeutig von unspezifischer Aggregation auszugehen sein. Es kann deshalb die spezifische cpSRP43-LHCP-Komplexbildung prinzipiell ausgeschlossen werden. Dennoch kann und sollte eine spezifische Komplexbildung im Sinne einer spezifischen Wechselwirkung zwischen L18-Domäne des LHCP mit dem cpSRP43 stattgefunden haben. Die Tatsache, dass in äquimolaren Ansätzen Membranprotein immer vollständig im Überstand verbleibt, lässt eine hohe Affinität in Folge von Spezifität vermuten. Geht man davon aus, ist es dennoch eindeutig, dass das cpSRP43 alleine nicht in der Lage war, unspezifische LHCP-Interaktion zu verhindern. Es sind insbesondere zwei Trends erkennbar: 1. Die unspezifische Wechselwirkung ist nicht im gleichen Maße überall vorhanden. In dem polydispersen Mix der sich bildenden Komplexspezies mit unterschiedlichem Oligomerisierungsgrad korreliert letzterer mit dem Ausmaß unspezifischer Wechselwirkung. Die unspezifische Wechselwirkung ist in erster Linie gleich hydrophober LHCP-Interaktion zu setzen. Dies begründet sich dadurch, dass cpSRP43 alleine nie Oligomerisierungsverhalten zeigte. Außerdem zeigten solche Komplexe aus einer Kopplung mit 4 fachem LHCP-Überschuss einen noch deutlich stärkeren Membranprotein Überschuss in den Komplexfraktionen (Ergebnisse nicht gezeigt). Es ist außerdem erkennbar, dass zunehmend hochmolekulareres Laufverhalten der „Komplexe“ mit einem zunehmenden LHCP-Anteil korrelierte. Ergo ist die unspezifische LHCP-Interaktion stark mitverantwortlich für die ausgeprägte „Aggregation“ der Komplexe. 2. Die „Urea-Methode“ führt nicht nur zu hochmolekularen „Komplexen“, sondern es kommt im Vergleich zur „Detergenz-Standard- Methode“ auch zu deutlich vermehrter unspezifischer LHCP-Interaktion. Das bedeutet, dass im Falle des Detergenz-solubilisierten LHCPs die hydrophobe Interaktion besser unterbunden wird als mit Urea-solubiliertem Protein. Außerdem kann bei einem LHCP:cpSRPP-Verhältnis von 1,43 (im Elutionspeak) spekuliert werden, dass bei der Detergenz-Standard-Methode definierte (oligomerisierte) 1:1-Komplexe neben anderen Komplexen mit nicht-stöchiometrischer Zusammensetzung nebeneinander vorlagen. Das würde dann auf eine unspezifische Oligomerisierung binärer cpSRP-LHCP-Komplexe hindeuten. Darüberhinaus wurde eine cpSRP43-LHCP-Kopplung durchgeführt, bei welcher das Membranprotein immer nur portionsweise (je 1/20 des Gesamt-LHCPs) zugegeben wurde, so dass die transiente Konzentration von freiem LHCP deutlich geringer war. Der hohe Überschuss des cpSRP43 sollte dann eine Interaktion mit dem selbigen begünstigen und weniger LHCP-Interaktionen zu lassen. Tatsächlich liegt das LHCP-cpSRP43-Verhältnis im Elutionspeak der Komplexe (880 kDa) bei 1,43 und das obwohl Urea-solubilisierter LHCP eingesetzt wurde. Das heißt trotz deutlich höherem Oligomerisierungsgrad kann auch hier prinzipiell ein Anteil definierter 1:1-

Komplexe spekuliert werden und dementsprechend eine unspezifische Zusammenlagerung „spezifischer Komplexe“.

Im Zusammenhang mit Vollängen-Transitkomplex wurde ebenso eine Auswertung der stöchiometrischen Verhältnisse von LHCP:cpSRP43 vorgenommen. Dieses betrug für den 7  $\mu\text{mol/l}$  Ansatz im kompletten Elutionsbereich mehr oder weniger konstant 1,25 (vgl. Abbildung 4.30). Es kann daraus in jedem Fall geschlussfolgert werden, dass die cpSRP54 die unspezifische Wechselwirkung im Sinne der hydrophoben Aggregation des LHCP deutlich zurückdrängt. Es wurden im Rahmen der Transitkomplexbindungen keine variierenden Stöchiometrieverhältnisse der Einzelproteine in der Kopplung eingesetzt, weshalb nicht mit letzter Bestimmtheit gesagt werden kann, dass das Verhältnis von 1,25 nicht die Ausgangsmischung widerspiegelt. Jedoch kann dies prinzipiell ausgeschlossen werden, da 1. die Intensitätsverhältnisse aller anderen Transitkomplexbindungen augenscheinlich mit dem densitometrisch vermessenen sehr gut übereinstimmten. Im Falle einer unspezifischen Kopplung wäre nicht davon auszugehen gewesen. 2. Eine unspezifische cpSRP43-LHCP-Wechselwirkung wurde, aufgrund der in der Literatur als sehr spezifische Wechselwirkung beschriebene Interaktion, generell nahezu ausgeschlossen. Da das Verhältnis von 1,25 nahe an der Äquimolarität ist und unter Berücksichtigung obiger Ausführungen, wurde die Anwesenheit von definierten Komplexen unbedingt angenommen. Darüberhinaus zeigt die „Konstanz“ dieses Werts über den kompletten Elutionsbereich, dass trotz polydisperser Zusammensetzung (also unterschiedlicher Oligomerisierungsgrad) der relative Aufbau der Komplexe zumindest bezogen auf das cpSRP43 und LHCP nahezu immer gleich ist. Anders ausgedrückt, kann die konstante Stöchiometrie so gedeutet werden, dass die „Bausteine“ der verschiedenen oligomerisierten Spezies immer gleich sind, sich jedoch in ihrer Anzahl im Komplex unterscheiden. Die densitometrische Auswertung der Proteinbandenintensitäten von 54M-Transitkomplex Fraktionierungen zeigte schließlich ein äquimolares LHCP:cpSRP43 bzw. sogar ein überstöchiometrisches Verhältnis des cpSRP43 (vgl. Abbildung 4.37). Die Auswertung geschah hier mit einem Ansatz, welchem ein zusätzlicher Überschuss von freiem cpSRP54M zugegeben wurde (vgl. Abbildung 4.34). Diese zeigten auch hinsichtlich des Oligomerisierungszustands einen Großteil von potentiell ternären Komplexen. Somit wird geschlussfolgert, dass die unspezifische Wechselwirkung im Sinne einer hydrophoben LHCP-Aggregation durch die M-Domäne des cpSRP54 verhindert werden konnte. Dies gilt auch für hochmolekulare (oligomerisierte) Komplexe, da sich die 1:1-Stöchiometrie über den kompletten Elutionsbereich zeigte.

### **5.2.2. Hydrophobe Interaktion nicht abgeschirmter LHCP-Bereiche führt zur Oligomerisierung der cpSRP-LHCP-Spezies**

Zuvor wurde die Stöchiometrie der Komplexe diskutiert. Im Fall der Vollängentransitkomplexes wurde herausgearbeitet, dass bei der Proteinstöchiometrie (LHCP:cpSRP43) im Komplex von 1,25

die Anwesenheit von definierten 1:1-Komplexen unbedingt angenommen werden sollte. Im Fall des 54M-Transitkomplexes ist aufgrund der 1:1-Stöchiometrie prinzipiell nur von intakten Komplexen auszugehen. Selbst im Zusammenhang mit cpSRP43-LHCP-Komplexen nach Detergenz-Standard-Methode und einem Stöchiometrieverhältnis von 1,43 sollte prinzipiell von der partiellen Anwesenheit von 1:1-Komplexen auszugehen sein. Insbesondere die Vollängentransitkomplexe zeigten nicht nur im Elutionspeak bei apparent 315 kDa, sondern auch bei höheren apparenten Molekulargewichten von bis zu 700 kDa (vgl. Abbildung 4.30) noch eine LHCP:cpSRP43-Stöchiometrie von 1,25. Ebenso wiesen die 43-LHCP-Komplexe (Standard-Detergenz-Methode) das Verhältnis von 1,43 im Elutionspeak bei einem apparenten MW von 580 kDa auf. 54M-Transitkomplexe wiesen schließlich gar Äquimolarität auf und dies auch bei hochmolekularen Fraktionen (> 300 kDa, vgl. Abbildung 4.34). Das heißt, es ist prinzipiell (cpSRP43-LHCP-Komplex) bzw. sehr wahrscheinlich (Transitkomplex bzw. 54M-Transitkomplex) von definierten Komplexen (im Sinne eines LHCP:cpSRP43 Verhältnisses von 1:1) bei diesen hohen Molekulargewichten auszugehen. Binärer 43-LHCP-Komplex (theoretisches MW: 61,4 kDa) wäre aufgrund des ungewöhnlichen Laufverhaltens des cpSRP43 bei apparent ~105 kDa zu erwarten gewesen. Ternärer Transitkomplex (theoretisches MW: 114 kDa) unter Betrachtung des Laufverhaltens von binärem cpSRP bei 150 kDa hätte bei ~175 kDa eluieren sollen. 54M-Transitkomplex (theoretisches MW: 83 kDa) schließlich sollte bei ~135 kDa eluieren. Tatsächlich konnte außer dem 54M-Transitkomplex jedoch keiner der anderen Komplexspezies bei diesen apparenten MWs in GFC-Läufen detektiert werden.

Wie kann dieses hochmolekulare Laufverhalten mit definierten Komplexen in Übereinstimmung gebracht werden und welche Kräfte führen zu einer Zusammenlagerung? Es ist zunächst davon auszugehen, dass definierte Komplexe oligomerisierten. Es kann angenommen werden, dass es zu Beginn zu einer spezifischen Wechselwirkung zwischen cpSRP43 und LHCP unter Ausbildung eines 1:1-Komplexes gekommen ist. Es folgte daraufhin keine „unkontrollierte“ LHCP-Interaktion im Sinne, dass (nur) hydrophobe Proteindomänen des Membranproteins relativ wahllos mit anderen solcher unpolaren Domänen aggregierten. Vielmehr kam es zu einer Art „ganzheitlicher“ unspezifischer Wechselwirkung bzw. Zusammenlagerung zwischen definierten cpSRP-LHCP-Komplexen, die zu höhermolekularen Addukten führte. Solche unspezifische Zusammenlagerung definierter Komplexe brachte Oligomere mit 1:1-Stöchiometrie hervor. Potentielle 1:1 Komplexe aus cpSRP43 und LHCP bei einem apparenten MW von 580 kDa (Detergenz-Standard-Methode), sollten tendenziell aus 5 zusammengelagerten „cpSRP43-LHCP-Bausteinen“ bestehen. Im Falle des cpSRP-LHCP-Komplexes sollte bei einem apparenten MW von ~315 kDa von 2 zusammengelagerten ternären Transitkomplexen auszugehen sein. 54M-Transitkomplexe zeigten einen Anteil von potentiell ternärem Komplex bei ~135 kDa. Da aber auch die höhermolekularen Komplexe eine 1:1-Stöchiometrie zeigten, ist bei diesen auch von einer Zusammenlagerung definierter Komplexe auszugehen. Die Ursache für die „kontrollierte Oligomerisierung“ könnte potentiell mit der unspezifischen Wechselwirkung bzw. Zusammenlagerung von im Komplex exponierten hydrophoben

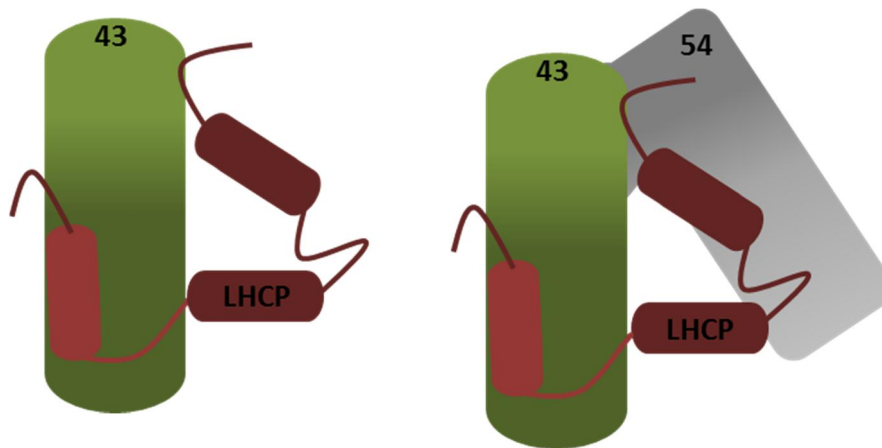
LHCP-Domänen liegen. Dies ist im Hinblick auf den cpSRP43-LHCP- sowie den 54M-Transitkomplex reaktiv eindeutig, da die Chaperonbestandteile (also cpSRP43 bzw. cpSRP54M) in Abwesenheit des LHCP nie Oligomerisierungstendenzen zeigten. Im Falle des Volllängen-Transitkomplexes kann getroffene Aussage hingegen nicht mit letzter Bestimmtheit gehalten werden, da insbesondere das Volllängen-cpSRP54 selbst immer wieder die Tendenz zur Oligomerisierung zeigte (vgl. 5.1.4). Ein weiterer entscheidender Hinweis, dass es sich in jedem Fall um hydrophobe Interaktion bei der Oligomerisierung handeln sollte, zeigt die Tatsache, dass die Komplexbildung in Anwesenheit von 1 mol/l NaCl ebenfalls hocholigomerisierte Kopplungsaddukte erbrachte (Ergebnisse nicht gezeigt). Es ist deshalb anzunehmen, dass das cpSRP43 nicht in der Lage ist, die hydrophoben Domänen seines Cargoproteins vollständig abzuschirmen. Entsprechend unpolare Bereiche werden zwar vor (obig beschriebener) „unkontrollierter LHCP-Zusammenlagerung“ geschützt, dennoch nicht in dem Maße, dass eine Oligomerisierung von Einzelkomplexen verhindert werden kann.

In der Literatur wird potentiell ternärer Transitkomplex nur von Payan und Cline, 1991 beschrieben. Die Autoren detektierten ohne die genaue Kenntnis des cpSRPs eine lösliche LHCP-Spezies bei 120 bzw. 125 kDa. Die Molekulargrößen wurden mittels nativer Gelelektrophoreseläufe verschiedener Polyacrylamidkonzentration bestimmt. Ersteres MW konnte für eine lösliche LHCP-Spezies, welche nach vorausgegangener Chloroplasteninsertion von radioaktiv markierten precursor LHCP (pLHCP) direkt aus dem Stroma extrahiert wurde, ermittelt werden. Ein MW von 125 kDa zeigte eine LHCP-Spezies von radioaktiv markierten maturen LHCP, welche mit Stromaextrakt *in vitro* inkubiert wurde. Die Autoren konnten höchstwahrscheinlich unter Verwendung von nativem cpSRP einen ternären Transitkomplex beschreiben. Im Zusammenhang mit ausschließlich rekombinanten Proteinen gab es jedoch noch keine genaue Beschreibung eines binären bzw. ternären Komplexes. Jaru Ampornpan et al., 2013 stellen zwar im Rahmen ihrer Desaggregationsversuche von LHCP mit cpSRP43 ein Modell bis zur Monomolekularisierung des LHCP in binären Komplexen vor, können jedoch keine expliziten Nachweise für die Existenz solcher Komplexe liefern. Die Daten der Autoren beruhen ausschließlich auf statischen Lichtstreuungsversuchen bei 360 nm sowie auf Fluoreszenzanisotropie-Daten.

Es wird deutlich, dass die Literatur bezüglich der Beschreibung explizit gezeigter Vereinzelnung des LHCP durch sein Chaperon sehr dünn ist. Es stellt sich deshalb an dieser Stelle die Frage, inwiefern cpSRP43 überhaupt im Stande ist, das sehr stark hydrophobe Membranprotein mit seinen 3 Transmembrandomänen vollständig abzuschirmen? Tatsächlich besitzt das LHCP 70% der Größe seines Chaperons. Dieses Größenverhältnis zwischen Substrat und Löslichkeits-vermittelndem Chaperon ist höchst untypisch im Vergleich zu anderen Systemen. Es wurden in der Einleitung die bekanntesten Chaperonsysteme vorgestellt. Diese fungieren alle in einer 1:1-Stöchiometrie mit ihrem Substrat. Es wurde dabei die Kategorisierung in „Foldasen“ und „Holdasen“ eingeführt (Hoffmann et al., 2004). „Foldasen“ sind i.d.R. sehr hochmolekulare multimere Komplexe bis zu mehreren

Megadalton. Die Vertreter Hsp 104 bzw. das homologe prokaryotische ClpB z.B. bilden im Inneren eine axiale Pore aus und „inkorporieren“ das aggregationsanfällige Protein als Ganzes für den Ablauf seiner Rückfaltung (Lee et al. 2003; Bukau Horwich, 1998). Ein Vergleich mit den multimeren „Foldase“-Chaperonen ist im Falle des cpSRP43 nicht angebracht, da das Protein monomolekular arbeitet. Die „Holdasen“ hingegen sind gerade solche Chaperone, die als monomolekulare Strukturen agieren. Das Hsp70 schützt dabei immer nur sehr kleine Bereiche von mehreren AS seines Substrats bei Rück- bzw. Entfaltung bzw. generell vor Aggregation. Die sHSPs gehören ebenfalls zu dieser Gattung. Für diese 12-40 kDa großen Strukturen konnte gezeigt werden, dass sie mit ihren entfaltenen aggregationsanfälligen Substraten in einem stark überstöchiometrischen Verhältnis wechselwirken (Stengel et al., 2009). Chloroplastidäres SRP43 bindet in einer 1:1-Stöchiometrie an sein Chaperon (Stengel et al., 2008). Komplexbildungsversuche, die mit bis zu 8 fachem Überschuss von 43er Protein durchgeführt wurden, bestätigten dass ein großer molarer Überschuss keinen Einfluss auf das Oligomerisierungsverhalten der Komplexe hat (vgl. Abbildung 4.22). Überschüssiges cpSRP43 eluiert in entsprechenden GFC-Läufen als freies Protein von der Säule. Oben vorgestelltes Hsp70 interagiert mit seinen Substraten immer nur über kurze hydrophobe Bereiche. Auch im Falle des cpSRP43 konnte bezüglich der Interaktion mit den stark hydrophoben Transmembrandomänen bisher nur eine Interaktion mit der TM3 nachgewiesen werden (Cain et al., 2011). Daher ist es wohl sogar sehr wahrscheinlich, dass im cpSRP43-LHCP-Komplex hydrophobe Domänen nicht oder zumindest nicht vollständig abgeschirmt werden. Diese Ausführung erhärtet nochmal oben getroffene Aussage, dass auch im „definierten Komplex“ tatsächlich hydrophobe Interaktionsstellen vorhanden sind, welche die Oligomerisierung hervorrufen.

Es soll an dieser Stelle noch auf einen weiteren Aspekt eingegangen werden: Die Transitkopplungen (mit Vollängen-cpSRP) zeigten im Vergleich zu cpSRP43-LHCP-Komplex in der Hauptelution einen deutlich geringeren Oligomerisierungsgrad. Dieser wurde aufgrund des apparenten MWs auf ein „Transkomplexdimer“ geschätzt. Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass Bochumer Ergebnisse ( [REDACTED] [REDACTED] unveröffentlicht) bei gleicher Kopplungskonzentration etwas größere Transitkomplexe mit ~500 kDa zeigten. Dennoch hatten diese im Vergleich immer noch einen geringeren Oligomerisierungsgrad. Darüberhinaus wurde zuvor schon erläutert, dass auch höher oligomerisierte Transitkomplexe ein LHCP:cpSRP-Verhältnis von ~1,25 zeigten, was auf weniger „unkontrollierte LHCP-Interaktion“ hindeutet. Es kann daraus geschlossen werden, dass cpSRP54 wegen seines offensichtlich Oligomerisierungs-mindernden Effekts zu einer weiteren Abschirmung hydrophober Bereiche des LHCP beiträgt. Zwar sind keinerlei Interaktionsstellen zwischen cpSRP54 und LHCP bekannt und Li et al., 1994 beschreiben, dass rekombinantes cpSRP54 alleine nicht in der Lage ist, LHCP in Lösung zu halten, doch könnte das cpSRP54 z.B. über sterische Abschirmung seinen Effekt entfalten. Chloroplastidäres SRP54 ist ein L-förmiges Protein (vgl. 5.1.4) mit einer großen Oberfläche. Abbildung 5.3 zeigt schematisch, wie dieser „Oberflächeneffekt“ eine Abschirmung hydrophober Bereiche des LHCP zur Folge haben könnte.



**Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der cpSRP54 Abschrägung**

Links: cpSRP43-LHCP-Komplex in hypothetischer binärer Form. Rechts: cpSRP-LHCP-Komplex in hypothetischer ternärer Form. Die dunkel roten Bereiche des LHCP präsentieren den N/C-Terminus sowie TM 1+2. Für diese Bereiche wurde noch keine Interaktion gezeigt. Hellrot: Stromaler Loop sowie TM3

Es soll abschließend noch ein weiterer interessanter Anknüpfungspunkt erwähnt werden: Dünschede et al., 2013 berichten, dass das cpSRP43 der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* nicht an das chloroplastidär vorhandene cpSRP54 komplexieren kann. Der Grund dafür liegt in mehreren AS-Austauschen in den bei Landpflanzen hochkonservierten Sequenzbereichen, die für die spezifische Wechselwirkung zuständig sind. Diese Veränderungen sind andererseits bei den Chlorophyten konserviert. Komplexbildungen von cpSRP43 mit LHCP (Bedingungen in *Chlamydomonas reinhardtii*) zeigen ein apparentes MW von  $453 \pm 36$  kDa. Komplexbildungen von cpSRP43/cpSRP54M mit LHCP zeigen hingegen Komplexe bei  $173 \pm 9$  kDa. Beide durch Gelfiltration bestimmte Molekulargewichte sind in relativ guter Übereinstimmung mit solchen in dieser Arbeit (vgl. dazu auch 5.2.7). Die Studie stellt weiter fest, dass der cpSRP-Komplex nicht mit dem Erscheinen der LHC-Proteine co-evolierte. Es kann vermutet werden, dass das cpSRP mit dem „Landgang“ der Pflanzen als Komplex evolvierte und bei jenen eine effiziente LHCP-Insertion erst möglich machte. Es gibt also Hinweise darauf, dass cpSRP43 als spezifisches LHCP-Chaperon intrinsisch kein „Monomolekularisierungspotential“ besitzt. Vielmehr ist gerade cpSRP54, wenn auch nicht direkt mit dem LHCP interagierend, als Hilfsfaktor notwendig.

### 5.2.3. Kopplung mit Urea-gelöstem bzw. Detergenz-gelöstem LHCP führt zu mechanistisch unterschiedlich ablaufenden Komplexkopplungen

In den vorangegangenen Diskussionskapiteln wurde u.a. deutlich, dass die Art der Vorsolubilisierung des LHCP und der damit verbundene Eintrag des Solubilisierungsagenzes in den Komplexbildungsansatz einen starken Einfluss auf die Eigenschaften der sich bildenden Komplexspezies hatte. Bei Betrachtung der cpSRP43-LHCP-Spezies wird deutlich, dass die Verwendung von SDS-gelöstem LHCP (Detergenz-Standard-Methode) gegenüber dem Eintrag von Urea-solubiliertem LHCP (Urea-Methode) sowohl deutlich weniger unspezifische LHCP-Aggregation als auch damit verbunden einen signifikant geringeren Oligomerisierungsgrad zeigte. Da im Falle der 43er-Chaperonisierung die Urea-Methode ungeeignet war, definierte Komplexe zu



erzeugen, wurde diese im Zusammenhang mit (54M)-Transitkomplexbildungen nicht mehr eingesetzt. In der Literatur beschriebene Studien zur Komplexbildung zwischen cpSRP (43) und LHCP gehen jedoch i.d.R. immer von Urea-vorgelöstem LHCP aus. Das Membranprotein wird standardmäßig zunächst in 8 mol/l Urea vorgelöst und zwecks Komplexbildung unter Verdünnung in die wässrige Chaperonlösung gegeben (Schünemann et al., 1998, Falk et al., 2010, Jaru-Amporpan et al. 2010 und 2013). Diese Variante stellt sicher, dass das Membranprotein in denaturierter Form der jeweiligen cpSRP-Spezies „präsentiert“ wird. Im denaturierten bzw. linearisierten Zustand sollte das Protein auch relativ gut den *in vivo*-Verhältnissen nach der TOC-/TIC-Insertion durch die Chloroplastenhüllmembran entsprechen. Beide Kanäle transportieren ungefaltetes Protein (Oreb et al., 2008). Beschriebene Voraussetzung erfüllt aber auch SDS-gelöster LHCP. Es soll im Folgenden über die mutmaßlichen mechanistischen Unterschiede in den Abläufen der Methoden diskutiert werden. Und somit eine potentielle Idee für die signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Komplexbildungsmethode geliefert werden.

Harnstoff wird relativ schwach hydratisiert und wirkt als Wasserstrukturbrecher (Pelluso et al., 2007). Dadurch entfaltet er seinen chaotropen Charakter, in Folge dessen die Exposition von hydrophoben Bereichen begünstigt wird. Folglich gehen Membranproteine bei ausreichender Ureakonzentration in Lösung. Bhuyan, 2002 konnte in Verbindung mit Denaturierungsstudien zu Ferrocytochrom c zeigen, dass Harnstoff erst ab sehr hohen Konzentrationen (im Zusammenhang mit Ferrocytochrom c ab ~5 mol/l) einen stark zunehmenden Denaturierungseffekt aufweist. In allen Komplexbildungen, die in dieser Arbeit in Verbindung mit Urea-gelöstem LHCP durchgeführt wurden (LHCP in 8 mol/l Urea vorgelöst), betrug die Endkonzentration von Harnstoff im Kopplungsansatz  $\leq 1$  mol/l. Somit war ein denaturierender Effekt des Harnstoffs im Kopplungsansatz prinzipiell ausgeschlossen. Die Zugabe des vorgelösten LHCPs in die wässrige Chaperonlösung erfolgte unter starkem Vortexen, um eine sofortige homogene Vermischung im Ansatz zu gewährleisten. Gleichzeitig erfährt das Membranprotein einen abrupten Wechsel von einer „per se Solubilisierungs-vermittelnden Umgebung“ in eine sehr hydrophile und bedingt „Solubilisierungs-vermittelnde Umgebung“. Unspezifische LHCP-Aggregation und spezifische cpSRP43-LHCP-Interaktion können in diesem Augenblick als kinetische Konkurrenzreaktionen betrachtet werden. Prinzipiell sind Aggregationsreaktionen deutlich schneller als Faltungsvorgänge. Goldberg et al., 1991 zeigten in Versuchen zur Renaturierung von Eiweiß-Lysozym aus hoch-konzentrierten Urealösungen, dass sich in weniger als 5 Sekunden Strukturen bilden, die zur Aggregation führen. Eiweiß-Lysozym ist im Gegensatz zum LHCP ein wasserlösliches Protein und sollte auch im denaturierten Zustand einen geringeren Anteil von aggregationsanfälligen, hydrophoben Domänen exponieren. Somit kann angenommen werden, dass bei dem Einbringen des vorsolubilisierten LHCPs in eine wässrige Umgebung dieser Vorgang noch schneller ist. Die cpSRP43-LHCP-Kopplung kann prinzipiell als Faltungsvorgang interpretiert werden. Bei der spezifischen Interaktion des Membranproteins mit dem Chaperon ändert dieses zumindest partiell seine Konformation. Es existiert keine direkte

Geschwindigkeitskonstante für die Komplexbildung, jedoch bestimmten Jaru-Ampornpan et al. 2013 in Desaggregationsprozessen von LHCP mit cpSRP43 eine quantitative Anbindung des Chaperonmoleküls an sein Substrat innerhalb von 15 s. Tatsächlich wurde nun im Falle der Urea-Kopplung ein hohes Maß an LHCP-Aggregation (überstöchiometrischer Anteil in cpSRP43-LHCP-Komplexen) beobachtet. Es bildeten sich Komplexe mit bis zu einem 4 fachen und im Elutionspeak einen mehr als 2 fachen LHCP-Überschuss. Daher ist tatsächlich von einer schnelleren Kinetik der Aggregation auszugehen. Solche Agglomerate assoziierten offensichtlich noch an cpSRP43 und erlangten dadurch Löslichkeit. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der abrupte Wechsel der „Löslichkeits-vermittelnden Umgebung“ im Zusammenhang mit der „Urea-Methode“ die unspezifische LHCP-Aggregation aufgrund des schnelleren kinetischen Ablaufs gegenüber „geordneter“ spezifischer Komplexbildung begünstigt. Es muss an dieser Stelle jedoch festgehalten werden, dass prinzipiell alternative Methoden zur graduellen Entfernung des Harnstoffs existieren, wie insbesondere die Dialyse. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit nicht getestet. Der Grund dafür war, dass mit der im Folgenden beschriebenen Methode der Detergenz-Standard-Methode ein Protokoll zur „definierteren“ Komplexbildung zur Verfügung stand. Dennoch erscheinen Versuche mit einer graduellen Harnstoffentfernung aus 2 Gründen lohnenswert: 1. Zur Überprüfung, inwiefern obige These einer vermehrten unspezifischen LHCP-Aggregation infolge einer abrupten Entfernung des Solubilisierungsmittels tatsächlich unterstützt wird. Die Aussagekraft solcher Experimente würde besonders darin liegen, besser zu erkennen inwiefern unspezifische LHCP-Zusammenlagerung durch kontrollierte und langsame Komplexbildung tatsächlich zurückgedrängt werden kann. Sollte die zeitliche Komponente bzw. der sehr schonende Entzug des Solubilisierungsmittels einen großen Effekt hinsichtlich der Verhinderung unspezifischer Interaktion haben, würde mit der Dialyse eine Methode mit bester Kontrollierbarkeit zur Verfügung stehen. 2. Die Verwendung von Urea-solubiliertem LHCP ist deshalb wünschenswert, da die Verwendung von SDS hinsichtlich der restlosen Entfernung des Detergenzes aus dem Kopplungsansatz schwierig ist. Ein potentieller Einfluss des SDS auch bei niedrigsten Restkonzentrationen kann nie völlig ausgeschlossen werden.

Der prinzipielle mechanistische Ablauf der Komplexbildung nach Detergenz-Standard-Methode ist grundlegend anders zu betrachten. SDS-gelöstes LHCP wurde im Komplexbildungsansatz so zu vorgelegtem Chaperon gegeben, dass die Detergenz-Konzentration zunächst 0,5-1% betrug. Somit gelangt das Membranprotein zunächst in eine „per se Solubilisierungs-vermittelnde Umgebung“. Der Entzug der SDS-vermittelten Löslichkeit geschieht während der  $K^+$ -Fällung in der Kälte graduell. Außerdem schließt diese Methode eine Renaturierung der Proteine aus einem denaturierten Zustand mit ein. Somit war es im Zusammenhang mit der Transitkomplexbildung auch unerheblich, ob der eingesetzte cpSRP-Komplex voroligomerisiert zum Einsatz kam. Es kann angenommen werden, dass während des sukzessiven Prozesses der Ausfällung des Detergenzes eine Renaturierung mit gleichzeitiger Komplexbildung stattfindet. Der Prozess kann folgendermaßen betrachtet werden: Die denaturierten Proteine erfahren zunächst durch DS-Bindung starke Abstoßungskräfte und liegen

monomolekular gelöst nebeneinander vor. In dem Maße wie DS durch Fällung sukzessive dem System entzogen wird, sollte es zur Rückfaltung der Proteine bzw. zur Komplexbildung kommen. Die Vorgänge während des Detergenzentzugs muss man sich prinzipiell dynamisch vorstellen. Es kann vermutet werden, dass ein solcher Prozess eine thermodynamisch kontrollierte Reaktion (spezifische cpSRP43-LHCP-Interaktion) gegenüber einer kinetisch bevorzugten Reaktion (unspezifische LHCP-Aggregation) begünstigt. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte darin bestehen, dass SDS prinzipiell stärker an hydrophobe Domänen assoziiert. Folglich kann spekuliert werden, dass die spezifische Komplexbildung über die potentiell hydrophile L18-Domäne des LHCP schon abläuft, während die hydrophoben Membrandomänen noch relativ mehr SDS gebunden haben. Dieses hätte zunächst den Effekt, dass es aufgrund elektrostatischer Rückstoßung signifikant schwächer zu hydrophober Wechselwirkung kommt. „Fertige“ Komplexe zeigten generell ein nur noch sehr schwaches Oligomerisierungspotential (vgl. auch 5.2.4). Somit kann weiter angenommen werden, dass „spätere“ Komplexbildungszustände deutlich weniger aggregationsanfällige Domänen exponierten. Es kann spekuliert werden, dass zu einem Zeitpunkt, zu welchem in Folge des SDS-Entzugs dessen „Abstoßungseffekt“ nicht mehr ausreichte, ein kritischer Komplexbildungszustand schon überwunden wurde. Diese Abläufe können im Zusammenhang mit der Detergenz-Standard-Methode das deutlich geringere Maß an unspezifischer LHCP-Aggregation erklären.

Andererseits soll nicht unerwähnt bleiben, dass denaturierende Agenzien wie SDS bei zunehmender Verdünnung ab einer kritischen Konzentration als eine Barriere für die reguläre Proteinfaltung auftreten können. In einem intermediären Zustand der Proteinerückfaltung können, aufgrund noch vorhandener Exponierung hydrophober Bereiche, Proteine schnell unspezifische Wechselwirkungen ausbilden. Die Folge wären undefinierte Komplexe (Ho et al., 2002). Solch ein Prozess wird durch hohe Proteinkonzentrationen begünstigt. Entsprechend konnte im Zusammenhang mit hochkonzentrierten Kopplungsansätzen nach Detergenz-Standard-Methode deutlich stärkere Aggregation beobachtet werden.

#### **5.2.4. Der Oligomerisierungsgrad der cpSRP-LHCP-Spezies ist stark konzentrationsabhängig**

Für nahezu alle Komplexvarianten konnte übereinstimmend eine starke Konzentrationsabhängigkeit des Oligomerisierungsgrades festgestellt werden. Es muss hier jedoch zwischen 2 „Konzentrationsbegriffen“ unterschieden werden: 1. Die initiale Konzentration der Komplexbildungspartner im Kopplungsansatz; 2. Die Konzentration bzw. nachträgliche Aufkonzentrierung von Kopplungsansätzen. Eine starke Abhängigkeit der Oligomerisierung konnte in erster Linie mit initialen Konzentrationen der Komplexbildungspartner beobachtet werden. Eine nachträgliche Aufkonzentrierung gebildeter Komplexe hatte in der Regel nur noch schwachen Oligomerisierungsfördernden Einfluss. Die Diskussion bezüglich der konzentrationsabhängigen Oligomerisierung betrachtet prinzipiell nur das apparente Molekulargewicht der Komplexspezies. Es

wurde keine Analyse der Stöchiometrie der Komplexpartner bei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Ergo bezieht sich die Diskussion auch prinzipiell nicht auf die konzentrationsabhängige unspezifische LHCP-Aggregation, die gesondert hätte betrachtet werden müssen. Vielmehr zielt sie auf die unspezifische Zusammenlagerung von Komplexen ab. Es muss jedoch klar sein, dass entsprechend der Argumentation aus 5.2.2 zumindest im Fall der cpSRP43-LHCP-Kopplung beides miteinander korreliert.

Die cpSRP43-LHCP-Kopplungen nach Urea-Methode (Abbildung 4.18) zeigten einen besonders starken Einfluss der initialen Kopplungskonzentration auf den Oligomerisierungszustand: cpSRP43-LHCP-Komplex bildete bei einer Kopplungskonzentration von 4  $\mu\text{mol/l}$  Komplexe mit einem mittleren apparenten MW von 430 kDa. Eine Aufkonzentrierung dieses Ansatzes um den Faktor 6 zeigte Komplexe mit apparentem MW von 500 kDa. Die Komplexkopplung mit initial 6,6  $\mu\text{mol/l}$  Proteinkonzentration, welche direkt eingeengt wurde, wies hingegen ein mittleres MW von 940 kDa auf. Letzterer Ansatz wurde vor Auftrag auf die Säule zwar direkt 3 x aufkonzentriert, dies sollte jedoch entsprechend des gegenübergestellten Ansatzes (aufkonzentrierter 4  $\mu\text{mol/l}$ -Ansatz) auch in diesem Fall einen nur untergeordneten „Vergrößerungseffekt“ gehabt haben. Im Falle der Kopplung mit Urea-gelöstem LHCP führte demnach eine Konzentrationserhöhung um 65% im Kopplungsansatz zu Komplexen mit  $\sim 2$  x höherem apparenten MW. Interessanterweise zeigten hingegen binäre Kopplungen mit SDS-solubilisiertem LHCP trotz deutlich unterschiedlichen Kopplungskonzentrationen (9-20  $\mu\text{mol/l}$ ) ein konstantes mittleres apparentes MW der Komplexe von  $\sim 500$  kDa auf. Die 43-LHCP-Kopplungen nach Detergenz-Standard-Methode waren auch gleichzeitig die einzigen Komplexe, welche keine konzentrationsabhängige Oligomerisierung zeigten. Volllängen-Transitkomplex (Einsatz von SDS-solubilisiertem LHCP!) zeigte hingegen ein intensives Oligomerisierungsverhalten in Abhängigkeit von der initialen Proteinkonzentration; gleichzeitig aber einen geringen Effekt auf das apparente Laufverhalten bei nachträglicher Aufkonzentrierung (Abbildung 4.25, Abbildung 4.26). Bei 7  $\mu\text{mol/l}$  äquimolarer Proteinkonzentration wiesen die cpSRP-LHCP-Komplexe ein mittleres MW von 315 kDa auf; eine Aufkonzentrierung um den Faktor 6 (Endkonzentration: 40  $\mu\text{mol/l}$ ) brachte nur eine geringe Verschiebung hin zu 415 kDa. Bochumer Ergebnisse von [REDACTED] zeigten, dass eine Erhöhung auf 10  $\mu\text{mol/l}$  initialer Proteinkonzentration schon mit einem mittleren MW von 620 kDa zu einer ausgeprägteren Oligomerisierung führte. Eine Kopplungskonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  führte gar zu monodispers hocholigomerisierten Komplexen, die im Ausschlussvolumen der GFC-Säule  $> 1300$  kDa liefen. Ähnliches Verhalten konnte schließlich auch für 54M-Transitkomplex beobachtet werden (vgl. Abbildung 4.31). Im Zusammenhang mit 54M-Transitkomplex zeigten sich tendenziell 2 Fraktionen von Komplexspezies: Eine niedermolekulare Fraktion ( $< 240$  kDa) sowie eine höhermolekulare Transitkomplexspezies, die i.d.R. ein mittleres apparentes MW von  $\sim 500$  kDa hatte. Während im Fall des 7  $\mu\text{mol/l}$  Ansatzes die niedermolekulare Spezies deutlich überwiegte, verschob sich das „Gleichgewicht“ im 10  $\mu\text{mol/l}$  Ansatz stärker zu den hochmolekularen Komplexen.

Aufkonzentrierungen des 7  $\mu\text{mol/l}$ -Ansatzes um den Faktor 4 auf 28  $\mu\text{mol/l}$  zeigten ebenso eine Verschiebung in Richtung der hochmolekularen Spezies.

Wie kann dieser generelle Trend der Bildung höhermolekularer Komplexspezies in Abhängigkeit von der initialen Konzentration im Unterschied zu dem geringen Einfluss einer nachträglichen Aufkonzentrierung verstanden werden? Zunächst einmal stellen Oligomerisierung bzw. Aggregation oftmals konzentrationsabhängige Vorgänge dar. Je höher die Proteindichte in der Lösung, desto wahrscheinlicher ist ein intermolekularer Kontakt zwischen potentiell attraktiv wirkenden Sequenzen. Im Fall der cpSRP43-LHCP-Kopplung (Urea-Methode) ist das höhermolekulare Laufverhalten der Komplexe aus dem höher konzentrierten Ansatz (6,6  $\mu\text{mol/l}$ ) direkt mit der schon diskutierten ablaufenden (stärkeren) LHCP-Aggregation zu erklären. Der 4  $\mu\text{mol/l}$ -Ansatz zeigte in den Komplexfraktionen (densitometrische Auswertung) tatsächlich ein nahezu äquimolares Verhältnis zwischen LHCP- und cpSRP43-Signal (Ergebnisse aus Schad, Diplomarbeit 2014). Auch die 6-fach aufkonzentrierten Komplexe wiesen eine äquimolare Stöchiometrie auf. Daraus kann geschlossen werden, dass die unspezifische LHCP-Aggregation stark konzentrationsabhängig ist. 4  $\mu\text{mol/l}$  im Kopplungsansatz stellte jedoch eine Konzentration dar, bei welcher diese unspezifische hydrophobe Interaktion weitestgehend unterbunden werden konnte. Zudem kann gesagt werden, dass sobald der Komplex einmal fertig „gefaltet“ vorliegt (in oligomerisierter Struktur), dieser nicht mehr aggregationsanfällig ist. Es scheint dann alle potentiell hydrophob interagierenden Strukturen abgesättigt zu sein. Im Fall der Verwendung von SDS-gelöstem LHCP kann keine konzentrationsabhängige Oligomerisierung im Sinne einer stärkeren unspezifischen LHCP-Aggregation beobachtet werden. Unabhängig von der initialen Proteinkonzentration bilden sich gleich stark oligomerisierte Komplexe (im Sinne einer Komplexzusammenlagerung). Dies bedeutet, dass die Verwendung von SDS-gelöstem LHCP dessen unspezifische Aggregation Proteinkonzentrationsunabhängig verhindern kann. Bei Betrachtung des Vollängen-Transitkomplexes ergibt sich ein leicht anderes Bild. Zunächst kann festgehalten werden, dass der fertig „gefaltete“ Komplex in gleicher Weise wie der cpSRP43-LHCP-Komplex relativ inert gegenüber weiterer Oligomerisierung ist. Somit kann auch in diesem Fall von einer Absättigung hydrophober Domänen ausgegangen werden. Ein Unterschied besteht jedoch darin, dass trotz der Verwendung von SDS-gelöstem LHCP die Komplexe eine stark konzentrationsabhängige Oligomerisierung in Bezug auf die initiale Proteinkonzentration zeigten. Im Vergleich zu den cpSRP43-LHCP Komplexen drängt sich der Verdacht einer Beteiligung des cpSRP54s auf. Höher konzentrierte Transitkomplexansätze wurden nur bei der Kooperationsgruppe in Bochum (Ergebnisse von ██████████ unveröffentlicht) durchgeführt. Die Komplexfraktionen wurden nicht densitometrisch analysiert. Es ist jedoch augenfällig, dass das LHCP:cpSRP43-Verhältnis in den hochmolekularen Fraktionen des 100  $\mu\text{mol/l}$ -Ansatzes deutlich über 1,25 (vgl. Abbildung 4.26) liegt. Somit muss für solche Ansätze in Verbindung mit Transitkomplex eher wieder eine vermehrte unspezifische LHCP-Aggregation angenommen werden. Im Zusammenhang mit 54M-Transitkomplex schließlich zeigte sich ebenso eine stärkere

Oligomerisierung bei Erhöhung der initialen Proteinkonzentration. Hier konnte prinzipiell jedoch nur zwischen 2 Oligomerisierungszuständen unterschieden werden. Bochumer Ergebnisse zeigten jedoch, dass bei „hohen“ Konzentrationen (50  $\mu\text{mol/l}$ ) die Komplexe ebenso im Ausschlussvolumen bei  $> 1000$  kDa eluierten und sich zudem in diesen Fraktionen ein LHCP-Überschuss zeigte. Somit kann in jedem Fall ausgeschlossen werden, dass spezifisch die NG-Domäne des cpSRP54 für die konzentrationsabhängige Oligomerisierung verantwortlich war, da sich dieser Effekt auch im Zusammenhang mit deletiertem cpSRP54 zeigte. Die hoch-konzentrierten 54M-Transitkomplexe zeigten hingegen mit erhöhter initialer Proteinkonzentration auch eine augenscheinlich vermehrte LHCP-Aggregation.

### 5.2.5. Aggregationshemmer können die unspezifische LHCP-Interaktion nicht verhindern

Wie schon zuvor herausgestellt wurde (vgl. 5.2), muss das Vorhandensein überstöchiometrischer Mengen des LHCPs im Falle der cpSRP43-LHCP-Komplexe auf unspezifische hydrophobe Interaktion zurückzuführen sein. Auch die unspezifische Zusammenlagerung potentieller definierter Komplexe sollte durch hydrophobe Wechselwirkungen nicht abgesättigter LHCP-Domänen im Komplex verursacht sein. Interionische Wechselwirkungen sind ohnehin auszuschließen, da die Kopplungen standardmäßig in 0,3 mol/l NaCl-Puffer durchgeführt wurden. Die Motivation für den Salzeintrag entstammt der Beobachtung, dass cpSRP43 in salzhaltiger Umgebung eine verstärkte Chaperonaktivität besitzt (Jaru-Amporpan et al. 2010). Es muss natürlich klar gestellt werden, dass hydrophobe Interaktionen in salzhaltiger Umgebung tendenziell verstärkt ablaufen, weshalb die Abwesenheit von Salz prinzipiell sinnvoll gewesen wäre. Im Zusammenhang mit cpSRP43-LHCP-Kopplungen wurde nie in salzfreier Umgebung gearbeitet, jedoch zeigte sich im Falle der Herabsetzung des NaCl-Gehalts auf 0,15 mol/l absolut keine Auswirkung auf die Zusammensetzung der Komplexe. Daraus wurde geschlossen, dass der Salzeintrag sehr wahrscheinlich keinen verstärkten hydrophoben Effekt hervorruft. Andererseits konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von SDS-gelöstem LHCP zumindest die LHCP-Aggregation stark zurückgedrängt werden konnte. Aus diesem Grund und der Annahme, dass hydrophobe Interaktion auch der Grund für die unspezifische Oligomerisierung definierter Komplexe sein muss, wurden verschiedene Detergentien in Bezug auf ihren Einfluss auf die Komplexkopplung getestet. Wie unter 4.2.3 erwähnt, wurde das „Detergenz-Screening“ in Arbeitsteilung mit der Bochumer Arbeitsgruppe [REDACTED] durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt lag noch keine explizite Stöchiometrieauswertung der Komplexbestandteile in Abhängigkeit der beiden Komplexbildungsmethoden vor. Jedes Detergenz wurde entweder in Ansätzen nach Urea-Methode oder nach Detergenz-Standard-Methode verwendet. Mit Kenntnis der deutlich stärkeren LHCP-Aggregation bei Verwendung von Urea-solubilisiertem LHCP sollte die Aussagekraft für den Einfluss des jeweiligen Detergenzes trotzdem gewahrt sein. Denn ein potentieller spezifischer Einfluss eines Agenzes sollte sowohl die unspezifische LHCP-Aggregation als auch die unspezifische Komplexzusammenlagerung (mutmaßlich LHCP induziert) verhindern.

Detergentien können grundlegend kategorisiert werden in nicht-ionische, ionische und zwitterionische Vertreter, wobei hier jeweils nur die polare Kopfgruppe betrachtet wird. Nicht-ionische Detergentien haben den Vorteil, dass sie meist relativ mild sind, während ionische Vertreter eine deutlich stärkere Solubilisierungskraft, gleichzeitig aber auch einen stärkeren Denaturierungseffekt besitzen. Zwitterionische Strukturen bewegen sich i.d.R. inmitten dieses Wirkungsspektrums. Jedoch ist die Auswirkung eines Detergenzes letztlich recht proteinspezifisch. Darüberhinaus ist ein Detergenz durch die Länge seines hydrophoben Kohlenwasserstoff-Schwanzes charakterisiert. Es wurden im Rahmen eines „Detergenz-Screenings“ verschiedene laborübliche amphiphile Strukturen auf ihren Einfluss spezifisch die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen mutmaßlich interagierenden LHCP-Molekülen zu lösen, getestet (vgl. 4.2.3). Da die kritische Mizelläre Konzentration (CMC = critical micellar concentration) die minimale Konzentration definiert um ein hydrophobes Protein in Lösung zu halten, erschien es sinnvoll die Detergentien unterhalb, bei und oberhalb ihrer individuellen CMC zu testen. Die CMC ist insbesondere Temperatur- und Salzkonzentrations-abhängig. Trotz der Durchführung der Komplexkopplung bei einer NaCl-Konzentration von 0,3 mol/l, was zu einer Absenkung der tatsächlichen CMC in dieser Umgebung führt, wurde die Standard-CMC (gilt für ionenfreie Umgebung) angenommen.

Zunächst soll festgehalten werden, dass keines der getesteten Detergentien tatsächlich in der Lage war, spezifisch die mutmaßlich Aggregations-auslösenden LHCP-Interaktionen bzw. die unspezifische Zusammenlagerung der Komplexe zu unterbinden. Es zeigten sich prinzipiell 3 Auswirkungen: Komplexstabilitäts-/Oligomerisierungs-fördernder Einfluss, Komplexintegritäts-störender sowie schlicht kein erkennbarer Einfluss. Ersteres war im Zusammenhang mit den nicht-ionischen Detergentien LM und Desoxycholat der Fall. Bei beiden Detergentien zeigten sich bis zu einer 5 fachen CMC potentiell völlig intakte Komplexe. Das apparente MW nahm mit steigender Detergenzkonzentration um bis 43% zu. Bei beiden amphiphilen Verbindungen handelt es sich um relativ milde Detergentien mit langen hydrophoben Schwänzen. Es erscheint durchaus plausibel, dass die Zunahme des apparenten MWs nicht durch eine fortschreitende Oligomerisierung, sondern vielmehr durch die Anlagerung von Detergenzmolekülen an den Komplex, zustande kam. Diese These wird dadurch bestärkt, dass jeweils mit steigender Detergenzkonzentration das apparente MW sukzessive in „kleinen Schritten“ zunahm. Es kann an dieser Stelle spekuliert werden, ob gerade diese potentielle Anlagerung milder Detergentien mit ausgedehnten unpolaren Resten an den Komplex ein weiterer Hinweis auf dessen hydrophoben Charakter ist. Interessanterweise zeigte sich solches Verhalten nur in Verbindung mit nach Detergenz-Standard-Methode angesetzten Kopplungen. Die Detergentien TX-100, LDAO, CTAB sowie CHAPS zeigten auch bei 2 facher CMC keinen Einfluss auf die Komplexbildung. OG, Deriphat als zweifach anionisches Detergenz sowie SDS führten zu einer Desintegration der Komplexe. Diese verdeutlichte sich im Falle des Deriphats und OGs in zunehmend unabhängiger Elution der Komplexbestandteile (vgl. Abbildung 4.19). Interessanterweise zeigte sich das LHCP-Signal in beiden Fällen unverändert hochmolekular im Ausschlussvolumen der

Superdex 200 Säule, während sich das cpSRP43 polydispers auf deutlich niedrigmolekulare Fraktionen aufteilte. Im Falle des SDS-Zusatzes zeigte sich ein Co-elution des cpSRP43 und des LHCP mit einem Elutionspeak bei apparent ~240 kDa. Aufgrund der stöchiometrischen Zusammensetzung in der Fraktionierung konnte jedoch nicht von intakten Komplexen ausgegangen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Dieser Befund kann als weiterer Hinweis auf hydrophob interagierende bzw. oligomerisierte LHCP-Moleküle gedeutet werden. Die Detergentien Deriphat und OG zerstören offensichtlich die nicht-kovalente spezifische Komplexbindung zwischen LHCP und cpSRP43. Das LHCP-Signal taucht jedoch weiterhin bei gleichem bzw. höherem Molekulargewicht auf, d.h. es zeigt hier seine oligomerisierte Struktur ohne „Chaperonhülle“. Die hydrophoben unspezifischen Interaktionen innerhalb des Aggregats scheinen stabiler zu sein als solche zwischen cpSRP43 und LHCP. In dem Maße wie die Detergentien die Interaktion mit dem Löslichkeitsvermittelndem Protein auflösen, bilden diese selbst eine Detergenzmizelle um die LHCP-Aggregate. Dies muss angenommen werden, da die LHCP-Aggregate in Lösung verbleiben. Schließlich kann für den Einfluss des SDS angenommen werden, dass dieses aggressive Detergenz zusätzlich die Aggregatstruktur angreift bzw. diese sich in dauerhafter SDS-Umgebung erst gar nicht ausbildet. Das Ergebnis ist die Co-elution als SDS-gelöste Proteinspezies.

In der Literatur beschreiben Falk et al. 2010 die cpSRP43-LHCP Interaktion selbst als vorwiegend hydrophob. So findet einerseits die spezifische Anbindung der L18-Domäne in eine molekulare hydrophobe Rinne des cpSRP43 statt (Stengel et al. 2008), andererseits konnten Jaru-Amporpan et al. 2010 zeigen, dass Vollängen-LHCP um mindestens eine Größenordnung stärker an cpSRP43 bindet als dies das synthetische L18-Peptid tut. Dies weist auf einen klaren Beitrag hydrophober Domänen des LHCP zur Bindung an sein Chaperon hin. Es ist somit nicht verwunderlich, dass bestimmte Detergentien einen desintegrierenden Einfluss auf die spezifische Komplexbindung zeigten.

Neben Detergentien kommen noch weitere Substanzen tendenziell als Aggregationshemmer in Frage. Solche Co-solventen, zu denen insbesondere Polyole zählen, haben einen Protein-stabilisierenden Effekt. Timasheff 1993 beschreibt die Wechselwirkung zwischen den Polyolen und den Proteinen als indirekt, da diese nicht mit den Proteindomänen wechselwirken. Diamant et al., 2001 zeigten, dass es in Anwesenheit von Glycerin zu einer Erhöhung der Ausbeute von funktionellem Protein kam. Der Co-Solvent befand sich dabei in Lösungen von Urea-denaturierter Malat-Dehydrogenase, die sukzessive auf Konzentrationen verdünnt wurden, die potentiell eine Renaturierung des Proteins zu lassen. Die Autoren konnten mit steigender Konzentration von Glycerin eine zunehmende Reaktivierung um bis zu 70% gegenüber Osmolyt-freien Ansätzen detektieren. De Marco et al. 2005 mutmaßen schließlich, dass das Vermögen der Osmolyte die Proteinfaltung zu stimulieren insbesondere mit einem Viskositäts-steigernden Effekt der Proteinumgebung zusammenhängt. Dadurch wird die Geschwindigkeit der Faltung verlangsamt und die Wahrscheinlichkeit der thermodynamisch ungünstigeren Missfaltung gegenüber der korrekten verringert. Es wurden im



Rahmen dieser Arbeit 4 verschiedene Proteinaggregationshemmer (Saccharose, Glycerin, PEG, Urea) im Rahmen von Transitkomplexansätzen auf ihre Fähigkeit die Oligomerisierung zurück zu drängen, getestet (vgl. 4.3.2). Glycerin erschien dabei als vielversprechendster Kandidat, da dieses neben seinem osmotischen Effekt als amphiphile Schnittstelle fungieren kann. Vagenende et al. (2009) zeigten in Simulationsergebnissen, dass sich der 3-wertige Alkohol an hydrophobe Domänen anlagern kann und diesen mehr Löslichkeit vermittelt. Für Vollängen-Transitkomplexansätze wurde anhand der stöchiometrischen Auswertung eine Oligomerisierung im Sinne einer unspezifischen Komplexzusammenlagerung, hervorgerufen durch nicht-abgeschirmte hydrophobe Domänen des LHCP, angenommen. Eine Anlagerung des Glycerins an solche exponierten hydrophoben Bereiche oder ein Viskositäts-steigernder Effekt der anderen Agenzien könnte so vor dieser unspezifischen Wechselwirkung schützen. Die Transitkomplexansätze wurden nach Detergenz-Standard-Methode durchgeführt. Die potentiellen Proteinaggregationshemmer wurden zu Beginn den Ansätzen beigemischt, damit gewährleistet ist, dass diese während der mutmaßlichen Komplexbildung (KDS-Fällschritt) zugegen sind. Es zeigte sich jedoch im Vergleich zu Standardansätzen kein signifikant abweichendes apparentes MW der Komplexe (vgl. Abbildung 4.27). In gleicher Weise wie die getesteten Detergentien zeigten auch die Aggregationshemmer also keinen Effekt hinsichtlich der Verhinderung der unspezifischen Oligomerisierung.

#### 5.2.6. Die nicht-kovalente Interaktion im cpSRP-/ Transitkomplex ist „Elektrophorese-labil“

Die gewöhnliche Identifizierung der gebildeten cpSRP-LHCP-Komplexspezies verlief per nativer Gelfiltration und anschließender Visualisierung der Fraktionierung in einer SDS-PAGE mit Coomassie-Anfärbung. Diese Methode kann als 2D-Analyse von Komplexen verstanden werden. In der 1. nativen Dimension wird die Komplexintegrität nicht berührt und es kann mithilfe der GFC eine Molekulargrößenbestimmung vorgenommen werden. Die 2. denaturierende Dimension (SDS-PAGE) klärt über die Zusammensetzung der Komplexspezies auf. Eine andere Methode zur Identifizierung der Komplexe stellt die native Elektrophorese dar. Diese sagt zwar für sich alleine genommen nichts über die genaue Komplexzusammensetzung aus, doch kann diese anhand des apparenten Molekulargewichts in der PAGE abgeschätzt werden. Der Hauptvorteil der Identifizierung von Proteinkomplexen mittels nativer Elektrophorese ist die schnelle Durchführung der Methode. Es existieren 2 grundlegende Varianten der nativen Elektrophorese: 1. Die Blue-native PAGE (BN-PAGE); 2. Die colourless-native PAGE (CN-PAGE). Die CN-PAGE ist derzeit die mildeste verfügbare Elektrophorese-Methode (Wittig und Schägger, 2008). Andererseits birgt hier das Fernhalten von Detergentien in Verbindung mit Membranproteinen die Gefahr von Aggregation, welche sich oft als Schmierbanden äußert (Schägger et al., 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, Komplexbildungsansätze nach Urea-Methode zunächst in einer BN-PAGE aufzutrennen (Ergebnisse nicht gezeigt). Da der gebildete Transitkomplex

wasserlöslich ist, kamen im Zusammenhang mit der PAGE keine Detergentien zum Einsatz. Der Kathodenpuffer enthielt jedoch 0,002% Coomassie G250 (entspricht Invitrogen Manual Empfehlung). Die Elektrophorese wurde bei RT und konstanten 125 V durchgeführt und lag somit niedriger als vom Hersteller Invitrogen empfohlen (150 V). Es zeigte sich in der BN-PAGE sowohl für cpSRP als für Transitkomplex jeweils im hochmolekularen Bereich sowie unterhalb von 66 kDa Proteinschmier. Letzterer wurde in Verbindung mit monomolekularisierten Proteinen in Verbindung gebracht. Der Proteinschmier und das Ausbleiben distinkter Banden im Gel ließ darauf schließen, dass der Komplex in Gegenwart des anionischen Detergenzes Coomassie seine Integrität verlor. Eine CN-PAGE zeigte zwar kein entscheidend besseres Ergebnis (vgl. Abbildung 4.28), jedoch konnten hier teilweise distinkte Banden identifiziert werden. Es muss zunächst erwähnt werden, dass Molekulargewichtsbestimmungen im Zusammenhang mit einer CN-PAGE unter Vorbehalt zu sehen sind. Wittig und Schägger, 2005 betonen, dass diese nur für Protein(-komplexe) mit einem  $pI \leq 5,4$  tendenziell verlässlich sind. Dies sollte unter Betracht der Einzel-pIs der Komplexbestandteile jedoch weder für den cpSRP-Komplex noch für den Transitkomplex der Fall sein (vgl. 4.3.3). Insbesondere die Bahnen, in welchen sich Transitkomplex befand, zeigten wiederum hochmolekularen Schmier, gleichzeitig aber auch distinkte Banden bei knapp überhalb 480 kDa sowie knapp unterhalb 146 kDa. Die cpSRP-Komplex Kontrollbahnen wiesen diese Banden nur mit sehr schwacher Intensität und dazu etwas weiter unterhalb auf. Dennoch zeigten parallel durchgeführte Blots, dass es sich bei den distinkt auftretenden Banden potentiell um cpSRP-Komplex handeln sollte (vgl. Abbildung 4.29). Sowohl Anti-43- als Anti54-Blots hatten unterhalb von 146 kDa jeweils distinkte Signale auf gleicher Höhe. Außerdem zeigten sich etwas unterhalb von 242 kDa sowie unterhalb von 480 kDa in beiden Blots Banden auf exakt gleicher Höhe. Diese sollten als cpSRP-Spezies zu deuten sein. Im Gegensatz dazu wies der LHCP-Blot nur im oberen Bereich einen Schmier auf, was illustriert, dass das Protein schon kurz nach dem Einlaufen ins Gradientengel aggregierte. Außerdem erschien das Signal sehr schwach. Der 54er Blot zeigte sehr intensiven Proteinschmier über den kompletten Laufbereich. Chloroplastidäres 43er Protein im Vergleich dazu relativ wenig. Die Ergebnisse können so gedeutet werden, dass der Transitkomplex schon im oberen Bereich des Gradientengels zerfiel (LHCP-Proteinschmier) und das hydrophobe Membranprotein in Abwesenheit von Detergenz aggregierte. Auch der Großteil des cpSRP-Komplexes scheint zu zerfallen. Das 54er Protein aggregiert ebenfalls sehr stark. Dies lässt sich auch daran erkennen, dass trotz potentiell gleichen Auftrags wie cpSRP43 sich sehr wenig Protein monomolekular unterhalb von 54 kDa findet. Die als „intakter“ cpSRP gedeuteten Banden sollten nicht zerfallene Komplexe unterschiedlichen Oligomerisierungsgrades darstellen, wobei es sich potentiell bei dem Signal unterhalb von 146 kDa um binären cpSRP handeln müsste.

Es ist durchaus erstaunlich, dass der Komplex (sowohl Transit- als auch cpSRP-Komplex) im Zusammenhang mit der nativen elektrophoretischen Auftrennung (CN-PAGE) solch eine geringe Stabilität aufweist. Laserre et al., 2006 konnten mithilfe von 2-D BN-PAGE/SDS-PAGE auf der

Suche nach generellen Proteininteraktionen löslicher cytosolischer bzw. in der Cytoplasmamembran von *E.coli* situierten Proteinen 50 heteromere Proteinkomplexe identifizieren. Gavin et al., 2002 konnten mithilfe einer tandem affinity purification (TAP), die auf sehr milde Weise eine Interaktion eines Proteins durch Bindung an seinen „tag“-tragenden Komplexpartner mittels Affinitätschromatographie bestimmt, lediglich 18 heteromere Proteinkomplexe beschreiben. Rak et al. 2007 konnten in Verbindung mit Untersuchungen zu diversen Untereinheiten der ATP-Synthase aus Hefezellen zeigen, dass bei Verwendung der CN-PAGE und unter Einsatz von Digitonin nahezu die komplette Supramolekulare Struktur des Komplexes erhalten blieb. Diese Studien zeigen, dass selbst unter den Bedingungen der BN-PAGE schon eine Vielzahl von Proteinkomplexen stabil bleiben. Die CN-PAGE stellt eine noch mildere Methode dar, die sogar die Integrität von Supramolekularen Komplexen erhält und aufgrund ihres schonenden Charakters anderen Methoden überlegen ist. Da ein Gradientengel (4-16%) benutzt wurde, ist es darüberhinaus erstaunlich, dass der Transitkomplex offensichtlich schon im oberen Teil des Gels zerfiel. In der oberen weitmaschigen Polyacrylamidmatrix sollten wenn überhaupt nur sehr schwache Scherkräfte innerhalb des Proteinkomplexes infolge der Migration auftreten. Auffällig ist im Zusammenhang mit dem LHCP-Blot aber auch dessen schwache Intensität im Vergleich zu den cpSRP-Blots, obwohl dieser im Kopplungsansatz äquimolar zugesetzt wurde. Dies könnte aber auch nur eine Folge einer schlechten Blotperformance sein, wie sie im Laufe der Arbeit einige Male im Zusammenhang mit LHCP-Blots beobachtet wurde. Der Transitkomplex als solcher zerfiel vollständig während der Migration. Ebenso zeigte sich nur wenig mutmaßlicher intakter cpSRP-Komplex. Es war aber auf jeden Fall von intaktem cpSRP im Assay auszugehen, da dieser frisch aus einer Aufarbeitung stammte und ein einwandfreies GFC-Laufverhalten zeigte. Interessanterweise lässt sich in der nativen Elektrophorese darüberhinaus die hydrophobe Natur des cpSRP54 erkennen, da dieses zu einem sehr großen Teil aggregierte. Gleiches Verhalten des cpSRP43-LHCP-Komplexes mit hochmolekularem Proteinschmier bei der Durchführung einer BN-PAGE konnte durch Ergebnisse von ██████████ bestätigt werden.

#### 5.2.7. Aspekte zum 54M-Transitkomplex

Unter 5.2.2 wurde schon vorgestellt, dass 54M-Transitkomplexe als einzige Spezies potentiell monomolekularisierten LHCP in ternären Komplexen aufwies. Densitometrische Auswertungen zeigten eine 1:1-Stöchiometrie des LHCP:cpSRP43-Verhältnisses über den kompletten Elutionsbereich. Dies schließt in jedem Fall eine unspezifische LHCP-Aggregation in den Komplexen aus und deutet sehr stark auf definierte intakte Komplexe hin. Ein ternärer 54M-Transitkomplex sollte entsprechend des Laufverhaltens von binärem 54M-cpSRP-Komplex (107 kDa) bei einem mittleren apparenten MW von ~135 kDa laufen. Ansätze mit einem einfachen stöchiometrischen Überschuss von freiem cpSRP54M im Kopplungsansatz zeigten nach densitometrischer Auswertung 61% des gesamten LHCP-Signals nach der GFC-Fraktionierung bei  $\leq 200$  kDa (vgl. 4.4.2.2). Komplexe

unterhalb dieses apparenten MWs wurden als potentiell ternär aufgefasst. Dieser Wert ergab sich anhand der Annahme, dass die Elution (entsprechend einer Normalverteilung) des ternären Komplexes potentiell ca. 0,75 ml (Erfahrungswert) vor der Peakelution (mittleres apparentes MW ~135 kDa) einsetzt. Jenes Volumen entsprach einem MW  $\leq 200$  kDa. Entsprechend wurden die LHCP-Signale (= 39%), welche in der GFC-Fraktionierung apparent höher als 200 kDa liefen, als zu oligomerisierten Komplexen zugehörig interpretiert. Die Komplexe zeigten aber insgesamt eine geringere Polydispersität im Vergleich zu Vollängen-Transitkomplex. Die höchstmolekularen Komplexe tauchten in sehr geringer Konzentration bei einem apparenten MW von 700 kDa auf. Auffällig erschien, dass solche hochmolekularen Fraktionen trotz Überschusses im Ansatz kein oder in substöchiometrischen Mengen vorhandenes cpSRP54M zeigten. Zuvor durchgeführte Kopplungen mit äquimolaren Konzentrationen des 54M-cpSRP-Komplexes und LHCP (ohne zusätzliches freies cpSRP54M) hatten zudem gezeigt, dass solche 54M-Transitkomplexe einen geringeren Anteil von potentiell ternärem Komplex zeigten. Diese Kopplungen wiesen einen deutlich erkennbaren höhermolekularen Elutionspeak bei 520 kDa auf. Es kann daraus geschlossen werden, dass das deletierte cpSRP54M die Komplexoligomerisierung zunehmend mit höherer Konzentration zurückdrängen kann. Andererseits führte ein noch größerer Überschuss von freiem cpSRP54M (2-4 fach) in den Kopplungsansätzen zu keinem besseren Ergebnis im Sinne eines höheren Anteils von ternären Komplexen. Da die Komplexoligomerisierung mit der unspezifischen Interaktion von exponierten hydrophoben Domänen korreliert, muss geschlussfolgert werden, dass cpSRP54M diese abschirmt. Gleiche Argumentation wurde im Zusammenhang mit dem Oligomerisierungs-mindernden Einfluss des cpSRP54-Vollängenproteins schon angeführt. Die Tatsache, dass cpSRP54M diesen Einfluss noch verstärkt, lässt 2 Schlussfolgerungen zu: 1. Die M-Domäne des Proteins ist entscheidend für die Abschirmung hydrophober Sequenzen. 2. Die NG-Domäne des Vollängenproteins konterkariert diesen Einfluss wieder teilweise bzw. stimuliert die Bildung eines höheren Oligomerisierungszustands (mittleres apparentes MW des Vollängen-Transit: 315 kDa). Auch im Falle des cpSRP54M ist dieser Vorgang nicht absolut, sondern bedingt, d.h. es kommt weiterhin zur Bildung oligomerisierter Komplexe. Jedoch zeigten wie schon zuvor erwähnt solche hochmolekularen Komplexe cpSRP54M in substöchiometrischer Menge, so dass u.U. spekuliert werden kann, ob gerade die Abwesenheit des cpSRP54M wieder zur Oligomerisierung führt.

Ein weiterer interessanter Punkt im Rahmen der 54M-Transitkomplexbindung war die Beobachtung, dass sich der Einsatz von His-cpSRP54M spezifisch Oligomerisierungs- bzw. Polydispersitätsfördernd auswirkte (vgl. 4.4.2). Da das „tag“-tragende Protein problemlos aufgereinigt werden konnte, wurde dieses für Transitzkopplungen, welchen ein einfacher stöchiometrischer Überschuss von freiem cpSRP54M zugesetzt wurde, zunächst präferiert. Aufgrund der Detergenz-Standard-Methode (Denaturierung/Renaturierung der Proteine) sollte von einer gleichen Verteilung der 54M-Spezies („tag“-freie Spezies entstammt 54M-cpSRP) in den gebildeten Komplexen auszugehen sein. Es zeigte sich in erster Linie eine deutliche Verschiebung aller Proteinsignale in den hochmolekularen

Bereich. Die hochmolekularen Fraktionen (1200 – 300 kDa) zeigten darüberhinaus exklusiv His-cpSRP54M-Signal. Die „tag“-freie Spezies tauchte nur in den Fraktionen  $\leq 300$  kDa auf. Auch in Komplexbopplungen mit 54M-cpSRP-Komplex (also „tag“-freies cpSRP54M) und C-terminal His-tag tragendem LHCP wurde verstärktes Aggregationsverhalten beobachtet (mündliche Mitteilung von

Inwiefern kann der His-tag einen Einfluss auf die Proteine bzw. die Komplexbildung haben? Carson et al., 2006 konnten in einer umfangreichen Analyse keinen signifikanten Einfluss des His<sub>6</sub>-tags auf die Kristallstruktur von Proteinen erkennen. Li et al., 1999 berichten jedoch, dass u.a. der Histidingehalt des N- bzw. C-Terminus sehr wohl einen Einfluss haben kann. Histidinreste begünstigen einen entfalteten Zustand. Darüberhinaus ist bekannt, dass die aromatische Imidazolseitenkette des Histidins an „ $\pi$ - $\pi$ -stacking“ Interaktionen mit anderen aromatischen Systemen beteiligt sein kann (Wang et al., 2006). Woestenenk et al., 2004 erkannten bei einem systematischen Vergleich von insgesamt 20 Proteinen, dass sowohl N-terminaler als auch C-terminaler His-tag allgemein eine negative Auswirkung auf die Löslichkeit besitzen. Die Autoren betonen jedoch, dass dieses Verhalten Proteinabhängig war. Es existieren also Hinweise darauf, dass der His<sub>6</sub>-tag trotz seiner relativ kleinen Größe Einfluss auf das Gesamtprotein besitzen kann. Im Falle der Komplexbildung zwischen 3 Proteinen ergeben sich zusätzlich noch mehr Interaktionsmöglichkeiten. So kämen insbesondere Wechselwirkungen mit den insgesamt 25 aromatischen AS in der LHCP-Sequenz in Frage („ $\pi$ - $\pi$ -stacking“). Darüberhinaus wäre auch eine Interaktion mit dem konstitutiv vorhandenen His-tag des cpSRP43 möglich. Diese Interaktionen sind spekulativ, könnten aber im Rahmen des beobachteten Oligomerisierungs-fördernden Einflusses spezifisch durch den His-tag des cpSRP54M sowie des LHCP eine Rolle gespielt haben. Tatsächlich bestand und besteht jedoch keine Notwendigkeit, eines der beiden Proteine als „tag“-Variante einzusetzen. Lediglich cpSRP43 muss aus Gründen der vorherigen cpSRP-Komplexaufreinigung als „tag“-Version eingesetzt werden. Ein Einfluss dieses His<sub>6</sub>-tags wurde im Rahmen dieser Arbeit nie getestet. Dieser kann nicht ausgeschlossen werden, erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich.

Es soll im Folgenden noch ein wenig näher auf die potentiell ternäre 54M-Transitkomplexspezies, welche folglich monomolekularisierten LHCP komplexiert trägt, eingegangen werden. Die Daten, die durch bioanalytische Verfahren erzeugt wurden (GFC + SDS-PAGE Fraktionierung) ließen die Interpretation von intakten ternären 54M-Transitkomplexen zu. Mit diesen Komplexen wurden (DEER)-EPR-spektroskopische Messungen durchgeführt. Eine prinzipielle Voraussetzung für solche Messungen ist, dass das zu vermessende Protein paramagnetische Zentren („spin-label“) besitzt. Das Vorhandensein von einem „spin-label“ führt in DEER-Messungen zu keinem Signal. Sind 2 „spin-label“ in unmittelbarer Umgebung zueinander, kann anhand der gegenseitigen Beeinflussung eine Distanz gemessen werden (vgl. M&M 3.3.5). Mehr als 2 „spin-label“ führen nur dann zu eindeutigen Distanzsignalen, wenn diese sich z.B. in einem symmetrischen Komplex mit gleichen Abständen

befinden. In allen anderen Fällen kommt es zu Signalüberlagerungen, die nicht sinnvoll interpretiert werden können. Da DEER-EPR-Messungen in ihrer Reichweite der „spin-label“ Distanz auf  $\leq 8$  nm limitiert sind, können proteinogen prinzipiell nur intramolekulare Signale erfasst werden. „Intermolekulare Signale“ treten dann auf, wenn es in Folge von Proteinaggregation zu einer Agglomeration von „spin-labels“ kommt. Die Messungen hatten einerseits das Ziel Abstandsdaten definierter Positionen des im cpSRP-Komplex gebundenen LHCP zu messen, andererseits dienten sie der Überprüfung von monomolekularisiertem LHCP im Komplex. Es wurden sowohl Total-54M-Transitkomplexansätze (7  $\mu\text{mol/l}$ ) als auch Gelfiltrations-gereinigte Fraktionen vermessen (vgl. 4.4.5). Die Transitzkopplungen erfolgten jeweils mit einfach gelabeltem LHCP. Die Interpretation der EPR-Daten wurde schon eingehend im Ergebniskapitel beschrieben: Es zeigte sich in beiden Fällen Aggregationssignal. Auch die Gelfiltrations-gereinigte Probe unterstützt die Annahme von reinen ternären Komplexen nur eingeschränkt. An dieser Stelle soll deshalb ein Vergleich zwischen den bioanalytischen GFC-Daten (s.o.) und den physikalischen EPR-Daten gezogen werden um den tendenziellen Widerspruch erklären zu können. Im Fall des Total-54M-Transitkomplexansatzes zeigte eine densitometrische Auswertung der LHCP-Banden nach GFC-Fraktionierung einen potentiellen Gehalt ternären Komplexes von ~60%; entsprechend ~40% mutmaßliche oligomerisierte Komplexe. Es war in diesem Fall potentiell mit einem Aggregationssignal zu rechnen. Tatsächlich trat ein solches auch relativ stark in Erscheinung. Somit konnten im Zusammenhang mit diesen Proben kein zwangsläufiger Widerspruch zwischen Gelfiltrationsergebnissen und EPR-Daten festgemacht werden. Die gelfiltrationsgereinigte Fraktion (Molekulargewichtsbereich: 160-120 kDa) sollte hingegen ausschließlich monodispers ternären Komplex enthalten. Entsprechend der damit verbundenen Monomolekularisierung des einfach gelabelten LHCPs war in der EPR-spektroskopischen Vermessung dieser Probe kein Signal zu erwarten. Dennoch trat ein solches in Erscheinung. Wie schon unter 4.4.5.2 deutlich gemacht wurde, kann aufgrund der Modulationstiefe von 0,13 geschlossen werden, dass dieses Signal prinzipiell schwach ist. Außerdem deutet die breite Abstandsverteilung auf ein Aggregationssignal hin (mündliche Mitteilung von Yevhen Polyhach, ETH Zürich). Ein Aggregationssignal bei potentiell einfach gelabeltem LHCP ist jedoch nur dann vorstellbar, wenn sich mind. 2 Membranproteine (dann mit unterschiedlichen absoluten Konformationen in den Komplexaggregaten, ansonsten 3 Membranproteine) in einem Komplex bzw. Komplexaggregat finden. Eine entsprechende Komplexspezies ist aber gleichzeitig aufgrund der GFC-Daten auszuschließen. Somit rückt eine „post-gelfiltrationschromatographische“ Komplexaggregation in den Fokus. Die GFC-Fraktion wurde unmittelbar nach Beendigung des Laufs mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15% versetzt. Für Glycerin wurde schon im Zusammenhang mit Vollängen Transitkomplex gezeigt, dass dieses keinen Einfluss auf den Komplex hat. Das anschließende Schockfrieren in flüssigem  $\text{N}_2$  sollte auch hinsichtlich einer Aggregation unkritisch sein. Die Probe verblieb zudem bis zum Messen im gefrorenen Zustand. Somit scheint eine Aggregation nach dem GFC-Lauf sehr unwahrscheinlich zu sein. Eine andere Erklärung könnte jedoch noch darin liegen,

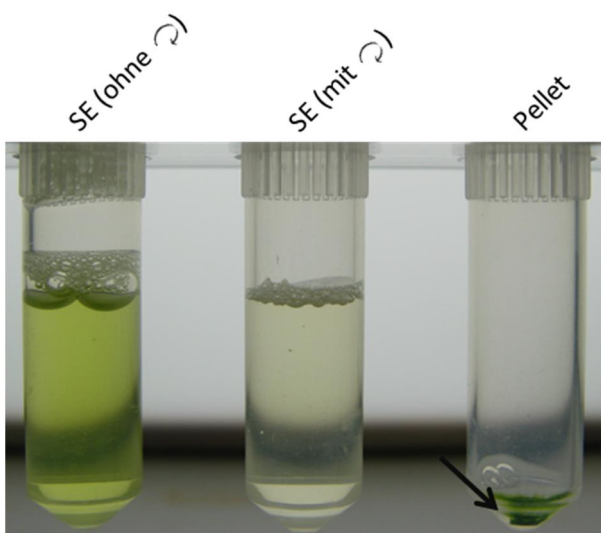
dass es bei der Markierung des LHCP mit „spin-label“ zu einer Mehrfachmarkierung kam. Diesbezüglich gab es innerhalb der Arbeitsgruppe schon im Vorfeld Hinweise. Insbesondere deprotonierte Aminogruppen sind in der Lage mit der Methylengruppe des verwendeten PROXYL-Iodacetamids zu reagieren. Das „spin labeling“ mit der Einfachcysteinmutante V90C wurde bei pH 7,0 durchgeführt. Zwar ist der spezifische  $pK_s$ -Wert des LHCP N-Terminus nicht bekannt, doch liegt der durchschnittliche  $pK_s$ -Wert der N-Termini bei 7,7 (Grimsley et al., 2008). Ergo sind bei dem gewählten pH-Wert während der Markierung teilweise schon deprotonierte N-Termini zu erwarten. Eine Nebenreaktion würde zu mehrfach markiertem LHCP führen. Eine Überprüfung wäre an dieser Stelle sehr einfach, da lediglich entsprechend markierter LHCP in SDS-Lösung mitvermessen werden müsste. Diese Kontrollmessung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden, da entsprechend markierter LHCP (V90C) restlos aufgebracht war. Sollte sich obige Vermutung tatsächlich bestätigen, würde Maleimid-funktionalisierter Nitroxyl-„spin-label“ eine Sulfhydrylgruppen-spezifischere Alternative darstellen. Da die durch den Kooperationspartner (AG Jeschke, ETH Zürich) optimierte DEER-EPR-Spektroskopie mittlerweile in der Lage ist spin-markiertes Protein in Konzentrationen um 1  $\mu\text{mol/l}$  zu messen, könnten im Rahmen von Gelfiltrations-gereinigten Transitkomplexproben Distanzmessungen im LHCP möglich sein.

#### 5.2.8. Aspekte zu Transitkomplexen mit/in SE

Dieses letzte Diskussionskapitel wird sich mit den Versuchen im Rahmen der Transitkomplekkopplung mit/in SE beschäftigen. Die Motivation, natives cpSRP bzw. Stromaextrakt zur Transitkomplekkopplung mit rekombinantem LHCP zu verwenden, hatte folgende Gründe: 1. Die einzige Literaturreferenz, welche explizit einen ternären Volllängenkomplex beschreibt, ist die Studie von Payan und Cline, 1991. Die Autoren arbeiteten ausschließlich mit nativem cpSRP bzw. mit Stromaextrakt. Tatsächlich hatten die Autoren zu diesem Zeitpunkt gar keine explizite Kenntnis über dieses Chaperonsystem. 2. Die generelle Transitkomplekkopplung wird als unabhängig von weiteren Faktoren (proteinogenen oder niedermolekularen) beschrieben (Schünemann et al., 1998; Falk und Sinning, 2010, Jaru-Ampornpan et al., 2010). Der ternäre nicht-oligomerisierte Zustand des Komplexes könnte u.U. jedoch spezifisch von nicht identifizierten Faktoren des Stromas abhängig sein oder durch diese begünstigt werden. 3. Die Verwendung von Stromaextrakt bzw. nativem cpSRP bietet ein Referenzsystem für die Validität der Kopplungsergebnisse mit rekombinantem Protein. Insbesondere Ziel war es entsprechend den ersten beiden Gründen im Zusammenhang mit den nativen Chaperonfaktoren sowie unter möglichst nativen Bedingungen einen eindeutig ternären Transitkomplex zu beschreiben.

Grundvoraussetzung für die Transitkomplekkopplung mit nativem cpSRP, war zunächst dessen Aktivität zu betrachten. Prinzipiell konnte aufgrund der Elution der RuBisCO, entsprechend ihrer quartären Komplexform als 16-mer, von der Integrität des SEs ausgegangen werden. Anfängliche

cpSRP-Aktivitätstests sollten jedoch Auskunft darüber geben, ob und in welchem Maße nativer cpSRP generell in der Lage ist, rekombinant zugefügtes LHCP in Lösung zu halten (vgl. 0). Es zeigte sich bei der Zugabe von äquimolaren Mengen des Urea-gelösten Membranproteins zu cpSRP in SE eine vollständige Solubilisierung (vgl. Abbildung 4.41). Im Gegensatz zur Negativkontrolle (Pelletfraktion) zeigte sich im SE-Ansatz das komplette zugesetzte LHCP als Monomersignal in der Überstandsfraktion. Dies sprach für eine volle Aktivität des nativen cpSRPs. Auffällig in diesen LHCP-Blots war jedoch das Auftreten mehrerer Banden. Die Banden knapp oberhalb von 40 kDa konnten als SE-spezifisch identifiziert werden. Bei 25 kDa bzw. knapp oberhalb davon zeigte sich jedoch interessanterweise ebenso eine Doppelbandierung. Da His-LHCP eingesetzt wurde, konnte die obere als spezifisches Signal von rekombinantem Protein identifiziert werden. Die untere Bande trat auch in der Kontrolle mit SE ohne LHCP-Zugabe auf. Es handelte sich dabei um mutmaßlich nativen LHCP bzw. LHCII. Während der Stromaextraktion müsste dieser eigentlich abgetrennt worden sein. Das Lysat der Chloroplasten wurde zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile immer hochtourig zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Dennoch konnte i.d.R. auch nach längerer Zentrifugation eine leichte bis mittlere Grünfärbung des SE beobachtet werden. Es könnte sich hierbei um lösliche Thylakoidmembranfragmente mit inseriertem LHCII handeln. Nachdem bekannt war, dass natives LHCP nach konventioneller Aufarbeitung im SE verblieb, wurde dieses für alle weiteren hier in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse vor Verwendung zusätzlich hochtourig zentrifugiert. Es zeigte sich dabei immer ein grünes Pellet. Der Überstand zeigte danach nur noch eine sehr blasse Grünfärbung.



**Abbildung 5.4: Gegenüberstellung von Stromaextrakt.**

Links: Konventionell aufgearbeitetes SE ohne zusätzlichen Zentrifugationsschritt. Mitte: SE nach zusätzlichem hochtourigem Zentrifugationsschritt. Rechts: Pellet nach Zentrifugation

Es ist aber nicht davon auszugehen, dass diese LHC-Spezies im Aktivitätstest mit dem nativen cpSRP in irgendeiner Weise wechselwirkte. Da äquimolare Mengen von LHCP quantitativ in Lösung gehalten wurden, wurde die Zugabe von überstöchiometrischen Mengen von LHCP getestet. Erstaunlicherweise tauchte selbst bei einem 2-fach stöchiometrischen Überschuss von LHCP kein entsprechendes Signal in der Pelletfraktion auf. Neben der monomolekularen Bande, welche gleich intensiv wie im äquimolaren Ansatz erschien, zeigte sich eine LHCP-Bande am oberen Blotrand an



der Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel. Der zugegebene LHCP-Überschuss zeigte sich also als hochmolekulares, aber lösliches Aggregat. Da die Überstandsfraction entsprechend jeder SDS-PAGE Probe zuvor mit Sparmix versetzt und aufgeköcht wurde, kann geschlussfolgert werden, dass dieses sich nicht einmal in SDS löste.

Dieses Signal stellte sich als signifikant heraus. Wie schon in den Ergebnissen (vgl. 4.5) beschrieben, zeigte sich dieses nämlich bei nahezu allen GFC-Fraktionierungen von äquimolaren Kopplungen im Zusammenhang mit nativen cpSRP. Die LHCP-Signale traten zum einen in den hochmolekularen GFC-Fractionen, zum anderen in der SDS-PAGE am oberen Blotrand auf. Dies bedeutet konkret: Es bildeten sich lösliche hochmolekulare LHCP-Aggregatspezies (> 1000 -750 kDa), welche entsprechend in der nativen Dimension (GFC) in frühen Fractionen eluierten. Diese LHCP-Aggregatspezies waren darüberhinaus so „verbacken“, dass diese selbst durch SDS-Behandlung nicht solubilisiert werden konnten und entsprechend nicht ins Trenngel einliefen. Es wurden zeitgleiche Anti43-/Anti54-Blots dieser Kopplungsansätze gemacht. Diese zeigten im Gegensatz zu Fractionierungen von SE (vgl. Abbildung 4.40) einen Großteil des cpSRP-Signals in den identischen hochmolekularen Fractionen, in denen sich das LHCP-Signal zeigte. In der PAGE liefen sie aber erwartungsgemäß entsprechend ihres monomolekularen Laufverhaltens (Ergebnisse nicht gezeigt). Es kann geschlussfolgert werden, dass es bei der Transitzkopplung von rekombinantem Urea-gelösten LHCP und nativem cpSRP zu einer potentiell gleichen unspezifischen LHCP-Aggregation wie im Fall der rekombinanten Kopplung nach Urea-Methode kam. Natives cpSRP assoziierte an diese Aggregate und hielt sie in Lösung. Anders als bei den rekombinanten Spezies im Standardpuffer lösen sich diese LHCP-Aggregate nicht einmal oder unvollständig bei Zugabe von SDS. Es kann spekuliert werden, dass bei der Zugabe von rekombinantem LHCP in SE ersteres noch stärker aggregierte als in vergleichbaren Ansätzen in Standardpuffer. Ein Widerspruch im Hinblick auf die anfänglich durchgeführten Aktivitätstests bleibt: In diesen zeigte sich bei äquimolarer Kopplung das LHCP tatsächlich monomolekular in der PAGE. Eine Aussage über den Oligomerisierungszustand bzw. „Aggregationsstatus“ kann nicht getroffen werden (keine GFC-Fraktionierung). Bei gleicher Konzentration (und lediglich größerem Volumen) zeigten die äquimolaren Kopplungen, welche GFC fraktioniert wurden, gegen SDS-Behandlung resistente LHCP-Aggregate. Wenn spekuliert wird, dass im Fall der Aktivitätstests LHCP-Aggregation bzw. die Bildung löslicher Aggregate in gleichem Maße ablief, müsste vermutet werden, dass die unspezifisch aggregierten LHCPs einen Reifungsprozess durchliefen. Während sie zu Beginn noch ohne Weiteres SDS-löslich waren, führte eine längere Inkubation der Komplexe zu „SDS-resistenten“ LHCP-Aggregaten.

Es wurde ebenso der generelle Einfluss von SE auf die Komplexbildung von rekombinanten Proteinen getestet (vgl.4.5.2.2). Tatsächlich zeigten Transitzkopplungen in SE mit einem 4 fachen Überschuss von rekombinantem cpSRP zu Membranprotein einen Großteil des LHCP-Signals bei einem mittleren apparenten MW von ~200 kDa (vgl. Abbildung 4.42). Eingesetzter rekombinanter Vollängen-cpSRP

wies ein mittleres apparentes MW von 150 kDa auf und konnte in Anti43-/Anti54-Blots in den gleichen Fraktionen wie der LHCP identifiziert werden. Dieser in SE durchgeführte Ansatz mit einer Endkonzentration von 0,35  $\mu\text{mol/l}$  LHCP und einem 4 fachen Überschuss von rekombinantem cpSRP zeigte mutmaßlich ternären Transitkomplex aus Volllängenproteinen. Eine Proteinkonzentrationserhöhung führte jedoch in allen weiteren Kopplungsversuchen, welche ansonsten unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden zu LHCP-Signalen, die sich in hochmolekularen Fraktionen am oberen Blotrand zeigten (s.o.). Es bestätigte sich, dass die Komplexbindung auch in SE stark Proteinkonzentrationsabhängig ist. Es wurde daraufhin getestet, ob eine Aufkonzentrierung des SE einen Einfluss auf den Oligomerisierungsgrad des Transitkomplexes zeigt. Erstaunlicherweise zeigte sich mit zunehmender „SE-Konzentration“ eine Intensivierung des unspezifischen Oligomerisierungsverhaltens. Diese Tatsache lässt gar einen negativen Effekt des SE vermuten. Die Ergebnislage im Zusammenhang mit Kopplungen in SE ist also sehr widersprüchlich. Die oben erwähnte Transitzkopplung zeigte relativ eindeutig potentiell ternären Komplex, was auf einen positiven Einfluss des SE hindeutete. Nahezu alle anderen Kopplungen deuteten aber gar auf einen negativen Einfluss hin. Hier schien das SE insbesondere die unspezifische LHCP-Aggregation zu fördern. Auch im Zusammenhang mit der Verwendung von rekombinantem cpSRP zeigten sich in SE ungewöhnlich „SDS-resistente“ LHCP Aggregate.

## 6. Zusammenfassung

Das Lichtsammlerprotein (light harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein, LHCP) ist das Apoprotein des Haupt-Lichtsammelkomplexes (LHCII) und stellt das häufigste Membranprotein der Erde dar. Nicht nur aufgrund seiner Abundanz, sondern auch wegen seiner speziellen Translokation als stark hydrophobes Membranprotein durch hauptsächlich wässrige Milieus von cytosolischen Ribosomen bis in die Thylakoidmembran der Chloroplasten ist der Biogeneseweg dieses Proteins von besonderem Interesse. LHCP ist kernkodiert und wird nach seinem Import in Chloroplasten als Transitkomplex mit dem stromalen Signalerkennungsprotein (cpSRP) zur Thylakoide geleitet. Der cpSRP-Komplex besteht aus dem cpSRP43 mit Chaperonfunktion für das LHCP sowie dem Co-Chaperon cpSRP54, welches eine entscheidende Rolle in der stromalen Zielführung des Transitkomplexes spielt. Sowohl die Proteinkonformation des LHCP während seiner Biogenese als auch der *in vivo* Faltungsablauf während der Thylakoidinsertion sind noch völlig unklar. Mithilfe der Elektronen-paramagnetischen Resonanz (EPR-)Spektroskopie sollte in dieser Arbeit der Faltungszustand des LHCP im Transitkomplex mit dem cpSRP oder in Teilkomplexen davon ermittelt werden.

Kopplungen von cpSRP43 und LHCP bestätigten, dass das Chaperon als Minimaleinheit zur quantitativen Solubilisierung des Membranproteins genügt. Gelfiltrationschromatographische (GFC-) Untersuchungen solcher Komplexe wiesen jedoch mit einem apparenten MW von  $\geq 600$  kDa ein sehr hochmolekulares Laufverhalten auf. Variierende Proteinstöchiometrien im Komplex zeigten in densitometrischen Auswertungen eine undefinierte Aggregation. Zusätze von Agenzien zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen wie z.B. Detergentien oder auch Salzzugabe zeigten keinen Einfluss auf die Aggregate. Vollängen-Transitkomplexe dagegen wiesen trotz unterschiedlichem Angebot von Einzelproteinen reproduzierbar definierte Stöchiometrien auf. Diese zeigten eine LHCP:cpSRP43-Stöchiometrie von 1,25. Dennoch hatten diese Komplexe mit einem apparenten MW von  $> 300$  kDa einen mindestens dimeren Assemblierungsgrad. Eine Voraussetzung für eindeutige EPR-spektroskopische Distanzmessungen zwischen definierten Positionen im LHCP ist jedoch dessen monomolekularisiertes Vorliegen im Chaperonkomplex. Die Darstellung von ternären Transitkomplexen mit einem zu erwartenden apparenten MW von  $\sim 175$  kDa war auch durch Zusatz verschiedener Proteinaggregationshemmer nicht möglich. Transitkomplexe mit einer verkürzten Version des cpSRP54 zeigten schließlich eine definierte 1:1-Komplexstöchiometrie bei gleichzeitiger polydisperser Komplexzusammensetzung. Es konnten  $\sim 60\%$  dieser sogenannten 54M-Transitkomplexe nach GFC-Daten und densitometrischer Auswertung als potentiell ternär eingeschätzt werden. Darüber hinaus gelang es solche Ansätze durch GFC-Fraktionierung zusätzlich von oligomerisierten Spezies aufzureinigen. Dennoch zeigten die Präparate vor GFC-Fraktionierung ein (noch) zu hohes Aggregationssignal im Hintergrund und nach Fraktionierung ein zu schwaches Signal, um eine eindeutige Aussage der EPR-Daten zuzulassen. Dennoch bietet dieses ausgearbeitete Komplexbildungsprotokoll in Verbindung mit der Verwendung von verkürztem cpSRP54 eine solide Basis, um weitere Versuche zu EPR-Messungen an cpSRP-gebundenem LHCP durchzuführen.

### Summary

The light harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein (LHCP) is the apoprotein of the major light harvesting complex II (LHCII) and represents the most abundant membrane protein on Earth. It is of special interest not only due to its abundance, but also because the transport of this highly hydrophobic protein through several aqueous compartments is a challenging part of LHCII biogenesis. LHCP is nuclear encoded and post-translationally imported into the chloroplast. In the stroma LHCP constitutes a complex with the chloroplastic signal recognition particle (cpSRP). This so-called transit complex is delivered to the thylakoid membrane. The cpSRP complex comprises the cpSRP43 which functions as a chaperone for LHCP and the co-chaperone cpSRP54 which is crucial for the stromal targeting of the transit complex. The major goal of this work was to investigate the folding state of LHCP in the transit complex with cpSRP or parts of it by using electron paramagnetic resonance (EPR-) spectroscopy.

Complex formation of cpSRP43 and LHCP confirmed that the chaperone as a minimal unit is enough for the quantitative solubilization of the membrane protein. However, gel filtration chromatography (GFC) of these complexes showed quite a high apparent molecular weight of  $\geq 600$  kDa. A variable protein stoichiometry in the complex, as assessed by gel densitometry, exhibited the complexes to be non-specific aggregates. Additives such as detergents or salt to avoid this unspecific aggregation did not show any influence. By contrast, full length transit complexes reproducibly displayed a defined protein stoichiometry of cpSRP43:LHCP-stoichiometry 1,25, despite a varying stoichiometry of the components offered during complex formation. Nevertheless these complexes also assembled, at least into dimers, as indicated by their apparent molecular weight in GFC of  $> 300$  kDa. This was prohibitive for EPR measurements that require a monomolecular of the complexes to be analyzed. The addition of protein aggregation inhibitors did not either achieve non-aggregated transit complexes with an anticipated apparent molecular weight of  $\sim 175$  kDa. Transit complexes with a shortened version of the cpSRP54 protein finally showed a defined 1:1-stoichiometry, albeit with a polydisperse complex composition. According to GFC-data and densitometric analysis it was assumed that  $\sim 60\%$  of these so-called 54M transit complex represent a ternary species. Moreover, these preparations were purified by GFC in order to isolate the ternary from oligomeric complexes. Even with these samples, conclusive results by EPR-spectroscopy could not be achieved. On one hand the samples before GFC-separation still showed too high an amount of aggregation signal, on the other hand in GFC-purified samples the EPR signal was too weak. However, this established protocol of complex formation, using the shortened version of cpSRP54, will presumably be a useful basis for carrying out further EPR studies on

cpSRP-bound

LHCP.

## 7. Literatur

- Alder, N.N; Theg, S.M (2003): Protein transport via the cpTat pathway displays cooperativity and is stimulated by transport-incompetent substrate. In: *FEBS Letters* 540, S. 96–100.
- Aldridge, C.; Cain, P.; Robinson, C. (2009): Protein transport in organelles: Protein transport into and across the thylakoid membrane. In: *FEBS Journal* 276 (5), S. 1177–1186.
- Amin, P.; Sy, D.A.C; Pilgrim, M. L.; Parry, D.H; Nussaume, L.; Hoffman, N.E (1999): Arabidopsis Mutants Lacking the 43- and 54-Kilodalton Subunits of the Chloroplast Signal Recognition Particle 1 he Chloroplast Signal Recog Have Distinct Phenotypes. In: *Plant Physiology* (121), S. 61–70.
- Angelini, S.; Boy, D.; Schiltz, E.; Koch, H.-G (2006): Membrane binding of the bacterial signal recognition particle receptor involves two distinct binding sites. In: *The Journal of Cell Biology* 174 (5), S. 715–724.
- Arakawa, T.; Tsumoto, K. (2003): The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304, S. 148–152.
- Bacher, G.; Lütcke, H.; Jungnickel, B.; Rapoport, T. A.; Dobberstein, B. (1996): Regulation by the ribosome of the GTPase of the signal-recognition particle during protein targeting. In: *Nature* 381, S. 248–251.
- Batey, R. T.; Rambo, R.P; Lucast, L.; Rha, B.; Doubna J.A (2000): Crystal Structure of the Ribonucleoprotein Core of the Signal Recognition Particle. In: *Science* 287 (5456), S. 1232–1239.
- Bhuyan, A. K. (2002): Protein Stabilization by Urea and Guanidine Hydrochloride. In: *Biochemistry* 41 (45), S. 13386–13394.
- Braun, N. A.; Davis, A. W.; Theg, S. M. (2007): The Chloroplast Tat Pathway Utilizes the Transmembrane Electric Potential as an Energy Source. In: *Biophysical Journal* 93 (6), S. 1993–1998.
- Bukau, B.; Horwich, A. L. (1998): The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. In: *Cell* 92 (3), S. 351–366.
- Cabré, F.; Canela, E. I.; Canela, M. A. (1989): Accuracy and precision in the determination of stokes radii and molecular masses of proteins by gel filtration chromatography. In: *Journal of Chromatography A* 472, S. 347–356.
- Cain, P.; Holdermann, I.; Sinning, I.; Johnson, A. E.; Robinson, C. (2011): Binding of chloroplast signal recognition particle to a thylakoid membrane protein substrate in aqueous solution and delineation of the cpSRP43–substrate interaction domain. In: *Biochemical Journal*. 437 (1), S. 149–155.
- Carson, M.; Johnson, D. H.; McDonald, H.; Brouillette, C.; DeLucas, L. J. (2007): His-tag impact on structure. In: *Acta Crystallographica D Biological Crystallography* 63 (3), S. 295–301.
- Cavalier-Smith, T. (1982): The origins of plastids. In: *Biological Journal of the Linnean Society* 17, S. 289–306.
- Cavalier-Smith, T. (2000): Membrane heredity and early chloroplast evolution. In: *Trends in Plant Science* 5 (4), S. 174–182.

- Chandrasekar, S.; Chartron, J.; Jaru-Ampornpan, P.; Shan, S. (2008): Structure of the Chloroplast Signal Recognition Particle (SRP) Receptor: Domain Arrangement Modulates SRP–Receptor Interaction. In: *Journal of Molecular Biology* 375 (2), S. 425–436.
- Cline, K.; Dabney-Smith, C. (2008): Plastid protein import and sorting: different paths to the same compartments. In: *Current Opinion in Plant Biology* 11 (6), S. 585–592.
- Connolly, T.; Gilmore, R. (1989): The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. In: *Cell* 57 (4), S. 599–610.
- DeRocher, A.E; Helm, K.W; Lauzon, L.M; Vierling, E. (1991): Expression of a Conserved Family of Cytoplasmic Low Molecular Weight Heat Shock Proteins during Heat Stress and Recovery. In: *Plant Physiology* 96, S. 1038–1047.
- Diamant, S.; Eliahu, N.; Rosenthal, D.; Goloubinoff, P. (2001): Chemical Chaperones Regulate Molecular Chaperones in Vitro and in Cells under Combined Salt and Heat Stresses. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (43), S. 39586–39591.
- Doyle, S. M.; Wickner, S. (2009): Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. In: *Trends in Biochemical Sciences* 34 (1), S. 40–48.
- Driessen, A.J.M; Nouwen, N. (2008): Protein Translocation Across the Bacterial Cytoplasmic Membrane. In: *Annual Reviews of Biochemistry* 77 (1), S. 643–667.
- Dünschede, B.; Bals, T.; Funke, S.; Schünemann, D. (2011): Interaction studies between the chloroplast signal recognition particle subunit cpSRP43 and the full-length translocase Alb3 reveal a membrane-embedded binding region in Alb3 protein. In: *Journal of Biological Chemistry* 286, S. 35187–35195.
- Dünschede, B.; Träger, C.; Richter, C.; Funke, S.; Walter, B.; Ziehe, D.; Hofmann, E.; Schünemann, D. (2013): Chloroplast SRP54 was recruited for posttranslational protein transport via complex formation with SRP43 during land plant evolution. Unveröffentlicht.
- Egea, P.F; Shan, S.; Napetschnig, J.; Savage, D.F; Walter, P.; Stroud, R.M (2004): Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor. In: *Nature* 427, S. 215–221.
- Ellis, R.J. (1993): The general concept of molecular chaperones. In: *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 339 (1289), S.257-261
- Ellis, R.J.; van der Vies, S.M.; Hemmingsen, S.M. (1989): The molecular chaperone concept. In: *Biochemical society symposia* 55, S. 145-153
- Falk, S.; Ravaud, S.; Koch, J.; Sinning, I. (2010): The C Terminus of the Alb3 Membrane Insertase Recruits cpSRP43 to the Thylakoid Membrane. In: *Journal of Biological Chemistry* 285 (8), S. 5954–5962.
- Falk, S.; Sinning, I. (2010): cpSRP43 Is a Novel Chaperone Specific for Light-harvesting Chlorophyll a,b-binding proteins. In: *The Journal of Biological Chemistry* 285 (28), S. 21655–21661.
- Flores-Pérez, Ú.; Jarvis, P. (2013): Molecular chaperone involvement in chloroplast protein import. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (2), S. 332–340.
- Freyman, D.M; Keenan, R.J; Stroud, R.M; Walter, P. (1997): Structure of the conserved GTPase domain of the signal recognition particle. In: *Nature* 385, S. 361–364.

- Frigon, R.P; Leyboldt, J.K; Uyeji, S.; Henderson, L.W (1983): Disparity between Stokes radii of dextrans and proteins as determined by retention volume in gel permeation chromatography. In: *Analytical Chemistry* 55, S. 1349–1354.
- Funke, S.; Knechten, T.; Ollesch, J.; Schünemann, D. (2005): A unique sequence motif in the 54-kDa subunit of the chloroplast signal recognition particle mediates binding to the 43-kDa subunit. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280, S. 8912–8917.
- Gavin, A.C; Bösch, M.; Krause, R.; Grandi, P.; Marzioch, M.; Bauer, A. et al. (2002): Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. In: *Nature* 415, S. 141–147.
- Goldberg, M.E; Rudolph, R.; Jaenicke, R. (1991): A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. In: *Biochemistry* 30.
- Goloubinoff, P.; Mogk, A.; Zvi, A.P.B; Tomoyasu, T.; Bukau, B. (1999): Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (24), S. 13732–13737.
- Grimsley, G.R; Scholtz, J.M; Pace, C.N (2009): A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins. In: *Protein Science* 18, S. 247–251.
- Groves, M. R.; Mant, A.; Kuhn, A.; Koch, J.; Dübel, S.; Robinson, C.; Sinning, I. (2001): Functional Characterization of Recombinant Chloroplast Signal Recognition Particle. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (30), S. 27778–27786.
- Grudnik, P.; Bange, G.; Sinning, I. (2009): Protein targeting by the signal recognition particle. In: *Biological Chemistry* 390 (8), S. 775–782.
- Hartl, F. U.; Hayer-Hartl, M. (2002): Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. In: *Science* 295 (5561), S. 1852–1858.
- Heijne, G. von (1990): Protein targeting signals. In: *Current Opinion in Cell Biology* 2 (4), S. 604–608.
- Hermkes, R.; Funke S.; Richter C.; Kuhlmann J.; Schünemann D. (2006): The alpha-helix of the second chromodomain of the 43 kDa subunit of the chloroplast signal recognition particle facilitates binding to the 54 kDa subunit. In: *FEBS Letters* 580, S. 3107–3111.
- Ho, J.G.S; Middelberg, A.P.J; Ramage, P.; Kocher, H.P (2003): The likelihood of aggregation during protein renaturation can be assessed using the second virial coefficient. In: *Protein Science* 12 (4), S. 708–716.
- Hoffman, N.E; Franklin, A.E (1994): Evidence for a Stromal GTP Requirement for the Integration of a Chlorophyll a/b Binding Polypeptide into Thylakoid Membranes. In: *Plant Physiology* 105, S. 295–304.
- Hoffmann, J.H; Linke, K.; Graf, P. C. F.; Lilie, H.; Jakob, U. (2004): Identification of a redoxregulated chaperone network. In: *The EMBO Journal* 23, S. 160–168.
- Holdermann, I.; Meyer, N. H.; Round, A.; Wild, K.; Sattler, M.; Sinning, I. (2012): Chromodomains read the arginine code of post-translational targeting. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (2), S. 260–263.

- Horwich A.L.; Fenton, W.A.; Chapman, E.; Farr, G.W. (2007): Two families of chaperonin: physiology and mechanism. In: *Annual review of cell and developmental biology* 23, S. 115-145.
- Inaba, T.; Schnell, D. J. (2008): Protein trafficking to plastids: one theme, many variations. In: *Biochemical Journal* 413 (1), S. 15.
- Jaru-Ampornpan, P.; Chandrasekar, S.; Shan, S. (2007): Efficient Interaction between Two GTPases Allows the Chloroplast SRP Pathway to Bypass the Requirement for an SRP RNA. In: *Molecular Biology of the Cell* 18, S. 2636–2645.
- Jaru-Ampornpan, P.; Liang, F.-C; Nisthal, A.; Nguyen, T. X.; Wang, P.; Shen, K. et al. (2013): Mechanism of an ATP-independent Protein Disaggregase: II. DISTINCT MOLECULAR INTERACTIONS DRIVE MULTIPLE STEPS DURING AGGREGATE DISASSEMBLY. In: *Journal of Biological Chemistry* 288 (19), S. 13431–13445.
- Jaru-Ampornpan, P.; Shen, K.; Lam, V. Q.; Ali, M.; Doniach, S.; Jia, T. Z.; Shan, S. (2010): ATP-independent reversal of a membrane protein aggregate by a chloroplast SRP subunit. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (6), S. 696–702.
- Jaru-Ampornpan, P.; Nguyen, T.X; Shan, S. (2009): A distinct mechanism to achieve efficient signal recognition particle (SRP)-SRP receptor interaction by the chloroplast srp pathway. In: *Molecular Biology of the Cell* 20, S. 3965–3973.
- Jonas-Straube, E. (2001): Functional Analysis of the Protein-interacting Domains of Chloroplast SRP43. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (27), S. 24654–24660.
- Kathir, K. M.; Rajalingam, D.; Sivaraja, V.; Kight, A.; Goforth, R. L.; Yu, C. et al. (2008): Assembly of Chloroplast Signal Recognition Particle Involves Structural Rearrangement in cpSRP43. In: *Journal of Molecular Biology* 381 (1), S. 49–60.
- Keenan, R.J; Freymann, D.M; Stroud, R.M; Walter, P. (2001): The Signal Recognition particle. In: *Annual Reviews of Biochemistry* 70, S. 755–772.
- Kim, Y.-S; Jones, L. S.; Dong, A.; Kendrick, B. S.; Chang, B. S.; Manning, M. C. et al. (2003): Effects of sucrose on conformational equilibria and fluctuations within the native-state ensemble of proteins. In: *Protein Science* 12 (6), S. 1252–1261.
- Klein, R.R; Mullet, J.E (1987): Control of gene expression during higher plant chloroplast biogenesis. In: *The Journal of Biological Chemistry* 262 (9), S. 4341–4348.
- Kogata, Naoko; Nishio, Kazuaki; Hirohashi, Toshiya; Kikuchi, Shingo; Nakai, Masato (1999): Involvement of a chloroplast homologue of the signal recognition particle receptor protein, FtsY, in protein targeting to thylakoids. In: *FEBS Letters* 447 (2-3), S. 329–333.
- Kohler, R.; Boehringer, D.; Greber, B.; Bingel-Erlenmeyer, R.; Collinson, I.; Schaffitzel, C.; Ban, N. (2009): YidC and Oxal Form Dimeric Insertion Pores on the Translating Ribosome. In: *Molecular Cell* 34 (3), S. 344–353.
- Kurland, C.G (1992): Evolution of mitochondrial genomes and the genetic code. In: *BioEssays* 14 (10), S. 709–714.
- Kurzchalia, T.V; Wiedmann, M.; Girshovich, A.S; Bochkareva, E.S; Bielka, H.; Rapport, T.A (1986): 634.indd. The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54K polypeptide of the signal recognition particle. In: *Nature* 320, S. 634–636.



- Laemmli, U.K (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227, S. 680–685.
- Lang, M.; Kroth, P. G. (2001): Diatom Fucoxanthin Chlorophyll a/c-binding Protein (FCP) and Land Plant Light-harvesting Proteins Use a Similar Pathway for Thylakoid Membrane Insertion. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (11), S. 7985–7991.
- Lasserre, J.-P; Beyne, E.; Pyndiah, S.; Lapaillerie, D.; Claverol, S.; Bonneu, M. (2006): A complexomic study of *Escherichia coli* using two-dimensional blue native/SDS polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Electrophoresis* 27 (16), S. 3306–3321.
- Lathe, G.H; Ruthven, C.R.J (1956): The separation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water. In: *Biochemistry* 62, S. 665–674.
- Le Maire, Marc; Aggerbeck, Lawrence P.; Monteilhet, Claude; Andersen, Jens P.; Møller, Jesper V. (1986): The use of high-performance liquid chromatography for the determination of size and molecular weight of proteins: A caution and a list of membrane proteins suitable as standards. In: *Analytical Biochemistry* 154 (2), S. 525–535.
- Lee, S.; Sowa, M.E; Watanabe, Y.; Sigler, P.B; Chui, W.; Yoshida, M.; Tsai, F.T.F (2003): The Structure of ClpB: A Molecular Chaperone that Rescues Proteins from an Aggregated State. In: *Cell* 115 (229-240).
- Leeuw, E. de; te Kaat, K.; Moser, C.; Menestrina, G.; Demel R.; Kruijff, B. de et al. (2000): Anionic phospholipids are involved in membrane association of FtsY and stimulate its GTPase activity. In: *The EMBO Journal* 19 (4), S. 531–541.
- Lewis, N. E.; Marty, N. J.; Kathir, K. M.; Rajalingam, D.; Kight, A. D.; Daily, A. et al. (2010): A Dynamic cpSRP43-Albino3 Interaction Mediates Translocase Regulation of Chloroplast Signal Recognition Particle (cpSRP)-targeting Components. In: *Journal of Biological Chemistry* 285 (44), S. 34220–34230.
- Li, X.; Romero, P.; Rani, M.; Dunker, A.K; Obradovic, Z.: Predicting protein disorder for N-, C- and internal regions.
- Li, X.; Henry, R.; Yuan, J.; Cline, K.; Hoffman, N.E (1995): A chloroplast homologue of the signal recognition particle subunit SRP54 is involved in the posttranslational integration of a protein into thylakoid membranes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, S. 3789–3793.
- Lopez-Juez, E. (2006): Plastid biogenesis, between light and shadows. In: *Journal of Experimental Botany* 58 (1), S. 11–26.
- Ljutova, E.M; Kasakov, A.S; Gurvits, B.Ya (2007): Effects of Arginine on Kinetics of Protein Aggregation Studied by Dynamic Laser Light Scattering and Turbidimetry Techniques. In: *Biotechnological. Progress* 23 (6), S. 1411–1416.
- Mantle, T.J. (1978). In: *Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry* B105b, S. 1-17
- Marco, A. de; Vigh, L.; Diamant, S.; Goloubinoff, P. (2005): Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in *Escherichia coli* by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. In: *Cell Stress Chaperones* 10 (4), S. 329–339.
- Martin, T.; Sharma, R.; Sippel, C.; Waagemann, K.; Soll, J.; Vothknecht, U. C. (2006): A Protein Kinase Family in *Arabidopsis* Phosphorylates Chloroplast Precursor Proteins. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (52), S. 40216–40223.

- Martin, W.; Stoebe, B.; Goremykin, V.; Hansmann, S.; Hasegawa, M.; Kowallik K.V. (1998): Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. In: *Nature* 393, S. 162–165.
- Mchaourab, H. S.; Godar, J. A.; Stewart, P. L. (2009): Structure and Mechanism of Protein Stability Sensors: Chaperone Activity of Small Heat Shock Proteins. In: *Biochemistry* 48 (18), S. 3828–3837.
- Mogk, A.; Tomoyasu, T.; Goloubinoff, P.; Rüdiger, S.; Röder, D.; Langen, H.; Bukau, B. (1999): Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. In: *The EMBO Journal* 18 (24), S. 6934–6949.
- Moore, M.; Goforth, R. L.; Mori, H.; Henry, R. (2003): Functional interaction of chloroplast SRP/FtsY with the ALB3 translocase in thylakoids: substrate not required. In: *The Journal of Cell Biology* 162 (7), S. 1245–1254.
- Moran, N. A. (1996): Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, S. 2873–2878.
- Mullet, J.E (1988): Chloroplast Development and Gene Expression. In: *Annual Reviews of Plant Physiology* 39, S. 475–502.
- Nakai, M.; Goto, A.; Nohara, T.; Sugita, D.; Endo, T. (1994): Identification of the SecA protein homolog in pea chloroplasts and its possible involvement in thylakoidal protein transport. In: *The Journal of Biological Chemistry* 269 (50), S. 31338–31341.
- Neuhaus, H. E.; Emes, M. J. (2000): Nonphotosynthetic Metabolism in plastids. In: *Annual Reviews of Plant Physiology* 51, S. 111–141.
- Nilsson, Robert; van Wijk, Klaas Jan (2002): Transient interaction of cpSRP54 with elongating nascent chains of the chloroplast-encoded D1 protein; 'cpSRP54 caught in the act'. In: *FEBS Letters* 524 (1-3), S. 127–133.
- Nisbet, E. G.; Nisbet, R. E. R. (2008): Methane, oxygen, photosynthesis, rubisco and the regulation of the air through time. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363 (1504), S. 2745–2754.
- Oecking, Claudia; Jaspert, Nina (2009): Plant 14-3-3 proteins catch up with their mammalian orthologs. In: *Current Opinion in Plant Biology* 12 (6), S. 760–765.
- Oreb, Mislav; Tews, Ivo; Schleiff, Enrico (2008): Policing Tic 'n' Toc, the doorway to chloroplasts. In: *Trends in Cell Biology* 18 (1), S. 19–27.
- Ouyang, M.; Li, X.; Ma, J.; Chi, W.; Xiao, J.; Zou, M.; Chen, F.; Lu, C.; Zhang, L. (2011): LTD is a Protein required for sorting light-harvesting chlorophyll-binding proteins to the chloroplast SRP pathway. In: *Nature Communications* 1278, S. 1-11
- Pasch, J. C.; Nickelsen, J.; Schünemann, D. (2005): The yeast split-ubiquitin system to study chloroplast membrane protein interactions. In: *Applied Microbiology Biotechnology* 69 (4), S. 440–447.
- Payan L.A.; Cline, K. (1991): A Stromal Protein Factor Maintains the Solubility and Insertion Competence of an Imported Thylakoid Membrane Protein. In: *The Journal of Cell Biology* 112 (4), S. 603–613.
- Peluso, P. (2000): Role of 4.5S RNA in Assembly of the Bacterial Signal Recognition Particle with Its Receptor. In: *Science* 288 (5471), S. 1640–1643.

- Peter, G.F; Thornber, J.P (1991): Biochemical Composition and Organization of Higher Plant Photosystem II Light-harvesting Pigment-Proteins. In: *The Journal of Biological Chemistry* 266 (25), S. 16745–16754.
- Plumley, F.G; Schmidt, G.W (1995): Light-Harvesting Chlorophyll alb Complexes Interdependent Pigment Synt hesis and Protein Assembly. In: *The Plant Cell* 7, S. 689–704.
- Porra, R.J; Thompson, W.A; Kriedemann, P.E (1989): 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. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 975 (384-394).
- Potschka, M. (1987): Universal calibration of gel permeation chromatography and determination of molecular shape in solution. In: *Analytical Biochemistry* 162 (1), S. 47–64.
- R**ace, Helen L.; Herrmann, Reinhold G.; Martin, William (1999): Why have organelles retained genomes? In: *Trends in Genetics* 15 (9), S. 364–370.
- Rak, M.; Tetaud, E.; Godard, F.; Sagot, I.; Salin, B.; Duvezin-Caubet, S. et al. (2007): Yeast Cells Lacking the Mitochondrial Gene Encoding the ATP Synthase Subunit 6 Exhibit a Selective Loss of Complex IV and Unusual Mitochondrial Morphology. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (15), S. 10853–10864.
- Richter, Christine V.; Träger, Chantal; Schünemann, Danja (2008): Evolutionary substitution of two amino acids in chloroplast SRP54 of higher plants cause its inability to bind SRP RNA. In: *FEBS Letters* 582 (21-22), S. 3223–3229.
- Richter A. (2010). Klonierung von cysteinfreien polykationischen Polypeptiden & Click-chemische Verknüpfung eines Lichtsammelkomplexes mit einem silaffinähnlichen Protein. *Staatsexamensarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Rosendal, K.R; Wild, K.; Montoya, G.; Sinning, I. (2003): Crystal structure of the complete core of archaeal signal recognition particle and implications for interdomain communication. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (25), S. 14701–14706.
- S**chad, A. (2014). Charakterisierung und Beschreibung des Oligomerisierungsverhaltens des Transitkomplexes: Das light harvesting chlorophyll-a/b-binding protein (LHCP) in Assoziation mit nativem und rekombinantem cpSRP. *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Schaffitzel, C.; Oswald, M.; Berger, I.; Ishikawa, T.; Abrahams, J. P.; Koerten, H. K. et al. (2006): Structure of the E. coli signal recognition particle bound to a translating ribosome. In: *Nature* 444 (7118), S. 503–506.
- Schägger, H.; Cramer, W.A; Jagow, G. von (1994): Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. In: *Analytical Biochemistry* 217, S. 220–230.
- Schleiff, E. (2003): Characterization of the translocon of the outer envelope of chloroplasts. In: *The Journal of Cell Biology* 160 (4), S. 541–551.
- Schleiff, E.; Becker, T. (2010): Common ground for protein translocation: access control for mitochondria and chloroplasts. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (1), S. 48–59.

Schuenemann, D.; Gupta, S.; Persello-Cartieaux, F.; Klimyuk, V.I; Jones, J.D.G; Nussaume, L.; Hoffman, N.E (1998): A novel signal recognition particle targets light-harvesting proteins to the thylakoid membranes. In: *PNAS- Plant Biology* 95, S. 10312–10316.

Sivaraja, V.; Kumar, T. S. K.; Leena, P. S. T.; Chang, A.-n; Vidya, C.; Goforth, R. L. et al. (2005): Three-Dimensional Solution Structures of the Chromodomains of cpSRP43. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (50), S. 41465–41471.

Song, W.; Raden, D.; Mandon, E.C; Gilmore, R. (2000): Role of Sec61alpha in the regulated transfer of the ribosome-nascent chain complex from the signal recognition particle to the translocation channel. In: *Cell*, 100, S. 333–343.

Standfuss, J.; van Scheltinga, A.C T.; Lamborghini, M.; Kühlbrandt, W. (2005): Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5Å resolution. In: *The EMBO Journal* 24, S. 919–928.

Stengel, K. F.; Holdermann, I.; Cain, P.; Robinson, C.; Wild, K.; Sinning, I. (2008): Structural Basis for Specific Substrate Recognition by the Chloroplast Signal Recognition Particle Protein cpSRP43. In: *Science* 321 (5886), S. 253–256.

Szabo, A.; Stolz, L.; Granzow, R. (1995): Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). In: *Current Opinion in Structural Biology* 5 (5), S. 699–705.

Timasheff, S.N (1993): The Control of Protein Stability and Association by Weak Interactions with Water: How Do Solvents Affect These Processes? In: *Annual review of Biophysics & Biomolecular Structure*. 22, S. 67–97.

Tu, C.-J; Schuenemann, D.; Hoffman, N.E (1999): Chloroplast FtsY, chloroplast signal recognition particle and GTP are Required to Reconstitute the Soluble Phase of Light-harvesting Chlorophyll Protein Transport into Thylakoid Membranes. In: *The Journal of Biological Chemistry* 274 (38), S. 27219–27224.

Turnbull, W. Bruce; Daranas, Antonio H. (2003): On the Value of c: Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry? In: *Journal of the American Chemical Society* 125 (48), S. 14859–14866.

Vagenende, V.; Yap, M. G. S.; Trout, B.L (2009): Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. In: *Biochemistry* 48 (46), S. 11084–11096.

van Woestenenk, E.A; Hammarström, M.; van den Berg, S.; Härd, T.; Berglund H. (2004): His tag effect on solubility of human proteins produced in Escherichia coli: a comparison between four expression vectors. In: *Journal of Structural and Functional Genomics* 5, S. 217–229.

Walter, P.; Blobel, G. (1980): Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. In: *PNAS - Biochemistry* 77 (12), S. 7112–7116.

Wang, P.; Dalbey, R. E. (2011): Inserting membrane proteins: The YidC/Oxa1/Alb3 machinery in bacteria, mitochondria, and chloroplasts. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1808 (3), S. 866–875.

Wang, L.; Sun, N.; Terzyan, S.; Zhang, X.; Benson, D. R. (2006): A Histidine/Tryptophan  $\pi$ -Stacking Interaction Stabilizes the Heme-Independent Folding Core of Microsomal Apocytochrome b 5 Relative to that of Mitochondrial Apocytochrome b 5. In: *Biochemistry* 45 (46), S. 13750–13759.

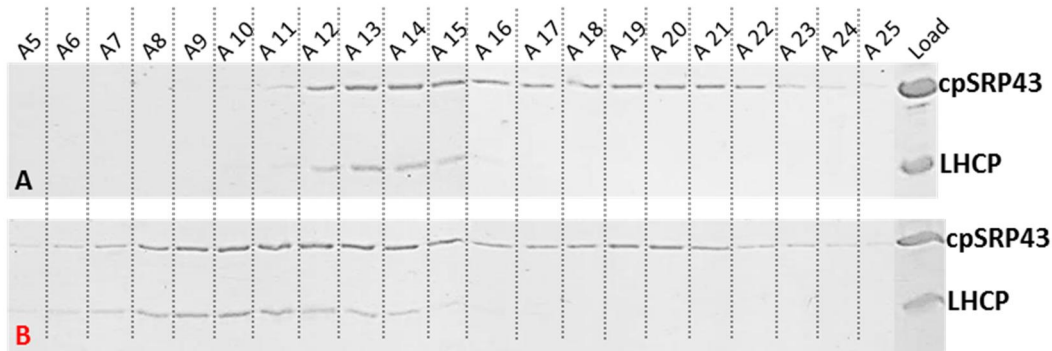
- Werwie, M. (2013). Biologischer Lichtsammler (LHCII) für Halbleiternanokristalle (Quantum Dots). *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Wilkinson, KD (2004): In: Protein protein interactions; Methods and Application. Humana press; MA,USA. S. 2-15
- Wittig, I.; Schägger, H. (2005): Advantages and limitations of clear-native PAGE. In: *Proteomics* 5 (17), S. 4338–4346.
- Wittig, I.; Schägger H. (2008): Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. In: *Proteomics* 8 (19), S. 3974–3990.
- Yalovsky, S.; Paulsen, H.; Michaeli, D.; Chitnis, P.R; Nechushtai, R. (1992): Involvement of a chloroplast HSP70 heat shock protein in the integration of a protein (light-harvesting complex protein precursor) into the thylakoid membrane. In: *PNAS-Biophysics* 89, S. 5616–5619.
- Yuan, J.; Henry, R.; Cline, K. (1993): Stromal factor plays an essential role in protein integration into thylakoids that cannot be replaced by unfolding or by heat shock protein Hsp70. In: *PNAS - Plant Biology* 90, S. 8552–8556.
- Zhu, X.; Zhao, X.; Burkholder, W.F.; Gragerov, A.; Ogata, C.M.; Gottesmann, M.E., Hendrickson, W.A. (1996): Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. In: *Science* 272, S. 1606-1614
- Zopf, D.; Bernstein, H.D; Johnson, A. E.; Walter, P. (1990): The methionine-rich domain of the 54 kd protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence. In: *The EMBO Journal* 9 (13), S. 4511–4517.

## 8. Anhang

### 8.1. Zusatzmaterial des Ergebnisteils

#### 8.1.1. Bezug auf 4.2.1

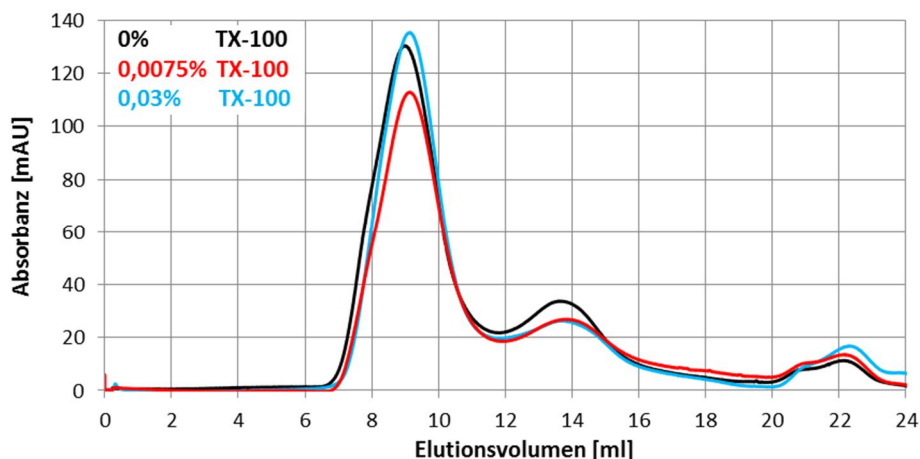
Abbildung 8.1 zeigt die zu Abbildung 4.16 zugehörige Fraktionierung des Gelfiltrationsdurchlaufs. Die entsprechenden Erläuterungen finden sich unter 4.2.1.



**Abbildung 8.1: Einfluss der Ni-Säulenaufreinigung auf die Komplexgröße des cpSRP43-LHCP-Komplexes.**

SDS-PAGE. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 9 – 19,5 ml (A5 – A25) wurden untersucht. **A** zeigt den cpSRP43-LHCP Kopplungsansatz nach Detergenz-Standard-Methode. **B** zeigt den cpSRP43-LHCP Kopplungsansatz nach Detergenz-Absorptionsmethode und Ni-Säulenaufreinigung. Es wurden von jeder Fraktion 10  $\mu$ l sowie 5  $\mu$ l Load auf ein 12% PAA-Gel aufgetragen.

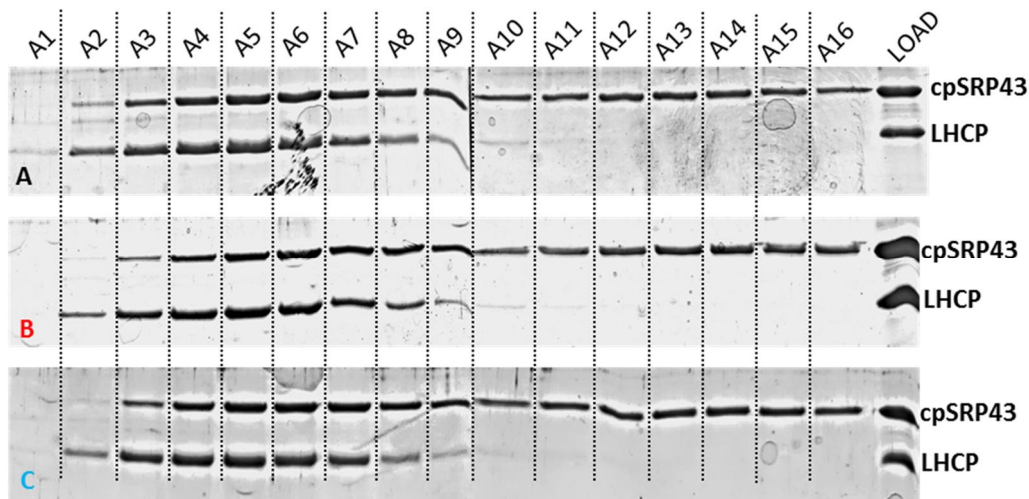
#### 8.1.2. Bezug auf 4.2.3.1



**Abbildung 8.2: Einfluss des Detergenz Triton X-100 auf den cpSRP43-LHCP-Komplex.**

Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramm. Es wurden je 500  $\mu$ l 20  $\mu$ mol/l cpSRP43-LHCP Komplex auf die Säule aufgetragen. Die Komplexe wurden mit Urea-vorsolubilisiertem LHCP zunächst bei einer Proteinkonzentration von  $\sim$ 6,6  $\mu$ mol/l (Ureaendkonzentration: 0,8 mol/l) hergestellt und nachfolgend 3 x aufkonzentriert (=20  $\mu$ mol/l). Den verschiedenen Ansätzen wurde im Komplexbildungsansatz kein, 0,0075% (=1/2 x CMC) bzw. 0,03% (= 2 x CMC) Triton X-100 zugesetzt. Standardlaufbedingungen. Es erfolgte ein fraktionierter Auffang des Eluats in 0,5 ml Schritten.

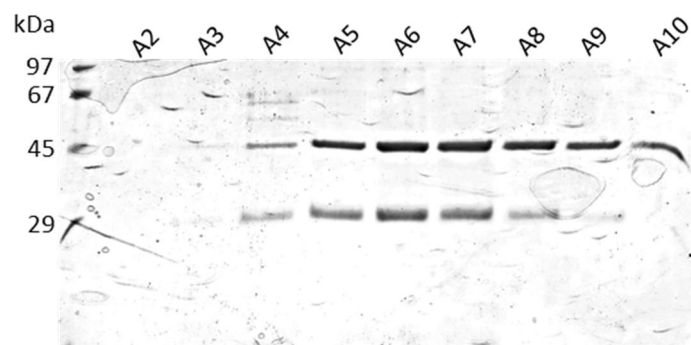
Abbildung 8.2 zeigt die Gelfiltrationschromatogramme der cpSRP-LHCP-Kopplungen unter Einfluss von TX-100. Das nicht-ionische Detergenz zeigte bei keiner der getesteten TX-100 Konzentrationen (0,5-2-fache CMC) einen Einfluss auf die Komplexe. Diese eluierten bei einem mittleren apparenten MW von ~900 kDa. Abbildung 8.3 lässt erkennen, dass die mit Urea-solubiliertem LHCP gebildeten Komplexe augenscheinlich einen LHCP-Überschuss (insbesondere im Elutionspeak) enthielten (vgl. dazu 4.2.3.1 und Diskussion 5.2.3/5.2.5).



**Abbildung 8.3: Einfluss des Detergenz Triton X-100 auf den cpSRP43-LHCP-Komplex.** SDS-PAGE. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 7 – 14 ml (A1 – A16) wurden untersucht. **A:** Ansatz ohne Detergenz. **B:** Ansatz mit 0,0075% Triton X-100. **C:** Ansatz mit 0,03% Triton X-100. Es wurden jeweils 35  $\mu$ l Fraktion sowie 10  $\mu$ l Load mit  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt.

### 8.1.3. Bezug auf 4.2.4

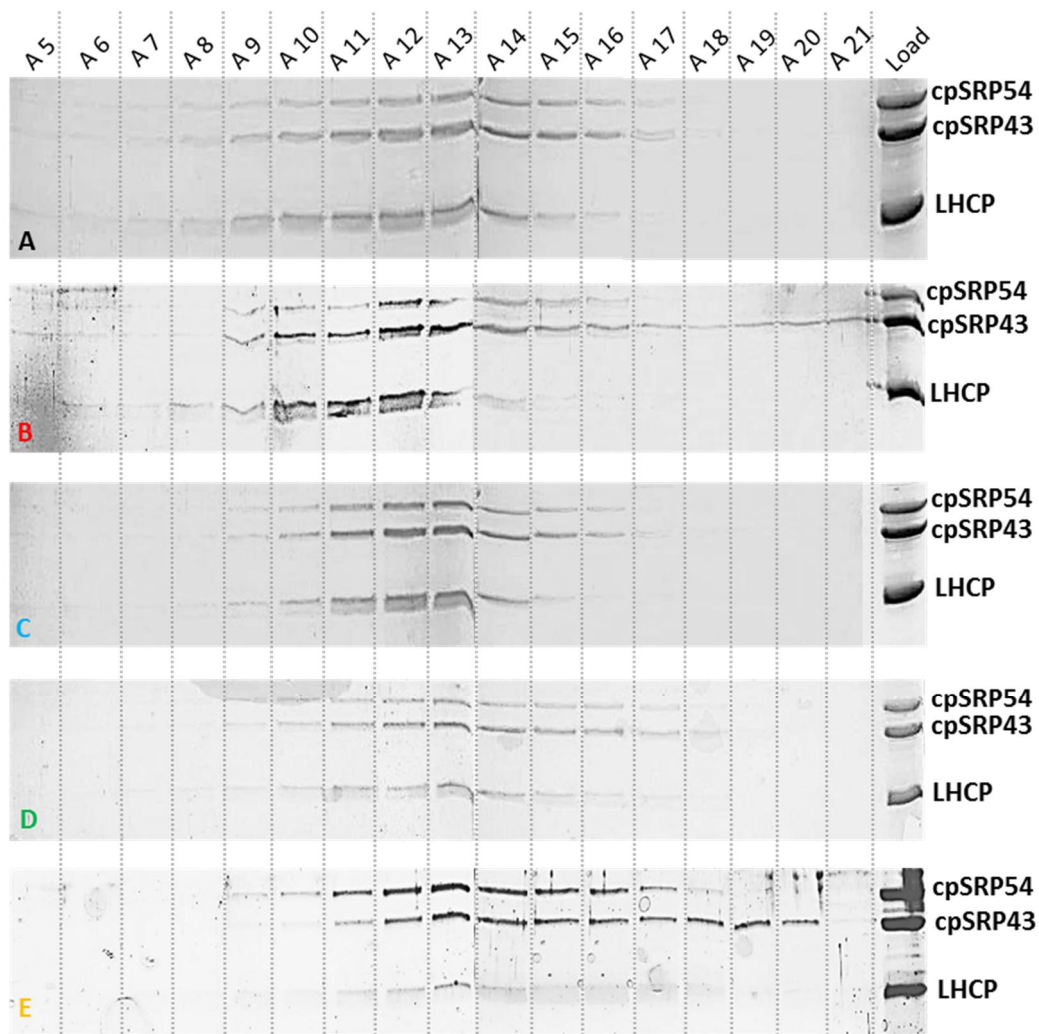
Abbildung 8.4 zeigt die Fraktionierung der cpSRP43-LHCP-Kopplung mit fraktionierter Zugabe des Urea-Solubilierten LHCP. Entsprechende Erläuterungen finden sich unter 4.2.4.



**Abbildung 8.4: Schrittweise Zugabe von Urea-solubiliertem LHCP zu cpSRP43.** SDS-PAGE. Es wurde zunächst cpSRP43 mit 10  $\mu$ mol/l vorgelegt. LHCP wurde insgesamt in 10 Schritten bis zu einer äquimolaren Konzentration zugegeben. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 7,5 – 12 ml (A2 – A10) wurden untersucht. Es wurden je 40  $\mu$ l Fraktion aufgetragen.

## 8.1.4. Bezug auf 4.3.2

Abbildung 8.5 zeigt die zu Abbildung 4.27 zugehörige Fraktionierung der Gelfiltrationsläufe von Vollängen-Transitkomplex unter Einfluss von Proteinaggregationshemmern. Die Proteinbanden zeigten teilweise kein distinktes Laufverhalten bzw. auch nur sehr schwache Intensität, weshalb eine densitometrische Auswertung nicht möglich war. Dennoch passen die augenscheinlichen Intensitätsverhältnisse zwischen cpSRP43 und LHCP recht gut mit der densitometrisch vermessenen Fraktionierung überein. Deshalb sollten die stöchiometrischen Verhältnisse den unter 4.3.4 nahe kommen.

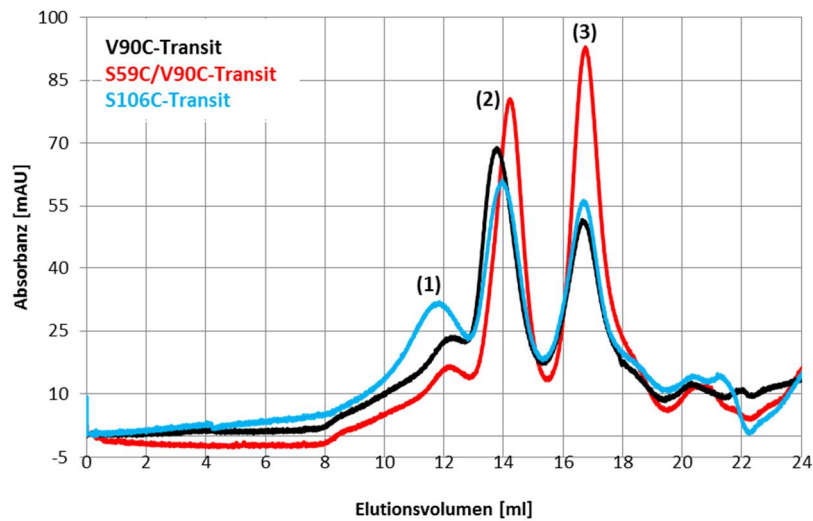


**Abbildung 8.5: Einfluss von potentiellen Proteinaggregationshemmern auf den Transitkomplex.**

SDS-PAGE. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 9 – 17 ml (A5 – A21) wurden untersucht. Jeweils 40 µl Fraktion wurden mit ¼ Endvolumen Auftragsmix in einem 15% PAA-Gel aufgetrennt. In der ganz rechten Bahn wurden je 20 µl Load appliziert. **A** = Zusatz von 5% PEG; **B** = Zusatz von 10% Saccharose; **C** = Zusatz von 10% Glycerin; **D** = Zusatz von 20% Glycerin; **E** = Zusatz von 2 mol/l Urea



## 8.1.5. Bezug auf 4.4.5.1



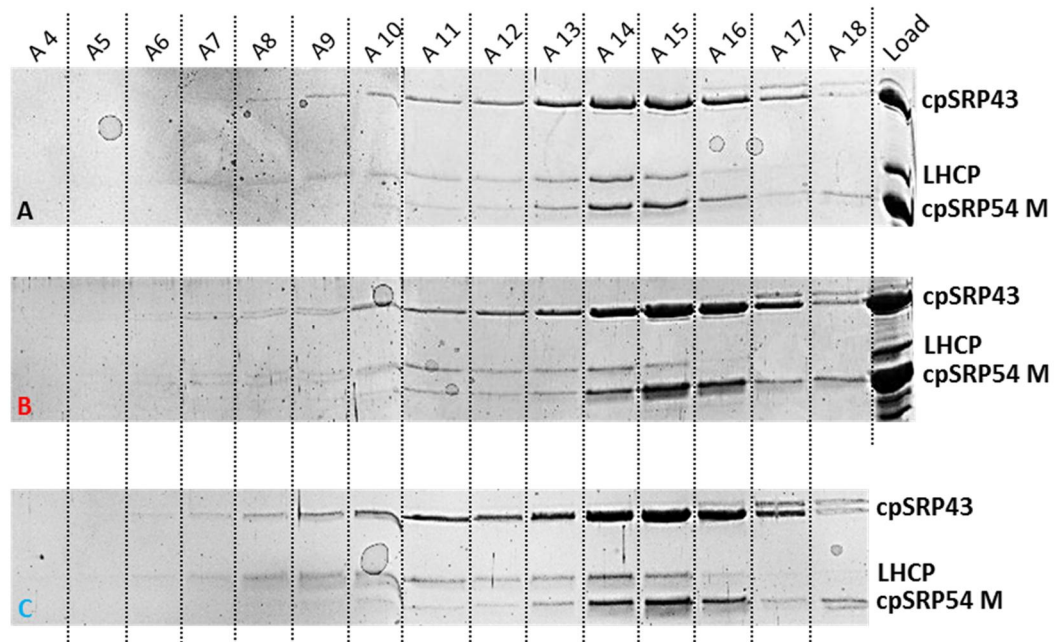
**Abbildung 8.6: Charakterisierung von Transitkomplexen mit cpSRP54M und PROXYL-markiertem LHCP (1).**

Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramme. 54M-cpSRP-Komplex sowie freies cpSRP54M wurde vor Verwendung in D<sub>2</sub>O haltigen cpSRP-Puffer gebracht. Weiterer verwendeter Puffer für die Proben wurden auch ausschließlich mit D<sub>2</sub>O angesetzt. Die ausgewiesenen LHCP-Mutanten wurden zuvor einer Standard-Markierung mit IAA-PROXYL unterzogen. Alle Transitkomplexproben wurden folgend nach Detergenz-Standard-Methode bei einer Endkonzentration von 7 µmol/l hergestellt und enthielten zusätzlich einen einfach stöchiometrischen Überschuss (7 µmol/l) von freiem cpSRP54M im Kopplungsansatz. Es wurden je 500 µl Transitkomplex mit cpSRP54M und PROXYL-markiertem LHCP auf die Säule aufgetragen. Standardlaufbedingungen.

In Abbildung 8.6 sind die zu 4.4.5.1 gehörigen Gelfiltrationsläufe der 54M-Transitkopplungen mit IAA-PROXYL-markierten LHCP-Mutanten zu sehen. Tabelle 8.1 zeigt die den Peaks zugehörigen mittleren apparenten MWs.

**Tabelle 8.1: Charakterisierung von Transitkomplexen mit cpSRP54M und PROXYL-markiertem LHCP.** Apparente Molekulargewichte entsprechend des Elutionsvolumens im jeweilig maximalen Peak. Die Peaks (1) der Chromatogramme beinhalten hauptsächlich nur cpSRP43 sowie LHCP; die Peaks (2) zeigen darüberhinaus cpSRP54M. Bei den Peaks (3) aller Chromatogramme handelt es sich um frei eluierendes cpSRP54M. Die Identifizierung der Peaks wurde anhand eines Gelauftrages des fraktionierten Eluats vorgenommen.

Peak #	V90C-Transit	S59C/V90C-Transit	S106C-Transit
(1)	345 kDa	335 kDa	408 kDa
(2)	164 kDa	130 kDa	149 kDa
(3)	36 kDa	36 kDa	36 kDa



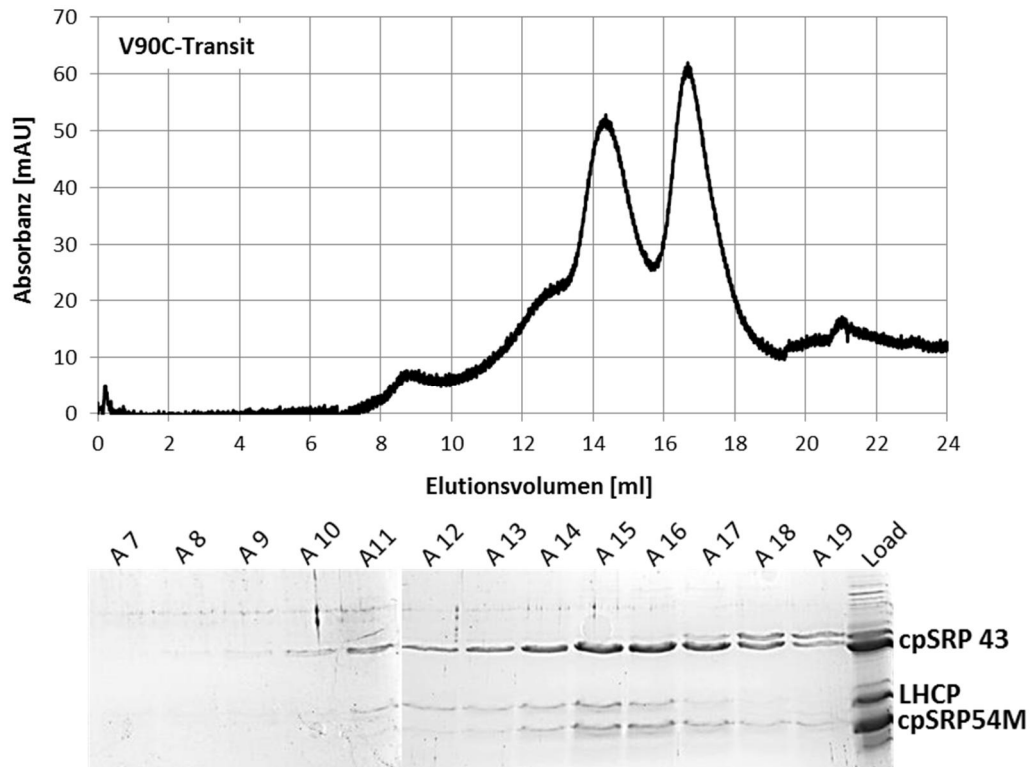
**Abbildung 8.7: Charakterisierung von Transitkomplexen mit cpSRP54M und PROXYL-markiertem LHCP (2).**

SDS-PAGE. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 8,5 – 16 ml (A2 – A18) wurden auf einem 15% PAA-Gel untersucht. **A** PROXYL-markierter V90C-54M-Transitkomplex. **B** PROXYL-markierter S59C/V90C-54M-Transitkomplex. **C** PROXYL-markiertem S106C-54M-Transitkomplex. Es wurden je 40  $\mu$ l Fraktion sowie 20  $\mu$ l Load aufgetragen. Allen Proben wurde vor Auftrag  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix beigemischt.

Abbildung 8.7 zeigt die Fraktionierung der verschiedenen 54M-Transitkomplexe. Es wurde die Totalprobe für die EPR-spektroskopische Vermessung verwendet. Entsprechende Erläuterungen finden sich unter 4.4.5.1.

#### 8.1.6. Bezug auf 4.4.5.2

In Abbildung 8.8 ist der zu 4.4.5.2 zugehörige Gelfiltrationslauf sowie dessen Fraktionierung zu sehen. Fraktion 15 mit einem mittleren apparenten MW von 143 kDa wurde für die EPR-spektroskopische Vermessung verwendet. Alle weiteren Erläuterungen sind 4.4.5.2 zu entnehmen.



**Abbildung 8.8: Charakterisierung von Transitkomplexen mit cpSRP54M und PROXYL-markiertem LHCP (3).**

Oben: Superdex 200 Gelfiltrationschromatogramme. 54M-cpSRP-Komplex sowie freies cpSRP54M wurde vor Verwendung in D<sub>2</sub>O haltigem HEPES-Puffer gebracht. Weiterer verwendeter Puffer für die Proben wurde auch ausschließlich mit D<sub>2</sub>O angesetzt. IAA-PROXYL-markierter V90C wurde mit 54M-cpSRP-Komplex nach Detergenz-Standard-Methode bei einer Konzentration von 7  $\mu\text{mol/l}$  sowie einfachem Überschuss (7  $\mu\text{mol/l}$ ) von freiem cpSRP54M gekoppelt. Es wurden 500  $\mu\text{l}$  Transitkomplex mit cpSRP54M und PROXYL-markiertem LHCP auf die Säule aufgetragen. Standardlaufbedingungen. Unten: SDS-PAGE. Die Fraktionen bei einem Elutionsvolumen von 8,5 – 16 ml (A2 – A18) wurden auf einem 15% PAA-Gel untersucht. Es wurden je 40  $\mu\text{l}$  Fraktion sowie 20  $\mu\text{l}$  Load aufgetragen. Allen Proben wurde vor Auftrag  $\frac{1}{4}$  Endvolumen Auftragsmix beigemischt.

## 8.2. Sequenzen

### 8.2.1. Basensequenz/Primärsequenz von His-cpSRP43

Das exprimierte His-cpSRP43 beinhaltet im Vergleich zum nativen Protein neben dem **His<sub>6</sub>-tag** eine weiter kurze N-terminale Verlängerung. Der „tag“ wird flankiert durch die AS GSS-[His<sub>6</sub>-tag]-SQDP. Das exprimierte mature Protein besitzt eine molekulare Masse von 36,6 kDa und einen pI = 4,34.

GGC	AGC	AGC	CAT	CAC	CAT	CAT	CAC	CAC	AGC	CAG	GAT	CCG	GCC	GTA	CAA	AGA	
G	S	S	H	H	H	H	H	H	S	Q	D	P	A	V	Q	R	
			10			20			30				40			50	
AAC	TAC	GAA	GAA	ACG	ACC	TCC	TCC	GTG	GAA	GAG	GCA	GAG	GAA	GAT	GAT	GAG	
N	Y	E	E	T	T	S	S	V	E	E	A	E	E	D	D	E	
			60			70			80				90			100	
TCA	TCA	TCA	TCG	TAC	GGA	GAA	GTG	AAC	AAG	ATC	ATT	GGA	AGC	CGA	ACG	GCG	
S	S	S	S	Y	G	E	V	N	K	I	I	G	S	R	T	A	
			110			120			130				140			150	
GGG	GAA	GGA	GCC	ATG	GAG	TAC	CTT	ATC	GAG	TGG	AAG	GAC	GGC	CAT	TCT	CCG	
G	E	G	A	M	E	Y	L	I	E	W	K	D	G	H	S	P	
160			170			180			190				200				
TCG	TGG	GTT	CCA	TCG	AGC	TAC	ATC	GCA	GCA	GAC	GTA	GTG	TCG	GAG	TAC	GAG	
S	W	V	P	S	S	Y	I	A	A	D	V	V	S	E	Y	E	
			210			220			230				240			250	
ACA	CCC	TGG	TGG	ACG	GCA	GCT	AAA	AAA	GCC	GAT	GAG	CAG	GCC	CTG	TCA	CAG	
T	P	W	W	T	A	A	K	K	A	D	E	Q	A	L	S	Q	
			260			270			280				290			300	
CTC	CTG	GAG	GAC	CGA	GAC	GTC	GAT	GCC	GTG	GAC	GAA	AAC	GGC	CGG	ACG	GCT	
L	L	E	D	R	D	V	D	A	V	D	E	N	G	R	T	A	
			310			320			330				340			350	
CTG	CTT	TTC	GTG	GCA	GGT	CTG	GGG	TCG	GAC	AAG	TGC	GTA	AGG	CTT	CTG	GCG	
L	L	F	V	A	G	L	G	S	D	K	C	V	R	L	L	A	
			360			370			380				390			400	
GAG	GCT	GGA	GCC	GAT	CTC	GAC	CAC	CGA	GAC	ATG	AGG	GGA	GGC	TTG	ACG	GCG	
E	A	G	A	D	L	D	H	R	D	M	R	G	G	L	T	A	
			410			420			430				440			450	
CTG	CAC	ATG	GCG	GCT	GGT	TAC	GTG	AGG	CCG	GAG	GTG	GTG	GAA	GCG	CTG	GTG	
L	H	M	A	A	G	Y	V	R	P	E	V	V	E	A	L	V	
			460			470			480				490			500	
GAG	CTG	GGA	GCT	GAT	ATT	GAA	GTG	GAA	GAC	GAG	AGA	GGG	TTA	ACG	GCG	TTG	
E	L	G	A	D	I	E	V	E	D	E	R	G	L	T	A	L	
			520			530			540				550			560	
GAA	CTA	GCG	AGG	GAG	ATT	CTG	AAG	ACG	ACG	CCG	AAG	GGG	AAT	CCG	ATG	CAG	
E	L	A	R	E	I	L	K	T	T	P	K	G	N	P	M	Q	
			570			580			590				600			610	
TTC	GGG	AGG	AGA	ATT	GGG	TTA	GAG	AAA	GTG	ATC	AAT	GTC	CTG	GAA	GGA	CAA	
F	G	R	R	I	G	L	E	K	V	I	N	V	L	E	G	Q	
			620			630			640				650			660	
GTG	TTC	GAG	TAC	GCC	GAG	GTG	GAT	GAG	ATC	GTA	GAG	AAA	CGA	GGG	AAA	GGC	
V	F	E	Y	A	E	V	D	E	I	V	E	K	R	G	K	G	
			670			680			690				700			710	
AAA	GAC	GTT	GAA	TAT	CTG	GTC	AGA	TGG	AAG	GAC	GGT	GGA	GAT	TGC	GAG	TGG	
K	D	V	E	Y	L	V	R	W	K	D	G	G	D	C	E	W	
			720			730			740				750			760	
GTG	AAA	GGT	GTA	CAC	GTG	GCG	GAA	GAT	GTG	GCT	AAG	GAC	TAC	GAG	GAT	GGG	
V	K	G	V	H	V	A	E	D	V	A	K	D	Y	E	D	G	
			770			780			790				800			810	

CTG	GAG	TAC	GCT	GTA	GCG	GAG	AGT	GTG	ATC	GGG	AAG	AGG	GTG	GGA	GAC	GAT
L	E	Y	A	V	A	E	S	V	I	G	K	R	V	G	D	D
820			830			840			850			860				
GGG	AAG	ACC	ATC	GAG	TAT	CTT	GTC	AAA	TGG	ACT	GAT	ATG	TCT	GAT	GCC	ACT
G	K	T	I	E	Y	L	V	K	W	T	D	M	S	D	A	T
870			880			890			900			910				
TGG	GAG	CCT	CAG	GAC	ATT	GTC	GAC	TCT	ACT	CTT	GTT	CTA	CTC	TAC	CAA	CAA
W	E	P	Q	D	I	V	D	S	T	L	V	L	L	Y	Q	Q
920			930			940			950			960				
CAA	CAA	CCA	ATG	AAT	GAA											
Q	Q	P	M	N	E											
970			980													

### 8.2.2. Basensequenz/ Primärsequenz von cpSRP54 und cpSRP54M

Das exprimierte cpSRP54 beinhaltet gegenüber dem nativen Protein eine geringfügige Verkürzung am N-Terminus. Es fehlen dort die ersten 4 AS (EMFG). Das gezeigte Vollängenprotein hat eine molekulare Masse von 52,3 kDa. Der pI liegt bei 9,01. Das **cpSRP54M** hat eine molekulare Masse von 21,5 kDa und einen pI von 9,72. His-cpSRP54M entspricht der Sequenz von cpSRP54M inklusive einem N-terminalen His<sub>6</sub>-tag und einem Linkerarm SQDP. Die molekulare Masse beträgt 23 kDa und der pI = 9,63.

CAG	TTG	ACT	GGT	GGC	CTC	GAG	GCT	GCT	TGG	AGC	AAA	CTC	AAA	GGC	GAA	GAG
Q	L	T	G	G	L	E	A	A	W	S	K	L	K	G	E	E
10			20			30			40			50				
GTC	TTG	ACT	AAG	GAC	AAT	ATT	GCT	GAG	CCA	ATG	CGG	GAT	ATC	AGA	AGA	GCT
V	L	T	K	D	N	I	A	E	P	M	R	D	I	R	R	A
60			70			80			90			100				
CTC	CTG	GAA	GCA	GAT	GTG	AGT	CTC	CCA	GTT	GTT	AGA	AGG	TTT	GTT	CAG	TCT
L	L	E	A	D	V	S	L	P	V	V	R	R	F	V	Q	S
110			120			130			140			150				
GTT	AGT	GAC	CAA	GCC	GTT	GGA	ATG	GGT	GTC	ATT	CGT	GGA	GTC	AAA	CCA	GAT
V	S	D	Q	A	V	G	M	G	V	I	R	G	V	K	P	D
160			170			180			190			200				
CAG	CAA	TTG	GTC	AAG	ATT	GTA	CAT	GAT	GAG	CTA	GTG	AAA	TTG	ATG	GGT	GGA
Q	Q	L	V	K	I	V	H	D	E	L	V	K	L	M	G	G
210			220			230			240			250				
GAA	GTA	TCT	GAG	TTA	CAG	TTT	GCT	AAA	TCA	GGT	CCT	ACA	GTA	ATA	TTG	TTG
E	V	S	E	L	Q	F	A	K	S	G	P	T	V	I	L	L
260			270			280			290			300				
GCT	GGG	CTC	CAA	GGA	GTT	GGA	AAG	ACA	ACG	GTT	TGT	GCT	AAA	CTA	GCT	TGT
A	G	L	Q	G	V	G	K	T	T	V	C	A	K	L	A	C
310			320			330			340			350				
TAC	CTA	AAG	AAG	CAG	GGA	AAA	TCT	TGC	ATG	CTT	ATT	GCT	GGA	GAT	GTA	TAC
Y	L	K	K	Q	G	K	S	C	M	L	I	A	G	D	V	Y
360			370			380			390			400				
CGA	CCT	GCT	GCT	ATC	GAT	CAA	CTT	GTC	ATT	TTA	GGT	GAA	CAG	GTT	GGT	GTG
R	P	A	A	I	D	Q	L	V	I	L	G	E	Q	V	G	V
410			420			430			440			450				
CCG	GTT	TAT	ACA	GCA	GGG	ACT	GAT	GTA	AAA	CCT	GCA	GAT	ATA	GCT	AAG	CAA
P	V	Y	T	A	G	T	D	V	K	P	A	D	I	A	K	Q
460			470			480			490			500				

## Anhang

GGT CTA AAA GAA GCT AAA AAG AAC AAT GTT GAT GTA GTT ATT ATG GAT ACT																	
G L K E A K K N N V D V V I M D T																	
			520				530					540				550	560
GCA GGG AGG CTT CAG ATA GAT AAA GGC ATG ATG GAC GAA TTA AAA GAC GTG																	
A G R L Q I D K G M M D E L K D V																	
			570				580					590				600	610
AAG AAA TTT CTG AAT CCA ACA GAA GTG TTA CTA GTT GTT GAT GCC ATG ACT																	
K K F L N P T E V L L V V D A M T																	
			620				630					640				650	660
GGA CAA GAA GCT GCA GCA CTG GTG ACG ACA TTC AAT GTA GAG ATA GGA ATT																	
G Q E A A A L V T T F N V E I G I																	
			670				680					690				700	710
ACA GGA GCC ATT TTG ACA AAG CTA GAT GGT GAT TCA AGA GGT GGT GCT GCT																	
T G A I L T K L D G D S R G G A A																	
			720				730					740				750	760
TTG AGT GTC AAG GAG GTA TCA GGA AAA CCG ATT AAA CTG GTA GGA CGT GGA																	
L S V K E V S G K P I K L V G R G																	
			770				780					790				800	810
GAG CGA ATG GAG GAT CTT GAA CCC TTT TAT CCA GAT CGA ATG GCT GGA CGA																	
E R M E D L E P F Y P D R M A G R																	
			820				830					840				850	860
ATT CTA GGA ATG GGA GAT GTG CTT TCA TTT GTA GAG AAG GCA ACA GAA GTT																	
I L G M G D V L S F V E K A T E V																	
			870				880					890				900	910
ATG CGT CAA GAA GAT GCA GAA GAT CTG CAG AAG AAG ATA ATG AGT GCA AAG																	
M R Q E D A E D L Q K K I M S A K																	
			920				930					940				950	960
TTC GAC TTC AAC GAT TTT CTA AAG CAG ACT CGT GCT GTA GCG AAA ATG GGT																	
F D F N D F L K Q T R A V A K M G																	
			970				980					990				1000	1010
TCG ATG ACA CGA GTT CTT GGA ATG ATT CCC GGA ATG GGG AAA GTG AGT CCA																	
S M T R V L G M I P G M G K V S P																	
			1030				1040					1050				1060	1070
GCA CAA ATC CGA GAA GCG GAA AAG AAT CTT TTA GTC ATG GAA GCA ATG ATT																	
A Q I R E A E K N L L V M E A M I																	
			1080				1090					1100				1110	1120
GAA GTG ATG ACA CCC GAG GAA AGA GAG AGA CCA GAG TTA CTA GCA GAA TCT																	
E V M T P E E R E R P E L L A E S																	
			1130				1140					1150				1160	1170
CCA GAG AGA AGA AAA AGA ATC GCT AAA GAT TCA GGA AAG ACA GAA CAA CAG																	
P E R R K R I A K D S G K T E Q Q																	
			1180				1190					1200				1210	1220
GTG AGC GCA CTT GTA GCA CAA ATC TTC CAA ATG AGA GTG AAA ATG AAG AAC																	
V S A L V A Q I F Q M R V K M K N																	
			1230				1240					1250				1260	1270
TTG ATG GGA GTG ATG GAA GGA GGA TCA ATT CCA GCA TTA AGC GGT CTC GAG																	
L M G V M E G G S I P A L S G L E																	
			1280				1290					1300				1310	1320
GAC GCA TTG AAA GCA GAA CAA AAG GCT CCA CCT GGA ACT GCA AGG AGG AAG																	
D A L K A E Q K A P P G T A R R K																	
			1330				1340					1350				1360	1370
AGA AAG GCA GAC TCA AGG AAG AAA TTT GTA GAG TCA GCA TCA AGC AAG CCT																	
R K A D S R K K F V E S A S S K P																	
			1380				1390					1400				1410	1420
GGT CCT CGT GGC TTC GGC TCT GGT AAC																	
G P R G F G S G N																	
			1430				1440					1450					

### 8.3. Abkürzungsverzeichnis

Neben den gängigen Abkürzungen für chemische Symbole, Maßeinheiten und geläufige Formulierungen der deutschen Sprache wurden darüber hinaus in dieser Arbeit folgende Abkürzungen verwendet:

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
Da	Dalton
Cam	Chloramphenicol
CHAPS	3-[3-(Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propansulfonat
CMC	„critical micellar concentration“ – kritische Mizellenkonzentration
cpSRP	Chloroplastidärer Signalerkennungspartikel
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dest.	destilliert
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Elu	Elution
EPR	Elektronenspinresonanz
FPLC	„Fast protein liquid chromatography“
His <sub>6</sub> -tag	Hexahistidyl-tag
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IAA-PROXYL	3-(2-Iodacetamido)-PROXYL
IB(s)	Inclusion body(ies)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactosid
KCl	Kaliumchlorid
LDAO	Dimethyldodecylamin-N-oxid
LB	„lysogeny broth“
LHCII	„light harvesting chlorophyll a/b-binding complex“ - Majorer Lichtsammelkomplex des Fotosystems II
LHCP	„light harvesting chlorophyll a/b-binding protein“ – Apoprotein des LHCII
LM	Laurylmaltosid
OD	Optische Dichte
OG	Octylglucosid
PAA	Polyacrylamid

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pH	„potentia hydrogenii“
pI	Isoelektrischer Punkt
rpm	„rounds per minute“ – Umdrehungen/Minute
RT	Raumtemperatur
S[K]DS	Natrium[Kalium]dodecylsulfat
SE	Stromaextrakt
SOC	“Super Optimal broth with Catabolite repression”
SV	Säulenvolumen
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
üN	über Nacht
UZ	Ultrazentrifuge
VK	Vorkultur
WP	Waschpuffer

### 8.3.1. Aminosäuren

**Tabelle 8.2: Aminosäuren im 3-Buchstaben und 1-Buchstabencode**

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Aspartatsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V



## 8.4. Verzeichnisse

### 8.4.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Proteintransportwege im Chloroplasten .....	8
Abbildung 1.2: Der co-translationale cpSRP-Transport.....	10
Abbildung 1.3: Schematische Struktur und Bändermodell des cpSRP43.....	11
Abbildung 1.4: Oberflächenpräsentation des cpSRP43/L18-Peptid-Komplexes.....	12
Abbildung 1.5: Interaktion der L18-TM3-Domäne des LHCP mit cpSRP43.....	14
Abbildung 1.6: Biogeneseweg des LHCP.....	15
Abbildung 1.7: Modell der Thylakoidinsertion des LHCP.....	16
Abbildung 2.1: Längenstandards für die denaturierende PAGE. ....	29
Abbildung 2.2: Längenstandards für die native PAGE.....	29
Abbildung 3.1: Eichgerade und Geradengleichung für die Superdex 200. ....	59
Abbildung 3.2: Eichgerade und Geradengleichung für die Superose 6. ....	60
Abbildung 4.1: Bakterienlysats-Überstand der Einzelüberexpressionen von cpSRP43 und cpSRP54.....	65
Abbildung 4.2: Totalproteinanalyse von cpSRP-54M und His-cpSRP54M. ....	65
Abbildung 4.3: Totalproteinanalyse der coüberexprimierten Proteine cpSRP43 und cpSRP54. ....	66
Abbildung 4.4: Elutionsprofil einer Ni-Säulen-Aufreinigung von cpSRP 43. ....	67
Abbildung 4.5: Elutionsprofil einer Ni-Säulenaufarbeitung des His-cpSRP54M. ....	67
Abbildung 4.6: Elutionsprofil einer Ni-Säulen Aufreinigung von rekombinatem Vollängen-cpSRP. ....	68
Abbildung 4.7: Elutionsprofil einer Ni-Säulen Aufarbeitung von 54M-cpSRP-Komplex. ....	69
Abbildung 4.8: Superdex 200 Gelfiltrationslauf des aufgereinigten cpSRP43.....	70
Abbildung 4.9: Superdex 200 Gelfiltrationslauf einer 54M-cpSRP-Komplexbindung. ....	71
Abbildung 4.10: Gelfiltrationslauf der Aufarbeitung von rekombinatem Vollängen-cpSRP (0,4 mg/ml).....	72
Abbildung 4.11: Elutionsfraktionen/Gelfiltrationslauf einer Ni-Säulenaufarbeitung von rekombinatem Vollängen-cpSRP (0,8 mg/ml).....	73
Abbildung 4.12: Elutionsfraktionen/Gelfiltrationslauf einer Ni-Säulenaufarbeitung von rekombinatem Vollängen-cpSRP (2 mg/ml).....	74
Abbildung 4.13: Superose 6 Gelfiltrationslauf einer cpSRP-Coexpression. ....	75
Abbildung 4.14: Superdex 200 Gelfiltrationslauf einer cpSRP-Kopplung (Gradientenelution). ....	76
Abbildung 4.15: Superdex 200 Gelfiltrationslauf einer cpSRP-Kopplung (Säulenkopplung).....	77
Abbildung 4.16: Einfluss der Komplexbildungsmethode auf die Komplexgröße des cpSRP43-LHCP-Komplexes.....	81
Abbildung 4.17: Einfluss der Komplexbildungsmethode auf die cpSRP43-LHCP-Komplexgröße. ....	82

Abbildung 4.18: Einfluss der Konzentration im Kopplungsansatz auf die cpSRP43-LHCP-Komplexgröße. ....	84
Abbildung 4.19: Einfluss des Detergenz Octylglucosids auf den cpSRP43-LHCP-Komplex. ....	86
Abbildung 4.20: – Einfluss des Detergenz Laurylmaltosid auf den cpSRP43-LHCP-Komplex. ....	87
Abbildung 4.21: Einfluss des Detergenz Deriphats auf den cpSRP43-LHCP-Komplex. ....	89
Abbildung 4.22: Einfluss verschiedener Komplexbildungsvariationen auf den cpSRP43-LHCP-Komplex. ....	90
Abbildung 4.23: Intensitätsverhältnis der Farbdichten von cpSRP43 und LHCP (Coomassie gefärbt). ....	92
Abbildung 4.24: Stöchiometrien des cpSRP43-LHCP-Komplexes. ....	93
Abbildung 4.25: Einfluss der Aufkonzentrierung auf den Transitkomplex. ....	95
Abbildung 4.26: Einfluss der Kopplungskonzentration auf den Transitkomplex. ....	96
Abbildung 4.27: Einfluss von potentiellen Proteinaggregationshemmern auf den Transitkomplex. ....	98
Abbildung 4.28: Auftrennung von Transitkopplungen/cpSRP-Komplex in einer nativen PAGE. ....	99
Abbildung 4.29: Immunoblot von Transit-kopplungen/cpSRP-Komplex nach Auftrennung in nativer PAGE. ....	100
Abbildung 4.30: Stöchiometrien des Vollängen-Transitkomplexes. ....	101
Abbildung 4.31: Einfluss der Aufkonzentrierung auf Transitkomplex mit cpSRP54M. ....	103
Abbildung 4.32: Einfluss der Aufkonzentrierung auf Transitkomplex mit cpSRP54M (2). ....	104
Abbildung 4.33: Einfluss eines Überschusses von 54M-cpSRP-Komplex bzw. His-cpSRP54M auf 54M-Transitkomplex. ....	105
Abbildung 4.34: Einfluss eines Überschusses von cpSRP54M bei der Transitkomplexbindung. ....	106
Abbildung 4.35: Charakterisierung von aufkonzentriertem niedermolekularem cpSRP54M-Transitkomplex. ....	108
Abbildung 4.36: Einfluss der Aufkonzentrierung durch Lyophilisation auf cpSRP54M-Transitkomplex. ....	109
Abbildung 4.37: Stöchiometrie des 54M-Transitkomplexes. ....	110
Abbildung 4.38: DEER-EPR Messungen von 54M-Transitkomplexen. ....	112
Abbildung 4.39: DEER-EPR Messung einer Gelfiltrationsfraktion von 54M-Transitkomplex. ....	114
Abbildung 4.40: Einfluss der Aufkonzentrierung von Stromaextrakt auf natives cpSRP. ....	117
Abbildung 4.41: Aktivitätstest von nativem cpSRP. ....	119
Abbildung 4.42: Transitkopplung von rekombinantem cpSRP mit rekombinantem LHCP in SE. ....	120
Abbildung 4.43: Transitkopplung von rekombinantem 54M-cpSRP-Komplex und LHCP in SE. ....	122
Abbildung 5.1: SAXS-Rekonstitution von Vollängen-cpSRP43. ....	126
Abbildung 5.2: Stöchiometrie – Gegenüberstellung. ....	129
Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der cp-SRP54 Abschirmung. ....	144
Abbildung 5.4: Gegenüberstellung von Stromaextrakt. ....	160

Abbildung 8.1: Einfluss der Ni-Säulenaufreinigung auf die Komplexgröße des cpSRP43-LHCP-Komplexes.....	174
Abbildung 8.2: Einfluss des Detergenz Triton X-100 auf den cpSRP43-LHCP-Komplex.....	174
Abbildung 8.3: Einfluss des Detergenz Triton X-100 auf den cpSRP43-LHCP-Komplex. ....	175
Abbildung 8.4: Schrittweise Zugabe von Urea-solubiliertem LHCP zu cpSRP43. ....	175
Abbildung 8.5: Einfluss von potentiellen Proteinaggregationshemmern auf den Transitkomplex. ...	176
Abbildung 8.6: Charakterisierung von Transitkomplexen mit cpSRP54M und PROXYL-markiertem LHCP (1).....	177
Abbildung 8.7: Charakterisierung von Transitkomplexen mit cpSRP54M und PROXYL-markiertem LHCP (2).....	178
Abbildung 8.8: Charakterisierung von Transitkomplexen mit cpSRP54M und PROXYL-markiertem LHCP (3).....	179

#### 8.4.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Eichproteine für die Gelfiltrationschromatographie. ....	30
Tabelle 2.2: Verwendete rekombinante Proteine. ....	31
Tabelle 2.3: Verwendete LHCP-Varianten. ....	32
Tabelle 2.4: Struktur und Daten zu 3-(2-Iodacetamido)-PROXYL.....	32
Tabelle 3.1: Zusammensetzung der 15% PAA-Gele .....	51
Tabelle 3.2: Laufprotokolle für GPC-Probenläufe und GPC-Eichläufe. ....	58
Tabelle 3.3: Eichung der Superdex 200 (10/30).....	59
Tabelle 3.4: Eichung der Superose 6 (10/30).....	60
Tabelle 4.1: Einfluss getesteter Detergenzien auf den cpSRP43-LHCP-Komplex. ....	85
Tabelle 4.2: Einfluss verschiedener Komplexbildungsvariationen auf den cpSRP43-LHCP-Komplex. ....	91
Tabelle 4.3: Einfluss der Aufkonzentrierung auf Transitkomplex mit cpSRP54M.....	103
Tabelle 5.1: Molekulare Massen und Stokes Radii von nativen GFC-Kalibrierungsproteinen.....	125
Tabelle 7.1: Charakterisierung von Transitkomplexen mit cpSRP54M und PROXYL-markiertem LHCP. ....	177
Tabelle 7.2: Aminosäuren im 3-Buchstaben und 1-Buchstabencode .....	184

## **9. Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen in dieser Arbeit verwendet habe.

Mainz, den 20.08.2014

Andreas Richter