

**Konformationsanalyse und
Lipidbindung am rekombinanten
Lichtsammlerprotein LHCIIb
höherer Pflanzen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Alexander Bender
geb. am 3.6.1972 in Wiesbaden

Mainz 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Thylakoidmembran	1
1.2	Der LHCII - Hauptlichtsammelkomplex des Photosystems II	4
1.2.1	Die dreidimensionale Struktur des LHCII	5
1.2.2	Pigmentbindung des LHCII	
1.2.2.1	<i>Chlorophylle</i>	5
1.2.2.2	<i>Carotinoide</i>	5
1.2.3	Die <i>in vitro</i> - Rekonstitution des LHCII	8
1.3	Struktur und Konformation des LHCII	9
1.3.1	Das Trimerisierungsmotiv des LHCII in Zusammenhang mit der Interaktion mit dem Lipid Phosphatidylglyzerin	9
1.3.2	Einfluss verschiedener Faktoren auf die Konformation des LHCII	11
1.3.2.1	<i>Der Einfluss von Lipiden auf die Konformation</i>	12
1.3.2.2	<i>Der Einfluss verschiedener Xanthophylle</i>	13
1.3.2.3	<i>Einfluss von Licht auf die Konformation</i>	14
1.4	Konformationsanalyse des LHCII mit Hilfe der Elektronenspin - Resonanz - Spektroskopie	15
1.5	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Geräte und Chemikalien	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Chemikalien	24
2.1.2.1	<i>Gase</i>	24
2.1.2.2	<i>ESR - Label und Farbstoffe</i>	24
2.1.2.2.1	<i>ESR - Label</i>	24
2.1.2.2.2	<i>Farbstoffe</i>	25
2.1.2.3	<i>Lipide</i>	25
2.1.2.4	<i>Lösemittel</i>	26
2.1.2.5	<i>Weitere Chemikalien</i>	26
2.2	Molekularbiologische Arbeiten	26
2.2.1	Konstruktion von LHCII - Mutanten	26
2.2.1.1	<i>Konstruktion der Mutante R21Qh durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der PCR - Reaktion</i>	27
2.2.1.2	<i>Konstruktion weiterer LHCII - Mutanten durch einfache Restriktion und Religation vorhandener Klone</i>	29
2.2.2	Agarose - Gelelektrophorese	30
2.2.3	Aufreinigung von DNA aus Agarose - Gelen über eine Nucleo Trap - Säule	31
2.2.4	Quantifizierung von DNA	32
2.2.5	Ligation	32
2.2.6	Transformation	33
2.2.7	Anzucht von Bakterien	33
2.2.8	Plasmid - Isolation mittels Midi - Präparation	34
2.2.9	Sequenzierung	34
2.2.10	Anlegen von Dauerkulturen	35

2.3	Proteinbiochemische Arbeiten	36
2.3.1	Isolation von Einschlusskörpern aus Bakterien	36
2.3.2	Quantifizierung des isolierten LHCP	37
2.3.3	Polyacrylamid - Gelelektrophorese	38
2.3.4	<i>In vitro</i> - Rekonstitution von monomerem LHCII	40
2.3.5	Trimerisierung von LHCII auf der Ni - Sepharose - Säule	41
2.3.6	Saccharosedichtegradienten - Zentrifugation	43
2.3.7	Konzentrationsbestimmung von LHCII	43
2.3.8	Extraktion von Pigmenten aus aufgereinigtem LHCII	44
2.4	Pigmente	44
2.4.1	Pigmentisolation aus Erbse	44
2.4.1.1	<i>Herstellung von Totalpigmentextrakt</i>	44
2.4.1.2	<i>Trennung von Chlorophyllen und Xanthophyllen mit 1,4 - Dioxan</i>	45
2.4.1.3	<i>Trennung der Chlorophylle mittels präparativer HPLC</i>	46
2.4.1.4	<i>Aufreinigung und Trennung der Xanthophylle</i>	47
2.4.2	Charakterisierung und Quantifizierung der isolierten Pigmente	49
2.4.2.1	<i>UV - Vis Spektroskopie</i>	49
2.4.2.2	<i>Pigmentanalyse mittels analytischer HPLC</i>	49
2.4.3	Entfernen von Lipiden aus Pigmentgemischen	50
2.5	Spektroskopische Methoden	51
2.5.1	CD - Spektroskopie	51
2.5.2	Fluoreszenzspektroskopie	52
2.6	Spezielle Methoden im Rahmen der Phospholipid - Bindungsstudie	52
2.6.1	Rekonstitution von LHCII mit Überschuss an PG	52
2.6.2	Immobilisierung und stringentes Waschen von LHCII	53
2.6.3	Bio - Beads - Behandlung von aufgereinigtem LHCII	53
2.6.4	Lipidextraktion nach Bligh und Dyer	54
2.6.5	Reinigung von Lipidextrakten	55
2.6.6	Dünnschichtchromatographie	56
2.6.6.1	<i>Verwendung von DPH - Farbstoff</i>	57
2.6.7	Densitometrische Auswertung von Dünnschichten	57
2.6.8	Photometrische Quantifizierung von Phosphatidylglyzerin	58
2.6.8.1	<i>Reinigungsprozedur der verwendeten Gläschen</i>	58
2.6.8.2	<i>„Nasse Veraschung“ von phospholipidhaltigen Proben</i>	59
2.6.8.3	<i>„Methode K“ von Stephanie Boggasch</i>	59
2.6.8.4	<i>Photometrischer PG - Nachweis nach Dr. Beutelmann</i>	60
2.6.8.5	<i>Herstellung einer Nullkontrolle für den Phospholipidnachweis</i>	60
2.6.9	Immunologischer Phospholipid - Nachweis mit einem spezifischen PG - Antikörper	64
2.6.10	Gaschromatographie	66
2.6.11	Berechnung des molaren PG zu Protein - Verhältnisses	68
2.7	Spezielle Methoden im Rahmen der ESR - Messungen	68
2.7.1	Markierung von LHCP mit SH - reaktivem TEMPO - Label	68
2.7.2	Fällung von Protein	69
2.7.3	Aufkonzentrierung von LHCII	70
2.7.4	ESR - Messungen und mathematische Auswertung	71
2.7.5	Modellierung neuer LHCII - Modelle	72

3	Ergebnisse	73
3.1	Phospholipidbindung an rekombinantem LHCII:	
	Vergleich von Trimerisierungsmotiv - Mutanten und Wildtyp	73
3.1.1	Ergebnisse der molekularbiologischen Arbeiten	73
3.1.1.1	<i>Konstruktion der Mutante R21Qh</i>	74
3.1.1.2	<i>Herstellung der Mutante ΔN22h</i>	76
3.1.2	Überblick über die verwendeten Nachweismethoden	77
3.1.3	Phospholipidnachweis mittels Dünnschichtchromatographie	79
3.1.3.1	<i>Die Wahl des richtigen Laufmittels</i>	79
3.1.3.2	<i>Welches Minimum an PG ist noch auf Dünnschichten als Molybdän - blau nachweisbar?</i>	80
3.1.3.3	<i>Wie oft muss mit Detergens gewaschen werden, um nicht stringent gebundenes Lipid von immobilisiertem LHCII zu entfernen?</i>	80
3.1.3.4	<i>Der Einsatz von Bio - Beads SM-2 - Ein Ausweg?</i>	82
3.1.3.5	<i>Versuche mit DPH - Farbstoff</i>	84
3.1.3.6	<i>Reinigung von Ni - Säuleneluat per Kieselsäure - Säule</i>	85
3.1.3.7	<i>Vergleichender Lipidnachweis mittels Dünnschichtchromatographie und Auswertung mit Raytest AIDA</i>	88
3.1.3.8	<i>Modifizierter Lipidnachweis auf Dünnschichtchromatogrammen und Bio-Rad Versa - Doc - Auswertung</i>	93
3.1.4	Vergleichender photometrischer Phospholipidnachweis von LHCII - Wildtyp und Trimerisierungsmotiv - Mutanten	97
3.1.4.1	<i>Vergleichender photometrischer Phospholipidnachweis mit der "Methode K"</i>	97
3.1.4.2	<i>Vergleichender photometrischer Phospholipidnachweis nach einer modifizierten Methode</i>	100
3.1.5	Vergleichender Phospholipidnachweis mittels eines spezifischen PG - Antikörpers	107
3.1.6	Vergleichender Phospholipidnachweis per Gaschromatographie	111
3.2	Distanzmessungen an rekombinantem LHCII mittels Elektronenspin - Resonanz - Spektroskopie	116
3.2.1	Konstruktion von fünf LHCII - Doppelmutante	116
3.2.2	Markierung von LHCII - Doppelmutanten mit TEMPO - Label	119
3.2.3	Effekte der Probenaufkonzentrierung von TEMPO - markiertem LHCII - Komplexen vor der ESR - Messung	120
3.2.4	Ergebnisse der ESR - Distanzmessungen mit rekonstituiertem LHCII	122
3.2.4.1	<i>ESR - Messungen von monomerem LHCII</i>	122
3.2.4.1.1	<i>Ergebnisse für die Mutante S3C,S160Ch</i>	123
3.2.4.1.2	<i>Ergebnisse für die Mutante S106C,S160Ch</i>	126
3.2.4.1.3	<i>Ergebnisse für die Mutante S52C,S160Ch</i>	128
3.2.4.1.4	<i>Ergebnisse für die Mutante S3C,S52Ch</i>	130
3.2.4.1.5	<i>Ergebnisse für die Mutante S3C,S106C</i>	131
3.2.4.1.6	<i>Ergebnisse für die Mutante S106C,V229C</i>	133
3.2.4.2	<i>ESR - Messungen von speziell rekonstituiertem bzw. behandeltem monomerem LHCII</i>	136
3.2.4.2.1	<i>Einfluss von Licht auf die Konformation des N - Terminus</i>	136
3.2.4.2.2	<i>Einfluss verschiedener Carotinoide auf die Konformation des LHCII</i>	138
3.2.4.2.2	<i>Einfluss verschiedener Lipide auf die Konformation des LHCII</i>	142
3.2.4.3	<i>ESR - Messungen an trimerem LHCII</i>	146
3.2.4.3.1	<i>Messungen von LHCII - Trimeren der Mutante S3Ch</i>	146
3.2.4.3.2	<i>Messungen von LHCII - Trimeren der Mutante S160Ch</i>	148
3.2.4.4	<i>Modellierung der N - terminalen Region des LHCII</i>	150

4	Diskussion	156
4.1	Diskussion der vergleichenden Bindungsstudie für das Lipid Phosphatidylglycerin an rekombinatem LHCII	156
4.1.1	Vergleichender Phospholipidnachweis mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie	156
4.1.1.1	<i>Bemerkungen zu den durchgeführten Vorversuchen</i>	156
4.1.1.2	<i>Die Färbung von Dünnschichtchromatogrammen mit Molybdän</i>	157
4.1.1.3	<i>Gerätespezifische Aspekte der densitometrischen Auswertung</i>	158
4.1.1.4	<i>Die Ergebnisse der beiden vergleichenden Analysen</i>	159
4.1.2	Deutung der Ergebnisse der vergleichenden Phospholipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie und AIDA - Auswertung	161
4.1.3	Vergleichender Phospholipidnachweis mit Hilfe einer photometrischen Nachweismethode	162
4.1.4	Vergleichende Analysen der Phospholipidbindung mittels Antikörper und Gaschromatographie	161
4.1.5	Zusammenfassung unter Berücksichtigung der aktuellen Kristallstruktur nach Liu <i>et al.</i> (2004)	166
4.2	Diskussion der durchgeführten ESR - Distanzmessungen an LHCII	168
4.2.1	Elektronenspin - Resonanz - Spektroskopie: Eine neue Möglichkeit zur Konformationsanalyse des LHCII	168
4.2.1.1	<i>Grenzen der ESR - Spektroskopie in Zusammenhang mit der Analyse von rekombinatem LHCII</i>	168
4.2.1.2	<i>Vorteile der ESR - Spektroskopie</i>	174
4.2.2	Die Konformation des Aminoterminus der LHCII	175
4.2.3	Der Einfluss von Carotinoiden auf die Konformation des LHCII	182
5	Zusammenfassung und Ausblick	186
6	Literaturverzeichnis	188
7	Anhang	200
7.1	Abkürzungsverzeichnis	200
7.2	Sequenzen der verschiedenen hergestellten LHCII - Mutanten	202
7.2.1	C3.2h (LHCII - Wildtyp mit C - terminalem His ₆ - Tag)	202
7.2.2	R21Qh	204
7.2.3	ΔN22h	204
7.2.4	S3C,S160Ch	204
7.2.5	S106C,S160Ch	204
7.2.6	S52C,S160Ch	204
7.2.7	S3C,S52Ch	205
7.2.8	S3C,S160C	205

1 Einleitung

Als die Erde vor etwa 4,6 Milliarden Jahren entstand, war die frühe Atmosphäre unseres Planeten reich an Kohlendioxid. Gasförmiger Sauerstoff war nicht vorhanden. Dies änderte sich vor ca. 3 Milliarden Jahren mit der Entwicklung der oxygenen Photosynthese. Innerhalb von 500 Millionen Jahren stieg der Sauerstoffanteil der Atmosphäre auf das heutige Niveau von etwa 20 Prozent an. Seitdem nutzen Pflanzen die Sonneneinstrahlung als optimale regenerative Energiequelle zur Synthese organischer Verbindungen. Der für uns so lebensnotwendige Sauerstoff entsteht dabei als Nebenprodukt. Ohne diesen fundamentalen Prozess wäre höheres Leben auf der Erde unmöglich. Ein Blick aus dem Weltraum auf unseren Planeten verdeutlicht den globalen Erfolg dieses Konzeptes.

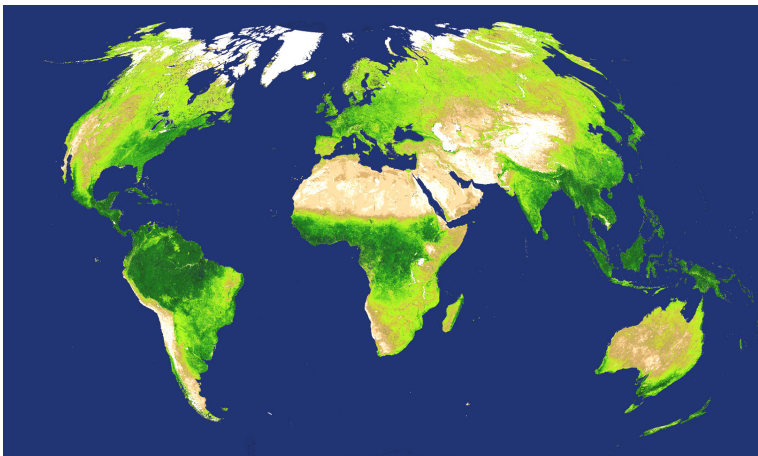


Abb. 1:

Ansicht der ergrüneten globalen Landmasse unserer Erde, generiert mit Hilfe von Aufnahmen der Space Shuttle Radar Topography Mission (SRTM) des Jahres 2000. (Quelle: [http:// photojournal.jpl.nasa.gov](http://photojournal.jpl.nasa.gov))

Die lichtabhängigen Reaktionen der Photosynthese finden bei Eukaryoten in den Chloroplasten statt, besser gesagt an der Thylakoidmembran dieser Organellen. Dort befinden sich die Pigment - Protein - Komplexe des Photosyntheseapparates mit den akzessorischen Pigmenten, welche die ankommenden Photonen des eingestrahnten Sonnenlichts absorbieren und die so gewonnene Energie über viele Komponenten innerhalb des Photosyntheseapparates weiterleiten, bis sie schließlich zum Aufbau von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH_2 und Energie, gespeichert als ATP, benutzt wird.

1.1 Die Thylakoidmembran

Die Thylakoidmembran höherer Pflanzen kann als eine Funktionsmembran aufgefasst werden, die einen hohen Faltungsgrad und eine stark ausgeprägte laterale Heterogenität aufweist. In ihr befinden sich die vier Hauptkomplexe des Photosyntheseapparats, an denen die photochemischen Primärprozesse ablaufen: die beiden Photosysteme I und II, der Cytochrom b_6/f - und der CF_0/CF_1 - Komplex mit der ATP-Synthetase (Murphy 1986; Chitnis und Thornber, 1988). Zunächst lässt sich diese Membran in Stroma- und Grana - Bereiche aufgliedern. Die Granabereiche zeichnen sich dabei durch eine verstärkte, „geldrollenartige“ Membranstapelung auf. Auffällig ist zudem, dass die vier Hauptkomplexe des Photosyntheseapparates nicht gleichmäßig über alle Bereiche der Membran verteilt sind, sondern sich in bestimmten Regionen konzentrieren.

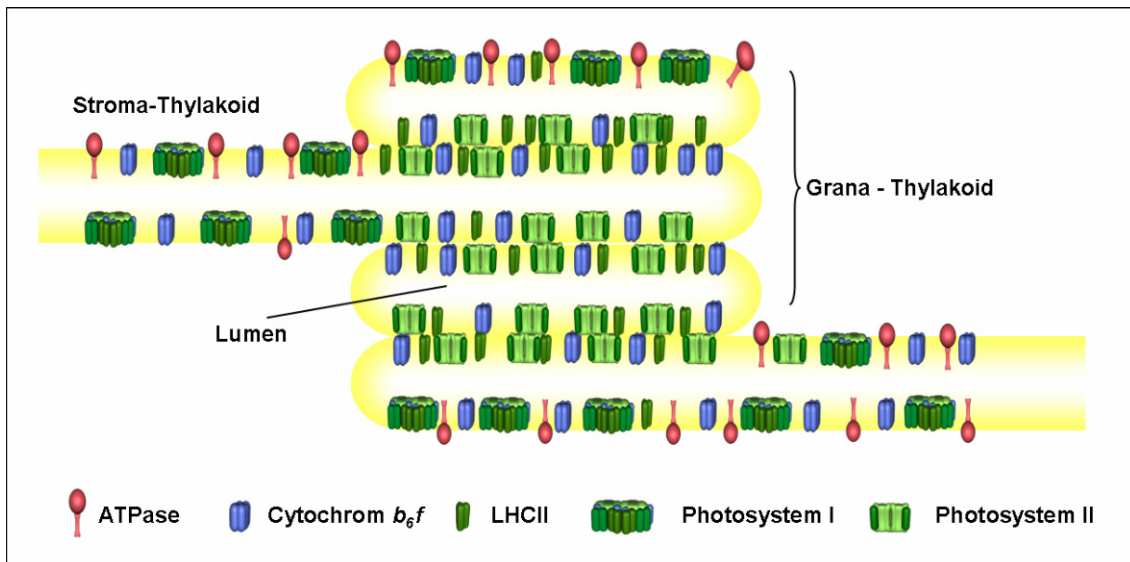


Abb. 2: Unterschiedliche Verteilung der verschiedenen Hauptkomplexe des Photosyntheseapparates in der Thylakoidmembran. Das Photosystem II mit seinen Lichtsammelantennen (LHCII) befindet sich hauptsächlich im Bereich der Grana - Thylakoide (nach Allen und Forsberg 2001, verändert).

In den Kernbereichen der Grana findet man überwiegend das Photosystem II mit seinen äußeren Lichtsammelantennen, den LHCII - Komplexen (*Light - harvesting - complex II*) angeordnet, in den stromalen Bereichen hingegen das Photosystem I und die ATP - Synthetase (Allen und Forsberg 2001).

In dieser Einführung soll im Folgenden lediglich auf das Photosystem II und seine Bestandteile eingegangen werden. Das Photosystem II und seine Lichtsammelantennen werden von vielen Autoren auch als Photosystem II - Superkomplex bezeichnet. Dieser Superkomplex konnte als Dimer, bestehend aus zwei spiegelsymmetrischen Untereinheiten, isoliert werden und besteht aus dem so genannten Kern - Komplex (*core - complex*) mit den D1- und D2 - Proteinen des Reaktionszentrums, den Kern - Antennen CP47 und CP43 und den minoren Antennen CP26 und CP29. An diesen Komplex ist der Wasserspaltende Komplex mit seinem Mangan - Cluster assoziiert, der für die Entstehung des Sauerstoffs während der Photosynthese verantwortlich ist. Dem Kern - Komplex aufgelagert findet man die peripheren oder auch majoren Antennen des Photosystems II, die oben bereits angesprochenen LHCII - Komplexe (vgl. Boekema *et al.* 1995; Barber 1998; Nield *et al.* 2000). Des Weiteren sind an den Kern - Komplex noch andere kleinere Proteine gebunden, denen an dieser Stelle aber keine weitere Beachtung geschenkt werden soll.

Bevor der in dieser Arbeit untersuchte LHCII näher beschrieben werden soll, zunächst einige Angaben zur Thylakoid - Membran.

Die Lipide dieser Membran weisen im Vergleich zu anderen bekannten Membransystemen einige Besonderheiten auf. Man findet überwiegend polare Glykolipide und Phospholipide. Sterole und Sphingolipide, wie sie zum Beispiel in der Plasmamembran oder dem Endoplasmatischen Retikulum vorkommen, sind kaum vorhanden (Murata und Siegenthaler 1998). Diese Lipidzusammensetzung kann dabei unter anderem mit Hilfe der Anzuchtstemperatur beeinflusst werden (Trémolières *et al.* 1981; Murata und Siegenthaler 1998).

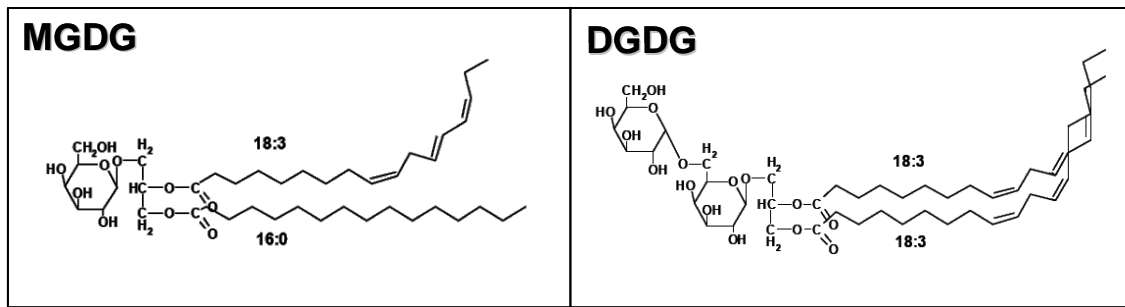


Abb. 3: Strukturen der beiden Glykolipide MGDG und DGDG (vgl. Joyard *et al.* 1998).

Die Galaktolipide MGDG (Monogalactosyl-Diacyl-Glycerin) und DGDG (Digalactosyl-Diacyl-Glycerin) sind mit etwa 50% bzw. 30% die häufigsten in der Thylakoidmembran vorkommenden Lipide. Beide kommen dabei recht ungleichmäßig verteilt in der Membran vor. So findet man etwa bei Spinat eine prozentuale Verteilung des MGDG von 34% in den stromalen und 18% in den luminalen Monolayern der Doppelmembran (bezogen auf den Gesamtanteil von 50%). DGDG weist eine ähnliche transversale Heterogenität auf. Hier findet man 26% (des Gesamtanteils von ca. 30%) in den luminalen Monolayern, während lediglich 5% in den stromalen Lipidschichten zu finden sind (Siegenthaler 1998).

Neben diesen beiden Lipiden konnten SL (Sulfochinovosyl-Diacyl-Glycerin) und das Phospholipid PG (Phosphatidylglycerin) zu jeweils 5 - 12% in der Thylakoidmembran nachgewiesen werden (Joyard *et al.* 1998). PG findet man dabei zu 8% seines Gesamtanteils in den stromalen Monolayern der Membranen.

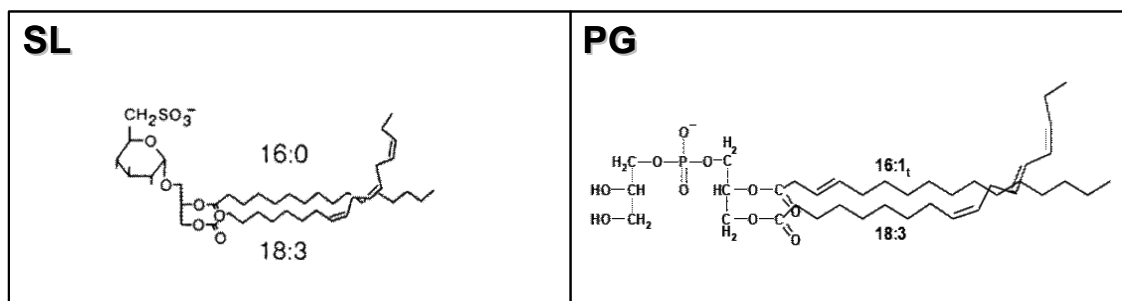


Abb. 4: Strukturen der beiden Lipide SL und PG (vgl. Joyard *et al.* 1998).

Die Fettsäuren der in der Thylakoidmembran vorkommenden Lipide sind zum größten Teil ungesättigt. Neben Linolensäure mit einer Kettenlänge von 18 Kohlenstoffatomen (18:3, dreifach ungesättigt) findet man ebenfalls Palmitinsäure (16:0), Linolsäure (18:2) und Hexadecatriensäure (16:3). Auffällig ist zudem das Auftreten einer weiteren ungewöhnlichen Fettsäure, der Δ -3-trans-Hexadecensäure (16:1_t). Diese Fettsäure, die eine trans-Doppelbindung am dritten Kohlenstoffatom aufweist (siehe Abbildung), findet man als typische Komponente des Phospholipids PG (vgl. Trémolières *et al.* 1981; Joyard *et al.* 1998). Solches PG ist besonders mit den peripheren Antennenkomplexen des PSII, dem LHCII assoziiert. Auf dieses Phänomen im Zusammenhang mit dem LHCII soll später noch näher eingegangen werden.

Lipide dienen in der Thylakoidmembran nicht nur als reine Matrix für die in ihr enthaltenen Pigment- und Proteinstrukturen (Siegenthaler 1998). Dazu wäre eine solche Diversität an verschiedenen Spezies, wie sie in der Membran zu beobachten ist, auch nicht notwendig (Dumas *et al.* 1999). Es ist eher davon auszugehen, dass der Grund für diese hohe Diversität in mannigfaltigen Interaktionen der Proteine mit den Lipiden selbst liegt. Eventuell findet dadurch sogar eine Beeinflussung der Prozesse der Photosynthese statt (Siegenthaler und Trémolières 1998). Solche Lipidinteraktionen werden in der Literatur mehrfach beschrieben. Zum Beispiel konnten Kruse *et al.* 2000 zeigen, dass das Phospholipid PG an der Dimerisierung des PSII beteiligt ist. Zudem scheint PG für die Aktivität des PSII an sich verantwortlich zu sein. Versuche mit einer *Synechocystis* - Mutante, der ein Schlüsselenzym der PG - Synthese fehlt, zeigten, dass es dadurch zu einer deutlichen Reduzierung der Aktivität des PSII im Vergleich zum Wildtyp kommt (Hagio *et al.* 2000). Aber auch Interaktionen mit Galaktolipiden wurden beschrieben. Der bereits angesprochene LHCII höherer Pflanzen lässt sich ohne DGDG nicht kristallisieren (Nußberger *et al.* 1993). DGDG dient in diesem Zusammenhang offenbar als Helfer bei der Ausbildung von höher geordneten Strukturen aus vielen einzelnen Molekülen und bindet dazu vermutlich peripher an LHCII. Zudem zeigten Isolationen von PSII - Kernkomplexen, sowie solchen von CP24, CP26 und CP29, dass DGDG auch sehr eng an diese Pigment - Protein - Komplexe assoziiert sein muss und ebenfalls am Zusammenhalt des Strukturgefüges beteiligt sein könnte. MGDG scheint hingegen eng an CP43 und CP47 assoziiert zu sein (Trémolières *et al.* 1994). Während dieser Arbeit sollte die spezielle Interaktion des Phospholipids Phosphatidylglyzerin mit dem LHCII näher untersucht werden. Im Anschluss an eine allgemeine Beschreibung dieses Pigment - Protein - Komplexes soll darauf näher eingegangen werden.

1.2 Der LHCII - Hauptlichtsammelkomplex des Photosystems II

Der LHCII ist wohl das am häufigsten vorkommende Membranprotein auf der Erde. Dieser Pigment - Protein - Komplex macht etwa ein Drittel des Gesamtproteins der Thylakoidmembran aus und bindet ca. 50% des in Pflanzen vorkommenden Chlorophylls. Durch diese Lichtsammelantenne, deren Aufgabe es ist, die einfallende Lichtenergie gerichtet zum Kernkomplex des PSII zu leiten, erhöht sich die Quantenausbeute des Photosystems II um den Faktor 100. In seiner nativen Umgebung findet man den LHCII als Trimer, bestehend aus drei Monomer - Untereinheiten. Es handelt sich dabei prinzipiell um kerncodierte Proteine, die in der Literatur als Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 bezeichnet werden (vgl. Jansson 1994). Diese drei Apoproteine besitzen einander vergleichbare Molekulargewichte von 24 bis 29 kDa und kommen etwa im Verhältnis 9 zu 3 zu 1 in der Membran vor (Jansson 1994). Es wurden dabei sowohl Mono- als auch Heterotrimer beschrieben (Jansson 1994; Jackowski *et al.* 2001). Alle drei Proteine sind sehr ähnlich und weisen Sequenzhomologien von etwa 85% (Lhcb1 und Lhcb2) bzw. 70% (Lhcb3) auf (Pichersky und Jansson 1996). Neben der trimeren Form des LHCII wurde auch die monomere Form des Komplexes in ergrünenden Pflanzen gefunden (Dreyfuss und Thornber 1994). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass dieses LHCII - Monomer eine intermediäre Form des Prozesses der Oligomerisierung darstellt. Seine Untersuchung erlaubt somit auch spätere Rückschlüsse auf das LHCII - Trimer.

1.2.1 Die dreidimensionale Struktur des LHCII

Seit 1994 ist die räumliche Struktur des LHCII weitgehend bekannt. So konnte damals mit Hilfe von elektronenkristallographischen Untersuchungen (Kühlbrandt *et al.* 1994) bei 3.4 Å bereits etwa 80% der Struktur dieses Pigment - Protein - Komplexes der Erbse aufgelöst werden. Aktuelle Untersuchungen von Liu *et al.* (2004) bei 2.72 Å mit Spinat - LHCII offenbaren sogar 94% der Struktur.

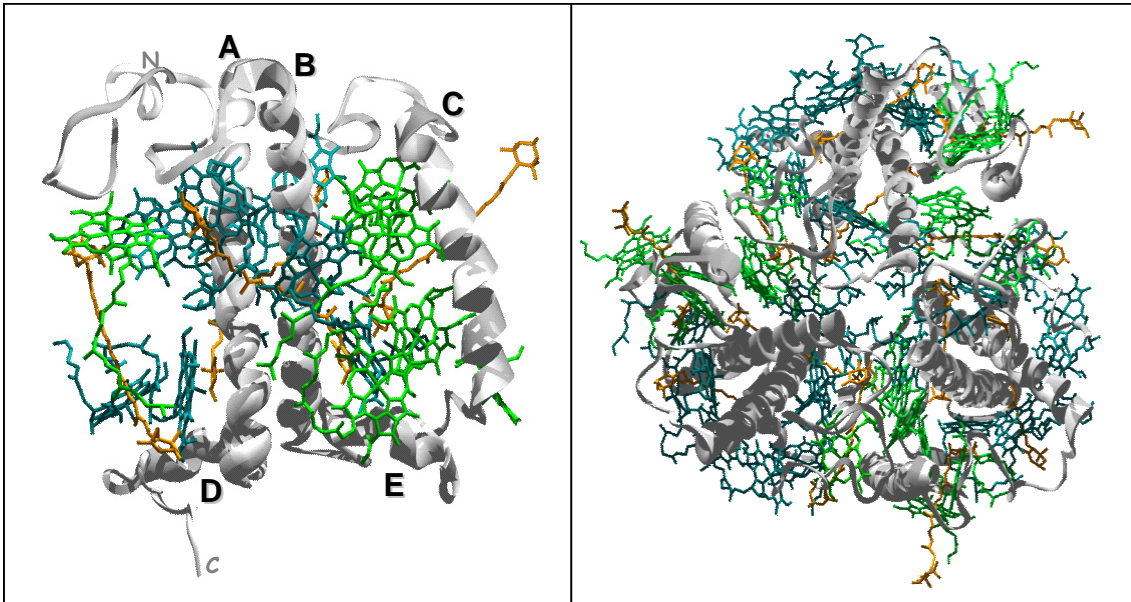


Abb. 5: Dreidimensionale Modelle des LHCII nach Liu *et al.* (2004) bei einer Auflösung von 2.72 Å. **Links:** Darstellung eines LHCII - Monomers. Die Illustration der komplexgebundenen Pigmente wurde wie folgt vorgenommen: Lutein, Neoxanthin und Violaxanthin = orange; Chl *b* = hellgrün; Chl *a* = blaugrün. Die drei transmembranen Helices wurden gemäß Kühlbrandt 1994 mit A bis C benannt. Des Weiteren wurden beide luminalen Helices D und E und die Termini des Apoproteins im Modell eingetragen. **Rechts:** Aufsicht auf ein LHCII - Trimer, bestehend aus drei monomeren Untereinheiten.

Der Pigment - Protein - Komplex weist in seiner monomeren Form eine Länge von 232 Aminosäuren auf. Neben drei transmembranen Helices (A bis C), einer luminalen Helix E und einer weiteren kurzen Helix D mit amphipathischem Charakter in der Nähe des C - Terminus des Apoproteins konnte gezeigt werden, dass dieser Komplex neben zwei zentralen Lutein - Molekülen, je ein Neoxanthin, ein Violaxanthin¹ und 14 Chlorophylle binden kann. Zwei der drei transmembranen Helices, Helix A und B, kreuzen sich dabei charakteristisch in der Mitte der Struktur in einem Winkel von 32°. Helix C steht senkrecht zur gedachten Membranebene. Des Weiteren konnten die Längen der drei transmembranen Helices mit 5,1 nm (A), 3,1 nm (B) und 2,9 nm (C) recht exakt angegeben werden (Kühlbrandt 1994). Der Aminoterminus des Proteins konnte hingegen nicht näher bestimmt werden. Diese Region wurde in der Struktur von Liu *et al.* erst ab Aminosäure 14 angegeben. Der Grund für die fehlende kristallographische Auflösung dieser Proteinbereiche könnte unter anderem in ihrer konformativen Flexibilität liegen, auf die später bezüglich des Aminoterminus noch eingegangen werden soll.

¹ In der Arbeit von Liu *et al.* auch als Xanthophyll - Zyklus - Carotinoid bezeichnet.

1.2.2 Pigmentbindung des LHCII

1.2.2.1 Chlorophylle

Wie bereits beschrieben, ist der LHCII in der Lage, 14 Chlorophylle zu binden. Diese Bindung erfolgt teils über die Koordination des zentralen Mg der Tetrapyrrolringe der Chlorophylle an geladene Aminosäurereste, teils über Carbonylgruppen der Hauptkette im Inneren des Komplexes (vgl. Peter und Thornber, 1988). Zudem existieren Bindungen über Wassermoleküle und die Phosphodiester - Gruppe des komplexgebundenen Phospholipids (Liu *et al.* 2004). Mit Hilfe der Auflösung von 2.72 Å kann heute eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Pigmente vorgenommen werden. Dadurch werden viele spektroskopische Daten bezüglich der Lage und des Typs der einzelnen Pigmente, die früher in der Literatur bereits angegeben wurden, bestätigt (Yang *et al.* 1999 bzw. Hobe *et al.* 2003). Neben 6 eher peripher angeordneten Chlorophyll *b* - Molekülen können so 8 mehr oder minder zentral angeordnete Chlorophyll *a* - Moleküle benannt werden. Gemischte Bindestellen können nicht beobachtet werden (Liu *et al.* 2004).

Interessant ist zudem, dass diese Pigmente in Bezug auf ihre Abstände zueinander bzw. ihre Lage (Bindungswinkel) am Proteingrundgerüst so optimal angeordnet sind, dass eine praktisch verlustfreie, strahlungslose Energieweiterleitung innerhalb des Komplexes erfolgen kann (Excitonen - Transfer). Aufgrund der Energieniveaus der beiden beteiligten Pigmente erfolgt eine Energieübertragung dabei immer zwischen zwei Chl *a* - Molekülen. Endabnehmer der auf diese Art und Weise gerichtet weitergeleiteten Energie ist schließlich das so genannte *special pair* des PSII - Kern - Komplexes mit zwei Chlorophyll *a* - Molekülen. Dort findet eine Ladungstrennung statt, bei der ein energetisch angehobenes Elektron in eine Elektronentransportkette eingespeist und letztendlich zum Aufbau von Reduktionsäquivalenten und Energie benutzt wird.

1.2.2.2 Carotinoide

Neben vierzehn Chlorophyllen sind mehrere Carotinoide an den LHCII assoziiert. Zusätzlich zu den beiden bereits angesprochenen Lutein - Molekülen im Zentrum des Komplexes bindet der LHCII ein Neoxanthin, sowie Violaxanthin (Ruban *et al.* 1999; Liu *et al.* 2004). Für alle diese Pigmente existieren dabei wohl definierte Bindestellen, die analog zu den verschiedenen oben angesprochenen Chlorophyll - Bindestellen oft eine hohe Affinität für nur eines der am LHCII assoziierten Carotinoide besitzen. So zeigen die beiden zentralen Bindestellen (auch L1 und L2 genannt) eine sehr hohe Affinität für Lutein. Lediglich Zeaxanthin kann mit ähnlich hoher Stringenz an diese Bindestellen assoziiert werden. Violaxanthin und Neoxanthin zeigten in eigenen Konkurrenzexperimenten mit rekombinantem LHCII (Bender 2000 [Diplomarbeit]) eine deutlich schwächere Neigung, hier zu binden. So ist Violaxanthin offensichtlich in der Lage, in beide Bindestellen zu inserieren, wenn es als einziges Carotinoid angeboten wird (Jahns *et al.* 2001). Neoxanthin kann dagegen nicht stabil in die L1 - Bindestelle gebunden werden (Croce *et al.* 1999 b).

Den beiden Lutein - Bindestellen am LHCII werden zudem unterschiedliche Funktionen zugeschrieben. Für die L1 - Bindestelle kann angenommen werden, dass sie starken Einfluss auf die Stabilität des LHCII hat. Hingegen wird für die L2 - Bindestelle postuliert, dass dort im Rahmen des weiter unten angeführten Xanthophyll - Zyklus Lutein auch durch Violaxanthin ersetzt werden kann (Bassi und Caffari 2000).

Für das Pigment Neoxanthin existiert eine eigene, exklusive Bindestelle (N1). Die Lage dieser Bindestelle konnte bereits 1999 mit Hilfe von Mutationsanalysen durch Croce *et al.* (1999 a) näher beschrieben werden und wurde durch die Kristallstruktur von Liu *et al.* in ihrer prinzipiellen Lage bestätigt. Sie liegt in der Nähe der Helix C und dem Helixkreuz zwischen Helix A und B. Weder Lutein noch Zeaxanthin können hier gebunden werden. Violaxanthin zeigt ebenfalls nur eine geringe Affinität für diese Bindestelle (vgl. Bender 2000 [Diplomarbeit]; Hobe *et al.* 2000). Die Exklusivität der Neoxanthin - Bindestelle beruht wahrscheinlich auf der unterschiedlichen Konformation dieses Pigments im Vergleich zu allen anderen komplexgebundenen Carotinoiden. Nur Neoxanthin kommt nativ im Chloroplasten ausschließlich als 9' cis - Isomer vor (Schwartz *et al.* 1997; Takaichi und Mimuro 1998). Alle anderen Carotinoide bevorzugen die all - trans - Konformation. Neuere Versuche mit 9' cis - Violaxanthin, welches offensichtlich ebenfalls fähig ist, in die N1 - Bindestelle zu inserieren, bestätigen diese Vermutung (Snyder *et al.* 2004).

Das Pigment Violaxanthin bindet im Gegensatz zu den eben genannten Pigmenten Lutein und Neoxanthin in der Nähe des Aminoterminus an den LHCII. Auch hier wurde eine eigene Bindestelle für dieses Carotinoid (V1) bereits früher vermutet (Ruban *et al.* 1999; Caffari *et al.* 2001), und konnte 2004 mit Hilfe der kristallographischen Auflösung bei 2.72 Å klar gezeigt werden. Sie gilt als Reservoir für zusätzliche Carotinoide und steht in engem Zusammenhang mit der Reaktion des Komplexes auf extreme Lichtbedingungen (Bassi und Caffari 2000; Caffari *et al.* 2001) im Rahmen des Xanthophyll - Zyklus (Bilger *et al.* 1993 bzw. Olson *et al.* 1995).

Die Funktion der an LHCII - gebundenen Carotinoide ist ebenso vielfältig wie die Art der komplexgebundenen Spezies. Einerseits tragen diese Pigmente, wie für die beiden zentralen Lutein - Moleküle beschrieben, zur Stabilisierung des gesamten Komplexes bei (vgl. Plumley und Schmidt 1987). Andererseits wird durch sie die so genannte „Grünlücke“ der Chlorophylle geschlossen, d.h. dass diese Carotinoide genau in einem Bereich Lichtenergie absorbieren und in das System einspeisen können (+/- 500 nm), in dem Chlorophylle dazu nicht in der Lage sind (Heldt, 1996; Liu *et al.* 2004). Eine dritte wichtige Funktion dieser Pigmente liegt in ihrer Fähigkeit, einen effektiven Schutz des Komplexes vor Photooxidation zu gewährleisten. Neben dem oben bereits angesprochenen Xanthophyll - Zyklus sind Carotinoide in der Lage, die Triplett - Anregung von Chlorophyll als Folge von Starklicht - Einstrahlung zu löschen und so die Entstehung von sehr reaktivem Singulett - Sauerstoff zu verhindern (Young und Frank 1996). Es wird diesbezüglich vermutet, dass während der Evolution zunächst die Lichtsammelfunktion der Carotinoide in der frühen anaeroben Atmosphäre entstand und erst später die Schutzfunktion essentiell für die aerobe Photosynthese in allen Organismen wurde (Siefertmann - Harms, 1985).

1.2.3 Die *in vitro* - Rekonstitution des LHCII

Seit den Arbeiten von Plumley und Schmidt (1987) und Paulsen *et al.* (1990) ist es möglich, LHCII *in vitro* aus seinen Bestandteilen, dem Apoprotein und den beteiligten Pigmenten, zu rekonstituieren. Dazu wird mit Hilfe von *E.coli* - Bakterien zunächst das Lhcb1 - Apoprotein (AB 80 Gen aus *Pisum Sativum*) mit einer Länge von 232 Aminosäuren überexprimiert. Dieses Gen wurde während früherer Arbeiten der Arbeitsgruppe in einen pDS12 - Expressionsvektor inkloniert und anschließend in kompetente *E.coli* - Stämme einligiert. Es steht so unter der Kontrolle des Lac - Operators und kann durch Zugabe des Galaktose - Analogons IPTG (Isopropylthiogalaktosid) zur Expression gebracht werden. Das Protein wird dabei in den Bakterien in Form von Einschlusskörpern (so genannten Inclusion Bodies) angereichert und kann so später leicht aus ihnen extrahiert werden. Die für die Rückfaltung des Pigment - Protein - Komplexes benötigten einzelnen Pigmente oder nativen Pigmentmischungen können aus Erbse isoliert und aufgereinigt in die *in vitro* - Rekonstitution eingesetzt werden. Während des eigentlichen Prozesses der Rekonstitution werden schließlich Detergens - solubilisiertes Apoprotein und in Ethanol gelöste Pigmente gemischt und anschließend in ein anderes Detergensmilieu überführt. Während dieses Detergens - Wechsels findet die Rückfaltung des Proteins unter Aufnahme der Pigmente statt (Einzelheiten zu dieser Methode sind dem Material und Methoden - Teil dieser Arbeit zu entnehmen).²

Durch den Einsatz von rekombinantem LHCII gegenüber nativen, aus Pflanzen isolierten Komplexen, entstehen mehrere Vorteile für die wissenschaftliche Untersuchung:

Erstens wird es so möglich, LHCII in hohen Konzentrationen verschiedenen Untersuchungen, zum Beispiel den in dieser Arbeit durchgeführten Phospholipidanalysen oder einer Elektronenspin - Resonanz - Spektroskopie zuzuführen.

Zweitens stellt die leichte Modifizierbarkeit der Aminosäure - Sequenz auf DNA - Ebene eine Möglichkeit dar, ganz gezielt Veränderungen in der Proteinstruktur in Bezug auf ihren Einfluss auf Struktur und Funktion des Lichtsammelkomplexes zu untersuchen.

Als dritter Punkt kann die Möglichkeit angeführt werden, mittels der eben genannten Veränderung der Aminosäure - Sequenz Motive in den LHCII einzuführen, die etwa dessen spätere Aufreinigung vereinfachen (z.B. Hexahistidylreste) oder ganz gezielt einzelne Aminosäureaustausche einzuführen, wie etwa singuläre Cysteine, über die eine spätere gezielte Markierung des Proteins erfolgen kann (z.B.: TEMPO - Label).

Viertens wird es durch diese *in vitro* - Rekonstitution erreichbar, gezielt andere Parameter, wie etwa die Pigmentzusammensetzung oder Lipidumgebung während der LHCII - Bildung zu verändern und so auch den Einfluss solcher Modifikationen experimentell zu erfassen.

² Alternativ zu dieser Methode ist auch eine Rekonstitution des LHCII mit Hilfe von Gefrier - Tau - Zyklen möglich. Da diese Methode aber während dieser Arbeit keine Anwendung fand, soll sie an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden (Paulsen *et al.* 1990).

Wie in vielen Experimenten gezeigt, ist dabei das Ergebnis dieser *in vitro* - Rekonstitution, also der rekombinante LHCII, in Funktion und Struktur mit seinem nativem Vorbild vergleichbar. So zeigten kristallographische Untersuchungen an rekombinanten Trimeren von Hobe *et al.* 1994 keinerlei Unterschiede in der Struktur zu nativem LHCII. Des Weiteren offenbarten Struktur - Funktions - Untersuchungen mit Hilfe von Fluoreszenz- und Circular Dichroismus - Untersuchungen (Plumley und Schmidt 1987; Paulsen *et al.* 1990 bzw. 1993), dass der rückgefaltete Lichtsammelkomplex sich auch diesbezüglich wie sein natives Vorbild verhält. Es ist somit möglich, mit Hilfe der *in vitro* - Rekonstitution Aussagen bzgl. der Struktur und Funktion des LHCII abzuleiten, die anschließend ohne Einschränkung auf den nativen LHCII übertragbar sind.

1.3 Struktur und Konformation des LHCII

Wie bereits weiter oben im Text beschrieben, konnten bislang nicht 100% des LHCII vollständig aufgelöst werden. Besonders der Aminoterminus der Struktur blieb ohne räumliche Zuordnung und konnte erst ab der Aminosäure Serin¹⁴ angegeben werden. Dies stellt ein großes Defizit dar, da gerade dieser Strukturbereich des Pigment - Protein - Komplexes von besonderer struktureller Bedeutung bei der Assemblierung der LHCII - Trimere sowie bei der Regulation der den Reaktionszentren zur Verfügung stehenden Anregungsenergie ist. Es kann postuliert werden, dass sowohl die Struktur dieser Region selbst als auch die dynamische Konformation dieses Aminoterminus Ursache für verschiedene Interaktionen des LHCII sind. Im folgenden Abschnitt soll darauf näher eingegangen werden.

1.3.1 Das Trimerisierungsmotiv des LHCII in Zusammenhang mit der Interaktion mit dem Lipid Phosphatidylglyzerin

Der LHCII liegt, wie bereits erwähnt, in seiner funktionellen Form als Trimer, gebildet aus drei Monomer - Untereinheiten vor. In Abbildung 5 wurde bereits eine Aufsicht auf ein solches Konstrukt gezeigt. Bereits dort wird deutlich, dass verschiedene Bereiche der einzelnen Monomer - Untereinheiten im Trimer recht eng benachbart angeordnet sind und es deshalb zu vermuten ist, dass dort verschiedene Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Monomeren auftreten (vgl. Liu *et al.* 2004). Wie bereits oben erwähnt, sind dabei unter anderem die N - Termini der einzelnen Monomere von besonderem Interesse.

Bereits frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass am Aminoterminus des LHCII ein kurzes Sequenzmotiv existiert, das essentiell für die Bildung von Trimeren ist (Hobe *et al.* 1995). Dieser folglich als Trimerisierungsmotiv bezeichnete Abschnitt der Aminosäurenkette beginnt mit den aromatischen Aminosäuren Tryptophan¹⁶ und Tyrosin¹⁷ und beinhaltet zudem die positive Aminosäure Arginin²¹. Seine Gesamtsequenz kann mit WYXXXR angegeben werden.

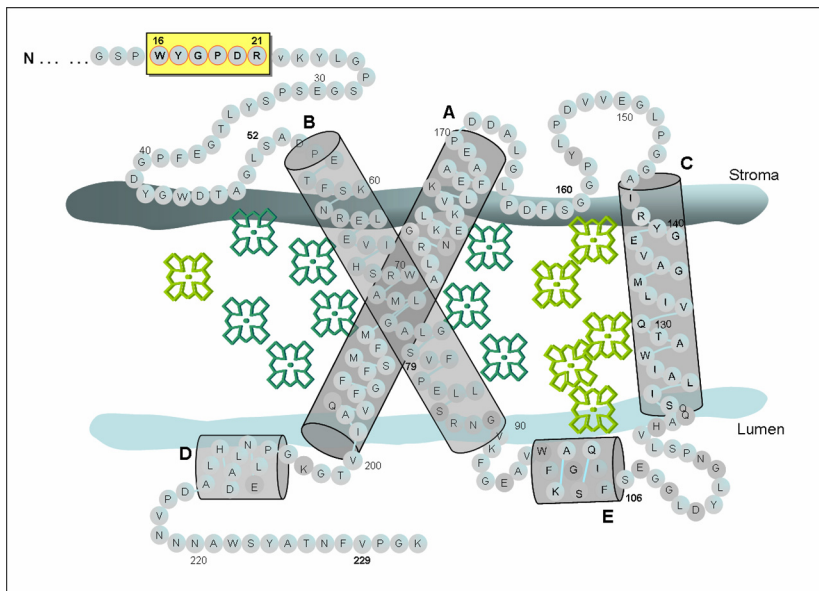


Abb. 6: Modell des LHCII unter Angabe der Aminosäuresequenz (modifiziert nach Liu *et al.* 2004). Das aminoterminale Trimerisierungsmotiv nach Hobe *et al.* 1995 wurde hervorgehoben.

Hobe *et al.* konnten 1995 zeigen, dass sowohl eine Deletion dieser Region als auch ein Aminosäureaustausch innerhalb des Trimerisierungsmotivs zum Verlust der Fähigkeit der Oligomerisierung führt. Für eine erfolgreiche Trimerisierung ist eine Deletion lediglich bis zur Aminosäure 15 zulässig. Fehlt zusätzlich das Tryptophan an Position 16, werden keine stabilen Oligomere mehr erreicht. Ein Austausch der aromatischen Aminosäuren an Position 16 und 17 beziehungsweise des positiven Arginins an Position 21 führt ebenfalls zu einem Verlust der Trimerbildung. Hingegen führt ein Austausch der nativen Aminosäure an Position 23 zu keinem solchen Effekt mehr. Diese Aminosäure liegt offenbar bereits hinter dem hier beschriebenen Motiv. Eine hypothetische Erklärung für die hier auftretenden Phänomene im Zusammenhang mit der Oligomerisierung wäre zum Beispiel, dass die beiden aromatischen Aminosäuren Tryptophan¹⁶ und Tyrosin¹⁷ hydrophobe Wechselwirkungen mit ebenfalls hydrophoben Aminosäuren benachbarter Monomer - Untereinheiten eingehen. Ebenfalls wäre denkbar, dass die positiv geladene Aminosäure Arginin²¹ mit negativ geladenen Aminosäureresten weiterer Monomere interagiert.

In der Literatur wird aber noch eine andere, interessante Möglichkeit für die Wichtigkeit dieses kurzen Sequenzabschnittes diskutiert. So besteht die Theorie, dass unter anderem über dieses Trimerisierungsmotiv eine Interaktion mit dem Phospholipid Phosphatidylglycerin vermittelt wird. Bereits an anderer Stelle dieser Einleitung wurde erwähnt, dass PG im Besonderen an den LHCII assoziiert ist. *In vivo* - Untersuchungen zeigten einen hohen Gehalt der für natives PG typischen Δ -3 - trans - Hexadecensäure (16:1_t) (Trémolières 1991). PG scheint sehr stringent an den LHCII gebunden zu sein. Bereits 1984 folgerten Remy *et al.* mit Hilfe von Versuchen mit radioaktiv markiertem PG, dass pro LHCII - Trimer etwa ein Molekül PG gefunden werden kann. Diese Angabe wurde von Gasser *et al.* 1999 anhand von immunologischen Experimenten zunächst bestätigt. Mit Hilfe der Kristallstruktur bei 2.72 Å konnten 2004 sogar drei gebundene PG pro Trimer detektiert werden. Dies bestätigt andere Ausführungen von Remy *et al.* 1982, dass für native LHCII - Trimere ein drei - bis vier mal höherer Gehalt an PG zu erwarten ist als bei Monomeren dieses Lichtsammelkomplexes.

Nußberger *et al.* (1993) zeigten, dass PG mit der Hilfe von Detergenzien nicht von isoliertem LHCII entfernt werden kann, währenddessen andere Lipide unter diesen Bedingungen vollständig abgelöst werden konnten. Erst eine Behandlung mit Phospholipase A₂ (Spaltung des PG) oder der proteolytische Verdau mit Chymotrypsin und Trypsin (Verlust der ersten 53 N - terminalen Aminosäuren) führt zu einem Verlust dieses Lipids (Remy *et al.* 1982; Krupa *et al.* 1992; Nußberger *et al.* 1993). Dabei geht gleichzeitig die Fähigkeit des Komplexes zur Ausbildung von Trimeren verloren. Flachmann und Kühlbrandt (1996) bezeichnen PG in diesem Zusammenhang als „Molekularen Kleber“ zwischen den einzelnen LHCII - Monomeren. Zumindest deuten die hier beschriebenen experimentellen Befunde auf eine direkte Wechselwirkung des PG und den Monomeren hin, bei der der N - Terminus des LHCII direkt betroffen zu sein scheint. Dieser Prozess scheint unter bestimmten Bedingungen reversibel. Führt man lipidfrei rekonstituierten LHCII - Monomeren zu einem späteren Zeitpunkt erneut PG mit Δ -3 - trans - Hexadecensäure oder auch synthetisch erzeugtes Dipalmitoyl - PG (DPPG) zu, erlangen diese wieder ihre Fähigkeit zur Trimerisierung (Hobe *et al.* 1994). Diese experimentellen Befunde unterstützten zudem die bereits früher gemachten Aussagen von Huner und Garnier (Huner 1987; Garnier 1990), die ebenfalls das Auftreten von LHCII - Trimeren in direktem Bezug zum Vorhandensein von PG mit Δ -3 - trans - Hexadecensäure stellten.

Die Kombination aller hier aufgeführten experimentellen Befunde der Literatur mit den bereits oben beschriebenen Versuchen von Hobe *et al.* in Zusammenhang mit der Charakterisierung des Trimerisierungsmotives lassen die bereits angesprochene Hypothese zu, dass es sich bei dem oben beschriebenen kurzen Sequenzmotiv WYXXXR um eine konkrete Interaktionsstelle für das Lipid PG handelt. Gerade der positiven Aminosäure Arginin²¹ wird in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle in Bezug auf eine mögliche Interaktion mit der negativen Kopfgruppe des PG zugesprochen (Flachmann und Kühlbrandt 1996). Diese Vermutung wird zudem durch NMR - Untersuchungen anhand kurzer synthetischer, zur aminoterminalen Sequenz des LHCII homologer Peptide durch Ververka *et al.* (2000) erhärtet. Der endgültige Beweis für diese Hypothesen sollte im Rahmen dieser Arbeit erbracht werden.

Durch die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur des LHCII bei 2.72 Å ergeben sich bezüglich dieser Hypothese ebenfalls neue Erkenntnisse, die zudem im Rahmen der Diskussion genannt werden sollen.

1.3.2 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Konformation des LHCII

Neben der eben beschriebenen strukturellen Bedeutung des Aminoterminus bei der Assemblierung der LHCII - Trimere in direktem Zusammenhang mit der Bindung von PG werden in der Literatur noch weitere Interaktionen des LHCII mit seiner Umgebung beschrieben. Diese setzen außer einer definierten Struktur dieses Proteinabschnitts zudem eine variable Konformation des N - Terminus des Pigment - Protein - Komplexes voraus.

1.3.2.1 Der Einfluss von Lipiden auf die Konformation

Im Zusammenhang mit dem Prozess der Grana - Stapelung (*Grana stacking*), also jenem Vorgang, der zu der „geldrollenartigen“ Übereinanderlagerung von mehreren Schichten der Thylakoidmembran im Chloroplasten führt, wird dem LHCII und insbesondere dessen Aminoterminus eine entscheidende Rolle zugesprochen (Mullet und Arntzen (1980) bzw. von Siegentahler (1991)). So konnten zum Beispiel mehrere *Chlamydomonas reinhardtii* - Mutanten beschrieben werden, die neben dem Lipid PG keine LHCII - Trimere mehr bilden konnten, was in Folge ebenfalls zu einem Verlust der Grana - Stapelung führte. Des Weiteren konnte bei isolierten LHCII - Präparationen eine Art Grana - Stapelung nachgewiesen werden. Diese Stapelung konnte durch das proteolytische Entfernen des Aminoterminus des LHCII vollständig verhindert werden (Mullet 1983).

Eine Schlüsselrolle bei diesem Prozess könnte somit die Interaktion des LHCII mit Lipiden (PG) und dadurch ausgelöst, eine spezifische Konformationsänderung des Aminoterminus dieses Komplexes spielen. Magnesium - Ionen vermitteln im Anschluss daran die eigentliche Stapelung der Membranen. Trémolières beschrieb bereits 1998 einen möglichen Mechanismus für diesen Vorgang.

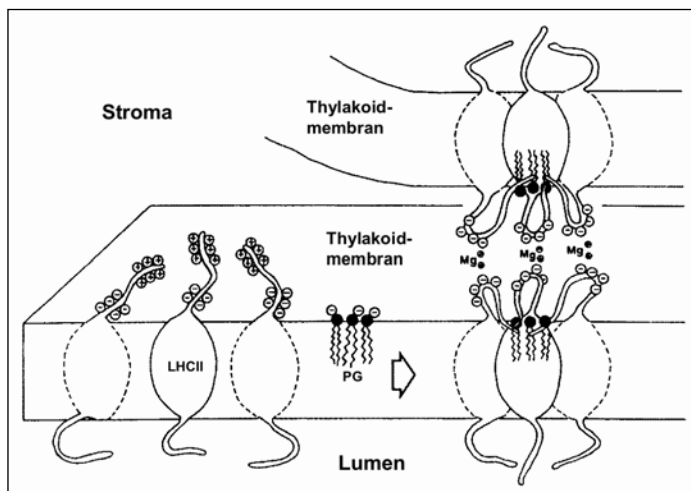


Abb. 7: Hypothetisches Schema für den Prozess der Grana - Stapelung nach Trémolières 1998 (verändert). Eine weitere Beschreibung der Vorgänge ist dem Text zu entnehmen.

Es wird hypothetisch davon ausgegangen, dass das Lipid PG nicht nur die Interaktion von drei Monomer - Untereinheiten (siehe weiter oben) im Zusammenhang mit dem Prozess der Oligomerisierung des LHCII bewirkt, sondern dabei auch eine konformative Änderung der aminoterminalen Region der Komplexe erfolgt. Dadurch soll es, so wird vermutet, zu einer Exposition von negativ geladenen Aminosäuren zwischen Aminosäure 29 und 53 kommen, durch die es im Anschluss, vermittelt durch Mg^{2+} - Ionen, zur Interaktion mit benachbarten LHCII - Komplexen kommt, welche letztlich zur Stapelung der Membranen führt. Da auch mit Hilfe der Kristallstruktur von Liu *et al.* bei 2.72 Å diesbezüglich keine neuen Erkenntnisse erzielt werden konnten, bleibt es hier allerdings bei einer hypothetischen Annahme.

Genauso konnte bislang nicht geklärt werden, warum das Lipid DGDG so wichtig für die Kristallisation des LHCII (Nußberger *et al.* 1993) ist. Mit Hilfe der aktuellen Kristallstruktur konnte zwar gezeigt werden, dass pro Monomer ein Molekül DGDG gebunden wird. Aber auch diese neue und genauere Struktur gibt keinen Aufschluss darüber, ob eine Interaktion mit DGDG, ähnlich wie bei

dem oben beschriebenen Prozess des Grana stackings vermutet, zu einer Änderung der Konformation des LHCII führt. So beschrieb Trémolières 1998 in diesem Zusammenhang, dass durch die Bindung des DGDG eine höhere Ordnung der Komplexe einhergehen könnte. Auch im Hinblick auf dieses Phänomen würde sich eine Konformationsanalyse des LHCII lohnen.

1.3.2.2 Der Einfluss verschiedener Xanthophylle

Bereits einzelne Experimente der eigenen Diplomarbeit hatten im Jahr 1999 gezeigt, dass die Rekonstitution mit einzelnen Carotinoiden (in der Diplomarbeit als Einzelxanthophyll - Experimente bezeichnet) zur Veränderungen des LHCII - Komplexes geführt hatte (siehe auch Hobe *et al.* 2000). Die Ergebnisse der nativen Gelelektrophorese, aber auch Versuche mit Proteasen ließen darauf schließen, dass sich die Konformation des gesamten Komplexes verändert haben musste. Komplexe, die ausschließlich mit Lutein bzw. Zeaxanthin erzeugt worden waren, zeigten dabei eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit auf verschiedenen schwach denaturierenden LDS - Gelen. Komplexe mit Neoxanthin, Violaxanthin und Zeaxanthin zeigten analog zur Kontrolle mit nativer Xanthophyllmischung keine solchen Auffälligkeiten.

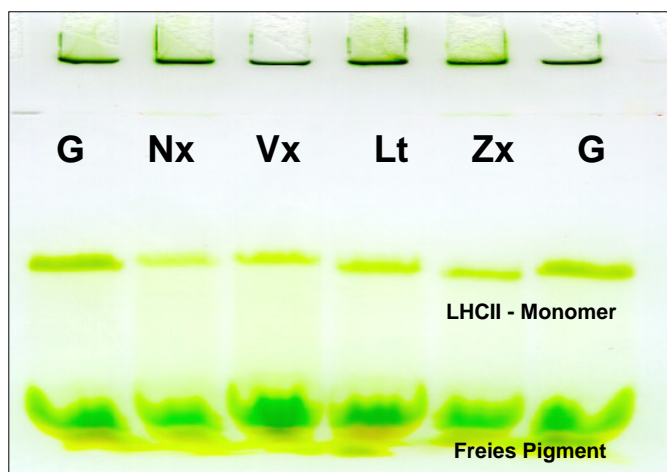


Abb. 8:

Ergebnis einer schwach denaturierenden LDS - PAGE mit so genannten Einzelxanthophyll - Komplexen: G = Gesamtxanthophyll; Nx = Neoxanthin; Vx = Violaxanthin; Lt = Lutein; Zx = Zeaxanthin. (entnommen: Bender 2000 Diplomarbeit)

Gegenüber der Protease Trypsin zeigten die Komplexe mit Lutein und Zeaxanthin keine Veränderung, Komplexe mit Neoxanthin und Violaxanthin wurden schneller verdaut als die Kontrolle mit Gesamtxanthophyll. Zudem zeigten Bestrahlungsversuche, dass die mittlere Lebensdauer dieser Komplexe deutlich niedriger lag, als bei den Komplexen mit Lutein, Zeaxanthin bzw. nativer Mischung der Xanthophylle.

Trotz des heutigen Wissens bezüglich der konkreten Bindungsstellen für die einzelnen am LHCII gebundenen Carotinoide (siehe weiter oben im Text), konnten diese Phänomene bislang nicht eindeutig geklärt werden.

Auch hier ist zu vermuten, dass es sich dabei um Veränderungen von Komplexeigenschaften aufgrund einer veränderten Konformation einzelner Bereiche des LHCII handelt. Ob dabei nur die bereits angesprochene aminotermiale Region des Pigment - Protein - Komplexes betroffen ist oder andere Bereiche der Struktur, bleibt offen. Wie schon für den Fall des Einflusses der Lipide auf den LHCII beschrieben, könnte nur eine Konformationsanalyse hier Aufschluss geben.

1.3.2.3 Einfluss von Licht auf die Konformation

Die Starklicht - Bestrahlung von Pflanzen macht es notwendig, die zur Verfügung stehende Anregungsenergie der beiden Reaktionszentren zu regulieren. Kommt es zu einem „Energiestau“ am Photosystem I, ausgelöst durch eine zu starke Anregung des PSII durch Licht einer Wellenlänge um 680 nm, ist das Photosystem II nicht mehr in der Lage, seinen Überschuss an Energie effizient an das Photosystem I abzuleiten, was zu seiner Schädigung führen kann. In solchen Fällen konnte eine Phosphorylierung des LHCII durch eine spezielle Kinase beobachtet werden. Diese Reaktion führt zu einer Umlagerung des Komplexes, weg vom PSII hin zum Photosystem I. Dort dient der LHCII dann im Sinne einer „Hilfs“ - Antenne dazu, den Überschuss an Energie schnell abzubauen (Allen und Forsberg 200; Kruse 2001). Dieser Prozess, der in der Literatur auch als *state transition* bezeichnet wird, ist voll reversibel, und wird wiederum durch eine Interaktion mit dem Aminoterminus des LHCII vermittelt. Der dabei agierenden Threonin - Kinase wird eine eigene Bindestelle an Position 5 des Aminoterminus zugeschrieben (vgl. Allen 1992).

Auch in diesem Zusammenhang vermuten einzelne Forscher eine konformative Änderung des Aminoterminus des LHCII (Zer 1999, Ohad 2001). Zwei Prozesse, die während der *state transition* durch Licht vermittelt und reguliert werden sollen, werden in diesem Kontext genannt: Erstens die Interaktion des LHCII mit der Kinase selbst (Nilsson *et al.* 1997) und zweitens die Aktivierung des Enzyms (Zer 1999). Zur Untermauerung dieser Vermutungen wurden Versuche mit Proteasen angeführt. Dabei zeigte sich, dass eine Bestrahlung mit Licht zu einer besseren Zugänglichkeit des Aminoterminus für die Protease Trypsin führte. Diese Protease, die im intakten LHCII - Monomer nur 35 Aminosäuren des N - Terminus verdaut (Paulsen *et al.* 1993), konnte nach Bestrahlung der Komplexe wesentlich effizienter an diese Komplexe angreifen. Auch diesem Prozess wird eine vollständige Reversibilität in der Dunkelheit zugeschrieben. Zudem konnten Nilsson *et al.* anhand zum LHCII sequenzhomologer synthetischer Peptide eine Zunahme der α - Helikalität in Zusammenhang mit einer Bestrahlung detektieren (vgl. Nilsson *et al.* 1997). Sie folgerten daraus eine konformative Änderung der aminoterminalen Region des LHCII in Folge von Bestrahlung mit Licht. Für rekombinanten oder nativen LHCII konnte dies bislang allerdings nicht konkret gezeigt werden.

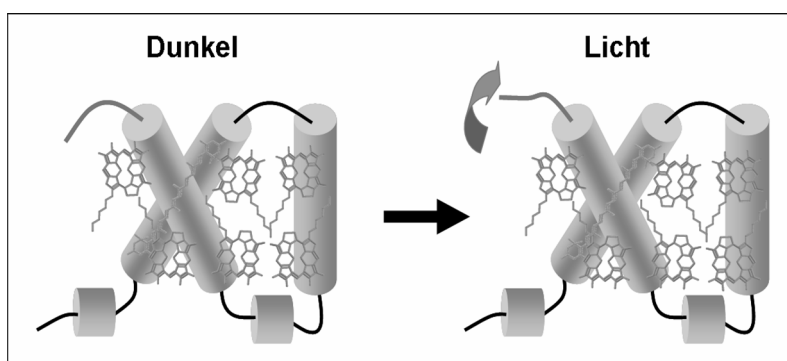


Abb. 9:

Hypothese einer aminoterminalen Konformationsänderung des LHCII durch Bestrahlung mit Licht. Nilsson *et al.* führen dies auf eine erhöhte α - Helikalität dieser Region nach Lichteinwirkung zurück.

1.4 Konformationsanalyse des LHCII mit Hilfe der Elektronenspin - Resonanz - Spektroskopie

Wie im vorherigen Kapitel angeklungen, wäre eine Konformationsanalyse des LHCII und vor allem dessen Aminoterminus von großem wissenschaftlichem Interesse. Eine solche Analyse könnte Aufschluss über die verschiedensten Interaktionen dieses Pigment - Protein - Komplexes mit seiner direkten Umgebung geben.

Bereits in der Vergangenheit wurden dazu mehrere Versuche in der eigenen Arbeitsgruppe unternommen. Mit Hilfe der Bindung von zwei Fluoreszenzfarbstoffen über zwei an verschiedenen Position des Proteins spezifisch eingefügte Cysteine sollte versucht werden, über die Messung der Effizienz der Energieübertragung zwischen beiden Farbstoffen Informationen über deren Abstand zueinander am Protein zu ermitteln. Solche Resonanz - Energie - Transfer - Messungen (RET) bzw. mit Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt auch als Fluoreszenz - Resonanz - Energie - Transfer - Messungen (FRET) bezeichnete Untersuchungen wurden in der Literatur mehrfach beschrieben (Corbalan - Garcia *et al.* 1993). Im Zusammenhang mit der Untersuchung des LHCII ergeben sich allerdings mehrere entscheidende Nachteile dieser Methode, von denen hier zwei genannt werden sollen: Zunächst handelt es sich bei der Bindung von solchen Fluoreszenzfarbstoffen, die meist recht große molekulare chemische Verbindungen darstellen, um einen recht invasiven Eingriff in die Struktur des LHCII. Es kann dabei nie völlig ausgeschlossen werden, dass diese Bindung selbst zu einer konformativen Änderung des Komplexes führt und somit die zu untersuchende Fragestellung unterminiert wird. Des Weiteren konnte in Versuchen der Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass es bislang nicht möglich war, einen geeigneten Farbstoff zu binden, der ausschließlich seine Anregungsenergie auf den zweiten (Akzeptor-) Farbstoff übertrug. Es kam immer wieder zu „Fehl“- Energieübertragungen auf die komplexgebundenen Pigmente, so dass die spätere Auswertung im Sinne einer Distanzmessung unmöglich wurde.

In der Literatur wird aber seit geraumer Zeit bereits eine andere Möglichkeit beschrieben, welche die oben genannten Probleme von RET bzw. FRET - Messungen eliminieren kann, die Elektronenspin - Resonanz - Spektroskopie. Diese Methode, die in den chemischen Wissenschaften neben der NMR - Spektroskopie schon seit langem zur Struktur- und Konformationsanalyse von synthetischen organischen und anorganischen Verbindungen verwendet wird, findet in den letzten Jahren auch immer öfter Verwendung im Zusammenhang mit der Biologie.

Anfänglich wurden dabei solche Systeme untersucht, in denen so genannte paramagnetische Zentren für die Funktion der zu untersuchenden Gesamtkomplexe von Bedeutung waren, wie zum Beispiel bei bestimmten Klassen von Metalloproteinen (vgl. Solomon und Hodgson 1998). Des Weiteren wurden ladungstrennte Zustände untersucht, wie etwa die der photosynthetischen Reaktionszentren (Levanon und Möbius 1997) bzw. Radikalenzyme (Stubbe und Van der Donk 1998). Methoden mit so genannten Spinsonden wurden zunächst vor allem zur Untersuchung des Ordnungsgrades und der Dynamik von Lipidmembranen eingesetzt (Marsh und Horvath 1998). Erst mit der Entwicklung der punktspezifischen Spinmarkierung von Proteinen, dem *Site Directed*

Spin Labeling (SDSL) durch Wissenschaftler wie Hubbel (Hubbel et al. 1998 bzw. 2000; Berliner 2000) wurden auch Strukturcharakterisierungen und Untersuchungen zur Dynamik von Strukturen ursprünglich diamagnetischer, nicht - kristalliner Systeme möglich. Ein Analogon zu der oben benannten RET oder FRET - Methode war entstanden.

Entscheidender Vorteil der Methode ist, dass die im Fall der ESR - Methode an die Proteine gebundenen so genannten Spin Label wesentlich kleiner sind als die bereits angesprochenen Fluoreszenzfarbstoffe. Ihre Größe entspricht eher der einer aromatischen Aminosäureseitenkette, so dass man in diesem Zusammenhang von einem nicht - invasiven Eingriff auf die Proteinstruktur sprechen kann (vgl.: Mchaourab *et al.* 1996 und Langen *et al.* 1998 u. 1999). Des Weiteren treten für den speziellen Fall des hier untersuchten LHCII keinerlei Interaktionen mit den komplexgebundenen Pigmenten oder dem Proteingrundgerüst auf, so dass diesbezüglich keine Signalverfälschung resultieren kann.

Bereits 1994 wurde mit Hilfe dieser Methode eine Struktur- und Dynamikuntersuchung von Bakteriorhodopsin durchgeführt (Hubbel und Altenbach 1994). Zudem wurden beispielhaft auch andere Membranproteine, wie das Rhodopsin (Kim *et al.* 1997) oder wasserlösliche Proteine wie das T4 Lysozym (Borbat *et al.* 2002) auf diese Weise untersucht.

An dieser Stelle soll eine kurze allgemeine Einführung in diese Art der ESR - Messungen gegeben werden, die nicht näher auf die physikalischen Grundlagen eingeht. Ausführlichere Informationen zu diesem Thema sind den Überblicksveröffentlichungen verschiedener Autoren zu entnehmen (u.a.: Faier 2000; Hustedt und Beth 1999; Hubbel und Altenbach 1994).

Voraussetzung für die Elektronenspin - Resonanz - Spektroskopie an biologischen Proben ist das Einführen paramagnetischer Spin - Label an die ansonsten meist diamagnetischen Proteine.³ Diese Spin - Label, die es in großer Zahl und Variabilität kommerziell zu erwerben gibt, haben alle gemeinsam, dass sie ein ungepaartes Elektron (meist in Form eines stabilen Nitroxyl - Radikals) in ihrer Struktur enthalten.⁴ Beispielhaft für solche Marker ist das in dieser Arbeit verwendete TEMPO - Spin Label, dessen Struktur dem Material - und Methodenteil dieser Dissertation zu entnehmen ist. Solche Label können im Sinne einer Michael - Addition über ihre Iodacetamido- oder Maleimid - Kopplungsgruppe an die Sulfhydryl - Seitenkette von Cysteinen gebunden werden (vgl. Reaktionsschemata: Kapitel 2.7.1). Dadurch entsteht eine sehr selektive Möglichkeit, Proteine zu markieren. Unspezifische Reaktionen der Proteinstruktur mit dem Label können unabhängig von der Reaktionsdauer nahezu ausgeschlossen werden. Wird Cystein dabei über einen Austausch beispielsweise von Serin in Proteinstrukturen eingefügt, ist diese Mutagenese in Bezug auf die

³ Ein so genannter *Diamagnet* enthält keine ungepaarten Elektronen und würde sich deshalb abgesehen von den in der NMR genutzten Kernspins in einem ihn umgebenden Magnetfeld neutral verhalten. *Paramagneten* enthalten hingegen ungepaarte Elektronen, die ein magnetisches Moment besitzen. Solche „einsamen Elektronen“ werden von einem sie umgebenden Magnetfeld beeinflusst und richten sich gemäß dessen Feldrichtung aus.

⁴ Neben „einfachen Labeln“ zur direkten Markierung von Proteinen existieren auch in dieser Hinsicht markierte Lipide etc., so dass die Einsatzmöglichkeiten für diese Methode mittlerweile recht mannigfaltig erscheinen.

Erhaltung einer intakten Struktur (Konformation) des mutierten Proteins zudem vernachlässigbar. Serin und Cystein unterschieden sich nur durch den Austausch einer OH - Gruppe durch die eben bereits genannte SH - Gruppe, was die Proteinstruktur nicht beeinflusst. Ähnliche strukturkonservative Austausche wären auch mit Threonin oder Alanin möglich (Howorka *et al.* 2000).

Zurück zu dem an das Protein gebundenen TEMPO - Label. Die Bindung eines solchen Labels macht die gesamte Proteinstruktur für spätere ESR - Messungen zugänglich. Werden zwei solcher Label an unterschiedlichen Positionen der Proteinstruktur gebunden, kann zudem die Distanz zwischen beiden TEMPO - Strukturen bestimmt werden.

Ein modernes ESR - Spektrometer, wie das während dieser Arbeit verwendete Bruker Elexsys 580 X-Band - Gerät des Max - Planck - Instituts für Polymerforschung Mainz besteht aus folgenden prinzipiellen Komponenten: Einem Probenkopf mit einem umgebenden Ring - Resonator, einer Mikrowellenquelle, mit der es möglich ist, definierte Mikrowellenimpulse in die Probe einzustrahlen und einem großen Magneten mit variablem Feld, der den Probenkopf umgibt. Daran angeschlossen findet man ein Detektionssystem mit angeschlossenem Rechner zur Auswertung der entstehenden Signale (vgl. Beschreibung im Material und Methoden - Kapitel 2.7.4).

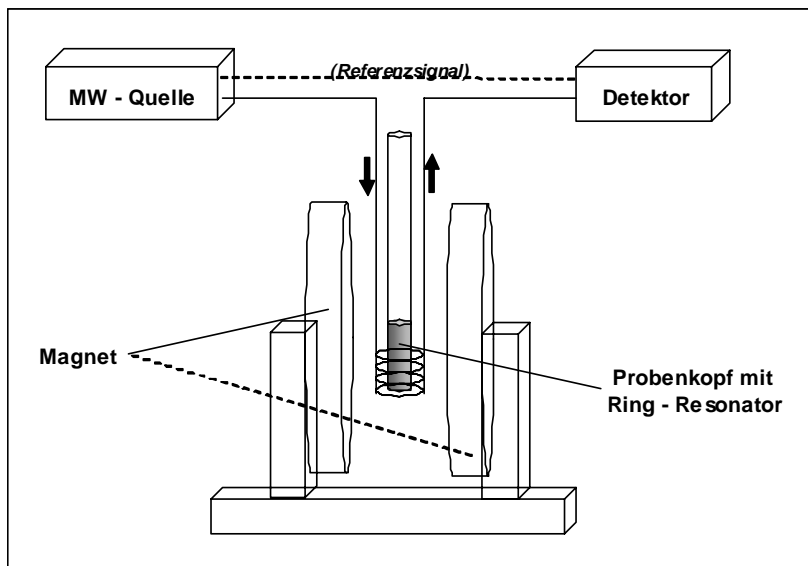


Abb. 10: Schematischer Aufbau eines ESR - Spektrometers nach Fajer 2000 (verändert). [MW - Quelle == Mikrowellen - Quelle]

Die folgende einfache schematische Abbildung soll die während der Messung ablaufenden Vorgänge verdeutlichen.

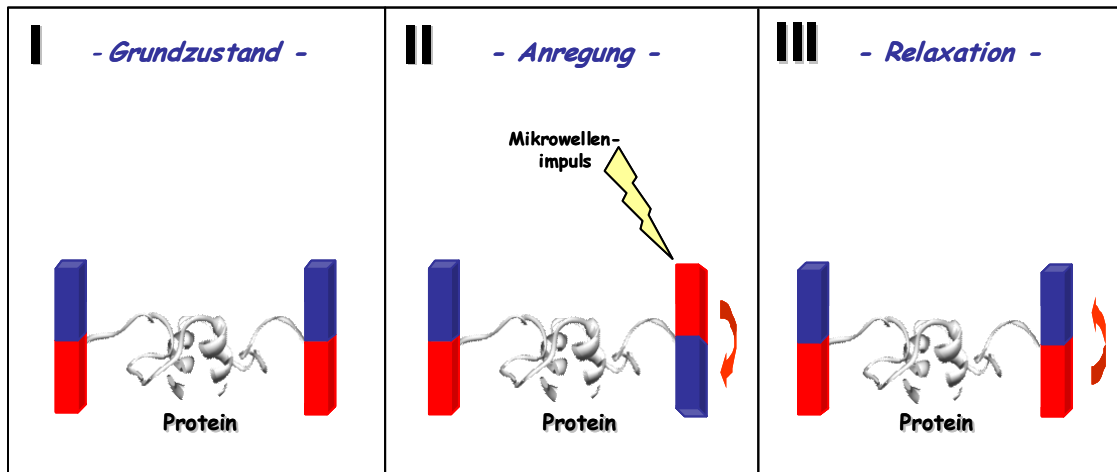


Abb. 11: Vereinfachte schematische Darstellung der prinzipiellen Vorgänge während einer ESR - Messung an zweifach gelabelten Proteinen zur Bestimmung der Distanz zwischen beiden Labeln. Eine genauere Beschreibung der drei Abbildungen ist dem Text zu entnehmen.

Betrachtet man, sehr stark vereinfacht, die beiden mittels des TEMPO - Label an das Protein gebundenen ungepaarten Elektronen⁵ als eine Art von Stabmagneten, so kann man zunächst beobachten, dass sich diese beiden Elektronenspin (siehe Fußnote) zunächst gemäß des anliegenden äußeren Magnetfeldes (umgebender Magnet) gleichförmig ausrichten (*Grundzustand*: Abb. 11 I).

Wird nun in ein solches System ein zusätzlicher, energetisch streng definierter Mikrowellenimpuls eingestrahlt, kommt es dadurch zu einer Invertierung eines der beiden Elektronenspin⁶ (*Anregung*: Abb. 11 II). Dadurch ändert sich die magnetische Umgebung des zweiten, nicht veränderten Spin, was man als Signaländerung detektieren kann. Die Intensität dieser Signaländerung hängt von der Distanz zwischen beiden Elektronenspins ab.

Nach dieser Anregung erfolgt im Zeitraum einiger Mikrosekunden eine Relaxation. Der mittels des Impulses in seiner Richtung umgekehrte Elektronenspin kehrt wieder in seine Ausgangslage zurück. Die Signaländerung fällt auf den ursprünglichen Wert zurück (*Relaxation*, vgl.: Abb. 11 III).

In der Literatur werden solche Experimente als PELDOR (*Pulsed Electron Double Resonance*) bzw. DEER (*Double Electron Electron Resonance*) - Experimente bezeichnet (vgl. Prisner *et al.* 2001). Diese Art von Experiment eignet sich besonders zur Messung von Distanzen von etwa 2 bis 5 nm und wurde während der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente unter Verwendung von Sequenzen mit vier Pulsen durchgeführt (*Four - Pulse - DEER*). Eine

⁵ Im weiteren Verlauf auch als Elektronenspin bezeichnet. Der Spin eines Elektrons ist neben der Masse und der elektrischen Ladung eine der grundlegenden Eigenschaften des Elektrons. Anders als Masse und Ladung ist der Elektronenspin jedoch eine rein quantenmechanische Größe, die der Anschauung nicht zugänglich ist. Der Spin des Elektrons kann zwei Werte annehmen, die gewöhnlich anhand der Magnetquantenzahl als +1/2 und -1/2 bezeichnet werden. Mit dem Elektronenspin ist ein magnetisches Moment assoziiert, welches eine direkte Messung der Spinrichtung erlaubt. Ein Strahl unausgerichteter Elektronen lässt sich durch ein Magnetfeld nach der Spinrichtung der Elektronen in zwei Strahlen aufspalten (so genannter Zeeman - Effekt).

⁶ Dies ist möglich, weil sich beide Elektronenspins aufgrund ihrer Umgebung (z.B.: andere Orientierung der Aminosäureseitenketten in Bezug auf das Magnetfeld) energetisch leicht voneinander unterscheiden.

genauere Beschreibung dieses Experimenttyps kann der angegebenen Literatur entnommen werden. (Pannier *et al.* 2000 bzw. Jeschke *et al.* 2004).

Alternativ zu dieser Art von ESR - Messungen findet man in Veröffentlichungen auch vielfach die Beschreibung so genannter *continuous wave* - Experimente (*cw* - ESR). Diese Art der Messung stellt allerdings hier aufgrund der zu erwartenden größeren Abstände zwischen den TEMPO - Labeln nicht die Methode der Wahl dar, während dessen sie bei einer Vermessung von sehr kurzen Distanzen bis 2 nm prinzipiell zu bevorzugen wäre (vgl. Hubbel und Altenbach 1994; Altenbach *et al.* 2001; Hubbel *et al.* 2000; Steinhoff *et al.* 1997; Persson *et al.* 2001). Auf die Beschreibung weiterer Vor- und Nachteile der beiden Methoden soll an dieser Stelle verzichtet werden.

Im Anschluss an die Durchführung von Puls - Experimenten folgt die Auswertung der resultierenden Signale, die prinzipiell einer Zerfallskurve ähneln, mit Hilfe einer Direkten Transformation unter Verwendung speziell zu diesem Zweck angepasster Programme. Die daraus resultierenden Abstands-informationen spiegeln die Distanzverteilung zwischen den beiden vor den Messungen an das Protein gebundenen TEMPO - Spin - Labeln wider (Detailierte Abbildungen folgen im Ergebnisteil).

Wird ein Protein mit Hilfe der Mutagenese an mehreren unterschiedlichen Positionen jeweils paarweise mit TEMPO - Spin - Labeln markiert, so dass in Kombination aller Markierungen ein Polyeder zwischen den Markierungsstellen aufgespannt würde, ist es im Anschluss an die ESR - Messungen der verschiedenen resultierenden Doppelmутanten möglich, den Aufenthaltsort einer bestimmten Position dieses Dreiecks im dreidimensionalen Raum im Sinne einer geometrischen Triangulation eindeutig zu bestimmen (vgl. Borbat *et al.* 2002).

Im Bezug auf den LHCII bedeutet das, dass es mit Hilfe dieser Methode möglich ist, den räumlichen Aufenthaltsort des Aminoterminus über Distanzmessungen mehrerer geeigneter TEMPO - markierter LHCII - Doppelmутanten näher zu bestimmen oder doch zumindest eine erhebliche Einschränkung möglicher Aufenthaltsorte zu erreichen. Somit ergibt sich eine Lösung für das am Anfang dieses Abschnitts angesprochene wissenschaftliche Problem der Konformationsanalyse dieses N - Terminus des LHCII.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Zwei Ziele sollten im Rahmen dieser Arbeit parallel mittels diverser Untersuchungen an rekombinanten LHCII - Komplexen verfolgt werden:

Zunächst sollte der Frage nachgegangen werden, ob es sich bei der von Hobe *et al.* 1994 bereits beschriebenen N - terminalen Struktur des Trimerisierungsmotives wirklich um eine charakteristische Interaktionsstelle für das Lipid Phosphatidylglyzerin handelt.

Dazu sollten die von Hobe *et al.* bereits 1995 beschriebenen so genannten Trimerisierungsmotiv - Mutanten mit einem Aminosäureaustausch innerhalb dieser für die Oligomerisierung wichtigen Region dazu benutzt werden, um eine vergleichende Phospholipid - Bindungsstudie durchzuführen.

Im Anschluss an *in vitro* - Rekonstitutionen unter Zugabe eines Überschusses an synthetischem Dipalmitoyl - PG (DPPG) und diversen Wasch- und Extraktionsschritten sollte anhand konservativer biochemischer Nachweismethoden ein spezifischer Nachweis des komplexgebundenen PG erfolgen. Dadurch sollte überprüft werden, ob es Unterschiede in der PG - Bindung zwischen den verschiedenen LHCII - Klonen im Vergleich zum Wildtyp gibt.

Des Weiteren sollte eine genaue Phospholipid zu Protein - Stöchiometrie für diese Mutanten und auch den Wildtyp ermittelt werden, da diesbezüglich bis vor kurzem keine exakten Angaben in der Literatur zu finden waren.

Zweites erklärtes Ziel dieser Arbeit sollte die Untersuchung der dynamischen Konformation des Aminoterminus des LHCII mit Hilfe der neuen Methode der Elektronenspin - Resonanz - Messungen sein.

Dazu sollte zunächst mit Hilfe von neu zu erstellenden LHCII - Doppelmutanten mit zwei markierbaren Cysteinen eine Methode etabliert werden, mit der der LHCII für ESR - Messungen zugänglich wird.

Im Anschluss daran sollte anhand unterschiedlicher Messungen überprüft werden, ob es in Bezug auf den Aminoterminus distinkt voneinander unterscheidbare Vorzugskonformationen gibt oder ob eher ein breites Ensemble an Konformeren existiert. Wenn möglich, sollte anhand der erhaltenen Daten zudem versucht werden, die Struktur dieses Aminoterminus zu visualisieren, um diesen bis heute unaufgelösten Bereich des Modells näher einzugrenzen.

Zuletzt sollte der Einfluss von verschiedenen Versuchsparametern, wie etwa der Zugabe von einzelnen Lipiden oder Carotinoiden während der Rekonstitution oder der Bestrahlung der erzeugten rekombinanten Komplexe mit definierten Lichtmengen auf die Konformation des LHCII, insbesondere des N - Terminus dieses Pigment - Protein - Komplexes überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Absorptions - Spektrometer:

UV-210PC	Shimadzu Corporation, (Kyoto, Japan)
MPS-2000	Shimadzu Corporation, (Kyoto, Japan)
V-550	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt)
SPECTRAMax Plus	Molecular Devices (Sunnyvale, California, USA) Software: SOFTmax PRO

Autoklav:

Varioklav Typ 500 H+P	Labortechnik GmbH, (Oberschleißheim, München)
-----------------------	---

Autospotter:

Desaga Spotter	Desaga GmbH (Heidelberg)
----------------	--------------------------

CD-Spektropolarimeter:

J-810-S	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt)
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Peltier-Element: Model CDF-426S/426L ○ Software: Spectra Manager, Version 1.6

ESR - Spektrometer:

Bruker Eleksys E580	Bruker BioSpin GmbH
FT/CW X-Band Spectrometer	(Rheinstetten/Karlsruhe)
	<ul style="list-style-type: none"> • Resonator: Bruker Flexline Split-Ring Resonator ER 4118X_MS3 • Zweite Mikrowellenquelle: YIG Oscillator (Avantek AV 78012): Magnostech GmbH Berlin

Fluoreszenz-Spektrometer:

Fluoromax-2	ISA SPEX / Jobin Yvon, (Grasbrunn)
	<ul style="list-style-type: none"> • Software: Datamax Software Version 2.24 • Kühlung: Ministat Compatible Control, HuberKältemaschinenbau GmbH, (Offenburg-Elgersweiler)

Gaschromatograph:

Dani 3800 HR 2CH	Dani S.P.A. Monza (Milano, Italy)
	<ul style="list-style-type: none"> • Säule: Chrompack Fused Silica 50M x 0,25 MM • Integrator: Shimadzu C-R1B (Kyoto, Japan)

Geldokumentationsanlagen:

Gel Doc 1000	Bio-Rad (München)
	<ul style="list-style-type: none"> • Software: Raytest AIDA Version 1.1 (beta)
Versa Doc Model 3000	Bio-Rad, (München)
	<ul style="list-style-type: none"> • Software: Quantity One

Gelelektrophorese:

Gelgießsystem	Midget-Systems, Pharmacia LKB, (Schweden)
Spannungsquelle	Bio-Rad Power Pac 3000, (Hercules, USA)
Kühlung	Haake G, Haake D1

Heizblock:

Satorius TB 4	Satorius (Göttingen)
Bachofer 2099-DA	Bachofer (Reutlingen)

HPLC:Analytische HPLC Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, (Groß-Umstadt)

Gradientenmischer	LG-1580-04 Quaternay Gradient Unit.
Pumpe	PU-1580 Intelligent Pump.
Detektor	MD-1515 UV/Vis-Intelligen Multiwavelength-Detector.
Degasser	DG-1580-53, 3-Line Degasser.
Säule	Chromolith SpeedROD RP-18e 50x4,6m.
Software	Jasco-PDA, BORWIN; Version 1.5

Präparative HPLC Waters Millipore GmbH, (Eschborn)

Pumpen	Model 510, 501, Waters Millipore.
Interface	System Interface Module, Waters Millipore.
Detektoren	GAT LCD 500, Gamma Analysen Technik GmbH, (Bremerhaven) [Absorption] RF 535, Shimadzu Corporation, (Kyoto, Japan) [Fluoreszenz].
Säule	Waters Bondapak C18; 125A / 10µm; 30x300 mm.
Software	Max 820, Waters.

Inkubationsschüttler:

Certomat	H/B, Braun Biotech International, (Melsungen)
----------	---

Magnetrührer:

IKA-Magnetrührer RCH	IKA Staufen
IKAMAG KMO2 basic	IKA Staufen

Mixer:

Heavy Duty Blendor	Blendor Waring, (USA)
--------------------	-----------------------

pH-Meter:

pH-Meter Serie 500	Krick Elektronische Messgeräte, (Berlin)
InoLab pH Level 2	WTW GmbH, (Weilheim)

Reinstwasseranlage:

Optilab-Standard	MembraPure, (Lörzweiler)
------------------	--------------------------

Rotationsverdampfer:

Rotovapor RE111	Büchi, (Flawil Schweiz)
-----------------	-------------------------

Scanner:

HP 4c	Hewlett Packard Instruments, (Oregon USA)
Agfa 1236u	AGFA - Gaevert GmbH, (Bonn)

Schüttler:

Phero-Shaker
 Certomat H
 IKA-Vibrax-VXR

Biotech - Fischer, (Reiskirchen)
 B. Braun Biotech International.
 Bachhofer GmbH.

Slot Blot Apparatur:

Minifold II
 SRC 072/0

Schleicher und Schuell (Dassel)
 (Mehrfachfiltrationsgerät für Mikroproben)

- Vakkumpumpe: Aquastopp von VanDer Heijden (Dörentrup)
- PVDF - Membran: PVM020C3R Fluorotrans Transfer Membran 0,2 µm

Speed-Vac:

Vacuum Concentrator
 Jouan RC 1010

Bachofer, (Reutlingen)
 Jouan (France)

Sterilbank:

Laminar Flow

SLEE Semiconductor Technik GmbH, (Mainz)

Thermocycler:

Cycler Primus 25

MWG Biotech, (München)

Tischrührgerät:

MS2 Mini-Schüttler
 Vorex Genie2,

IKA-Works Inc., (Wilmington, USA)
 Scientific Industries, Inc., (Bohemia, USA)

Ultraschallbad:

SONOREX super

Bandelin, (Berlin)

Waagen:

BP 2100S
 Analytik A200S

Sartorius AG, (Göttingen)
 Sartorius AG, (Göttingen)

Wärmeschrank:

Memmert

Memmert, Schwalbach

Wasserkocher:

HB4 basic

IKA Labortechnik, (Staufen)

Wasserbäder:

Heizwasserbad

Bachofer Laboratoriumsgeräte, (Reutlingen)

Zellaufschluss-Pressen:

French Pressure
 Cell Press

SLM Aminco, SLM Instruments, Inc.

Zentrifugen:Ultrazentrifugen:

A) Beckmann:
 Zentrifuge
 Rotoren

Beckmann Instruments (München)
 Beckmann Optima XL -100/L
 SW 60Ti; SW 41Ti.

B) Centrikon: Kontron Instruments, (Neufahrn)
 Zentrifuge Centrikon T 1065
 Rotor TST 41.14.

Kühlzentrifugen:

A) Beckmann: Beckmann Instruments (München)
 Zentrifuge Beckmann J2HS;
 Rotoren JLA-10500; JA-20.

B) Hettich: Hettich Zentrifugen, (Tuttlingen)
 Zentrifugen Hettich Universal 30RF; Hettich EBA 12
 Rotoren Rotor 1414; Rotor 1124.

Tischzentrifugen:

Zentrifugen Hettich Mikroliter 2020 incl. Winkelrotor.
 Hettich Mikro 12-24, Rotor 2029.

2.1.2 Chemikalien

2.1.2.1 Gase

Zum Eintrocknen der Pigmente und als Trägergas für die Gaschromatographie wurde Stickstoff 5.0 der Firma Messer - Griesheim (Darmstadt) verwendet. Der verwendete Wasserstoff 4.6 für die Gaschromatographie stammte von Linde (Wiesbaden).

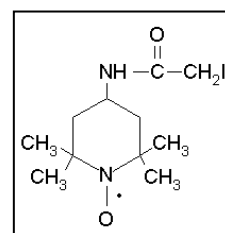
2.1.2.2 ESR -Label und Farbstoffe

2.1.2.2.1 ESR - Label:

Die zur Durchführung der Elektronen - Spin - Resonanz - Messungen benötigten Spin - Label mit freien Radikalen wurden von Sigma - Aldrich (Seisenhofen) bezogen:

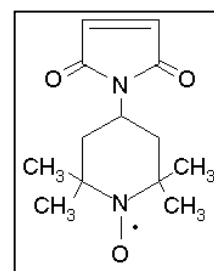
4-(2-Iodacetamido)-TEMPO, free radical

Molekulargewicht: 339,2 g/mol



4-2-maleimido-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinoxy, free radical

Molekulargewicht: 251,3 g/mol



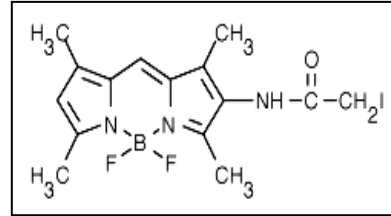
2.1.2.2 Farbstoffe:

Die beiden SH - reaktiven Farbstoffe zur Markierung von freien Cysteinen wurden über die Firma MobiTec (Göttingen) bezogen.

BODIPY® 507/545 IA

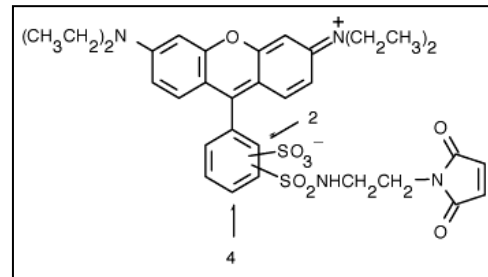
[N-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-2-yl)iodoacetamide]

Molekulargewicht: 431,0 g/mol



Rhodamine Red™ C2 maleimide

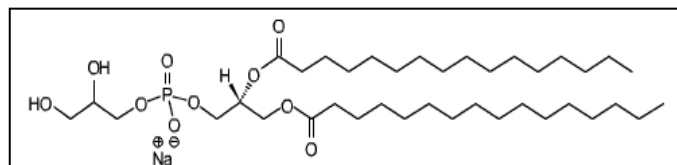
Molekulargewicht: 680,8 g/mol



2.1.2.3 Lipide

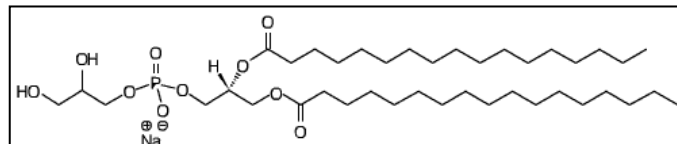
Die während dieser Arbeit verwendeten synthetisch hergestellten Phospholipide wurden von der Firma AVANTI Polar Lipids (Alabaster, USA) erworben.

Dipalmitoyl - PG (DPPG / 16:0-PG)



[1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)] Natrium-Salz),
Molekulargewicht: 744,96g/mol.

Diheptadecanoyl - PG (17:0 - PG)



[1,2-Diheptadecanoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)] Natrium-Salz)
Molekulargewicht: 773,02 g/mol

Alle weiteren verwendeten Lipide der Thylakoidmembran, wie MGDG, DGDG und SL wurden von der Firma Lipid Products (Redhill, SURREY GB) bezogen und stammten aus dort aufgereinigten Spinatextrakten.

2.1.2.4 Lösemittel

Die verwendeten Lösemittel stammten von den Firmen Merck (Darmstadt) und Riedel de Haen (Hannover).

Das benutzte Aceton wurde zusätzlich einmal bei Normaldruck destilliert, um Verunreinigungen zu entfernen. Nach Gebrauch wurde es rezykliert und nach zweimaliger Destillation wieder eingesetzt.

Der verwendete Diethylether wurde unter Zugabe von KOH zwei Stunden unter Rückfluss aufgekocht (Beseitigung von Peroxiden) und anschließend abdestilliert.

2.1.2.5 Weitere Chemikalien

Alle anderen Chemikalien wurden bei folgenden Herstellern in p.A. - Qualität bezogen:

- Amersham Pharmacia Biotech, (Freiburg);
- Biomol, (Hamburg);
- Bio-Rad (Hercules, USA);
- Boehringer, (Mannheim);
- Macherey-Nagel, (Düren);
- Merck eurolabs (ab 2002 VWR International GmbH, Frankfurt);
- MobiTec (Göttingen);
- New England BioLabs Inc., (Schwalbach);
- peQLab Biotechnologie GmbH, (Erlangen);
- Serva, (Heidelberg);
- SIGMA-Aldrich, (Deisenhofen);

2.2 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.1 Konstruktion von LHCII - Mutanten

Zur Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde rekombinantes Lichtsammelprotein verwendet, das aus E.coli - Bakterien überexprimiert wurde. Zuvor wurde die für das Protein codierende Erbinformation über ein Plasmid in den Bakterienstamm eingebracht. Der verwendete Expressionsvektor pDS12-RBSII (Bujard *et al.* 1987) zeichnet sich dabei dadurch aus, dass bei ihm die proteincodierende Sequenz direkt hinter einem Phagen - Promotor gesetzt wurde und unter der Kontrolle eines lac - Operons steht. Zusätzlich trägt das Plasmid eine Sequenz für eine Ampicillin - Resistenz, so dass eine spätere Selektion zwischen Bakterien mit- und ohne Plasmid möglich wird. Mit diesem Expressionssystem ist es möglich, gezielt Veränderungen (Mutationen) des LHCII auf DNA - Ebene vorzunehmen und nach Expression mit dem so definiert veränderten Protein zu arbeiten.

Für die Experimente dieser Arbeit mussten mehrere LHCII - Mutanten neu hergestellt werden.

Folgende Ausgangsklone fanden Verwendung:

Klon	Beschreibung	Herkunft	Verwendung
C3.2h	LHCP mit C - terminalem His ₆ - Tag	Kosemund (1999)	R21Qh
ΔN22	LHCP mit N - terminaler Deletion von 22 Aminosäuren	Dilly-Hartwig (1998)	ΔN22h
S3Ch	LHCP mit singulärem Cystein an Position 3 nahe des N - Terminus und His ₆ - Tag am C-Terminus	Huschenbett (2001)	S3C,S160Ch; S3C,S52Ch; S3C,S106Ch
S160Ch	LHCP mit singulärem Cystein an Position 160 (stromale Schleife) und His ₆ - Tag am C - Terminus	Huschenbett (2001)	S3C,S160Ch; S106,S160C
S52Ch	LHCP mit singulärem Cystein an Position 52 nahe der ersten Helix und His ₆ - Tag am C - Terminus	Storf (2001)	S52C,S160Ch; S3C,S52Ch
S106C	LHCP mit singulärem Cystein an Position 106 (luminale Schleife)	Storf (2001)	S106C,S160Ch
S106Ch	LHCP mit singulärem Cystein an Position 106 (Luminale Schleife) und His ₆ - Tag nahe des N - Terminus	Storf (2001)	S3C,S106C

Tab. 1: Ausklone zur Herstellung neuer LHCII - Mutanten.

2.2.1.1 Konstruktion der Mutante R21Qh durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der PCR - Reaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) können ganz gezielt Veränderungen in einer Basensequenz eingefügt (vgl. Chen und Przybyla 1994) werden. Insgesamt werden dazu drei verschiedene Primer benötigt. Zwei davon (sense- und antisense - Primer) sollten die gesamte zu mutierende Sequenz flankieren, ein weiterer Primer dient zur Einführung der Mutation selbst (Mutageneseprimer). Dieser Mutageneseprimer trägt die gewünschte Veränderung in der Basensequenz, sollte aber dennoch aufgrund genügend komplementärer Anteile zur Matrizen - DNA (Template) ausreichend stark an diese binden. Zusätzlich müssen auf beiden Seiten der einzuführenden Mutation Restriktionsschnittstellen vorhanden sein, die singulär im Plasmid vorkommen und mit deren Hilfe der mutierte DNA - Abschnitt später in ein gleich restringiertes offenes Original - Plasmid religiert werden kann.

Die eigentliche Mutagenese wird mit Hilfe zweier PCR - Reaktionen vollzogen, bei denen mit pfu-Polymerase gearbeitet wird, da diese nur eine geringe Fehler-rate bei gleichzeitig hoher Polymerisationsrate aufweist und zudem keine 3'-Transferase Aktivität besitzt.

In der ersten PCR - Reaktion wird zunächst mittels des Mutageneseprimers und eines der beiden anderen Primer ein kurzer DNA - Abschnitt amplifiziert, der die gewünschte Mutation trägt. Das so erhaltene Amplifikat wird nach Aufreinigung und Denaturierung mit dem dritten, noch verbliebenen Primer in einer weiteren PCR als neu hergestellter Primer eingesetzt. Das Endprodukt dieser zweiten PCR wird wiederum aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.2.3) und mit den beiden oben beschriebenen Restriktionsenzymen (vgl. Tab. 2) geschnitten. Danach

erfolgt die Ligation in ein gleich behandeltes offenes Original - Plasmid. Zur Verdeutlichung der Methode können die Abbildungen 18 und 19 des Ergebnisteils herangezogen werden, die speziell die Klonierung der Mutante R21Qh verdeutlichen.

Folgende Parameter wurden bei der Klonierung der Mutante R21Qh verwendet:

1. PCR-Reaktion: (100µl)

Vektor-DNA:	10 ng C3.2h
1. Primer:	5 pMol DS23 ⁺
Mutageneseprimer:	5 pMol R58Q
dNTP:	200 µM
10x pfu - Puffer:	1x
pfu-Polymerase:	2,5 U

2. PCR-Reaktion: (100 µl)

Vektor-DNA:	10 ng C3.2h
1. PCR-Produkt:	6-10%
2. Primer:	5 pMol S1
dNTP:	200 µM
10x pfu - Puffer:	1x
pfu-Polymerase:	2,5 U

- 300 sec „Hotstart“ 95°C
- Zugabe der pfu-Polymerase,
danach 25 Zyklen:
 - 60 sec Denaturieren 95°C
 - 60 sec Annealen 52°C
 - 90 sec Polymerisieren 72°C

- 300 sec „Hotstart“ 95°C
- Zugabe der Pfu - Polymerase,
danach 25 Zyklen:
 - 60 sec Denaturieren 95°C
 - 60 sec Annealen 52°C
 - 90 sec Polymerisieren 72°C

Die verwendeten Restriktionsenzyme EcoRI und BstEII, die im Anschluss der beiden PCR - Runden verwendet wurden, sind in Tabelle 2 auf der folgenden Seite näher beschrieben. Die Sequenzen der entsprechenden Primer können der Tabelle 3 (Seite 35) entnommen werden.

Material:

Pfu - Polymerase, (Stratagene, Heidelberg)

Pfu-Polymerase 2,5 U

Mineralöl

10x pfu - Puffer:

KCl	100	mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	100	mM
Tris-HCl (pH 8,75)	200	mM
MgSO ₄	20	mM
Triton X-100	1	%
BSA	1	mg/ml

2.2.1.2 Konstruktion weiterer LHCII - Mutanten durch einfache Restriktion und Religation vorhandener Klone

Die meisten in dieser Arbeit verwendeten LHCII - Mutanten wurden durch Restriktion und Religation bereits vorhandener LHCII - Klone der Arbeitsgruppe hergestellt. Dabei wird durch geschickte Kombination aus benutzten Ausgangsklonen und verwendeten Restriktionsendonukleasen ganz gezielt eine neue Information in einen bereits vorhandenen Klon eingefügt.

Für diese Art von Klonierung wurde Midipräp - DNA (vgl. Abschnitt 2.2.8) von zwei verschiedenen Ausgangsklonen (im Folgenden A und B genannt) verwendet.

Zunächst wurde die DNA der Mutante A nacheinander jeweils für 2 Stunden mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen inkubiert und anschließend per Agarose - Gelelektrophorese aufgetrennt. Von dieser Mutante wurde das größere erhaltene Fragment als späterer Vektoranteil der neuen Mutante ausgeschnitten und aufgereinigt.

Mit der Mutante B wurde analog verfahren. Allerdings wurde hier das kleinere erhaltene Fragment als späterer Insertanteil aus dem Agarose - Gel ausgeschnitten.

Nach Quantifizierung beider gewonnenen Fragmente (vgl. 2.2.4) folgte die Religation des so erhaltenen Fragmente der Mutante A und Mutante B, so dass ein neuer Klon entstand, bei dem die Informationen der beiden Ausgangsmutanten kombiniert worden war (Abschnitt 2.2.5).

Zur Verdeutlichung dieser Methode kann unter anderem die Abbildung 21, (Herstellung der Mutante $\Delta N22h$, Seite 76f.) herangezogen werden.

Folgende Restriktionsenzyme wurden verwendet:

Enzym	Sequenzmotiv	Puffer	Temperatur	Inaktivierung	Verwendung
BstEII	G↓GTNACC	NEB 3	60°C	- - -	S3C,S160Ch; S106C,S160Ch; S52C,S160Ch; $\Delta N22h$;
EcoRI	G↓AATTC	NEB 3	37°C	65°C, 20 min	S3C,S160Ch; S106C,S160Ch; S52C,S160Ch;
PstI	CTGCA↓G	NEB 3	37°C	80°C, 20 min	$\Delta N22h$
XhoI	C↓TCGAG	NEB 4 +BSA	37°C	65°C, 20 min	S3C,S52Ch; S3C,S106C
SacI	GAGCT↓C	NEB 4 +BSA	37°C	65°C, 20 min	S3C,S52Ch; S3C,S106C

Tab. 2: Verwendete Restriktionsendonukleasen der verschiedenen Klonierungen. (Alle Enzyme stammten von den Firmen NEB (Schwalbach) bzw. Pharmacia (Freiburg).)

Am Beispiel der Klonierung der Mutante S3C,S160Ch sollen die experimentellen Parameter aufgezeigt werden:

Zunächst wurde die DNA beider Ausgangsklone mit dem Restriktionsenzym inkubiert, welches bei der niedrigeren Temperatur eingesetzt werden konnte, in diesem Fall mit EcoRI⁷.

Ansatz der Restriktion:

DNA	5 µg	5 µl (1 mg/ml MPP - Stamm beider Mutanten)
NEB3 - Puffer	1/10	3 µl
EcoRI	20 U	1 µl (20 U / µl - Stamm)
dd H ₂ O	ad 30 µl	21 µl

Nach Inkubation für 2 Stunden wurde der Ansatz mit Mineralöl überschichtet⁸ und das Enzym durch 65°C Hitzeinkubation (20 Minuten) deaktiviert.⁹

Danach folgte die Zugabe des zweiten Enzyms (hier BstEII) und eine weitere zweistündige Inkubation bei 60°C im Heizblock:

BstEII	20U	2 µl (10 U/µl - Stamm)
--------	-----	------------------------

Im Anschluss wurden beide Verdauansätze schockgefroren und das zugegebene Mineralöl sauber abgezogen. Es folgte eine Überprüfung der vorgenommenen Restriktionen durch Auftrag eines Aliquots der Ansätze auf einem Agarose - Gel. Danach wurde jeweils der restliche Ansatz wiederum per Gelelektrophorese aufgetrennt und das entsprechende benötigte Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Nach einer Religation der korrespondierenden Fragmente der Komponenten A und B wurde das resultierende Plasmid in kompetente Zellen transformiert.

Material:

Mineralöl

1x NEB - Puffer:

NEB 3	100 mM NaCl; 50 mM Tris - HCl (pH 7,9); 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
NEB 4	50 mM KAc; 20 mM Tris - Ac (pH 7,9); 10 mM MgAc, 1 mM DTT

2.2.2 Agarose - Gelelektrophorese

Agarose - Gele erlauben es, Nukleinsäuren nach ihrer Größe aufzutrennen und als scharfe, extrahierbare Banden zu fokussieren. Dies wird dadurch ermöglicht, dass sich Ladung und Masse der Nukleinsäuren ab einem pH von größer 5 proportional zueinander verhalten.

⁷ Bei allen Klonierungen mit der Restriktionsendonukleasen - Kombination von XhoI und SacI wurden beide Enzyme gleichzeitig zugesetzt.

⁸ Das Mineralöl sollte das Verdunsten des wässrigen Ansatzes bei Inkubationen größer 50°C verhindern.

⁹ Im Fall des Enzyms EcoRI war dies besonders wichtig, da dieses Enzym sog. Sternaktivität aufweist, d.h. nach längerer Inkubationszeit in der Lage ist, auch unspezifisch Nukleinsäuren zu schneiden.

Während dieser Arbeit wurden Agarose - Gele zu zwei verschiedenen Zwecken verwendet. Erstens zur Visualisierung und Überprüfung von durchgeführten Restriktionen. Zweitens zur Isolation (Extraktion) von DNA - Fragmenten einer bestimmten Größe nach der elektrophoretischen Auftrennung. Zu diesem Zweck wurden je nach gewünschtem Trennbereich 1- bis 2% ige Agarose - Gele verwendet.

Für 10 Minigele wurden 1 g, 1,5 g bzw. 2 g Agarose in 100 ml 1x TBE Puffer im Mikrowellenherd aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde die nun flüssige Agaroselösung mit Hilfe einer Glaspipette auf Glasplättchen ausplattiert, die sich mit Kämmen versehen in einer vorbereiteten Gießkammer befanden. Nach dem Erstarren der Agarose konnten die Gele bei 4°C aufbewahrt werden.

Pro Geltasche konnten anschließend ca. 30 ng DNA in 1x Auftragspuffer aufgetragen werden. Danach erfolgte die eigentliche Elektrophorese in einer horizontalen Kammer bei zunächst 140 V. Nach Einlaufen der Proben in die Gelmatrix wurde die Spannung auf 200 V gesteigert. Die Trennung wurde so lange vorgenommen, bis das Bromphenolblau am untern Rand des Gels angekommen war. Zur Isolation von kleinen Fragmenten wurde bereits vorher abgebrochen.

Da dem verwendeten Gelpuffer neben 1x TBE auch 5 µl/100 ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde, konnten die aufgetrennten Nukleinsäuren anschließend mittels einer UV - Licht - Lampe oder der Versa Doc Imaging - Apparatur nachgewiesen, mittels mit aufgetragener DNA - Größenstandards identifiziert und gegebenenfalls aus dem Gel extrahiert werden. Ethidiumbromid interkaliert in die Nukleinsäuren und kann anschließend bei 312 nm angeregt werden.

Material:

10x TBE - Puffer:	0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure; 0,5 M EDTA
10x Auftragspuffer:	10 mM NaOH; 1 mM EDTA; 80% [v/v] Formamid (deionisiert); 0,1% [w/v] Xylen Cyanol; 0,1% [w/v] Bromphenolblau
Ethidiumbromid - Stamm:	10 mg/ml in H ₂ O bidest.
Agarose p.A.	

Verwendete Größenstandards: 100 Bp - und 1Kb - DNA Ladder [#N3231 bzw. #N3232] der Firma NEB (Schwalbach);

2.2.3 Aufreinigung von DNA aus Agarose - Gelen über eine Nucleo - Trap - Säule

Die Extraktion von DNA aus ausgeschnittenen Gelstücken erfolgte mittels eines „Nucleo - Trap“ - Kit von Machery und Nagel gemäß der Anleitung des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Die DNA wurde dabei zunächst unter Verwendung chaotropher Salze an eine aktivierte Silica - Matrix (Glasmilch) gebunden und konnte danach mit mehreren Puffern gewaschen werden. Danach erfolgte die Elution von dieser Matrix mittels 5 mM Tris pH 8,5 oder einem anderen Niedrigsalz - Puffer. Die Ausbeute an so gewonnener DNA wurde mittels Auftragen eines Aliquots auf ein Agarose - Gel bestimmt.

Material:

Nucleo - Trap - Kit	Machery und Nagel GmbH & Co. KG, (Düren)
5 mM Tris pH 8,5	
Wasserbad	

2.2.6 Transformation

Transformationskompetente *E.coli* - Zellen können aufgrund einer erhöhten Membrandurchlässigkeit relativ leicht mit Fremd - DNA infiziert werden. Diese Kompetenz wird dadurch erreicht, dass die Zellen in hohen Kalziumkonzentrationen auf Eis inkubiert werden. Anschließend reicht ein kurzer Hitzeschock zur erleichterten Aufnahme der Fremd - DNA.

Mit der Aufnahme der Fremd - DNA wird zusätzlich auch eine Ampicillin - Resistenz auf die *E.coli* - Zellen übertragen (- der pDS - Vektor trägt ein Ampicillin Resistenzgen, die β - Lactamase -), was die Selektion von transformierten und nicht - transformierten Zellen erleichtert. Nur Bakterien, die Fremd - DNA aufgenommen haben, wachsen später auf Ampicillin - haltigen Kulturplatten schnell heran.

Um zudem einen Anhaltspunkt für die Transformations - Effizienz zu erhalten, wurde zusätzlich ein ungeschnittenes Kontroll - Plasmid mit transformiert, das im Durchschnitt 10^7 Klone / μg transformierter DNA liefern sollte.

Die während dieser Arbeit verwendeten kompetenten Zellen von Stamm JM 101 (Genotyp supE, thi-1, $\Delta(\text{lac-proAB})[\text{F}'\text{traD36, proAB, lac}^q, \text{Z}\Delta\text{M15}]$ Volumen 50 μl) wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Danach folgte die Zugabe des $\frac{1}{2}$ Ligationsansatz unter vorsichtigem Rütteln des verwendeten Eppendorfgefäßes. Der gesamte Ansatz wurde anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert und danach 5 Minuten bei Raumtemperatur „mit Hitze“ behandelt. (Schließen der Bakterienmembranen und Aufnahme der Fremd - DNA.) Mit der mitgeführten Kontrolle (siehe oben) wurde gleich verfahren.

Daraufhin wurden 250 μl autoklaviertes LB - Medium (ohne Ampicillin) hinzu gegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C auf dem Drehrad im Brutschrank inkubiert. Von diesem Ansatz wurden danach 50- bzw. 100 μl auf sterilen LB - Amp Platten verteilt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Am folgenden Tag konnten von den herangewachsenen Bakterienkulturen einzelne Klone gepickt und weiteranalysiert werden.

Material:

Kompetente Zellen JM 101 (wurden zur Verfügung gestellt)
LB - Medium
LB - Amp - Agarplatten

2.2.7 Anzucht von Bakterien

Alle Materialien und Medien, die für molekularbiologische Arbeiten verwendet wurden, mussten zuvor sterilisiert werden (Autoklav bzw. Sterilfilter).

E.coli - Bakterien wurden entweder als Flüssigkultur (Plasmid - Isolation bzw. Protein-Überexpression) oder als Plattenkulturen (Vereinzeln von Bakterien nach der Transformation und Lagerung der Bakterienstämme für 1 bis 2 Monate bei 4°C) angezogen.

Material:

LB - Medium: 1% Pepton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl (pH 7,5)
(*Lauria Bertani - Medium*)

Das LB - Medium wurde auf pH 7,5 eingestellt und anschließend in geeignete Ansatzvolumina von 50-, 100- und 500 ml Größe aufgeteilt. Danach erfolgte die Sterilisation im Autoklav. Das Antibiotikum Ampicillin wurde in einem Volumenverhältnis von 1/1000 (100 mg/ml Stamm) frisch vor der Verwendung der Medien zum LB hinzugegeben.

Zu Herstellung von LB - Amp - Agarplatten wurde zu bestehendem LB - Medium 1,5% Agar zugegeben und erst danach sterilisiert. Die Zugabe des Antibiotikum erfolgte dann nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50°C.

2.2.8 Plasmid - Isolation mittels Midi - Präparation

Um genügend DNA für die weitere Charakterisierung (Sequenzierungen) und weitere Klonierungen zu erhalten, wurden so genannte Midi - Präparationen durchgeführt (MPP - DNA). Dazu wurde wiederum ein Kit der Firma Macherey und Nagel verwendet, das Nucleobond AX - 100 System.

Das Prinzip dieses Systems besteht darin, dass transformierte Zellen mittels NaOH und SDS lysiert werden können. Dadurch kann die Plasmid - DNA freigesetzt werden. Durch eine anschließende Ansäuerung des Mediums können danach Zellreste und die chromosomale DNA der *E.coli* präzipitiert werden. Die verbleibende Plasmid - DNA wird an Anionen - Austauschersäulen gebunden und kann mittels Waschpuffern gereinigt werden. Zuletzt kann diese DNA wieder mit einem Niedrigsalzpuffer von den Säulen eluiert werden, um sie im Anschluss mittels Isopropanol auszufällen. Nach Zentrifugation und Waschen des DNA - Pellets mit 70% Ethanol erfolgt die Wiederaufnahme der isolierten DNA in dest. Wasser.

Material:

100 bis 200 ml LB - Amp - Bakterienkultur des betreffenden Klons
Nucleobond AX -100 Kit
Isopropanol
70% Ethanol

2.2.9 Sequenzierung

Neu eingefügte Mutationen mussten auf DNA - Ebene verifiziert werden. Dazu wurden sämtliche Mutanten einer Sequenzierung nach Sanger (1977) unterzogen. Mit der zu testenden DNA als „Template“ und einem spezifischen „Primer“ wurde mit einem Kit eine PCR angesetzt, in der außer den notwendigen Deoxynucleosidtriphosphaten (dNTP) entsprechende farbstoffmarkierte Dideoxy - Analoga (ddNTP) mit zugegeben wurden. Beim Einbau solcher ddNTP während der PCR kommt es zu einem sofortigen Abbruch der Elongation, so dass unterschiedlich lange Kettenabbruchfragmente entstehen, die jeweils am Ende eine spezifische Farbstoffmarkierung tragen. Statistisch gesehen, wird es so viele Fragmente geben, dass das gesamte Template abgedeckt wird. Nach Auftrag des PCR - Produkts auf einem Gel kann so jeder einzelnen Farbstoff - Bande auf dem Gel einer Base in der Sequenz zugeordnet werden.

Für die durchgeführten Sequenzier - PCRs wurde der PCR „Big Dye“ V 3.1 - Kit der Firma GENterprice verwendet:

200-500 ng DNA	x µl der zu untersuchenden DNA
10 picomol Primer	1 µl der 10µM - Stammlösung
PREMIX V 3.1 - Puffer	4 µl [Puffer von GENterprice zur Verfügung gestellt]
Sequencing Puffer V3.1	4 µl [Puffer von GENterprice zur Verfügung gestellt]
ddH ₂ O	ad 20 µl

Die eigentliche PCR wurde in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Dabei wurde das Programm „Big“ mit folgenden Parametern verwendet:

- 60´ „Hotstart“ bei 95°C
- danach 35 Zyklen:

15´ Denaturierung	96°C
15´ Annealen	50°C
120´ Polymerisation	60°C
- Abschließend: Abkühlen nach 4°C, unbegrenzt. [Dauer ca. 3 Stunden]

Danach wurde der PCR - Ansatz (ohne Fällungsschritt) direkt bei der Firma Genterprice, Universität Mainz abgegeben und dort auf ein Sequenzier - Gel aufgetragen.

Für die meisten erfolgreichen Sequenzier - Reaktionen reichte eine Analyse in „sense“ - Richtung mit dem Primer DS23+ aus, um die gesamte codierende Sequenz abzulesen. Dennoch sollen in der folgenden Tabelle alle während dieser Arbeit benutzten Primer angegeben werden:

Bezeichnung	Sequenz	Orientierung
DS23+	5´ATTTGCTTTGTGAGCGG 3´	Vorwärts
R58Qh	5´GTACTTAACCTGGTCTGG 3´	Rückwärts
S1	5´CCTCAGAACTCCATC 3´	Rückwärts

Tab. 3: Während der Arbeit verwendete Primer

Die Auswertung der von GENterprice erhaltenen Sequenzen erfolgte elektronisch mit der Software: Chromas, Version 1.45 (Chromas, Australien).

2.2.10 Anlegen von Dauerkulturen

Zur langfristigen Archivierung der hergestellten Mutanten wurden neben der Lagerung von Midipräp - DNA auch transformierte Bakterienkulturen als Dauerkultur bei -80°C eingelagert. Dazu werden die Bakterienzellen in ein mit Glycerin versetztes Medium überführt und bei -80°C eingefroren. Dort überleben die Zellen, sind aber nicht mehr teilungsfähig.

Von einer LB - Amp Platte mit Kolonien des zu archivierenden Klons wurde eine Kolonie gepickt und in 5 ml LB - Amp - Flüssigkultur überführt. Nach Inkubation über Nacht auf dem Drehrad bei 37°C wurde aus der resultierenden Anzucht

200 µl Kultur entnommen und zu 800µl 80% Glycerin hinzu gegeben. Nach kurzem Mischen wurde die Kultur direkt bei -80°C eingefroren.

2.3 Proteinbiochemische Arbeiten:

2.3.1 Isolation von Einschlusskörpern aus Bakterien

Seit 1987 (Bujard *et al.*) ist bekannt, dass LHCP in *Escherichia coli* - Stämmen überexprimiert werden kann, denen zuvor das *cab* - Gen AB80 oder Derivate davon in einem Expressionsvektor der pDS12 - Reihe hinzugefügt wurde (Transformation siehe 2.2.6). Das Gen wird dabei von einem starken Phagen - Promotor kontrolliert, der unter der Kontrolle des *lac* - Operons steht. Durch die Zugabe des nicht metabolisierbaren Galaktose-Analogons IPTG (Isopropyl - β - D - Thiogalaktopyranosid) ist es so möglich, die Genexpression des bakterienfremden Proteins zu induzieren und so größere Mengen an LHCP - Apoprotein zu gewinnen.

LHCP wird dabei in Form von wasserunlöslichen Einschlusskörpern (Inclusion Bodies / IB) im Cytoplasma der Bakterien angehäuft. Diese Proteinpartikel sind gegenüber schwachen Detergenzien stabil, was man sich bei ihrer Isolierung zu Nutze macht. Man bricht die Bakterien mit Hilfe von Lysozym und schwachen Detergenzien wie Triton X-100 und Desoxycholat auf und zentrifugiert die dadurch freigesetzten Proteinpartikel ab. Danach können sie durch mehrere Waschschrte mit Detergenz weiter aufgereinigt werden. Die Reinheit des so erhaltenen LHCP kann später mit Hilfe eines denaturierenden SDS - Polyacrylamid - Gels überprüft werden (siehe Abschnitt 2.2.3).

Im Folgenden soll die Präparation für ein während dieser Arbeit häufig verwendetes Ansatzvolumen von 1000 ml LB - Medium näher beschrieben werden:

Am Vortag der eigentlichen IB - Präparation wurden zunächst mehrere Vorkulturen angesetzt. Einzelne Kolonien des gewünschten Klons wurden von einer LB - Amp - Platte gepickt und in 50 ml LB - Amp - Flüssigmedium überführt. Es folgte die Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank auf dem Drehrad.

Am folgenden Tag wurden die so hergestellten Vorkulturen in zwei vorbereitete, autoklavierte 450 ml LB - Amp - Hauptkulturen überführt und eine Stunde bei 37°C und 220 UpM auf dem Bakterienrüttler inkubiert. Danach konnte man eine deutliche Trübung der Kulturen erkennen. Nun wurde die Überexpression des LHCP durch Zugabe von 500 µl IPTG induziert und die Bakterien weitere 4 Stunden auf dem Rüttler weiter geschüttelt.

Im Anschluss wurden die Kulturen bei 8000 UpM und 4°C (Rotor JLA -10500) abzentrifugiert. Zu den Bakterienpellets wurde im Folgenden 20 bis 30 ml Lysis - Puffer zugegeben und das Ganze mit Hilfe des Ultraschallbades resuspendiert.

Danach erfolgte der mechanische Aufschluss der Bakterienzellen mit Hilfe der French Press - Apparatur in zwei Durchläufen. Das resultierende Lysat wurde direkt wieder auf Eis aufbewahrt.

Mit Hilfe mehrerer Detergenz - Waschschritte wurde im Anschluss eine weitere Aufreinigung des freigesetzten Proteins vorgenommen. Dazu wurde (nach einer erneuten Zentrifugation bei 8000 UpM) das entstandene Proteinpellet in Detergenzpuffer aufgenommen und gut durchmischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das resultierende Proteinpellet in 20 ml Triton - Puffer resuspendiert. In diesem Puffer wurde das Protein über Nacht auf dem Rad bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag folgte nach erneuter Zentrifugation die Aufnahme des Protein in Tris - Puffer. Die nun rein weiße Suspension wurde in Aliquots zu je 1 ml aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Vor jeder Entnahme eines Aliquots wurde gründlich gevortext, um eine gleiche Konzentration an Apoprotein in allen Aliquots zu gewährleisten.

Material:

LB-Medium	1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; (pH 7,5) steril
Ampicillin	100 mg/ml (=Amp)
IPTG	1M Stammlösung
Lysis - Puffer	0,8 mg/ml DTT; 4 µg/ml DNaseI [aus 1 mg/ml Stammlösung]
Detergenz - Puffer	200 mM NaCl; 1% Desoxycholsäure (w/v); 1% Nonidet P40 (w/v) 20 mM Tris-HCl (pH 7.5); 2 mM EDTA; 10 mM β-Mercaptoethanol
Triton-Puffer	0,5% Triton X-100 (w/v); 1 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)
Tris-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8.0); 1 mM EDTA,

2.3.2 Quantifizierung des isolierten LHCP

Nach der Präparation von LHCP folgte die Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle. Dabei kann die Konzentration über den Gehalt an aromatischen Aminosäuren per UV-Vis Spektroskopie bestimmt werden. Gemessen wird in diesem Fall die Absorbanz bei 280 nm, bei der die aromatischen Aminosäuren Thryptophan, Tyrosin und Phenylalanin absorbieren.

Material:

A ₂₈₀ - Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 2% SDS; 1 mM β-Mercaptoethanol
Tris - Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 8.9); 1 mM EDTA; 10 mM β-Mercaptoethanol

Für diese Konzentrationsbestimmung wurden in einem Eppendorfgefäß 10 µl der LHCP - Suspension zu 990 µl A₂₈₀ - Puffer hinzugegeben. Danach wurde 3 Minuten auf 100°C im Wasserbad erhitzt. Zusätzlich wurden auch 2 Referenzmischungen, die aus 990 µl Puffer und 10 µl Tris - Puffer bestanden, aufgekocht.

Nach dem Abkühlen der Lösungen folgte die Messung der Absorbanz bei 280 nm. Für die Konzentration des LHCP ergibt sich folgender Zusammenhang (Hobe *et al.* 1995):

Es gilt der molare Extinktionskoeffizient von $4,85 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Somit folgt für die Konzentration des LHCP, dass einer optischen Dichte von 0,1 52,5 µg/ml entspricht.

2.3.3 Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Qualität des überexprimierten und aufgereinigten LHCP, aber auch im Zusammenhang mit anderen Experimenten dieser Arbeit wurden wiederholt denaturierende SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophoresen (PAGE) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode lehnt sich dabei an Laemmli (1970) an. Durch das zugesetzte Detergenz wird den aufgetragenen Proteinen eine negative Nettoladung verliehen, so dass die Proteingröße zum einzigen Trennkriterium der Elektrophorese wird. Je nach Wahl des Puffers können die Trennbedingungen der Elektrophorese aber auch schwach denaturierend (nicht weiter beschrieben) oder nativ gewählt werden.

Das Gel setzt sich zusammen aus Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid, welche durch Zugabe eines Radikalstabilisators: TEMED (Tetramethylethylen-diamin) und einem Radikalstarter: APS (Ammoniumperoxodisulfat) zu einer netzartigen Matrix auspolymerisieren. Die resultierende Porengröße und damit auch die Trenneigenschaften des Gels können durch das Erhöhen des Vernetzungsgrades wie auch der Acrylamidkonzentration verändert werden (vgl. Laemmli 1970). Die hier beschriebenen Gele weisen zudem eine Aufteilung in zwei Zonen auf. Neben dem eigentlichen Trenngel mit einem pH von 8 wird ein Sammelgel vorgeschaltet, das einen pH von 6,8 aufweist und zur Fokussierung der aufgetragenen Proteine dient.

Die Polycralymid - Gele wurden wie folgt hergestellt:

Trenngel:

12% Polyacrylamid
(Acrylamid/Bisacrylamid = 30/1)
10% Glycerin
400 mM Tris-HCl pH 8,8
0,07% APS
0,05% TEMED

Sammelgel:

4,5% Polyacrylamid
(Acrylamid/Bisacrylamid = 30/1)
10% Glycerin
130 mM Tris HCl pH 6,8
0,05% APS
0,05% TEMED

Zunächst wurden alle Bestandteile für das Trenngel außer dem APS und dem TEMED in eine Saugflasche pipettiert. Danach folgte das Entgasen der Lösung mit Wasserstrahlvakuum. Zuvor wurde das Midget - Gelkammersystem mit Glasplatten, Spacern und Aluminiumplatten zusammengesetzt und vorbereitet. Nach dem Entgasen der Lösung wurde kurz vor dem eigentlichen Gießvorgang das APS und danach das TEMED zugesetzt. Nach der Zugabe dieser Chemikalien wurde kurz gemischt und direkt bis zur Markierung am oberen Rand der Gelkammer gegossen. Anschließend wurden alle Kammern mit 200 µl Aqua dest. überschichtet.

Nach etwa einer Stunde wurde das Wasser mit Filterpapier abgesaugt und das Sammelgel auf das nun auspolymerisierte Trenngel gegossen. Dabei wurde wie oben beschrieben verfahren. Nachdem das Sammelgel in die Kammern eingefüllt worden war, wurden die Kämmen eingesetzt. Wiederum nach einer Stunde konnte das Kammersystem auseinandergelöst, die Kämmen entfernt und anschließend die Gele voneinander getrennt werden. Bis zum Einsatz wurden die Gele feucht im Kühlschrank gelagert.

Material:

Midget - Gellkammersystem
Glas- und Aluminiumplatten
Spacer und Kämmen mit 0,75 mm Stärke
Saugflasche und Wasserstrahlpumpe

Wie bereits beschrieben kann durch die Wahl des Puffers, der während der Elektrophorese benutzt wird, der Grad des denaturierenden Charakters der Elektrophorese bestimmt werden.

Mit Hilfe von SDS - Puffer wurden stark denaturierende Gelelektrophoresen durchgeführt, wie sie etwa zur Reinheitskontrolle von Inclusion Body - Präparationen oder im Zusammenhang mit den später noch zu beschreibenden Enzymversuchen mit Trypsin und Chymotrypsin verwendet wurden.

SDS - Puffer: 50 mM Tris; 384 mM Glycerin; 1 mM EDTA; 0,1% SDS

Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proteine zunächst durch Zusatz von 1x Sparmix und kurzes Aufkochen denaturiert. Danach erfolgte der Auftrag auf das Gel. Flankierend zu den zu analysierenden Proben wurde meist SDS - 7 Proteinlängenmarker mit aufgetragen.

3x Sparmix: 100 mM Tris - HCl pH 6,8; 1,4 M β -Mercaptoethanol; 4% [w/v] SDS; 24% [v/v] Glycerin; 0,4M Bromphenolblau

<u>SDS - 7 Proteinlängenmarker:</u>	Rinderserumalbumin	66 KDa
	Ovalbumin	45 KDa
	NADPH	36 KDa
	Carboanhydrase	29 KDa
	Trypsinogen	24 KDa
	Trypsin - Inhibitor	21 KDa
	α - Lactalbumin	14,2 KDa

Die Gelelektrophorese fand bei Raumtemperatur statt und lief etwa 2 Stunden. Zunächst wurde die angelegte Spannung bei 150 V gewählt, bis die Proben die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel passierten. Danach konnte die Spannung auf 200 V erhöht werden. Im Anschluss an den Gellauf wurden die Gele meist mit Coomassie angefärbt oder einem Western Blotting unterworfen (siehe Abschnitt 2.6.8.5 ff).

Native Gele (aus Gründen der Vollständigkeit hier erwähnt) wurden mit Hilfe von Deriphat - Puffer bei 4°C durchgeführt (vgl. Peter und Thornber 1991). Dabei findet keine Denaturierung der Proben vor der Elektrophorese statt. Es wurde lediglich 1/10 Volumen 80% Glycerin zu den zu analysierenden Proben zugesetzt, um den Probenauftrag zu erleichtern.

Deriphat - Puffer: 0,15% Deriphat, 48 mM Glycin, 12 mM Tris

Diese Gele wurden mit maximal 80 Volt Spannung betrieben.

Im Anschluss an den Gellauf wurden einige der PAA - Glycerin Gele mit Coomassie (Coomassie Brillant Blau) angefärbt. Der Farbstoff bindet dabei an das Protein und färbt somit Banden auf dem Gel an, die Protein enthalten. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel dazu zunächst 30 Minuten in eine Gerda-Box mit Coomassie - Färbelösung gelegt und auf dem Rüttler leicht geschwenkt. Danach folgte das Abgießen der Färbelösung und die Zugabe von 1. Entfärber. Nach etwa 45 Minuten konnte dann dieser 1. Entfärber gegen den 2.

Entfärber ausgetauscht werden. Zur Unterstützung wurde ein Schwamm zugegeben, der den Farbstoff in sich aufsaugte. Nach Abschluss der Entfärbung wurde das Gel gründlich mit Wasser gespült und anschließend zwischen Cellophanstücken eingetrocknet.

Coomassie - Färbelösung:	1,75 mg/ml Coomassie Brillant Blue (Serva); 50% [v/v] Ethanol; 7% [v/v] konz. Essigsäure
1. Entfärber:	10% Ethanol; 7% konz. Essigsäure
2. Entfärber:	10% konz. Essigsäure

2.3.4 *In vitro* - Rekonstitution von monomerem LHCII

LHCII kann im *in vitro* aus seinen Bestandteilen, dem Apoprotein (LHCP) und den Pigmenten (Chlorophylle und Xanthophylle) zusammengesetzt werden. Die entstehenden rekombinanten Lichtsammelantennen sind dabei, wie Paulsen *et al.* (1990) zeigen konnten, ihren nativen Vorbildern praktisch identisch.

Alle während dieser Arbeit durchgeführten Rekonstitutionen wurden nach dem gleichen Muster (Standardbedingungen) durchgeführt, um eine spätere Vergleichbarkeit von Einzelexperimenten gewährleisten zu können.

Meist wurde dabei mit Totalpigmentextrakt aus Erbse (siehe 2.4.1) gearbeitet. Im Fall der hergestellten Einzelxanthophyll - Komplexe wurde jedoch eine Pigmentmischung aus zuvor einzeln per präparativer HPLC aufgereinigten Pigmenten (vgl. Abschnitt 2.4.1.3 und 2.4.1.4) wieder zusammengemischt. Dabei wurde die unten angegebene native Mischung der drei Xanthophyllspezies durch ein einziges zugesetztes Xanthophyll substituiert.

Folgende Standardbedingungen können angegeben werden:

Apoprotein	0,4	µg/µl
Chlorophyll (<i>a/b</i> = 3)	1,0	µg/µl
Xanthophyll	0,15	µg/µl

Die einzelnen Xanthophyllspezies verteilen sich in einem Totalpigmentextrakt etwa wie folgt:

Lutein:	64%;	
Neoxanthin:	23%	
Violaxanthin:	13%	[Alle Angaben in Gewichtsprozent.]

Alle durchgeführten Rekonstitutionen wurden nach der Detergenzwechsel - Methode (Paulsen *et al.*, 1993) durchgeführt, die im Folgenden für eine Proteinmenge von 250 µg beschrieben werden soll. Alle größeren während dieser Arbeit verwendeten Rekonstitutionsansätze waren Vielfache dieses Ansatzes:

Zunächst wurde ein Aliquot an Proteinsuspension von 250 µg aus der Stammlösung entnommen und durch Zugabe von gleichen Mengen an Wasser und 2-fach Solubilisierungspuffer auf ein Volumen von 600 µl gebracht. Das Ganze wurde 5 Minuten auf 100°C im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurden 50 mM β-Mercaptoethanol zugegeben. β-Mercaptoethanol dient dabei als Antioxidanz, Aminocaprinsäure und Benzamidin des Solubilisierungspuffers sind Proteasehemmer. Danach wurden 500 µg eingetrocknete Pigmente (- wie bereits beschrieben wurde, meist Totalpigmentextrakt verwendet -) in 60 µl

Ethanol gelöst und auf dem Vortexer zu dem mittlerweile abgekühlten Protein-aliquot hinzu gegeben. Es folgte weiteres Mischen für 30 Sekunden.

Die eigentliche Rekonstitution des LHCII findet bei der Detergenzwechsel - Methode durch den Wechsel der Detergenzumgebung statt. So wurde zunächst 1% Octyl- β -D-glucopyranosid (OG) zu dem Ansatz hinzu gegeben, was zu einer Ausbildung von LDS / OG - Mischmizellen führt. Nach einer weiteren kurzen Inkubationszeit von 5 Minuten wurde das LDS anschließend durch die Zugabe von KCl als schwerlösliches Kaliumdodecylsulfat ausgefällt. Dadurch verarmt die Detergenzumgebung und das Protein wird in Octylglycosid - Mizellen gezwungen. Bei diesem Prozess findet die Rückfaltung unter Aufnahme der Pigmente (*in vitro* Rekonstitution) statt (vgl. Paulsen *et al.* 1993) Das ausgefallene Salz wurde anschließend für eine Minute bei 12000 UpM und 4°C abzentrifugiert und der resultierende Überstand mit den in Mizellen verpackten Komplexen abgehoben. Nach einer weiteren 15 minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde dieser Zentrifugationsschritt wiederholt. Anschließend standen die durch diese Prozedur rekonstituierten LHCII - Monomere für weitere Untersuchungen und Experimente zur Verfügung.

Material:

Apoprotein

Totalpigmentextrakt bzw. selbst hergestellte Pigmentmischung

Ethanol p.A.

Octyl - β -D- glucopyranosid (Octylglucosid; OG; 1% Endkonzentration)

2M KCl (0,2 M Endkonzentration)

Aqua Dest.

1M β -Mercaptoethanol (50mM Endkonzentration)

2x - Solubilisierungspuffer (pH 9.0); 200mM Tris-HCl (pH 9.0); 10 mM ϵ -Aminocapronsäure; 2 mM Benzamidin; 4% Lithium - Dodecylsulfat (LDS)

2.3.5 Trimerisierung von LHCII auf der Ni - Sepharose - Säule

Bereits 1998 wurde von Rogl *et al.* eine Methode zur Trimerisierung von LHCII mit Hilfe von Ni - Chelat - Säulen (Ni - Sepharose - Säule) beschrieben. In Rogls Arbeit wurden denaturierte Proteine und Pigmente direkt auf der Säule rückgefaltet und gleichzeitig oligomerisiert.

Im Folgenden wird eine Methode der Oligomerisierung beschrieben, bei der bereits gefaltete LHCII - Monomere mit Hilfe der Ni - Sepharose - Säule zu Trimeren oligomerisiert wurden.

Voraussetzung für diese Methode ist die Bindung des Proteins an das mit Nickel beladene Sepharose - Material über einen an das Protein assoziierten Hexahistidylrest (Kågedal 1989). Alle während dieser Arbeit verwendeten LHCII - Mutanten waren mit einem solchen Hexahistidylrest (His₆ - Tag) ausgestattet. Die Bindung kann wie folgt beschrieben werden: Die bereits erwähnte Sepharose ist in der Lage, Nickel über drei von sechs Koordinationsstellen im Sinne eines Chelatkomplexes zu binden. Dies geschieht über IDA-Gruppen (Iminodiacetic acid) (vgl. Kågedal, 1989). Die anderen drei Koordinationsstellen des Nickels werden anschließend dazu genutzt, das Protein über seinen His₆-Tag an dieses Ni - Sepharose - Konstrukt zu binden. Das so entstandene „Sandwich“ aus Sepharose -- Nickel -- Protein kann später durch die Zugabe

von Substanzen wie Imidazol wieder aufgelöst werden. Imidazol hat eine höhere Bindungsaffinität für Nickel als der His₆ - Tag und verdrängt dadurch die gebundenen His₆ - Tag - Proteine im Sinne einer Substitutionsreaktion von der Ni - Sepharose - Matrix. Die so mobil gewordenen Pigment-Protein-Komplexe kommen dabei räumlich sehr dicht zusammen, was wahrscheinlich zur Trimerisierung der Komplexe führt.

Vor dem eigentlichen Auftrag von Protein auf das Säulenmaterial mussten mehrere vorbereitende Schritte durchlaufen werden: Zunächst wurde das verwendete Sepharose - Material in kleine Chromatographiesäulen überführt und anschließend sedimentiert. Im Anschluss folgte die Beladung des anfänglich weißen Materials mit 2 Volumina¹¹ 0,3 M Nickelchlorid - Lösung. Überschüssiges Nickel wurde danach mit Hilfe von 3 Volumina 50 mM Tris - HCl - Puffer (pH 7,5) von der Säule entfernt. Nach diesem Schritt nahm die Ni - Sepharose - Matrix ihre charakteristische hellblaue Färbung an.

Nach Abkühlen der Säule auf 4°C und Äquilibrieren mit zwei Volumina OG - Puffer erfolgte die eigentliche Beladung der Säulen mit den gemäß Abschnitt 2.3.4 hergestellten LHCII - Monomeren. Als Faustregel galt dabei, dass auf ein aufgeschichtetes Säulenvolumen von 250 µl Sepharose - Material auch etwa 250 µg Protein aufgetragen werden konnte. Nach dem Durchlaufen der Rekonstitutions - Lösung durch die Säulenmatrix verblieb eine stark grüne Schicht in der oberen Zone der Sepharose, was auf gebundene Komplexe schließen ließ. Nach einer Überschichtung der Säulenmatrix mit 200 µl OG - Puffer (Verschließen der Säule mit einem Stopfen) wurde der gesamte Ansatz für 30 Minuten dunkel bei 4°C inkubiert.

Im Anschluss an diese Inkubationszeit folgten drei Waschschrte der gebundenen Komplexe mit OG - Puffer und zwei mit Triton- X100 - Puffer (TX - Puffer). Im Anschluss daran folgte das Ablösen der Komplexe durch Zugabe von Imidazol- haltigem Eluat - Puffer. Nach Zugabe von etwa 5 Säulenvolumina dieses Puffers waren alle zuvor an die Säulenmatrix gebundenen LHCII - Komplexe wieder eluiert.

Anschließend wurde das Säulenmaterial durch Zugabe von größeren Mengen an Detergenz- und Imidazol- haltigem Puffer (2% SDS (w/v) und 0,4 M Imidazol) regeneriert und wieder nach 20% Ethanol überführt. Es konnte für mehrere Versuche verwendet werden.

Material:

Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Säule: Poly-Prep Chromatography Column	Bio-Rad (Hercules, USA)
0,3 M NiCl ₂	
50 mM Tris - HCL pH 7,5	

OG - Puffer: 1% OG (w/v); 0,1M Tris-HCl pH 9,0; 12,5% Saccharose;

TX - Puffer: 0,05% Triton-X 100 (v/v); 0,1 M Tris-Hcl pH 7,5; 0,1 mg/ml DPPG

Eluat - Puffer: 0,05% Triton-X 100 (v/v); 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,3 M Imidazol; 0,1 mg/ml DPPG

¹¹ In der Folge wird mit Volumina immer „Säulenvolumina in Bezug auf das Volumen der aufgeschichteten Sepharose - Menge“ gemeint.

2.3.6 Saccharosedichtegradienten - Zentrifugation

Mit Hilfe der Dichtegradienten Ultrazentrifugation wurden während dieser Arbeit monomere und trimere LHCII - Komplexe von freiem Pigment und voneinander getrennt. Dabei wurden kontinuierliche Saccharosegradienten verwendet, die durch zweimaliges Auftauen- und Einfrieren der Gradientenröhrchen hergestellt wurden. Man nutzt dabei die unterschiedlichen Schmelzpunkte der beiden Hauptkomponenten Wasser und Saccharose der Gradientenlösung aus. Beim Einfrieren verdrängt die schwerere Zuckerlösung die sich bildenden Wasserkristalle nach oben, so dass sich ein Gradient aufbaut, der oben im Röhrchen praktisch vollständig aus Wasser und ganz Unten aus der Zuckerlösung besteht. Durch die beiden Frier- Tau - Zyklen wird dabei die Linearität des Gradienten verbessert. Zusätzlich sind in den Gradienten 0,15 LM als Detergenz enthalten, damit die aufzutrennenden Komplexe nicht aggregieren.

Folgende Gradienten und Laufbedingungen wurden verwendet:

Trennungen im SW 41Ti bzw. TST41.14 - Rotor:

Laufbedingungen: 37000 UpM bei 4°C und für 17 Stunden

Gradienten: 0,3 M Saccharosegradienten:

Trennungen mit dem SW60Ti - Rotor:

Laufbedingungen: 57000 Upm bei 4°C und für 17 Stunden

Gradienten: 0,5 M Saccharosegradienten:

Verwendete Gradienten: 0,3 M bzw. 0,5 M Saccharose (w/v); 0,1% Laurylmaltosid (LM) (v/v); 5 mM Tricine (pH 7,8)

Nach einem Zentrifugenlauf, meist über Nacht, konnten am folgenden Tag die aufgetrennten Komplexe mittels einer Spritze aus den Gradienten abgesaugt werden und standen für weitere Analysen bereit.

2.3.7 Konzentrationsbestimmung von LHCII

Mittels eines von Butler und Kühlbrandt 1988 bestimmten molaren Extinktionskoeffizienten ist es möglich, die LHCII - Konzentration von monomerem und trimerem LHCII photometrisch zu bestimmen. Dazu wird eine Mehrfachbestimmung in geeigneter Konzentration durchgeführt. Vorgenommene Verdünnungen müssen anschließend eingerechnet werden.

Es gilt folgender Zusammenhang für monomeren LHCII in Detergenzumgebung:

$$\epsilon_{\text{LHCII}} = 5,46 \times 10^5 \text{ [cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}\text{]}$$

Nach dem Gesetz von Lambert und Beer folgt daraus für eine 1 cm - Küvette:

$$c_{\text{LHCII}} = E_{\text{LHCII}} / \epsilon_{\text{LHCII}} \text{ [Mol/L]}$$

(E = gemessene Absorbanz; ϵ = molarer Extinktionskoeffizient; c = Konzentration in Mol/L)

2.3.8 Extraktion von Pigmenten aus aufgereinigtem LHCII

Zur späteren Pigmentuntersuchung der abgetrennten rekonstituierten Lichtsammelantennen müssen zunächst die Pigmente aus dem umgebenden Medium, in dem sie aufgetrennt wurden, extrahiert werden (vgl. Martinson & Plumley, 1995).

Im Fall der mittels Saccharosedichtegradienten aufgetrennten Komplexe wurden die abgesaugten Komplexbanden wie folgt weiter aufgearbeitet:

Zu etwa 200 μl der grünen Saccharoselösung mit den Komplexen wurden 66 μl sec-Butanol zugegeben. Nach einer 5 minütigen Wartezeit folgte die Zugabe von 33 μl einer 5 M Salzlösung. Dadurch wurde eine deutliche Phasentrennung induziert. Anschließend wurde für 5 Minuten bei 14000 Upm [25200 x g] in der Hettich Tischzentrifuge zentrifugiert und die grüne organische Oberphase abgehoben. Die wässrige Unterphase wurde durch Zugabe von weiteren 33 μl Butanol ein zweites Mal extrahiert. Nach Vereinigung der beiden pigmenthaltigen organischen Phasen wurden die Extrakte kurz bei -20°C eingefroren, um in ihnen enthaltenes Restwasser auszufrieren. Anschließend standen die Proben für eine Pigmentbestimmung mittels analytischer HPLC zur Verfügung (siehe auch Abschnitt 2.4.2.2)

Material:

Aqua dest.

sec-Butanol

5 M NaCl

2.4 Pigmente

2.4.1 Pigmentisolation aus Erbse

2.4.1.1 Herstellung von Totalpigmentextrakt

Als Ausgangsmaterial für die Pigmentextraktion wurden Erbsen verwendet, die zuvor selbst angezogen wurden. Nach einer 24 stündigen Quellung wurden die Erbsen in Vermiculit ausgesät und danach im Klimaraum ca. 14 Tage lang angezogen. Im Klimaraum herrschten folgende Bedingungen: 16 Stunden Beleuchtung (ca. $150 \mu\text{mol} \cdot \text{e}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und 20°C Raumtemperatur.

Nach den 14 Tagen erfolgte das Ernten der Erbsenblätter und die Herstellung eines Totalpigmentextraktes.¹² Zunächst wurden dazu mit einer Schere die oberen Blätter der ca. 14 Tage alten Pflanzen geerntet und grob zerkleinert. Das Frischgewicht dieser Blätter betrug meist ca. 1000 g. Nach Zugabe von etwa 1,5 Litern Aufschlußpuffer erfolgte das Zerkleinern der Blätter im Waring Blendor zu einer durchschnittlichen Blattgröße von ca. 2 - 4 mm^2 . Das entstandene Homogenat wurde durch 3 Lagen Baumwollgaze in 500 ml Zentrifugenbecher abfiltriert und danach 10 Minuten bei 4°C , 10000 UpM im JLA-10500 Rotor zentrifugiert (Beckmann Kühlzentrifuge). Der abgetrennte Überstand wurde

¹² Anmerkung: Alle folgenden präparativen Schritte wurden auf Eis und unter abgedunkelten Beleuchtungsverhältnissen durchgeführt.

verworfen und das Pellet in insgesamt 500 ml Aceton resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der acetonische Überstand (Totalpigmentextrakt) in einem Becherglas auf Eis gesammelt und dunkel gelagert.

Material:

Pisum sativum var. Golf ca. 14 Tage alt
 Aufschlußpuffer: 25 mM Tris (pH 7.5); 1 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT);
 330 mM Sorbitol

100% Aceton

Die meisten in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit solchem **Totalpigmentextrakt** durchgeführt. Neben den Pigmenten Chlorophyll *a*, Chlorophyll *b*, Neoxanthin, Violaxanthin, Lutein und β -Carotin enthält dieser Extrakt auch alle Lipide des pflanzlichen Blattes, da diese zusammen mit den Pigmenten in bei der Extraktion in die organische Phase übergehen.

Im Anschluss an die Präparation musste der acetonische Totalpigmentextrakt eingetrocknet werden. Dazu wurde er in einem Scheidetrichter mit peroxidfreiem Diethylether überschichtet und anschließend ausgeschüttelt. Die Pigmente (und Lipide) wechseln dabei aus der wässrigen Acetonphase in die organische Etherphase über. Nach mehrfachem Waschen dieser Etherphase mit dest. Wasser wurde die Etherphase abgenommen und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers unter Vakuum getrocknet. Anschließend konnte dieser Totalextrakt in wasserfreiem Aceton wieder aufgenommen, photometrisch quantifiziert und anschließend aliquotiert werden. Danach wurde er mit Stickstoff 5.0 wieder eingetrocknet und konnte für mehrere Monate bei -20°C eingelagert werden.

2.4.1.2 Trennung von Chlorophyllen und Xanthophyllen mit 1,4-Dioxan

Für einige der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden Einzelpigmente benötigt. Diese konnten durch den im Anschluss beschriebenen Trennungsgang erhalten werden. Zunächst erfolgte eine Trennung der Chlorophylle und Xanthophylle mit Hilfe von Dioxan.

Dazu wurden in den noch nicht eingetrockneten Totalpigmentextrakt (in 500 ml Aceton / siehe vorheriges Kapitel) unter ständigem ständigem Rühren und Kühlung mit einem Tropftrichter 75 ml 1,4-Dioxan zugetropft und anschließend noch 160 ml Aqua dest. Die letzten 60 ml Wasser wurden sehr langsam zugegeben. Anschließend wurde der Rührer ausgeschaltet und eine Stunde auf Eis absitzen lassen. Die ausgefällten Chlorophylle wurden danach 10 Minuten bei 4°C und 10000 UpM (Beckmann Kühlzentrifuge, Rotor JLA - 10500) abzentrifugiert. Das Chlorophyllpellet wurde mit Diethylether aufgenommen und mehrmals mit Wasser gewaschen. Zur besseren Phasentrennung wurde 5M Salzlösung zugegeben. Danach wurde die Etherphase abgenommen und verbleibendes Restwasser über Nacht ausgefroren.

Der gelbliche Überstand mit den Xanthophyllen wurde ebenfalls in Diethylether aufgenommen und anschließend mehrmals mit Wasser gewaschen. Auch hier erfolgte die Zugabe von Salzlösung zur besseren Phasentrennung und Vermeidung der Emulsionsbildung. Anschließend folgte auch hier das Ausfrieren von Restwasser über Nacht.¹³

¹³ Die Lipide aus dem Totalpigmentextrakt werden durch die Dioxanfällung nicht entfernt. Sie verbleiben relativ gleichmäßig in beiden erhaltenen Pigmentpopulationen und können erst durch eine präparative HPLC vollständig aus den Einzelpigmenten entfernt werden.

Am nächsten Tag konnten beide Etherphasen durch Abnutschen vom ausgefrorenem Restwasser befreit und danach im Rotationsverdampfer eingetrocknet werden. Zur Lagerung der Kolben mit dem isolierten Pigment wurden diese mit Stickstoff überschichtet.

Material:

1,4-Dioxan
Totalpigmentextrakt
Aqua dest.
Diethylether (1x Dest.)
5 M NaCl - Lösung
Stickstoff 5.0

2.4.1.3 Trennung der Chlorophylle mittels präparativer HPLC

Zur Trennung von Chlorophyll *a* und *b* und zur Abtrennung von Chlorophyllderivaten wie z.B. Hydroxy- und phäophytinisiertem Chlorophyll wurde ein präparatives HPLC - System verwendet. Hierbei wurde ein C 18 - Material als stationäre Phase eingesetzt und ein Aceton / Wasser - Gradient als mobile Phase. Dadurch wird es möglich, die Chlorophylle aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität aufzutrennen.

Außerdem können Reste von Xanthophyllen als Vor- bzw. Nachlauf abgetrennt werden.

Material:

100% Aceton (filtriert und entgast)
86% Aceton (filtriert und entgast)
Wasser reinst (entgast und mit 0.1 mM Hepes, pH 7.0 gepuffert)
Eingetrocknete Chlorophylle unter Stickstoff
Diethylether

Präparative HPLC:

Säule: C18; 125 Å; 10 µm; 30x300 mm.

Detektoreinstellungen: GAT LCD 500:
Rise Time 0,3
Range 0,005
Wavelength 440 nm

Shimadzu RF 535:
Excitation 425 nm
Emission 680 nm
Response fast
Range 2
Sensitivity high

Programm: „CHLGRAD“ Dauer: max. 505 min.

<u>Programmierter Gradient</u> (Fluß auf 5 ml/min.)	A [%]	B [%]	t [min]	Δt [min]
	86	14	5	5
	86	14	105	100
	88	12	275	170
	100	0	325	50
	100	0	505	180

Da sich das Säulenmaterial vor der Trennung in 100% Aceton befand, musste zunächst eine Äquilibrierung auf den Startgradient von 86/14 vorgenommen werden. Dies erfolgt unter geringem Fluss über Nacht. Erst danach konnte eine Probe zur Trennung aufgetragen werden.

Die eingetrockneten und unter Stickstoff gelagerten Chlorophylle wurden in 86 ml 100% Aceton aufgenommen, im Ultraschallbad homogenisiert und anschließend mit 14 ml gefiltertem und entgastem Wasser auf 86% Acetongehalt eingestellt. Es folgte ein 10 minütiges Abzentrifugieren von wieder ausgefallenem Chlorophyll (Löslichkeitsprodukt in 86% Aceton niedriger als in 100% Aceton) bei RT (!) und 12000 UpM (Beckmann Kühlzentrifuge, JLA - 10500). Der Überstand wurde rasch abgegossen und in zwei 50 ml Portionen in eine spezielle Probenauftragsschleife, den Super - Loop eingefüllt. Anschließend erfolgte der Auftrag des Probenmaterials auf die Trennsäule.

Nachdem beide Loop - Füllungen auf die Säule aufgetragen worden waren, wurde das Programm „CHLGRAD“ gestartet und die Trennung vorgenommen.

Nach ca. zwei Stunden konnte eine Chlorophyll *b* - Fraktion aufgefangen werden, die direkt in Diethylether überführt und mehrmals mit Wasser gewaschen wurde. Nach erfolgter Phasentrennung wurde die Etherphase mit dem Chlorophyll im Rotationsverdampfer eingetrocknet und anschließend in einem definierten Volumen 100% Aceton wieder aufgenommen. Es folgte die Qualitätsprüfung mit der analytischen HPLC und gleichzeitig die Konzentrationsbestimmung mittels Photometer bzw. HPLC.

Ca. nach 2,5 Stunden konnte eine Chlorophyll *a* - Fraktion aufgefangen werden, mit der genauso verfahren wurde, wie mit der Chlorophyll *b* - Fraktion zuvor. Auch hier erfolgte eine Überführung in Ether, anschließendes Waschen und schließlich das Eintrocknen mittels Rotationsverdampfer. Wiederum erfolgte die Analyse und Quantifizierung mit Photometer und HPLC.

Danach wurden beide getrennten Chlorophylle aliquotiert, wieder eingetrocknet und mit Stickstoff überschichtet. Die Lagerung konnte für mehrere Monate bei -20°C erfolgen.

Es sei an dieser Stelle anzumerken, dass diese Einzelchlorophylle nach der HPLC frei von Lipiden sind. Dies konnte mit Hilfe von mehreren Dünnschichtchromatogrammen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

2.4.1.4 Aufreinigung und Trennung der Xanthophylle

Die Xanthophylle wurden bereits durch die Dioxanfällung (Abschnitt 2.4.1.2) von den Chlorophyllen getrennt und mussten im Folgenden noch voneinander separiert werden. Zunächst erfolgte ein Reinigungsschritt zum Beseitigen von nicht vollständig abgetrenntem Chlorophyll.

- **Verseifung des Rohxanthophyllextraktes nach der Dioxanfällung**

Die eingetrockneten und unter Stickstoff gelagerten Xanthophylle, die durch die Dioxanfällung isoliert werden konnten, wurden mit 50 ml Ethanol aufgenommen, im Ultraschallbad homogenisiert und mit 5 ml 60% KOH versetzt. (Verseifung der im Xanthophyllextrakt verbliebenen Chlorophylle und Lipide zu wasserlöslichen Substanzen.) Danach erfolgte die Inkubation über Nacht in einem auf 30°C eingestellten Brutschrank. Am folgenden Tag konnten die Xanthophylle in

Diethylether überführt werden, mehrmals mit Wasser gewaschen und anschließend von der wässrigen Phase mit den verseiften Chlorophyllen abgetrennt werden. Die abgetrennte wässrige Phase wurde noch einmal mit Ether nachextrahiert, um die Ausbeute an Xanthophyllen zu erhöhen.

Von der hier vorgenommenen Verseifung sind auch die im Rohxanthophyll-extrakt enthaltenen Lipide betroffen. Sie werden ebenfalls zum großen Teil verseift und können so grob abgetrennt werden.

Die vereinigte deutlich gelb - orange Etherphase wurde anschließend im Rotationsverdampfer eingetrocknet und mit Stickstoff überschichtet. Anschließend konnte die Trennung mittels präparativer HPLC erfolgen.

Material:

Eingetrocknete Xanthophylle unter Stickstoff
Ethanol
60% Kaliumhydroxid - Lösung
Diethylether
Aqua dest.

• **Trennung der Xanthophylle mit der präparativen HPLC**

Analog zu der beschriebenen Trennung der Chlorophylle mit der präparativen HPLC wurden auch die Xanthophylle mit dieser Methode aufgetrennt. Das dazu verwendete Programm „Xangrad“ beginnt mit einem Aceton / Wasser - Gradient von 76% Aceton, so dass die Rohxanthophylle zunächst in 76% Aceton aufgenommen werden mussten und nach Zentrifugation bei Raumtemperatur über den Super-Loop auf die Trennsäule aufgetragen wurden. Nach etwa 1,5 Stunden konnte auch hier mit dem Auffangen der einzelnen Xanthophylle begonnen werden. Analog zu der bereits beschriebenen Prozedur wurden die Pigmente direkt in Ether überführt und im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Anschließend folgte wiederum die Trocknung mit Hilfe des Rotationsverdampfers. Später wurden auch hier die Pigmente in einem definierten Volumen wasserfreien Aceton wieder aufgenommen, quantifiziert und aliquotiert. Danach standen sie für weitere Versuche zur Verfügung und wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Auch hier sei anzumerken, dass die Pigmente erst nach der präparativen HPLC vollständig frei von Lipiden waren (Dünnschichtchromatogramme nicht gezeigt).

Material:

Eingetrocknete Xanthophylle nach Verseifung.
100% Aceton
76% Aceton (gepuffert mit 1 mM Hepes - KOH pH: 7,5.)
Aqua dest.
Diethylether

Programm: „XANGRAD“ Dauer: max. 360 min.

<u>Programmierter Gradient</u> (Fluß auf 5 ml/min.)	A [%]	B [%]	t [min]	Δt [min]
	76	24	5	5
	76	24	100	100
	100	0	270	170
	100	0	360	90

2.4.2 Charakterisierung und Quantifizierung der isolierten Pigmente

Zur Charakterisierung und Quantifizierung der isolierten Pigmente wurden im Verlauf dieser Arbeit zwei Methoden benutzt, die im folgenden beschrieben werden.

2.4.2.1 UV-Vis Spektroskopie

Von allen isolierten Pigmenten wurden sowohl Absorptionsspektren als auch Extinktionen bei definierten Wellenlängen bestimmt. Dabei wurde zunächst eine geeignete Verdünnung in 80% Aceton hergestellt, die dann per Photometer vermessen wurde.

Zunächst wurde ein Absorptionsspektrum über einen Bereich von 750 - 400 nm aufgenommen, danach folgte zur Quantifizierung der Pigmente eine Messung bei genau definierten Wellenlängen. Zuvor wurde ein Nullabgleich bei 750 nm durchgeführt.

Nach Porra *et al.* (1989) gilt für die Chlorophyllkonzentration in 80% Aceton:

- **Chl a = 12,3 $A_{663,6}$ - 2,55 $A_{646,6}$ [µg/ml]**
- **Chl b = 20,3 $A_{646,6}$ - 4,9 $A_{663,6}$ [µg/ml]**

Für Proben in 100% Methanol gelten folgende Formeln:

- **Chl a = 16,29 $A_{665,2}$ - 8,54 $A_{652,0}$ [µg/ml]**
- **Chl b = 30,66 $A_{652,0}$ - 13,58 $A_{665,2}$ [µg/ml]**

Zur Quantifizierung der isolierten Xanthophylle wurde die Beziehung zwischen Absorbanz und Konzentration von Xanthophyllen nach Davies (1976) herangezogen:

Eine Absorbanz von 0,24 bei 440 nm entspricht dabei einer Konzentration von 1 µg/ml.

Material:

80% Aceton

Verdünnte Pigmentextrakte in 80% Aceton

2.4.2.2 Pigmentanalyse mittels analytischer HPLC

Bei der analytischen HPLC - Analyse werden die Pigmente mit Hilfe einer Reversed Phase - Säule (RP - Säule) mit einem geeigneten Laufmittel nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt. Analog zu dem Laufmittel, das schon bei der Beschreibung der präparativen HPLC genannt wurde, wurde auch hier mit einem Aceton / Wasser - Gradient gearbeitet. Die Trennung der Pigmente erfolgte über eine RP - Säule in 6,5 Minuten. Eintrocknete Pigmente wurden vor der Messung in 70% Aceton aufgenommen und mit Hilfe einer Auftragspritze in das System injiziert. Butanolextrakte wurden direkt vor der HPLC - Messung 2:1 mit 70% Aceton gemischt.

Während dieser Arbeit wurde die analytische HPLC zur Qualitätskontrolle frisch hergestellter bzw. länger gelagerter Pigmentaliquots und zur Kontrolle von rekonstituiertem LHCII auf Pigmentveränderungen verwendet.

Nach dem entsprechenden HPLC - Lauf wurde im ersten Fall anhand des Derivatisierungszustandes des jeweilig untersuchten Pigments entschieden, ob die betreffende Pigmentcharge für weitere Rekonstitutionsexperimente genutzt werden konnte. Prinzipiell wurden nur solche Pigmente weiter verwendet, die einen Derivatisierungsgrad von 8% nicht überschritten.¹⁴ Im zweiten Fall der Kontrolle bereits rekonstituierter LHCII - Komplexe auf Pigmentveränderungen wurde anhand der bestimmten Pigmentstöchiometrien entschieden, ob diese Komplexe weiteren Untersuchungen zugeführt werden sollten oder nicht.

2.4.3 Entfernen von Lipiden aus Pigmentextrakten

Wie bereits beschrieben, ist es nur durch eine Auftrennung der Pigmente des Totalpigmentextrakts mit Hilfe der präparativen HPLC möglich, alle Lipide aus diesem Extrakt vollständig zu entfernen.

An dieser Stelle soll dennoch eine weitere Methode genannt werden, die eine Möglichkeit darstellt, ohne großen apparativen Aufwand etwa 90% aller Lipide aus Pigmentextrakten zu entfernen. Lediglich das mengenmäßig am häufigsten vertretene Lipid MGDG (vgl. Einleitung dieser Arbeit) kann mit dieser Methode nur unvollständig entfernt werden. Alle anderen Lipide, wie etwa die Phospholipide, werden vollständig abgereichert.

Es handelt sich dabei um eine Säulenchromatographie der Pigmentextrakte mit einer Kieselsäure - Säule (vgl. Rouser *et al.* 1967). Zunächst wurde 1g sedimentierte, mittelfeine Kieselsäure in Chloroform aufgeschlämmt und in eine leere Chromatographiesäule gefüllt. Zuvor wurde dieser Kieselsäure eine Spartelspitze an Na - Ascorbat untergemischt. Nach Sedimentation wurden auf diese Säule in Chloroform aufgenommene Pigmentextrakte mit einem Chlorophyllgehalt von 1 mg (maximal) aufgetragen. Nach dem Auftrag der Pigmente wurde die Säule mit 5 ml Chloroform, gefolgt von 10 ml Aceton gewaschen. Der Chloroform- und acetonhaltige Durchlauf der Säule wurde dabei auf Eis gesammelt und anschließend direkt wieder eingetrocknet. Er enthielt die auf diese Weise nahezu lipidfrei gemachten Pigmente. Das Lipid, das bis zu diesem Zeitpunkt an die Kieselsäuren - Matrix gebunden war, konnte anschließend durch die Zugabe von 5ml Methanol von der Säule eluiert werden und stand als Nebenprodukt der Reinigung für weitere Versuche zur Verfügung. Die „lipidfreien“ Pigmente wurden anschließend direkt wieder eingetrocknet und bei -20°C für weitere Versuche gelagert.

Material:

Totalpigmentextrakt	[1 mg]
Säule: Poly-Prep Chromatography Column	Bio-Rad (Hercules, USA)
Kieselsäure, gefällt schwer	Merck (Darmstadt)
	[feines Material (<1µm), wurde durch Sedimentation abgetrennt]
Chloroform p.A.	
Aceton p.A.	
Methanol p.A.	

¹⁴ Gemeint sind z.B. Hydroxylierungen der Chlorophylle etc.

2.5 Spektroskopische Methoden

Die im Folgenden kurz beschriebenen Methoden der CD- und Fluoreszenz - Spektroskopie wurden während dieser Arbeit immer wieder dazu benutzt, um die Qualität der rekonstituierten und teilweise oligomerisierten LHCII - Komplexe vor- und nach diverser Prozessschritte, wie zum Beispiel Aufkonzentrierungen zu kontrollieren. Erst, wenn diese „Qualitätsprüfung“ erfolgreich verlaufen war, wurden die Komplexe weiteranalysiert und z.B. der ESR - Messung am MPI zugeführt.

2.5.1 CD - Spektroskopie

Die meisten biologischen Moleküle haben die Eigenschaft, rechts- und links - zirkular polarisiertes Licht in unterschiedlichem Maße zu absorbieren. Mit Hilfe der **Circular Dichroismus** - Spektroskopie kann diese Differenz in der Absorption in einer Probe bestimmt werden und anschließend als CD - Spektrum ausgedrückt werden.

Zirkular polarisiertes Licht kann dabei auf zwei Arten von einem Molekül absorbiert werden. Entweder tritt eine intrinsische, d.h. durch das Chromophor selbst bedingte Ladungsverschiebung (Anhebung eines Elektrons auf ein höheres energetisches Niveau) auf, oder es kommt zu einer excitonischen Kopplung, also einer gegenseitigen Beeinflussung von Übergangsdipolen von mehreren an das Molekül gebundener Chromophore (Schmidt 2000). Solche excitonischen Interaktionen führen zu einer Veränderung der Absorptionseigenschaften, so dass man eine Aufspaltung der Absorptionsbande in zwei unterschiedliche Banden beobachten kann. Je nach Stärke der Absorption tritt letztlich entweder ein positives oder ein negatives Signal auf, wobei der Nulldurchgang zwischen beiden Signalen der Wellenlänge der ursprünglichen Absorption entspricht. Diese Bandenform nennt man *konservativ* und ist auch bei der CD - Spektroskopie von Pigment - Protein - Komplexen wie dem LHCII zu beobachten.

Im Fall des LHCII beruht das charakteristische entstehende CD - Spektrum dabei auf der excitonischen Kopplung der an das Proteingerüst gekoppelten Pigmente. Die Abstände und die Orientierung der einzelnen Chromophore zueinander bestimmen das Signal. Ändern sich diese Parameter aufgrund z.B. eines beginnenden Zerfalls des Komplexes, ausgelöst etwa durch zu stringent durchgeführte Aufarbeitungsschritte während der Probenpräparation, so ist dies sofort am resultierenden CD - Signal erkennbar. Somit wird es durch den Vergleich mit „unveränderten“ Vergleichsproben bzw. mit Spektren von nativem LHCII möglich, die CD - Spektroskopie als eine Art „Qualitätskontrolle“ für die rekonstituierten und weiterverarbeiteten LHCII - Komplexe zu verwenden.

Alle Spektren wurden bei 4°C aufgenommen. Dabei wurden folgende Messparameter verwendet:

Wellenlängenbereich:	350 - 750 nm
Scan Speed:	50 nm/min
Sensitivity:	100 mdeg
Data Pitch:	0,5 nm
Band Width:	4 nm
Response Time:	4 sec

2.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Ähnlich wie bei der CD - Spektroskopie wurde auch mit dieser Methode meist die Intaktheit der präparierten LHCII - Komplex vor- und nach verschiedenen Aufarbeitungsschritten untersucht.

In einem korrekt gefalteten und intakten LHCII - Komplex wird die aufgenommene Lichtenergie des Chlorophyll *b* nahezu vollständig auf Chlorophyll *a* übertragen. Regt man einen solchen Komplex spezifisch bei einer Anregungswellenlänge des Chlorophyll *b* wie 470 nm an, so erhält man eine Fluoreszenz des Chlorophyll *a* bei 680 nm. Wird der Komplex etwa durch zu stringent durchgeführte Aufreinigungsschritte zunehmend zerstört, kann man dies sofort an der schwächer werdenden Chlorophyll *a* - Fluoreszenz erkennen. Zudem steigt die Eigenfluoreszenz des Chlorophyll *b* an, da es seine Energie nicht mehr auf ein anderes Chromophor übertragen kann.

Die Fluoreszenzmessungen in Lösung fanden in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 5 mm statt. Dabei wurde die sog. „Front Face“ - Apparatur verwendet, bei der die Emission im rechten Winkel zum Anregungslicht detektiert wird. Die Küvettenhalterung wurde während aller Messungen auf 20°C gekühlt.

Messparameter:

Anregung:	470 nm
Detektion :	680 nm
Slit:	3 / 3
Lamp Level:	2
Signal:	S/R
Integrationszeit:	0,1 s

2.6 Spezielle Methoden im Rahmen der Phospholipid - Bindungsstudie

2.6.1 Rekonstitution von LHCII mit Überschuss an PG

Im Rahmen der Untersuchungen zur Phospholipidbindung an LHCIIb wurden Detergenzwechsel - Rekonstitutionen vorgenommen, bei denen in Abwandlung zu der unter Kapitel 2.3.4 beschriebenen Methode ein Überschuss des Phospholipids Phosphatidylglyzerin (PG) zugegeben wurde. Dadurch sollte erreicht werden, dass während des Vorgangs der Rekonstitution jede potentielle PG - Bindestelle des LHCII sicher besetzt werden konnte und PG nie zum limitierenden Faktor werden würde.

Zu diesem Zweck wurden in Addition zu dem im eingesetzten Totalpigmentextrakt bereits enthaltenen nativen PG (vgl. Kapitel 2.4.1.1) nochmals ein 20 - fach molarer Überschuss (im Bezug zur eingesetzten molaren Proteinmenge) in Form von synthetischen DPPG zugesetzt. Diese Vorgehensweise steht im Einklang mit den Ergebnissen von Stephan Hobe (1995, Dissertation), der im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Lipidabhängigkeit der Trimerisierung des LHCII feststellte, dass ab einem molaren Lipid zu Protein - Verhältnis von 17 keine signifikante Steigerung der Trimerausbeute bei *in vitro* - Trimerisierungsversuchen möglich ist. Ab diesem Lipid zu Protein - Verhältnis sollten also die meisten der möglichen PG - Bindestellen am LHCII bereits besetzt sein.

In Abwandlung zu der unter Kapitel 2.3.4 angegebenen Methode wurde dazu direkt nach der Zugabe der Pigmente zu dem in Solubilisierungspuffer gelösten Protein 30 µl einer 5 mg/ml Stammlösung von DPPG zugegeben. Anschließend wurde kurz gemischt und etwa eine Minute lang inkubiert. Danach wurde wie bereits in Kapitel 2.3.4 beschrieben mit der Zugabe des zweiten Detergenz OG fortgeföhren.

Material:

DPPG 5 mg/ml - Stamm in H₂O (Avanti)

2.6.2 Immobilisierung und stringentes Waschen von LHCII

Im Anschluss an die Rekonstitution mit einem Überschuss an PG gemäß 2.6.1 wurden die so hergestellten LHCII - Monomere an Ni - Sepharose immobilisiert und mit verschiedenen Detergenzien gewaschen. Im Gegensatz zu der im Kapitel 2.3.5 geschilderten Methode diente dieser Schritt nicht zum Zweck der Oligomerisierung des LHCII zu Trimern, sondern dazu, nicht stringent an die LHCII - Komplexe gebundenes Phospholipid von den Komplexen abwaschen zu können. Nur solches PG sollte später analysiert werden, dass fest an den LHCII gebunden war.

Die Vorbereitung der Ni - Sepharose - Säulen und ebenfalls die Bindung der rekonstituierten LHCII - Komplexe erfolgte gemäß der bereits unter Kapitel 2.3.5 beschriebenen Methode. Im Anschluss an die 30 minütige Inkubationszeit folgten allerdings von der dort angegebenen Methode abweichende Waschschrirte: Es wurde mit fünf bis sieben Volumina an OG - Puffer gewaschen, was zu einer vollständigen Entfernung des freien, nur assoziierten PG von den Komplexen führte. Danach folgte die Zugabe von zwei Volumina TX - Puffer und das anschließende Eluieren der Komplexe mit Eluat - Puffer. Sowohl der TX - als auch der verwendete Eluat - Puffer enthielten dabei kein zusätzliches DPPG, so dass es selbst im Fall der trimerisierungsfähigen Wildtyp - Mutante C3.2h nur zu einer minimalen Trimerisierungsrate von maximal 10% der eingesetzten Komplexe kam. Im Anschluss an dieses stringente Waschen der Komplexe folgte die Analyse des an die Komplexe fest gebundenen Phospholipids mittels verschiedener Methoden.

Material:

Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Säule: Poly-Prep Chromatography Column	Bio-Rad (Hercules, USA)
0,3 M NiCl ₂	
50 mM Tris - HCL pH 7,5	

OG - Puffer: 1% OG (w/v); 0,1 M Tris - HCl pH 9,0; 12,5% Saccharose;

TX - Puffer: 0,05% Triton - X100 (v/v); 0,1M Tris - HCl pH 7,5;

Eluat - Puffer: 0,05% Triton - X100 (v/v); 10 mM Tris - HCl pH 7,5; 0,3 M Imidazol;

2.6.3 Bio - Beads - Behandlung von aufgereinigtem LHCII

Mit Hilfe von Bio - Beads SM-2 der Firma Bio-Rad sollten im Anschluss an die *in vitro* - Rekonstitution und Säulenbehandlung (Kapitel 2.6.1 und 2.6.2) bzw. nach der Trennung der Komplexe von freiem Pigment durch eine Saccharose-

dichtegradienten - Zentrifugation (vgl. 2.3.6) die Hauptmenge an Detergenz aus den betreffenden Versuchsansätzen entfernt werden.

Bio Beads bestehen aus großporigen Polystyrolkugeln, die aufgrund ihrer großen Oberfläche und uniformen Porengröße in der Lage sind, mit einer Vielzahl von Lösungsmitteln, wie Alkoholen, Ethern, Hexan aber auch wässrigen Lösungen eingesetzt zu werden. Trockene Beads weisen eine Porengröße von 9 nm auf und können z.B. im Fall des Detergenz Triton - X100 0,07 g pro g Beads aufnehmen.

Während der hier durchgeführten Versuche wurden die Beads im Sinne eines so genannten Batch - Verfahrens zur Abreicherung von OG und LM eingesetzt. Vor der Inkubation mit den aufzureinigenden komplexhaltigen Lösungen, wie z.B. abgesaugten Gradientenbanden, wurden die trocken gelagerten Bio Beads zunächst in Wasser überführt und für ca. 30 Minuten unter Vakuum entgast. Dadurch sollte die gesamte Luft aus den porösen Styrolkugeln entfernt werden, um so eine bessere Aufnahme des Detergenz zu gewährleisten. Danach wurden meist 40 mg dieser entgasten Beads zu 100 µl aufzureinigender Lösung hinzu gegeben und auf dem Rüttler für 30 Minuten inkubiert. Anschließend konnten die Beads durch kurze Zentrifugation pelletiert werden und die Lösung abpipettiert werden. Danach wurden die Beads noch einmal mit einem Volumen Wasser nachgewaschen.

Material:

Bio-Beads SM-2 Hydrophobic
and Polar Interaction Adsorbents

Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)

2.6.4 Lipidextraktion nach Bligh und Dyer

Zum Nachweis von LHCII - gebundenem Phospholipid musste zunächst eine Lipidextraktionsmethode gefunden werden, die eine 100% ige Extraktion des proteingebundenen Lipids aus wässrigen, detergenzhaltigen Lösungen erlaubt. Hierzu wurde auf die in der Literatur weit verbreitete Extraktionsmethode von Bligh und Dyer von 1959 zurückgegriffen, die in leichter Abwandlung durchgeführt wurde. Bei dieser Methode erfolgt die Extraktion der Lipide durch Zugabe von Chloroform : Methanol im Verhältnis 1: 2 (v/v). Das in den Proben bereits enthaltene Wasser dient als ternäre Komponente des Systems. Nach Schütteln und weiterer Zugabe von Chloroform kann nach kurzer Zentrifugation eine organische Unterphase, bestehend aus Chloroform - Methanol - Wasser entnommen werden, die die gesamten Lipide enthält. Die obere Phase enthält die gleichen Agenzien aber kein Lipid. Zwischen beiden Phasen entsteht zudem eine Schicht mit dem ausgefällten Protein, durch die hindurchgestochen werden muss, um die Unterphase abzuziehen. Durch Zugabe von Salzlösung kann die Phasentrennung unterstützt werden.

Zu 600 µl lipidhaltiger Probe wurden 450 µl eines MeOH - CHCl₃ - Gemisches (2:1) und nach kurzem Schütteln weitere 150 µl CHCl₃ zugesetzt. Danach wurde kräftig gemischt und daraufhin kurz zentrifugiert. Es kam zu einer Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde abgezogen und bei grüner Färbung nochmals mit 100 µl CHCl₃ nachextrahiert. Die organische Unterphase wurde zum Entfernen von mitextrahiertem Detergenz mit 500 µl dH₂O und 10 µl NaCl gewaschen. Nachdem die wasserfreien organischen Phasen vereinigt

worden waren, wurden sie unter Stickstoff eingetrocknet und standen nun für weitere Lipidnachweisreaktionen zur Verfügung.

Durch Vergleichsversuche im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei korrekter Anwendung dieser Extraktionsmethode möglich ist, 100% des zuvor zu den Ansätzen zugesetzten Phospholipids nach der Extraktion wieder zu finden (Daten nicht gezeigt).

Material:

Chloroform p. A.

Methanol p. A.

5 M NaCl

dH₂O

2.6.5 Reinigung von Lipidextrakten

Die mit Hilfe der unter 2.6.4 erhaltenen Lipidextrakte aus LHCII - haltigen Proben waren meist mit großen Mengen an Detergenz und vor allem Pigmenten verunreinigt. Beide Komponenten stören in größeren Konzentrationen die weiter unten beschriebenen diversen Nachweismethoden für das Phospholipid PG wie etwa die Dünnschichtchromatographie oder die Gaschromatographie. Deshalb wurde eine Aufreinigung der Lipidextrakte mit Hilfe einer Kieselsäuren - Säule vorgenommen (vgl. Rouser *et al.* 1967). Wie bereits unter 2.4.3 beschrieben, kann man mit Hilfe dieser Methode Lipide aus Pigmentextrakten entfernen. Umgekehrt ist es natürlich auch möglich, zunächst nur die Pigmente und Detergenzien von der Säule zu waschen und danach das dadurch aufgereinigte Lipid von der Säule zu extrahieren.

Zunächst wurde wiederum 1 g sedimentiere, mittelfeine Kieselsäure in Chloroform aufgeschlämmt und in kleinen Chromatographie - Säulen sedimentiert. Danach wurden die zu reinigenden, zuvor eingetrockneten Lipidextrakte in 1 ml Chloroform aufgenommen und auf diese Säulenmatrix aufgetragen. Es folgte das Waschen der Säule mit 5 ml Chloroform, gefolgt von 10 ml Aceton. Später wurden diese Waschmengen auf 10 ml Chloroform und 20 ml Aceton erhöht. Durch diese Zugabe von Chloroform und Aceton konnte zunächst die Hauptmenge an Pigment und Detergenz von der Säule gewaschen werden. Anschließend wurden die zuvor noch fest an die Säulenmatrix gebundenen Lipide (PG) durch Zugabe von 10 ml Methanol von der Säule eluiert. Die so erhaltene mehr oder minder pigmentfreie Lipidfraktion konnte im Anschluss erneut unter Vakuum eingetrocknet werden und einer nachfolgenden Lipidanalyse zugeführt werden.

Hinweis: Es ist streng darauf zu achten, dass die verwendeten Lösemittel, vor allem das Aceton absolut wasserfrei sind, da sich ansonsten die Bindungseigenschaften der Kieselsäure vollständig verändern können!

Material:

Säule: Poly-Prep Chromatography Column
Kieselsäure, gefällt schwer

Bio-Rad (Hercules, USA)

Merck (Darmstadt)

[feines Material (<1µm), wurde durch Sedimentation abgetrennt]

Chloroform p.A.

Aceton p.A.

Methanol p.A.

2.6.6 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie diente in dieser Arbeit dazu Lipide, vor allem das Phospholipid Phosphatidylglyzerin, neben Detergenzien und Pigmenten in einer Probe zu visualisieren. Dabei nutzt man das unterschiedlichen Migrationsverhalten der gelösten einzelnen Lipide bzw. der Detergenzien und Pigmente aufgrund von Unterschieden in der Hydrophobizität in Bezug zu einer stationären Phase, in diesem Fall der Kieselgelplatte aus.

Folgende Laufmittel wurden verwendet (vgl. Bratt und Åkerlund, 1993 und 1994):

Laufmittel A:	Chloroform : Methanol : Ammoniak	==	65 : 30 : 4 (v/v/v)
Laufmittel B:	Chloroform : Methanol : Essigsäure : Wasser	==	85 : 15 : 10 : 3,5 (v/v/v/v)
Laufmittel C:	Aceton : Wasser : Essigsäure	==	48,5 : 0,5 : 1,08 (v/v/v)

Es zeigte sich, dass mit Laufmittel B für die hier untersuchte Fragestellung der Phospholipidbindung an LHCII die besten Ergebnisse erzielt werden konnten.

Die verwendeten Kieselgel - Platten wurden vor dem Gebrauch für 24 Stunden bei 120°C getrocknet und anschließend unter Trocknungsmittel gelagert.

Die zu analysierenden lipid- oder detergenzhaltigen Proben wurden zunächst, falls notwendig bis zur Trockene eingengt, und danach in 20 µl Chloroform rückgelöst. Anschließend folgte das Auftüpfeln auf eine Kieselgelplatte mit Hilfe einer dünnen Pipette, im späteren Verlauf der Arbeit mit Hilfe eines Autospotters. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgte in einer mit dem entsprechenden Laufmittel befüllten Trennkammer. Nachdem das Laufmittel eine Strecke von etwa 5-10 cm zurückgelegt hatte, wurde die Platte aus der Trennkammer entnommen und mit einem Föhn getrocknet.

Meist fand im Anschluss der Nachweis des aufgetrennten Phospholipids mit Hilfe von selbst angesetztem Molybdän - Spray (Dittmer und Lester 1964) als Molybdänblau - Komplex in einer Spray - Kammer im Abzug statt. Im späteren Verlauf der Arbeit wurden die Kieselgelplatten in einer mit Nachweis - Argenz befüllten Tauchkammer kurz mit Argens benetzt (max. 5s) und danach an der Luft entwickelt.

Alternativ zum spezifischen Phospholipidnachweis konnten auch alle Lipide gleichzeitig durch reversiblen, unspezifischen Nachweis mit Joddampf (Nachweis der Lipid - Kohlenstoffdoppelbindungen) oder lediglich die Glykolipide mit α -Naphthol - Spray nachgewiesen werden.

Die Anleitungen zur Herstellung der entsprechenden Nachweis - Reagenzien können den Werken von Christie (1982) bzw. Colowick und Kaplan (1969) entnommen werden.

Da die Farbechtheit der meisten Lipid - Nachweisargenzien bereits nach einigen Stunden nachließ, wurden die so entwickelten Dünnschichten direkt mit Hilfe eines Flachbettscanners digitalisiert bzw. mit Hilfe der Versa Doc Geldokumentationsanlage (CCD - Kamera) ausgewertet.

Material

Kieselgel 60 - Platten Nr. 105553	Merck (Darmstadt)
Naphtholspray	
Molybdänblauspray	
Jod (doppelt sublimiert)	Merck (Darmstadt)
Desaga Spotter	Desaga GmbH (Heidelberg)

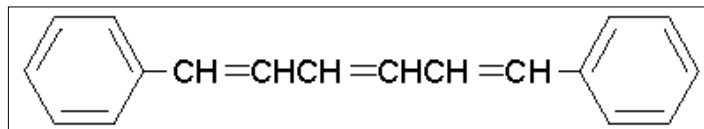
2.6.6.1 Verwendung von DPH - Farbstoff

Gemäß einer Veröffentlichung von Müthing und Radloff (1998) wurde versucht, den Nachweis des Phospholipids PG auf der Dünnschicht mittels eines Auxiliär - Farbstoffes zu verstärken. Dazu wurde der sog. DPH - Farbstoff, chemisch 1,6 Diphenyl-1,3,5-Hexatrien verwendet, der zusätzlich zum Molybdän - Spray (siehe vorheriger Abschnitt) auf die Dünnschicht aufgesprüht wurde. Anschließend wurde die Dünnschicht mit Hilfe der Gel Doc 1000 - Apparatur analysiert. Der DPH - Farbstoff kann bei ca. 370 nm angeregt werden und fluoresziert dann bei Wellenlängen größer 460 nm. Durch das gemeinsame Auftragen beider Farbstoff-argenzien, Dittmer/Lester - Argens und DPH - Fluorochrom sollte die Nachweisgrenze für Phosphatidylglyzerin auf Dünnschichten auf kleiner 1 µg herabgesetzt werden.

Material:

DPH - Farbstoff

1,6 Diphenyl-1,3,5 -Hexatrien;
Molekulargewicht: 232,3 g/mol;
Sigma-Aldrich (Deisenhofen).



2.6.7 Densitometrische Auswertung von Dünnschichten

Die meisten Dünnschichtchromatogramme wurden nach dem Entwickeln mit Dittmer - Lester - Argens mit Hilfe von densitometrischen Auswertungsprogrammen analysiert. Dadurch sollte eine genaue Quantifizierung des detektierten PG ermöglicht werden. Meist wurde dazu eine Standard - Eichreihe mit DPPG in direkter Nachbarschaft zu den zu analysierenden PG - Spots mit auf die Dünnschicht aufgetragen. Zu Beginn der Arbeit erfolgte diese Auswertung mit der Software AIDA von Raytest. Dazu wurden im Anschluss an das Entwickeln der Chromatogramme direkt 24 bit - Farbscans (600 dpi) angefertigt und mit der Software analysiert. Zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit wurden die entwickelten Dünnschichten direkt mit Hilfe der in der Versa Doc Geldokumentationsanlage eingebauten CCD - Kamera digitalisiert und danach direkt mit der Software Quantity One ausgewertet. Bei beiden Software - Varianten wurden zunächst mit Hilfe der mit aufgetragenen DPPG - Standards Eichgeraden entwickelt, die im Anschluss zur Quantifizierung des unbekanntes PG - Spots der zu analysierenden Probe benutzt wurden. Dazu mussten zunächst rechteckige Felder (möglichst gleich groß!) um die DPPG - Standard Spots gezogen werden, mit deren Hilfe die Software den exakten Graustufenwert ermittelte (Integration über die entstandene Fläche). Zusätzlich wurde ein leerer Bereich der Dünnschicht mit einem Feld umrahmt, den die Software zum Verrechnen der Hintergrundfärbung der Dünnschicht benutzte. Bei ungleichmäßiger Anfärbung des Hintergrunds mussten mehrere leere Flächen zur Berechnung der Hintergrundfärbung herangezogen werden.

Material:

Agfa 1236u Scanner	AGFA - Gaevert GmbH, (Bonn)
Gel Doc 1000	Bio-Rad (München)
	<ul style="list-style-type: none"> • Software: Raytest AIDA Version 1.1 (beta)
Versa Doc Model 3000	Bio-Rad, (München)
	<ul style="list-style-type: none"> • Software: Quantity One

2.6.8 Photometrische Quantifizierung von Phosphatidylglycerin

Neben dem Nachweis des PG mit der Hilfe von Dünnschichtchromatogrammen ist es auch möglich, PG mit einem photometrischen Nachweis zu quantifizieren (u.a. Debuch *et al.* 1968). Dazu muss das im PG enthaltene organische Phosphat zunächst mit Hilfe von Perchlorsäure in Orthophosphat überführt werden. Diesen Vorgang nennt man in der Literatur „nasse Veraschung“. Anschließend kann das so erhaltene anorganische Phosphat analog zur Vorgehensweise zur Detektion auf Dünnschichten nach Molybdat - Zugabe und Reduktion als Molybdänblau nachgewiesen werden. Dies geschah während dieser Arbeit photometrisch im Sinne eines „Flüssig - Assay“ auf Microplates.

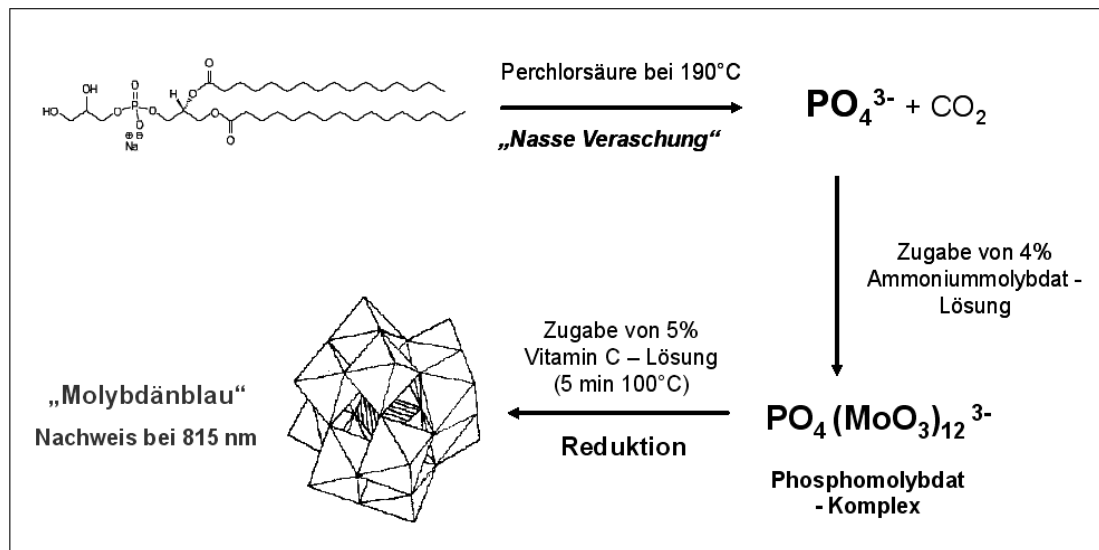


Abb. 13: Überblicksschema zur photometrischen Nachweismethode für das Phospholipid Phosphatidylglycerin (Schema nach Cogan *et al.* 1999).

Die Etablierung der Methode wurde während einer Diplomarbeit von Stephanie Boggasch durchgeführt, so dass einige der folgenden Unterkapitel den Ergebnissen Ihrer Arbeit entsprechen.

2.6.8.1 Reinigungsprozedur der verwendeten Gläschen

Die oberste Regel bei der Anwendung der im Folgenden dargestellten PG - Nachweismethode ist die absolute Sauberkeit der verwendeten Reagenzien und Reaktionsgefäße. Hier soll die Methode beschrieben werden mit der die Glasröhrchen gereinigt wurden:

Nach Benutzung der Gläschen wurden diese kurz mit dest. Wasser gespült und über Nacht in einem Gemisch aus konzentrierter Salzsäure und dH_2O eingeweicht (~ 1:1). Am folgenden Tag wurden sie intensiv mit entionisiertem Wasser gewaschen, anschließend kurz mit Aceton abgespült und dann im Trockenschrank getrocknet. In einigen Fällen wurde die verwendete Salzsäure durch Chromschwefelsäure ersetzt, um sehr hartnäckige Verunreinigungen zu entfernen. Nur mit Hilfe dieser „Reinheitsregeln“ war die Durchführung der hier dargestellten Methode möglich.

Material

Salzsäure

entionisiertes Wasser

Aceton

2.6.8.2 „Nasse Veraschung“ von phospholipidhaltigen Proben

Die auf ihren Phospholipidgehalt hin zu untersuchenden Proben wurden zunächst einer Lipidextraktion gemäß Abschnitt 2.6.4 unterworfen. Die erhaltenen Extrakte wurden im Anschluss in saubere Glasröhrchen (siehe oben) überführt und anschließend unter Vakuum eingetrocknet. Sollte später eine Berechnung des molaren PG zu Protein - Verhältnisses gemäß Kapitel 2.6.11 erfolgen, wurden die Proben nochmals in einem definierten Volumen Methanol aufgenommen, ihr Chlorophyllgehalt mittels Quantifizierung nach Porra (vgl. der Angaben unter 2.4.2.1) bestimmt und danach wieder eingetrocknet.

Zur „nassen Veraschung“ wurde zu diesen eingetrockneten Proben 200 µl Perchlorsäure (PCA) zugesetzt. Danach wurden die Röhrchen kurz in ein Ultraschallbad gehalten und anschließend in einem Heizblock bei 190°C für 30 Minuten inkubiert. Danach erschienen die vor der Inkubation farbigen Lösungen farblos. Während dieses Siedevorgangs wurden die Röhrchen mit handelsüblichen Glasmurmeln verschlossen, um ein entweichen von Dampf zu verhindern. Gleichzeitig zu den später zu analysierenden Proben wurden jeweils drei Vergleichsproben von gleich behandelten DPPG - Standards zwischen 1 und 10 µg mit verascht. Nach der Veraschung wurden die Glasröhrchen abkühlen lassen.

Material

Perchlorsäure

Glasröhrchen und Glasmurmeln

2.6.8.3 „Methode K“ von Stephanie Boggasch

Im Anschluss an die „nasse Veraschung“ wurde gemäß der von Stephanie Boggasch entwickelten Methode 100 µl dH₂O zu jeder Probe hinzu gegeben. Dann folgte unter kräftigem Mischen die Zugabe von 300 µl Molybdat (4%) und gleich darauf, ebenfalls während des Mischens, 300 µl Ascorbat (5%). Danach erfolgte die Farbstoffentwicklung in einem 100°C heißem Wasserbad für 5 min. Dazu wurden die Gläschen mit Schraubdeckeln verschraubt. Nach dem Abkühlen erfolgte die photometrische Messung an einem Mikroplatten - Photometer.

Es werden jeweils 200 µl Probe in eine Vertiefung der Mikroplatte pipettiert und im SpectraMax Plus - Plattenreader die Absorption bei 815 nm gemessen.

Mit den parallel zu den zu quantifizierenden Proben mitbehandelten DPPG - Standards wurde gleich verfahren. Mit ihrer Hilfe konnte im Anschluss an die Photometrie mit Hilfe der SpectraMax Pro - Software des Plattenreaders eine Eichreihe für die PG - Menge in µg aufgestellt werden und die unbekannt Proben so quantifiziert werden.

Folgende Einstellungen wurden am Plattenreader gewählt:

Wellenlänge	815 nm
Path-Check ¹⁵	on
Blanking	Pre-Read der Platte
Auto - Calibration	on

Material:

ddH ₂ O	
Ammoniummolybdat - Lösung	4%
Na - Ascorbat - Lösung	5%

2.6.8.4 Photometrischer PG - Nachweis nach Dr. Beutelmann

Nachdem es mit der Methode K bei 50% aller Versuchsansätze zu Problemen mit dem Phospholipid - Nachweis gekommen war (siehe entsprechendes Kapitel des Ergebnisteils) wurde zur Durchführung des photometrischen Nachweises auf eine alte unveröffentlichte Methode nach Dr. Peter Beutelmann, Universität Mainz, angelehnt an Rouser *et al.* 1967 zurückgegriffen.

Bei dieser Methode erfolgt im Gegensatz zu der „Methode K“ eine Zugabe von 1200 µl Wasser zu den veraschten Proben. Dadurch wird die Perchlorsäure in den Ansätzen stärker verdünnt. Danach wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei der „Methode K“ 120 µl 4% ige Ammoniummolybdat - und 120 µl 5% ige Na - Ascorbat - Lösung zu den Ansätzen hinzu gegeben. Durch diese Veränderungen der Versuchsparameter konnten die Probleme, die sich für die „Methode K“ ergaben, beseitigt werden.

Verwendetes Material und Einstellungen des Plattenreaders: siehe oben

2.6.8.5 Herstellung einer Nullkontrolle für den photometrischen Phospholipidnachweis

Da sich im Verlauf der durchgeführten Versuche selbst für LHCII - Mutanten, bei denen kein gebundenes PG erwartet wurde ein positiver Nachweis mit Hilfe der oben geschilderten Methode ergab, wurde nach der Möglichkeit einer „Nullkontrolle“ gesucht. Dazu wurden gemäß der Versuchsergebnisse von Nußberger *et al.* (1993) LHCII - Monomere mit Chymotrypsin und Trypsin verdaut. Dadurch soll, so Nußberger, der N - Terminus des LHCII bis zur Aminosäureposition 51 abgedaut werden, was zu einem völligen Verlust des Phospholipids führen soll.

¹⁵ Das Gerät normalisiert die Wegstrecke des Lichts durch die Probe auf 1 cm, d. h. die Daten werden auf einen Wert korrigiert, der bei der Absorptionsbestimmung einer Probe in einer 1 cm Küvette gemessen werden würde. Dadurch werden Ungenauigkeiten beim Befüllen der Mikroplatte eliminiert. Innerhalb eines Versuchsansatzes dürfen die Proben nur einheitlich mit oder ohne Path Check gemessen werden, da sie sich sonst nicht miteinander vergleichen lassen.

Enzym	Activator	Inhibitor	Spezifität
Trypsin (Bovine pancreas)	20 mM Ca ²⁺ (Stabilisierung)	PMSF (u.a.)	-X -↑- Y- X = Lys; Y = unspezifisch
Chymotrypsin A₄ (Porcine pancreas)	Ca ²⁺	PMSF (u.a.)	-X -↑- Y- X = Trp; Tyr; Phe; Leu; Met; Ala; Y = unspezifisch

Tab. 4: Verwendete Proteasen der Firma Boehringer (Mannheim).

• Verdau von LHCII nach der Detergenzwechsel - Rekonstitution

Direkt nach der Detergenzwechsel - Rekonstitution wurden zu mehreren 200 µl Aliquots einer Rekonstitutionslösung zunächst 20 µl 100 mM HEPES pH 8, gefolgt von 20 µl 5 mM CaCl₂ und 20 µl einer Enzymlösung (1 mg/ml) zugegeben. Es wurde sowohl mit einer Chymotrypsin - Lösung als auch mit einer Mischung aus Trypsin und Chymotrypsin im Verhältnis 1 zu 1 gearbeitet. Im Anschluss an die Enzymzugabe erfolgte eine Inkubation bei 0°C im Eisbad. Nach 10, 30 und 90 Minuten wurde jeweils ein Verdauansatz entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 1 µl einer 0,2M PMSF - Lösung gestoppt. Anschließend wurde der Ansatz weiter auf Eis gelagert bis nach 90 Minuten alle Ansätze mit PMSF abgestoppt waren.

Material:

5 mM CaCl₂

100 mM HEPES-KOH pH 8

Enzymlösung (1mg/ml)

0,2M PMSF - Lösung in Ethanol (Phenylmethylsulfonylfluorid)

Im Anschluss an diesen partiellen Verdau sollten die verschiedenen Ansätze auf Ni-Säulen immobilisiert werden, um durch die Proteolyse freigesetztes PG von den Komplexen zu waschen. Da sich die verdauten Komplexe aber nicht mehr auf der Ni - Sepharose - Matrix binden ließen, wurden zwei zuvor entnommenes Aliquot jedes Verdauansatzes auf zwei denaturierende PAGE aufgetragen (vgl. Abschnitt 2.3.3) und aufgetrennt. Im Anschluss an die Elektrophoresen wurde eine PAGE mit Coomassie angefärbt. Die zweite PAGE wurde einem Western Blotting unterworfen, um die verdauten Komplexe mittels eines Antikörpers auf ihren His₆ - Tag - Gehalt hin zu überprüfen.

• Western Blot und Anti-His - Antikörperbehandlung

Durch die Methode des Western Blot und die anschließende Markierung mit Antikörper sollten geringste Spuren von LHCII und dessen Fragmente nach der Trennung auf dem PAA - Gel sichtbar gemacht werden (nach Paulsen *et al.* 1990).

Da die Komplexe nach der PAA - Gelelektrophorese im Polyacrylamid - Raster gebunden vorliegen, folgte zuvor die Übertragung aller Proteine auf PVDF - Membran mittels Western Blotting. Auf der Membran sind die Proteine immobilisiert und für großmolekulare Markierungsagenzien wie z.B. Antikörper besser zugänglich und können dann sichtbar gemacht werden.

Material:

Western-Blot Puffer:	20 mM Tris; 150 mM Glycin; 0.05% 10% SDS (w/v); 20% Methanol (v/v)
Schaumstofflagen	
3MM Filterpapier	ca. 9x9 cm; GB002; Schleicher Schuell, Dassel
PVDF - Membran	PVM020C3R - Fluorotrans - Transfer - Membran 0,2 µm

Zunächst zum Aufbau des Western Blot Sandwich:

Die Schaumstofflagen, das Filterpapier und die Transfermembran wurden in Western - Blot - Puffer äquilibrirt und anschließend in folgender Reihenfolge luftblasenfrei zusammengebaut:

- schwarze Gitterseite (unten; Kathode, -)
- Schaumstofflage
- Filterpapier
- Gel (zur besseren Übersicht spiegelverkehrt aufgelegt !)
- PVDF - Membran
- Filterpapier
- Schaumstofflage
- weiße Gitterseite (oben, Anode, +)

Diese Transfereinheit wurde anschließend in die Blotkammer (Tankblot-Kammer) eingesetzt, die Kammer mit kaltem Blot - Puffer aufgefüllt und die Elektrophorese gestartet. Dabei wurde zur besseren Umspülung und Kühlung des Sandwich zusätzlich ein Rührer eingeschaltet, der den Blot - Puffer ständig verwirbelte. Die Elektrophorese wurde mit 160 mA 60-90 Minuten lang betrieben und dann abgebrochen.

Prüft man anschließend den Transfer, indem man das Gel mit Coomassie anfärbt, kann man keinerlei Banden mehr auf dem Gel detektieren. Somit sind alle Proteine auf die PVDF - Membran übertragen worden.

Des Weiteren kann der Transfer durch reversibles und unsensitives Anfärben der Proteine auf der Membran gezeigt werden:

Ponceau S Färbung:Material:

Ponceau S	0,2% (w/v)
Trichloressigsäure	3% (w/v)
Aqua bidest.	ad 100 ml

Die Membran wurde einige Minuten mit der Färbelösung inkubiert und danach bis zur Entfärbung des Hintergrundes in Aqua bidest. gelegt. Dabei wurden nach einiger Zeit Proteinbanden sichtbar. Der seitlich aufgetragene SDS-7 Proteinmarker konnte zur besseren späteren Orientierung markiert werden.

Zum Nachweis der durch den Western Blot übertragenen LHCP und deren Fragmenten folgte die Markierung mit spezifischen Antikörpern.

Vor dieser Markierung wurden alle unbesetzten Bindungsstellen der Membran durch Zugabe von Proteinen blockiert, damit sie an der folgenden Nachweisreaktion nicht teilnehmen konnten. Dies geschah über Nacht durch Inkubation in *Blocking - Puffer*:

Material:

Blocking - Puffer: [Für 100 ml: 3 g Rinderserumalbumin (BSA);
ad 100 ml mit 1x TBS - Puffer (pH 7.5)]

1. Antikörper:

Es wurde für 1 Stunde mit dem 1. Antikörper *Anti - ^{RGS}HIS - Antikörper (Maus IgG₁, Quiagen)*, gelöst in 5 ml TBS und 5 ml Blocking - Puffer inkubiert [1:1000 - Verdünnung]. Danach folgte dreimal 10 Minuten Waschen mit 1x TBS, 1x TBSTT und schließlich mit 1x TBS.

Material:

10x TBS	Für 1000 ml:	8,8 g NaCl (1.5M); 100 mM Tris/HCl (pH 7,5), also 12.1 g
5x TBS-Tween/Triton (TBSTT)	Für 1000 ml:	146.1 g NaCl (2.5 M); 2,5 ml Tween 20; 100 mM Tris/HCl; 10 ml Triton X -100

2. Antikörper:

Anschließend wurde als Enhancer für die Markierung ein 2. Antikörper gegen den 1. Antikörper, *Anti-Maus IgG - AP*, eingesetzt, der zusätzlich Alkalische Phosphatase enthält [Verdünnung 1:25000]. Wiederum wurde eine Stunde inkubiert. Danach folgte viermal 10 Minuten Waschen des Blots mit je zweimal TBSTT und TBS und anschließend das Spülen in AP-Puffer.

Material:

AP - Puffer:	100 mM Tris-HCl (pH 9.); 100 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂
BCIP - Lösung:	50 mg/ml in Aqua bidset. (Br-Cl-Indolyphosphat)
NBT - Lösung :	50 mg/ml in 70% DMF (Nitroblautetrazolium)

Zum endgültigen Nachweis der Proteine wurde der Alkalische Phosphatase - Anhang des 2. Antikörpers benutzt. Diese Alkalische Phosphatase spaltet in alkalischem Milieu die Phosphatgruppe des BCIP, das dabei oxidiert wird und einen blauen Niederschlag bildet. BCIP wird dabei in Kombination mit NBT verwendet, das durch Einwirkung der Phosphatase reduziert wird und im reduzierten Zustand auch einen blauen Niederschlag bildet.

Der Blot wurde zu diesem Zweck zusammen mit 5 ml AP-Puffer, 33 µl NBT und 16 µl BCIP in einer Folie eingeschweißt und bis zur Entwicklung der blauen Banden in diesem Medium belassen (Dauer 5h). Anschließend wurde er mit Aqua dest. abgespült und an der Luft getrocknet.

- **Verdau von rekonstituiertem LHCII auf der Ni- Sepharose - Säule**

Alternativ zum Verdau der Detergenzwechsel - Rekonstitutionen vor der Immobilisierung auf Ni - Sepharose -Säulen wurde auch eine Proteolyse von bereits auf der Säulenmatrix gebundenen LHCII - Komplexen durchgeführt. Dadurch war der am C - Terminus befindliche His₆ - Tag nicht mehr für das Enzym zugänglich.

Zunächst wurden 800 µl Rekonstitutionslösung wie unter 2.6.2 beschrieben auf je eine Ni - Sepharose - Säule aufgetragen. Danach folgte die Zugabe einer

fertigen Enzymlösung, bestehend aus jeweils 80 µl des entsprechenden Enzyms (1 mg/ml), 5 mM CaCl₂ und 100 mM Hepes. Nach dem Durchlaufen der Enzymlösung wurde die Reaktion, analog zu dem Prozedere des Verdaus vor der Säule, nach unterschiedlichen Inkubationszeiten durch Zugabe von 8 µl PMSF (0,2 M) in 300 µl OG - Puffer abgestoppt. Anschließend konnten die verdauten, noch immobilisierten Komplexe mit Puffer gewaschen werden und nach dem Eluieren mit Eluat - Puffer weiteranalysiert werden.

2.6.9 Immunologischer Phospholipid - Nachweis mit einem spezifischen PG - Antikörper

Im Anschluss an die Untersuchung der PG - Bindung mittels Dünnschichtchromatographie und Photometrie wurde während eines kurzen Exkurses auch die Anwendung eines spezifischen PG - Antikörpers ausprobiert. Dieser Antikörper wird in verschiedenen Veröffentlichungen von Kruse (1995 und 2000) beschrieben und auch von Herrn Kruse zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um einen Anti - Rabbit - PG - Antikörper. Bei diesem Antikörper - Nachweis wurden die zu analysierenden LHCII - Komplexe per Slot Blotting mit Hilfe einer entsprechenden Apparatur auf die PVDF - Membran aufgebracht. Dadurch sollte ein zusätzlicher Stress und ein „Abfallen“ des eventuell nur schwach gebundenen Phospholipids während der Gelelektrophorese vermieden werden.

Aufbau der Apparatur:

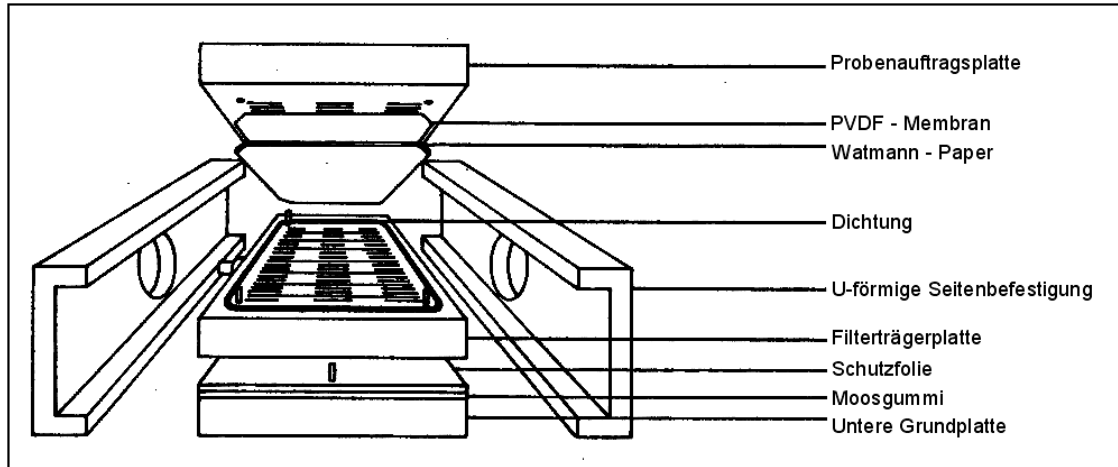


Abb. 14: Aufbau der Slot - Blot Apparatur (Schema des Herstellers, verändert)

Vor dem Zusammenbau der Slot Blot Apparatur nach obigem Schema wurde die benutzte PVDF - Membran 10 Sekunden in Methanol eingeweicht und dadurch aktiviert. Danach wurde sie kurz mit Wasser abgespült, mit TBS - Puffer äquilibriert und direkt in die Apparatur eingespannt. Das gleiche geschah mit den verwendeten Watman - Papern.

Der Probenauftrag auf die Membran erfolgte durch Aufpipettieren der zu analysierenden Proben in die Vertiefungen der Probenauftragsplatte. Gleichzeitig war leichtes Vakuum an der Apparatur angelegt, so dass die aufgetragenen LHCII - haltigen Lösungen direkt durch die aufgespannte PVDF - Membran hindurch-

gesaugt wurden. Die Komplexe verblieben dabei auf der Membran. Im Anschluss an diesen Probenauftrag wurde die Membran mit TBS - Puffer gewaschen und anschließend aus der Apparatur herausgenommen. Man konnte nun deutlich die Spots mit den immobilisierten Proben erkennen.

Zum Nachweis der durch den Western Blot übertragenen LHCP und deren Fragmenten folgte die Markierung mit spezifischen Antikörpern.

Material:

Minifold II SRC 072/0	Schleicher und Schuell (Dassel) (Mehrfachfiltrationsgerät für Mikroproben)
	• Vakkumpumpe: Aquastopp von Van Der Heijden (Dörentrup)
3MM Watmann - Paper PVDF - Membran 10x TBS	ca. 9x9 cm; GB002; Schleicher Schuell, Dassel PVM020C3R Fluorotrans Transfer Membran 0,2 µm Für 1000 ml: 8,8 g NaCl (1.5M); 100 mM Tris/HCl (pH 7,5), also 12.1g

Vor der eigentlichen Antikörper - Reaktion wurden alle unbesetzten Bindungsstellen der Membran durch Zugabe von Fischgelatine über Nacht blockiert.

Danach wurde der Blot jeweils einmal mit TBS, TBST und TBS - Puffer gewaschen.

Material:

Fischgelatine 10x TBST	3g in 100 ml 1x TBS - Puffer (Sigma, Deisenhofen) Für 1000 ml: 8,8 g NaCl (1.5M); 100 mM Tris/HCl (pH 7,5), also 12.1g; 2,5 ml Tween 20
---------------------------	---

1. Antikörper:

Es wurde für 2 Stunden mit dem *1. Antikörper Anti- Rabbit - PG - Antikörper*, gelöst in 5 ml TBS und 5 ml Blocking - Puffer inkubiert [1:1000 - Verdünnung]. Danach folgte dreimal 10 Minuten Waschen mit 1x TBS, 1x TBST und schließlich mit 1x TBS.

2. Antikörper:

Anschließend wurde als Enhancer für die Markierung ein *2. Antikörper gegen den 1. Antikörper, Anti-Rabbit- IgG - AP*, eingesetzt, der zusätzlich Alkalische Phosphatase enthält [Verdünnung 1:2500]. Wiederum wurde eine Stunde inkubiert. Danach folgte viermal 10 Minuten Waschen des Blots mit je zweimal TBST und TBS .

Der eigentliche Nachweis der Antikörper erfolgte über den Alkalische Phosphatase - Anhang des *2. Antikörpers*. Im Gegensatz zu der Methode, die im Zusammenhang mit dem Western Blotting beschrieben wurde (vgl. Abschnitt 2.6.8.5), wurde hier alternativ zum BCIP / NBT - Nachweis mit einem Chemilumineszenz - Farbstoff - Kit der Firma Bio-Rad gearbeitet. Der in dem Kit enthaltene Farbstoff koppelt an die AP des *2. Antikörpers* und konnte anschließend mit Hilfe der Versa Doc - Geldokumentationsanlage detektiert werden. Die genaue Anwendung des Kits ist der beigefügten Anleitung zu entnehmen.

Material:

Immun Star Substrate Chemiluminescent Protein Detection Kit	Bio-Rad (Hercules, USA)
--	-------------------------

2.6.10 Gaschromatographie

Während dieser Arbeit wurde auch versucht, an LHCII gebundenes PG mit Hilfe der Gaschromatographie über die spezifischen Fettsäuren des Lipids nachzuweisen.

Die Gaschromatographie beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von Stoffen zwischen einer in einer Säule befindlichen stationären flüssigen Phase und einer mobilen, gasförmigen Phase, welche die Säule durchströmt. Die stationäre Phase besteht aus einer dünnen Schicht (0.2 µm) einer nicht-flüssigen Flüssigkeit, wie z.B. Methylsilikon oder Methylphenylsilikon, die an einer inerten Oberfläche der Säule haftet. Die mobile Phase besteht aus einem inerten Trägergas, meist Stickstoff, Helium oder Wasserstoff, das mit einem definierten, aber einstellbaren Fluß durch die Säule strömt.

Durchgesetzt haben sich offene Kapillarsäulen (fused silica) mit einem inneren Durchmesser von 0.1 - 0.6 mm und bis zu 100 m Länge (DANI 3800: 50 m), die in Spiralen aufgedreht sind. Injektor, Säule und Detektor befinden sich in einem separat thermostatisierbaren Kompartiment.

Bei der häufigsten Auftragsmethode wird die gelöste flüssige Probe mit Hilfe einer Spritze in µl - Mengen in den heißen Injektor gespritzt und dort sofort verdampft. Der Gasstrom transportiert die Substanzen durch die Säule. Je nach Wechselwirkung der Substanzen mit der stationären Phase werden die Proben mehr oder minder lang auf der Säule zurückgehalten.

Für den Nachweis der chromatographisch getrennten Substanzen können versch. Detektoren verwendet werden. Universell ist dabei der FLAMMENIONISATIONSDETEKTOR (FID), der alle in einer Wasserstoff/Luft - Flamme brennbaren Substanzen erfasst. Bei der Verbrennung entstehen Ionen, die die elektrische Leitfähigkeit der Flamme erhöhen, was zu einem Peak am Detektor führt. Die Empfindlichkeit des Detektors liegt dabei bei $3 \cdot 10^{-12}$ g/s .

Wie auch bei der HPLC beruht die Zuordnung der PEAKS auf ihrer Retentionszeit im Vergleich zu authentischen Vergleichssubstanzen, wobei zur analysierenden Probe oft die Vergleichssubstanz als so genannter „interner Standard“ mit aufgetragen wird [spiking].

Sind Proben nicht ausreichend flüchtig, wie z.B. Kohlenhydrate, Aminosäuren, Steroide, etc., lassen sie sich oft durch chemische Derivatisierungen wie **Methylierung**, Acetylierung, Trimethylsilylierung, etc. in flüchtige Derivate überführen.

Als Probenvorbereitung wurden flüssige Proben in verschließbaren Zentrifugengläsern in der Verdampferzentrifuge zur Trockene eingedampft. Kieselgelproben von der DC wurden im Heizblock bei 90° C für 10 min erwärmt und dann (eventuell unter Zugabe von einigen Tropfen MeOH) ebenfalls in der Verdampferzentrifuge getrocknet.

Zu den trockenen Proben wurden 0,5 ml MeOH/HCl (4%) und 100 µl interner Standard (= 100 nmol Pentadecansäure, (C15:0), in Toluol [siehe Spiking]) zugegeben. Im späteren Verlauf wurde anstatt dieser 15:0 Standard - Fettsäure bereits vor den durchgeführten Reinigungsschritten mittels der Kieselsäure - Säule (vgl. Abschnitt 2.6.5) interner Standard in Form von 15:0 Phosphatidylcholin zugesetzt und mit aufgearbeitet.¹⁶

¹⁶ Durch die Zugabe einer definierten Menge an Phosphatidylcholins zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Probenaufarbeitung können später eventuelle Verluste durch die Aufarbeitung herausgerechnet werden, da der Integrator des Gaschromatographen alle detektierten Fettsäuren immer auf eine konstante Menge an internen Standard bezieht.

Das Glas wurde dicht verschraubt und 45 min bei 90° C im Heizblock erwärmt (Methylierungsreaktion). Nach Abkühlen der Proben wurden 3 ml Hexan und 0,5 ml Aqua dest. zugegeben und kräftig geschüttelt. Nach der Phasentrennung (kurz zentrifugieren) wurde die wässrige Unterphase vollständig mit der Pasteurpipette abgezogen, die verbleibende Oberphase mit einer Spatelspitze wasserfreiem Na₂SO₄ versetzt und erneut ausgeschüttelt. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig in ein neues Zentrifugenglas abgegossen, zur Trockene eingengt und in 20 - 50 µl Petroleumbenzin (Siedepunkt 120° C) rückgelöst. Von dieser Lösung wurden 1- 2 µl in den Gaschromatographen eingespritzt. Nach dem Lauf erfolgte die automatische Auswertung durch den an den Chromatographen angeschlossenen Integrator. Der Integrator lieferte dabei Angaben [nmol Fettsäure] bezogen auf die eingestellten 100 nmol zugegebenen Standards.

Im Rahmen der Arbeit wurde das Setup des Gaschromatographen wie folgt verändert:

Injektor: 260°C
 Detektor: 250°C
 Säule: 170°C

Folgende Einstellungen wurden am Shimadzu - Integrator gewählt:

Funktion:	Wert:	Beschreibung:
Width	5	
Slope	1605	Winkel
Drift	0	
Min Ar	5000	Kleinste zu integrierende Fläche
T-DBL	0	
Lock	5	Integration erst ab 4.5 min
Stp TM	30	Ende des Laufs
ATTEN	5	Amplitude Papier
SPEED	5	Geschwindigkeit Papier
METHOD	43	Methode für INTERNEN Standard
SPL WT	100	100 µmol int. Standard als Vorgabe
IS WT	100	Addition von x nmol internen Standards

Es ergaben sich folgende Retentionszeiten - Intervalle zur Bestimmung unbekannter Fettsäuren bei einem Intervall - Fenster von 3%:

Nummer	Name	Retentionszeit	Response factor
1	15-0	8,2	1
2	14-0	5,5	1,06
3	16-0	9,7	0,942
4	16-1	11	0,94
5	16-3	n.n	0,94
6	18-0	15	0,842
7	18-1	17	0,842
8	18-2	n.n	0,842
9	18-3 w6	20,6	0,842
10	18-3 w3	26,2	0,842

Material:

MeOH/HCl (4%)

100 nmol Pentadecansäure in Toluol

15:0 Phosphatidylcholin

NaSO₄

Hexan

Petroleumbenzin (Siedepunkt 120°C)

Sigma (Deisenhofen)

Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)

2.6.11 Berechnung des molaren PG zu Protein - Verhältnis

Im Zusammenhang mit der vergleichenden Phospholipidbindungsstudie an rekombinantem LHCII wurden immer wieder molare PG zu Protein Verhältnisse berechnet und in dieser Arbeit angegeben.

Dabei wurde nach folgender Berechnungsweise verfahren:

Zunächst wurde nach der Lipidextraktion der Proben (vgl. 2.6.4) der Chlorophyllgehalt nach Porra in Methanol bestimmt (vgl. 2.4.2.1). Dieser wurde in eine absolute Menge in Mol umgerechnet.

Unter der Annahme, dass 12 Chlorophylle pro Apoprotein des rekonstituierten LHCII gebunden sind (Kühlbrandt 1994), wurde diese Menge an Chlorophyll durch den Faktor 12 geteilt, was zur Angabe der absoluten Menge an Protein im Ansatz führte. Im Anschluss an die diversen Nachweismethoden für das Phospholipid PG wurden die ermittelten Mengen an PG (meist in μg detektiert) ebenfalls in eine absolute Menge in Mol umgerechnet.

Danach konnte das molare PG zu Protein - Verhältnis als Quotient der absoluten Menge an PG zur absoluten Menge im Ansatz eingesetzten Proteins berechnet und angegeben werden.

2.7 Spezielle Methoden im Rahmen der ESR - Messungen

2.7.1 Markierung von LHCP mit SH - reaktivem TEMPO - Label

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Mutanten mit einem singular eingeführten Cystein bzw. Doppelmутanten mit zwei eingeführten Cysteinen mit „TEMPO free radical“ (vgl. Strukturen unter 2.1.2.2.1) markiert. Dabei wurden zwei verschiedene TEMPO - Agenzien verwendet, die über verschiedene Koppelungsgruppen verfügten: einmal eine *Iodacetamido* - Gruppe und einmal eine *Maleimid* - Gruppe.

Vor der Markierung wurde durch Zugabe von TCEP (Tris-(2-Carboxyethyl)phosphin sichergestellt, dass alle SH - Gruppen (Cysteine) des eingesetzten Proteins als freie SH - Gruppe vorlagen. TCEP verhindert die Bildung von Disulfid - Brücken.

Iodacetamide reagieren sehr schnell mit Thiolen (Cystein) unter Bildung von Thioethern. Die Reaktion ist dabei sehr spezifisch, so dass andere Aminosäuren in der Regel nicht von ihr betroffen werden. Ein Nachteil der Iodacetamide ist ihre Unbeständigkeit an Licht, speziell in Lösung. Deshalb wurde das Iodacetamido - TEMPO - Agens immer unter abgedunkelten Bedingungen benutzt.

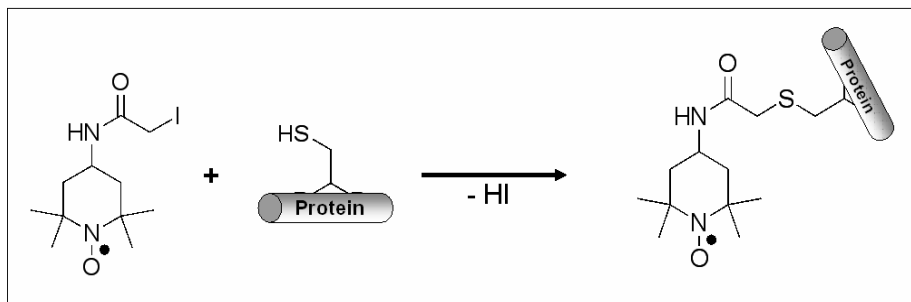


Abb.15:
Reaktion von Iodacetamid - TEMPO mit proteingebundenem Cystein.

Maleimide reagieren mit Thiolen im Sinne einer Michael - Addition unter Bildung eines Thioethers. Von Vorteil ist dabei, dass es nie zu Kreuzreaktionen mit anderen Aminosäuren kommen kann, was in einigen Fällen für Iodacetamide beschrieben wurde. Des Weiteren wird keine Lichtinstabilität beschrieben, wie bei Iodacetamiden. Nachteilig ist allerdings die größere „Spacerlänge“ zwischen dem freien Radikal des TEMPO und dem Proteingerüst, weshalb Maleimid - TEMPO nur zu Beginn der ESR - Messungen eingesetzt wurde.

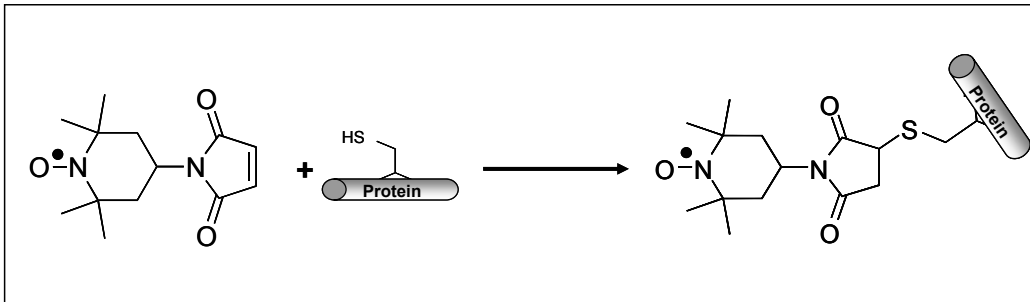


Abb.16: Reaktion von Maleimid -TEMPO mit proteingebundenem Cystein

Analog zu den hier gezeigten Reaktionen mit den verschiedenen TEMPO - Labels wurden auch die Kopplungen der beiden Fluoreszenzfarbstoffen *Bodipy* und *Rhodamine Red C2 maleimide* (vgl. Abschnitt 2.1.2.2.2) in Zusammenhang mit dem Doppelmarkierungsexperiment (siehe Ergebnisteil) durchgeführt.

Zur Durchführung der eigentlichen Markierung wurde Apoprotein in einer Konzentration von 1 mg pro ml in 0,5% SDS gelöst. Danach folgte die Zugabe von 20 mM Natriumphosphat - Puffer und das Auffüllen des Ansatzes mit Wasser auf 5 ml. Im Anschluss wurde der gesamte Ansatz für zwei Minuten aufgeköcht, bis das Protein vollständig gelöst war. Zu diesem Ansatz wurden 2 mM TCEP zugegeben (Funktion siehe oben). Im Anschluss daran folgte die Zugabe des entsprechenden TEMPO - Labels in einem 10 - fach molaren Überschuss zum eingesetzten Protein. TEMPO wurde dabei gemäß den Herstellerangaben in DMSO gelöst und als stark konzentrierte Lösung dem Ansatz zugesetzt. Nach Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C konnte im Anschluss eine Fällung des Proteins vorgenommen werden.

Material:

10% SDS - Lösung
 100 mM Na-Phosphat - Puffer pH 7.0
 H₂O
 100 mM TCEP - Stammlösung in DMF
 TEMPO in DMSO

2.7.2 Fällung von Protein

Im Anschluss an die eigentliche Markierungsreaktion wurde zu dem oben angegebenen Ansatz 1/10 Volumen an 100 mM Essigsäure und das 2,3 fache Volumen an 100% Aceton zugesetzt. Nach kurzer Inkubation bei 0°C auf Eis konnte das dadurch ausgefallene Protein durch Zentrifugation bei 4°C und 14.000 Upm (Hettich Kühlzentrifuge; Corex - Glasröhrchen) pelletiert werden. Nachfolgend wurde das Präzipitat mehrfach mit 70% Ethanol und einmal mit

100% Ethanol gewaschen, 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 2 -fach Solubilisierungspuffer (vgl. Abschnitt 2.3.4) rückgelöst. Danach erfolgte die erneute Quantifizierung des nun TEMPO - markierten Proteins und die Lagerung bei -20°C .

Material:

100mM Essigsäure
100% Aceton p.A.
100% Ethanol p.A.
70% Ethanol (v/v)

2.7.3 Aufkonzentrierung von LHCII

Für die eigentliche ESR - Messung müssen stark konzentrierte LHCII - Proben angeboten werden, da ansonsten das Verhältnis zwischen erzielttem Signal- zu Rauschverhältnis limitierend für die spätere Auswertung der durchgeführten ESR - Experimente wird.

Zu diesem Zweck wurden alle LHCII - Rekonstitutionen vor der ESR - Messung mit der Hilfe von Centricon YM-30 Zentrifugalfiltereinheiten der Firma Millipore aufkonzentriert. Diese Filtereinheiten bestehen aus kleinen Polypropylen - Röhrchen mit einer darin aufgespannten Polycarbonat - Membran. Diese Membran weist eine definierte Porengröße von 30 KDa auf und kann somit genutzt werden, um rekombinanten, aufgereinigten LHCII (Größe: ~ 60 KDa) aufzukonzentrieren. Diese Konzentrierung findet während einer Zentrifugation bei mäßiger Beschleunigung statt, bei der die LHCII - Komplexe von der Membran zurückgehalten werden, wässrige Bestandteile des Ansatzes mit kleinerem Molekulargewicht als 30KDa jedoch abzentrifugiert werden.

Zur Durchführung wurden meist etwa 2000 μl LHCII - haltiger Dichtegradientlösung in ein Centricon YM-30 Röhrchen gefüllt und anschließend für ca. 2 Stunden bei 6000 Upm (Hettich Kühlzentrifuge) bei 4°C zentrifugiert. Während dieser Zeit wurde immer wieder die abzentrifugierte, klare Pufferlösung entfernt und die aufkonzentrierte LHCII - Lösung oberhalb der Membran durch kurzes, vorsichtiges Mischen von der Membran gelöst. Dadurch konnte der gesamte Vorgang beschleunigt werden. Wenn das gewünschte Endvolumen der LHCII - Lösung von etwa 40 μl erreicht war (Faktor 40 der Ausgangskonzentration), wurde die Konzentrierung beendet und ein Aliquot der resultierenden Komplexsuspension gemäß Butler und Kühlbrand (1988) mittels Microplate - Photometer quantifiziert. Im Anschluss konnten diese aufkonzentrierten Proben von etwa 200 bis 400 μM LHCII - Konzentration für die ESR - Messung benutzt werden. Vor der eigentlichen Messung wurden sie nochmals mit 80% Glycerin im Verhältnis 1:1 gemischt (Glasartiges Erstarren der Proben im flüssigen Stickstoff) und in spezielle Glasröhrchen umgefüllt.

Material:

Centricon YM-30 Centrifugal Filter Unit

Millipore (Billerica, MA, USA)

2.7.4 ESR - Messungen und mathematische Auswertung

Alle ESR - Messungen des rekombinanten LHCII wurden am Max Planck Institut für Polymerforschung Mainz durch Dr. Gunnar Jeschke und Dr. Grazyna Panek durchgeführt. An dieser Stelle soll nur ein sehr kurzer Abriss der verwendeten Methode gegeben werden. Eine genauere Darstellung der Methode kann Pannier *et al.* (2000 a und b) bzw. Jeschke *et al.* (2004 a) entnommen werden.

Zur Durchführung des Vier Puls - DEER - Experiments (siehe Einleitung dieser Arbeit) wurde ein Bruker Eleksys 580 X-Band Spektrometer verwendet. Dieses Gerät war mit einem Bruker Flexline Split-Ring Resonator und einer zusätzlichen zweiten Microwellenquelle der Firma Magnetech ausgestattet. Die dipolaren Evolutionszeiten wurden bei Frequenzen von 9,3 bis 9,4 Ghz beobachtet. Dabei fand folgendes DEER - Experiment gemäß Pannier *et al.* (2000) Verwendung:

$$\pi / 2(\nu_{obs}) - \tau_1 - \pi(\nu_{obs}) - t' - \pi(\nu_{pump}) - (\tau_1 + \tau_2 - t') - \pi(\nu_{obs}) - \tau_2 - echo$$

Die dipolare Evolutionszeit dieses Experiments ist $t = t' - \tau_1$. Die Datenanalyse erfolgte nur für $t > 0$. Der verwendete Resonator wurde mit $Q \sim 100$ überkoppelt.

Die so genannte Pumpfrequenz ν_{pump} wurde auf das Zentrum der Resonator - Senke eingestellt und stimmte mit dem Maximum des Nitrosyl - EPR - Spektrum des verwendeten TEMPO überein. Die Beobachtungsfrequenz ν_{obs} war 65 MHz größer und stimmte mit dem Niedrig - Feld - Maximum des Nitrosyl - Spektrums überein (vgl. Jeschke *et al.* 2004).

Zur Messung des LHCII wurden die Proben nach der oben beschriebenen Mischung mit 80% Glycerin in spezielle ESR - Glasröhrchen luftblasenfrei überführt. Dabei reichte ein Endvolumen von 60 μ l für die Messung aus. Danach wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in den Split-Ring Resonator des Spektrometer eingesetzt. Die eigentliche Messung des DEER - Experiments dauerte mehrere Stunden und wurde bei 50K unter Kühlung mit flüssigem Helium durchgeführt.¹⁷ Je nach Probenkonzentration wurden dabei 20- bis 80 Scan - Wiederholungen vorgenommen.

Die resultierenden DEER - Spektrum wurden im Anschluss an die Messung mittels Direkter Transformation mit eigens zu diesem Zweck erzeugten Programmen ausgewertet und mittels einer kubischen Hermit - Interpolation zwischen den Messpunkten gemäß Jeschke *et al.* (2004 a) zur Berechnung von Abstandverteilungen zwischen den beiden im System eingeführten TEMPO - Spin - Labeln benutzt. Mit Hilfe mehrerer Messungen konnten daraus die in dieser Arbeit gezeigten gemittelten Abstandsverteilungen für die an verschiedenen Positionen des LHCII angefügten TEMPO - Spin - Label kalkuliert werden.

Material:

Bruker Eleksys E580
FT/CW X-Band Spectrometer

Bruker BioSpin GmbH
(Rheinstetten/Karlsruhe)

- Resonator: Bruker Flexline Split-Ring Resonator ER 4118X_MS3
- Zweite Mikrowellenquelle: YIG Oscillator (Avantek AV 78012): Magnetech GmbH Berlin

¹⁷ Die Pump - Pulslänge betrug 12 ns. Die Protonenmodulation wurde durch Zugabe von sog. *traces* bei acht verschiedenen τ_1 - Werten, beginnend bei $\tau_1(0) = 200$ ns und einem Zuwachs von $\Delta\tau_1 = 8$ ns gemittelt.

2.7.5 Modellierung neuer LHCII - Modelle

Mit Hilfe der neu gefundenen Abstandsinformationen wurde im Anschluss an die ESR - Messungen durch Thorsten Schweikardt am Institut für Biophysik der Universität Mainz eine Modellierung der N - terminalen Region des LHCII vorgenommen.

Es wurde dabei nach der Methode des „Modelling by satisfaction of spartial restraints“ mit dem Programm „MODELLER“ von Šali und Blundell (1993) gearbeitet, mit dessen Hilfe Sánchez und Šali bereits im Jahre 1998 17% des gesamten Hefegenoms aus *Saccharomyces cerevisiae* (1071 Proteine !) modellierten (vgl. Sánchez und Šali 1998).¹⁸

Unter Verwendung der im Internet frei zugänglichen pdb - File des LHCIIb nach Kühlbrandt 1994 und der mittels ESR - Messungen bestimmten Abstandsinformationen konnten über 700 Modelle neu berechnet werden, die alle die durch die gefundenen Abstandsintervalle vorgegebenen Modellbedingungen erfüllten. Nach optischer und statistischer Auswertung der gefundenen Modelle folgte die Visualisierung mit Hilfe des Programms DeepView 3.7.

Material:

Modeller Version 6.2

DeepView 3.7 SP5 / Swiss-PDB-Viewer

SaliLab (San Francisco, USA)

<http://www.expasy.org/spdbv>

¹⁸ Eine genaue Beschreibung der Funktionsweise und Anwendung von „Modeller“ im Rahmen der Modellierung von Proteinen kann der Diplomarbeit von Thorsten Schweikardt: „3D-Modellierung von Sequenzen auf der Basis von Röntgenstrukturen, Mainz 2001“ entnommen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Phospholipidbindung an rekombinantem LHCII: Vergleich von Trimerisierungsmotiv-Mutanten und Wildtyp

Ein Ziel dieser Arbeit sollte die Untersuchung der Phospholipidbindung, speziell der Bindung von Phosphatidylglyzerin (PG) an LHCIIb sein. Rekombinanter LHCII mit nativer Aminosäurezusammensetzung (Wildtyp) sollte mit solchem verglichen werden, bei dem im Bereich des Trimerisierungsmotives Mutationen vorgenommen worden waren. Dadurch sollte die Frage: „Ist das Trimerisierungsmotiv auch eine konkrete PG - Bindestelle?“ geklärt werden.

3.1.1 Ergebnisse der molekularbiologische Arbeiten

Für die oben angeführte Fragestellung wurden neben der Wildtyp - Mutante C3.2h (Kosemund 1999), die neben der natürlichen LHCP - Aminosäuresequenz am C - Terminus sechs Histidylreste, den sog. His₆ - Tag trägt, LHCII - Mutanten mit einem Austausch von einer oder mehreren Aminosäuren im Bereich des Trimerisierungsmotives verwendet (Hobe *et al.* 1995). Das folgende Schema soll einen Überblick über die verwendeten LHCII - Mutanten geben. Zum besseren Überblick sind nur die N - proximalen Bereiche der Mutanten angegeben. C - terminal tragen alle diese Mutanten am Ende der nativen Aminosäuresequenz einen sog. His₆ - Tag.

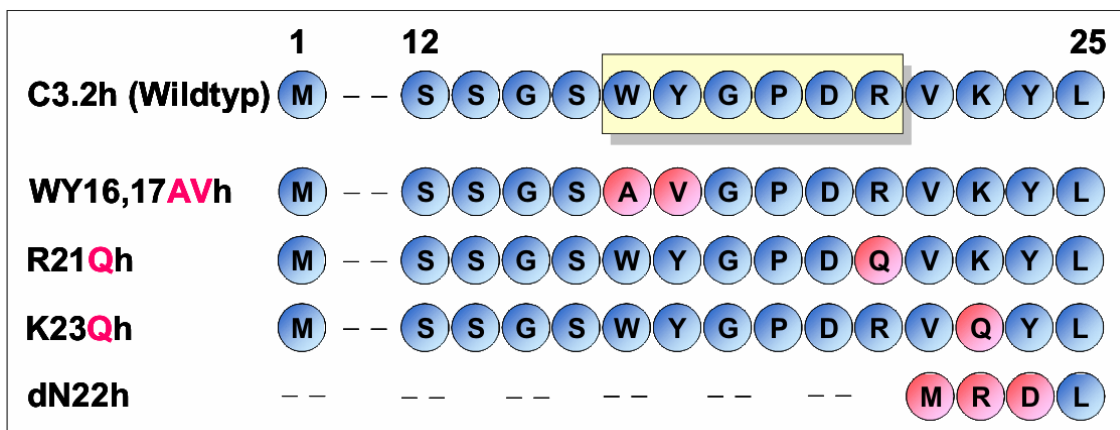


Abb. 17: N - proximale Sequenz der verwendeten LHCII - Mutanten. Das sog. Trimerisierungsmotiv ist zusätzlich gelb hinterlegt. Die veränderten Aminosäuren der Mutanten wurden rot gekennzeichnet. Bei der Deletionsmutante Δ N22h beginnt die kodierende Sequenz für das LHCP erst ab Position 22 und ist somit im Vergleich zum Wildtyp um das Trimerisierungsmotiv verkürzt.

Bei den in Abb. 17 angeführten Mutanten konnte meist auf bereits aus *E.coli* überexprimiertes Apoprotein zurückgegriffen werden. Die Mutanten R21Qh und Δ N22h mussten allerdings im Rahmen eigener molekularbiologischer Arbeiten neu kloniert werden.

3.1.1.1 Konstruktion der Mutante R21Qh

Die Mutante R21Qh wurde mittels einer ortsgerichteten Mutagenese mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) hergestellt.

Dabei wurde in einem ersten PCR - Schritt mittels des Mutageneseprimers R58Q und des Gegenprimers DS23+ ein 163 Basenpaar langes DNA - Fragment amplifiziert, welches die gewünschte Mutation an Position 21 trägt. Dieses Amplifikat wurde nach Aufreinigung und Quantifizierung als Primer, zusammen mit dem Gegenprimer S1 in einer zweiten PCR-Reaktion verwendet, so dass ein 1033 Basenpaar langes Fragment entstand, das die gesamte codierende Sequenz des LHCP und N - proximal die gewünschte Mutation beinhaltet. Als Template - DNA für beide Reaktionen wurde DNA des Klons C3.2h (Wildtyp) verwendet. (Weitere Angaben zu den verwendeten Primern können dem Material und Methoden Teil, Tabelle 2 entnommen werden.)

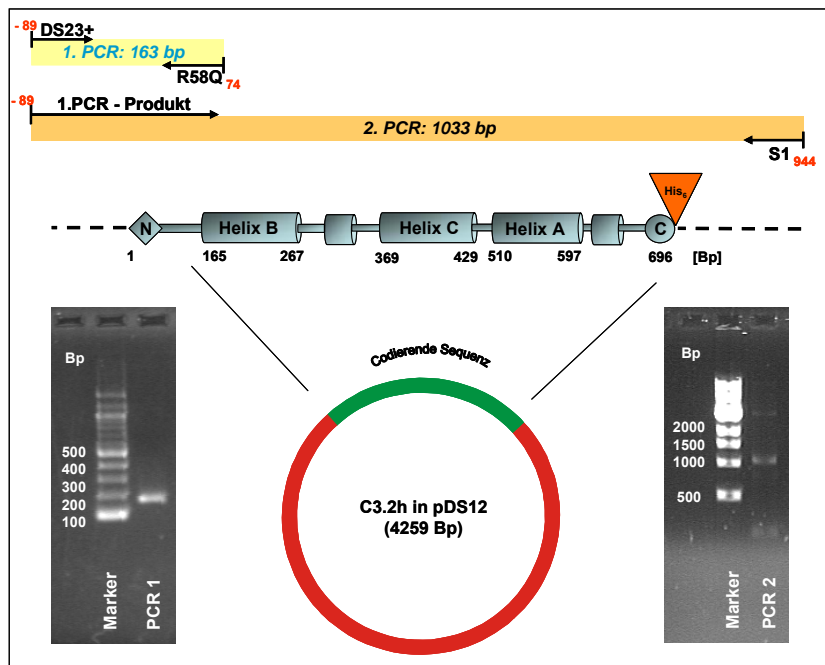


Abb. 18:

Klonierung der Mutante **R21Qh**:

Neben einem Schaubild zur Strategie der Klonierung wurden die beiden Kontroll - Gele der PCR - Reaktionen aufgetragen. **Links** ein 2% Agarose - Gel der 1.PCR, **rechts** ein 1% Agarose - Gel der 2. PCR: Neben einem Aliquot der PCR - Reaktionen wurde jeweils ein Standard - Basenpaar - Marker aufgetragen.

Das 1033 Bp - Fragment der 2. PCR - Reaktion wurde nach Aufreinigung per NucleoTrap - Kit und Quantifizierung mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BstEII geschnitten. Das so entstandene EcoRI - BstEII - Fragment von 450 Basenpaar Länge wurde anschließend in einen zuvor gleich behandelten C3.2h - Vektor einligiert.

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis des Restriktionsverbaus der Mutante C3.2h (späterer Vektoranteil) und des zweiten PCR - Produkts (späterer Insert - Anteil) vor der Ligation.

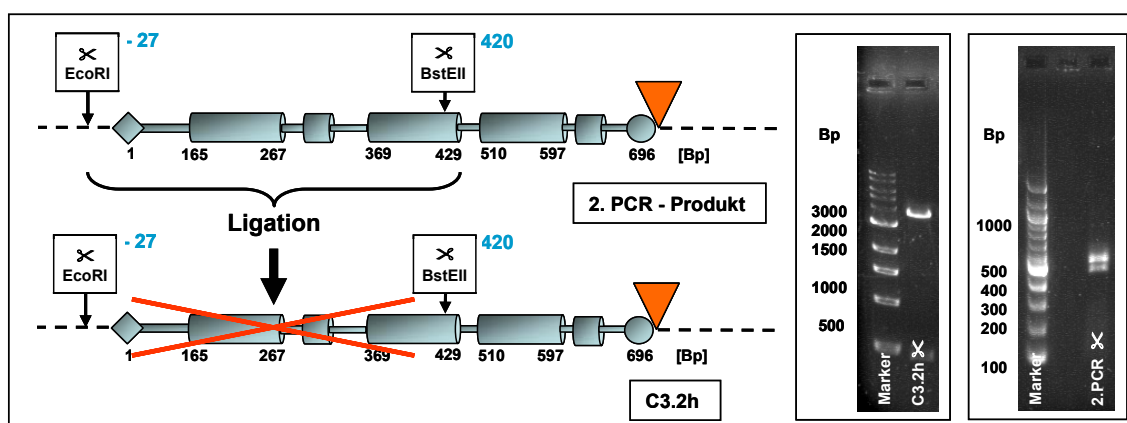


Abb. 19: Schaubild und Ergebnis der Restriktion mit EcoRI und BstEII zur Herstellung der Mutante R21Qh: Neben dem Schema sind zwei Agarose Gele abgebildet. **Links:** geschnittener C3.2h (Vektor - Anteil); **Rechts:** restringiertes 2. PCR - Produkt (Insert - Anteil der späteren Religation). Flankierend wurde jeweils ein geeigneter Standard - Basenpaar - Marker aufgetragen. (Rotes Dreieck = Position des His₆ - Tag)

Wie obige Abbildung zeigt, entstehen bei der Restriktion mit EcoRI und BstEII zwei Restriktionsprodukte für das 2. PCR - Produkt (Insert). Anhand des Schaubildes ist ersichtlich, dass für die Religation das untere 447 Basenpaar - große Fragment eingesetzt wurde. Anschließend folgte die Transformation in kompetente JM101 - *E.coli* - Zellen und Selektionierung auf LB - Amp - Platten (vgl. Abschnitt 2.2.7). Per Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass die neu entstandene LHCII - Mutante den gewünschten Aminosäureaustausch an Position 21 von R nach Q aufweist (siehe Sequenz im Anhang). Schließlich wurden in größerem Maßstab Inclusion Bodies der Mutante hergestellt (Material und Methoden Abschnitt 2.3.1) und eine Testrekonstitution (vgl. 2.3.4) vorgenommen.

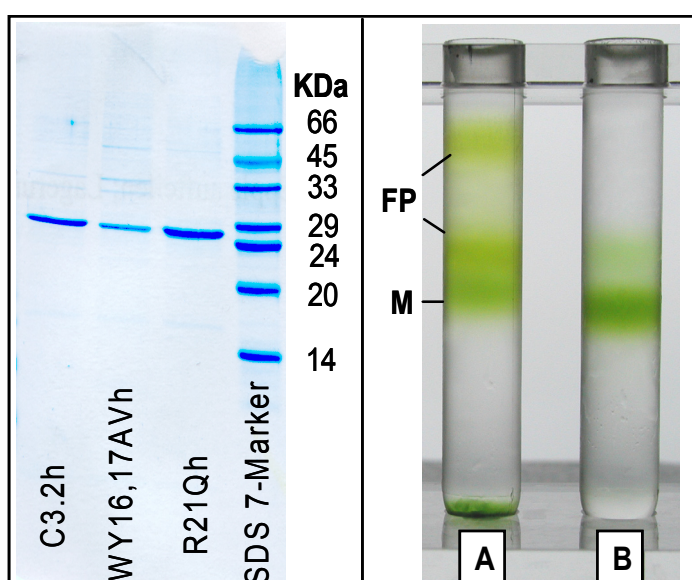


Abb. 20: Ergebnis der Überexpression und Testrekonstitution für die Mutante R21Qh:

Links: Denaturierendes 12% PAA - Glycerin Gel mit je 0,5 µg Protein der Mutanten C3.2h, WY16,17AVh und R21Qh. Daneben wurde SDS7 - Marker aufgetragen.

Rechts: Saccharose - Dichtegradientenzentrifugation mit Aliquots einer Proberkonstitution mit R21Qh. **A:** Aufgetrennte Monomere (M) nach Detergenzwechselrekonstitution. **B:** Auftrag des Säuleneluates nach Trimerisierungsversuch auf der Ni - Sepharose - Säule. (FP = Freies Pigment)

Anhand der Testrekonstitution zeigte sich, dass die neu erstellte Mutante keine Trimere bildet und zudem einen His₆ - Tag aufweist, da sie an Ni - Sepharose Säulenmaterial immobilisierbar ist.

3.1.1.2 Herstellung der Mutante $\Delta N22h$

Die Mutante $\Delta N22h$ wurde durch Restriktion und Religation von in der Klonbank der Arbeitsgruppe bereits vorhandenen LHCII-Mutanten hergestellt und sollte als eine Art „Nullkontrolle“ für die Trimerisierungsmotivmutanten verwendet werden.

Das Ausgangsmaterial für die Herstellung dieses Klons bildete sog. Midipräp - DNA (vgl. Abschnitt 2.2.8) der Mutanten C3.2h und $\Delta N22$ (Dilly-Hartwig 1998). Wie bereits beschrieben, weist die Mutante C3.2h die mature Aminosäuresequenz und einen C - terminalen His₆ - Tag auf. Die Mutante $\Delta N22$ weist eine N - proximale Verkürzung um 22 Aminosäuren auf. Somit beginnt die proteinkodierende Sequenz bei ihr erst nach dem sog. Trimerisierungsmotiv.

Ziel der Klonierung war nun das Einführen des C - terminalen His₆ - Tag in der Mutante $\Delta N22$, um das resultierende Apoprotein analog zu den Trimerisierungsmotivmutanten mit His₆ - Tag auch an Ni - Sepharose - Säulen binden zu können. Zu diesem Zweck wurden sowohl C3.2h als auch $\Delta N22$ mit den Restriktionsendonukleasen PstI und BstEII inkubiert. Die folgende Abbildung soll sowohl die angewandte Klonierungsstrategie als auch das Ergebnis der Restriktion verdeutlichen.

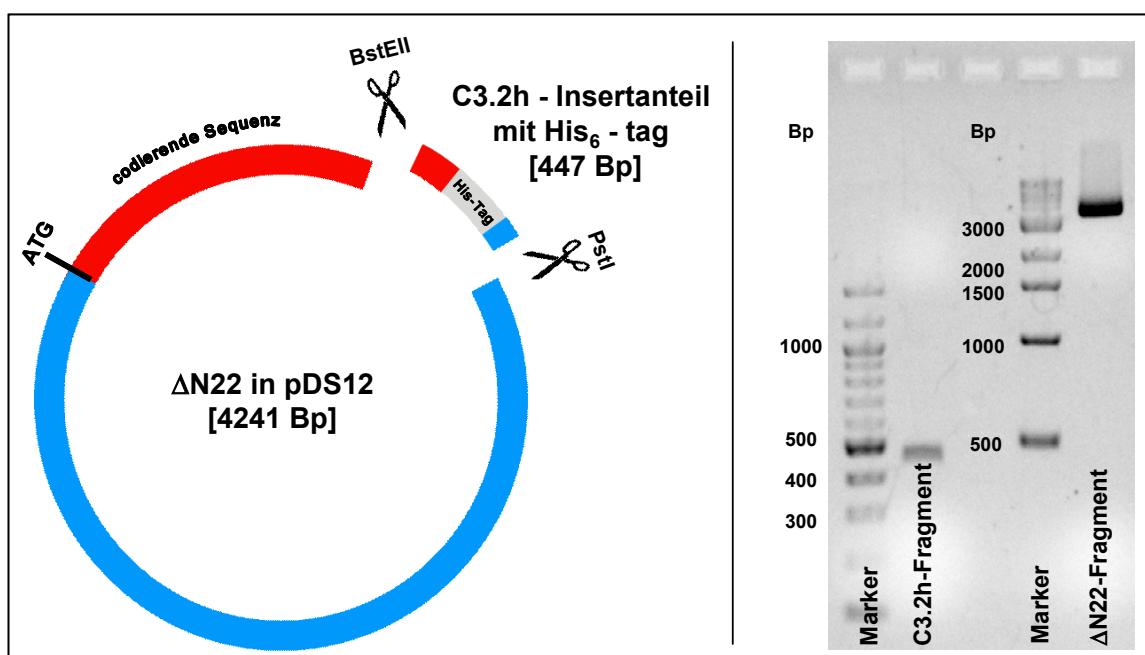


Abb. 21:

Links: Klonierungsstrategie für die Herstellung der Mutante $\Delta N22h$: Mittels BstEII und PstI wurde ein ~425 Bp großes C - terminales Fragment aus der Mutante $\Delta N22$ herausgeschnitten und durch ein gleich behandeltes Fragment aus C3.2h ersetzt. (rot: LHCP - codierender Bereich; Blau: pDS12 - Vektoranteil; Grau: His₆ - Tag).

Rechts: 1% Agarosegel zur Analyse der durchgeführten Restriktion: (von li. nach re.) 100 Bp - Marker; C3.2h - Fragment mit ~425 Bp; 1000 Bp - Marker und $\Delta N22$ Fragment von ~3,5 KBp.

Nach Aufreinigung und Quantifizierung der erhaltenen Fragmente, folgten Religation, Transformation in kompetente JM101 - *E.coli* - Zellen und Selektionierung auf LB - Amp - Platten (vgl. Kapitell 2.2.7). Per Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass die neu entstandene LHCII - Mutante die gewünschte N - proximale Verkürzung der codierenden Sequenz und den neu eingefügten C - terminalen His₆ - Tag aufweist (siehe Anhang). Schließlich wurden wiederum in größerem Maßstab Inclusion Bodies der Mutante hergestellt und eine Testrekonstitution vorgenommen (Abbildungen nicht gezeigt).

3.1.2 Überblick über die verwendeten Nachweismethoden

Zum besseren Verständnis der in dieser Arbeit behandelten Nachweismethoden von an LHCII - gebundenem Phosphatidylglycerin soll zu Beginn ein Organigramm mit den verschiedenen Methoden gezeigt werden.

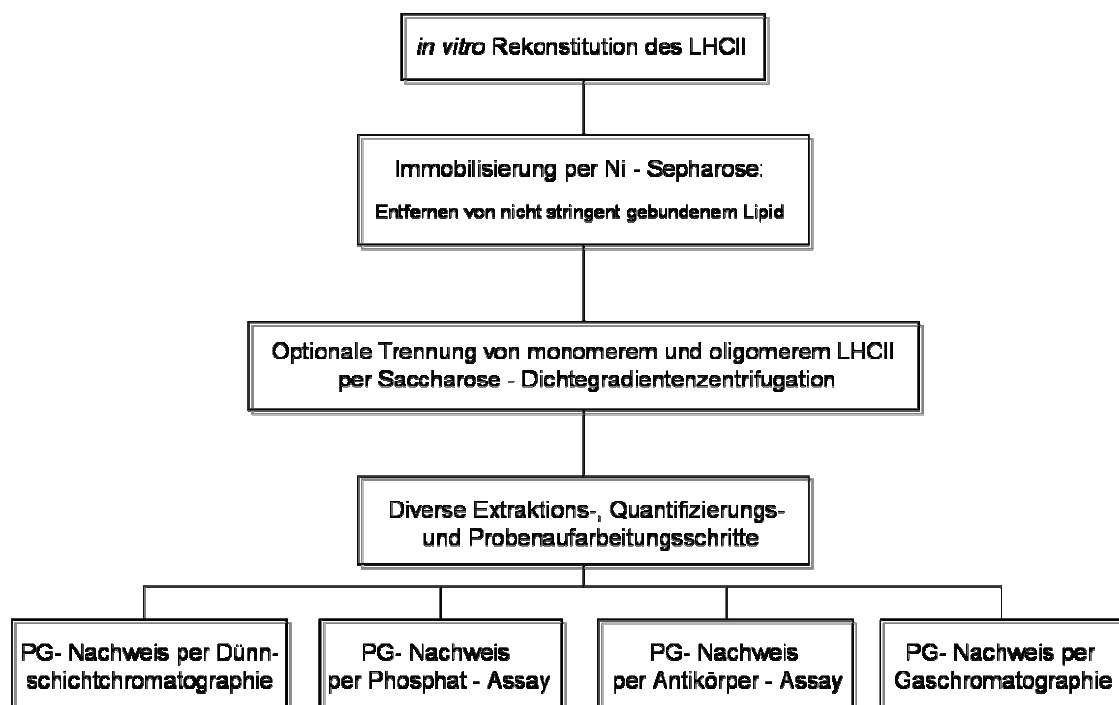


Abb. 22: Übersicht der verschiedenen verwendeten Methoden zum Nachweis von an LHCII gebundenem Phosphatidylglycerin.

Wie obige Übersicht zeigt, steht am Anfang aller verwendeten Methoden zum Nachweis des gebundenen PG die *in vitro* - Rekonstitution, wie sie bereits von Paulsen *et al.* 1990 und 1993 beschrieben wurde (vgl. 2.3.4). Neben dem aus *E.coli* überexprimierten Apoprotein wurde Totalpigmentextrakt aus Erbse mit einem molaren Chl *a* zu Chl *b* - Verhältnis von 3 zu 1 und einem Chlorophyll zu Carotinoid - Verhältnis von 1 zu 0,15 verwendet. Dieser Pigmentextrakt enthält noch Lipide mit der natürlichen Lipidzusammensetzung der Thylakoidmembran und somit auch das in den Pflanzen enthaltene PG. Dennoch wurde bei den Rekonstitutionen zusätzlich synthetisches Dipalmitoyl - PG von Avanti (Struktur: siehe 2.1.2.3) im 20 - fach molaren Überschuss zum eingesetzten Apoprotein zugesetzt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass alle potentiellen PG - Bindestellen am LHCII sicher abgesättigt werden können und somit PG nie zum limitierenden Faktor für die Bindung wird.

Im Anschluss an die Detergenswechsel - Rekonstitution folgte das Immobilisieren der Komplexe an Ni - Sepharose - Säulen und anschließendes stringentes Waschen mit Detergentien.¹⁹ Dadurch sollte nicht an Bindungsstellen gebundenes, sondern lediglich am Komplex assoziiertes PG abgewaschen werden, um später eine genaue Analyse des rein komplexgebundenen PG zu ermöglichen. Im Anschluss daran wurden die gebundenen Komplexe mittels Imidazol von den Säulen eluiert.²⁰

Optional wurde nach diesem Schritt eine Trennung von verbliebenem freiem Pigment und rekonstituierten Komplexen (Monomeren und ggf. Trimeren) per Saccharose - Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt.

Da die danach folgenden diversen Extraktions-, Quantifizierungs- und Probenaufarbeitungsschritte sehr spezifisch für die jeweils folgende Nachweismethode waren, sollen sie im Zusammenhang mit den einzelnen Methoden beschrieben werden.

¹⁹ Die Bindung des LHCII an Ni - Sepharose wird durch die C - terminalen Hexahistidylreste am Apoprotein ermöglicht, die mit dem Nickel, welches zuvor an das Trägermaterial Sepharose gebunden wurde, interagieren können.

²⁰ Imidazol löst die Bindung zwischen Nickel und His₆ - Tag, indem es im Sinne einer Substitutionsreaktion an Nickel bindet und den His₆ - Tag aus der zuvor etablierten Bindung verdrängt.

3.1.3 Phospholipidnachweis mittels Dünnschichtchromatographie

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden mehrere voneinander abweichende Methoden des PG - Nachweises per Dünnschichtchromatographie erarbeitet.

Allem voran standen einige Vorversuche, deren Ergebnisse zunächst gezeigt werden sollen.

3.1.3.1 Die Wahl des richtigen Laufmittels

Zunächst musste eine Laufmittelkombination zur Entwicklung von Dünnschichtchromatogrammen gefunden werden, bei dem das Phosphatidylglycerin sicher, ohne Störungen durch andere Komponenten des Ansatzes wie Imidazol, Tris - Puffer und diverse Detergentien als Molybdänblau nachgewiesen werden konnte (Dittmer und Lester 1964). Die nachfolgende Abbildung zeigt das Ergebnis dieser Versuche.

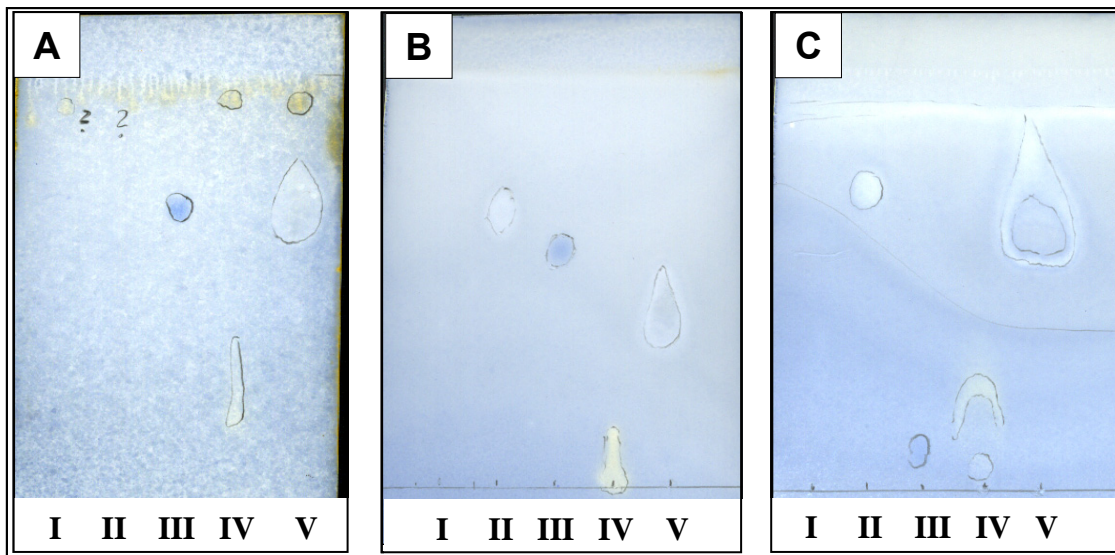


Abb. 23: Laufmittelversuch: Auf drei versch. Dünnschichten (A-C) wurden jeweils ein Aliquot Imidazol (I), OG(II), 3 µg DPPG (III), Tris pH: 7.5 (IV) und 10% SDS (V) aufgetragen. Dünnschicht **A** wurde mit $\text{CCl}_3 / \text{MeOH} / \text{NH}_3$ im Verhältnis 65:30:4 (v/v/v), Dünnschicht **B** mit $\text{CCl}_3 / \text{MeOH} / \text{HAc} / \text{H}_2\text{O}$ im Verhältnis 85 / 15 / 10 / 3,5 (v/v/v/v) und Dünnschicht **C** mit Aceton / $\text{H}_2\text{O} / \text{HAc}$ 48,5 / 0,5 / 1,08 (v/v/v) entwickelt. Danach erfolgte das Färben der Dünnschichten mit Molybdän.

Man kann erkennen, dass alle aufgetragenen Stoffe, außer dem Imidazol durch Molybdän nachweisbar sind. Zudem zeigt sich, dass mit dem Laufmittelgemisch des Versuches B alle Komponenten unterschiedlich weit transportiert werden, so dass es bei einer Mischung aller Komponenten zu keiner Überlagerung kommen würde. Eine solche Mischung tritt unter anderem bei Extrakten aus LHCII- enthaltenden Ni - Säuleneluat oder bei abgesaugten Banden aus Saccharose - Dichtegradienten auf.

Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse wurden deshalb alle weiteren Dünnschichtchromatogramme mit dem Laufmittel: $\text{CCl}_3 / \text{MeOH} / \text{HAc} / \text{H}_2\text{O}$ im Verhältnis 85 / 15 / 10 / 3,5 (v/v/v/v) gemäß Chromatogramm B entwickelt.

3.1.3.2 Welches Minimum an PG ist noch auf Dünnschichten als Molybdänblau nachweisbar ?

Als zweiter Vorversuch wurden DPPG - Mengen in steigender Quantität auf einer Dünnschicht aufgetragen, um die Grenze für einen optischen Nachweis des PG näher charakterisieren zu können. Es zeigte sich, dass für einen noch visuell sichtbaren Nachweis des PG mittels Molybdän eine Mindestmenge von 1 µg aufgetragen werden musste. Wird weniger aufgetragen, ist eine Differenzierung zwischen PG - Spot und oft auch leicht blau gefärbtem Hintergrund der Dünnschicht nur noch schlecht möglich (Abbildung nicht gezeigt.)

Anhand dieses Vorversuches wurde eine Mindestauftragsmenge von 1 µg PG für alle weiteren Versuche festgelegt und somit die Ansatzvolumina entsprechend berechnet.

3.1.3.3 Wie oft muss mit Detergens gewaschen werden, um nicht stringent gebundenes Lipid von immobilisiertem LHCII zu entfernen ?

Wie bereits in Zusammenhang mit dem Schaubild (Abb. 22) beschrieben, wurden die unter Überschuss an PG rekonstituierten LHCII - Komplexe an Ni - Sepharose - Säulen immobilisiert, um freies, nur assoziiertes und nicht über potentielle Bindungsstellen gebundenes PG mittels Detergens abzuwaschen. In Anlehnung an die Arbeiten von Nußberger *et al.* (1993) wurde dazu das Detergens Octylglukosid verwendet.

In einem Vorversuch sollte zunächst geklärt werden, wie viel OG zu diesem Zweck benötigt wird. Dazu wurde eine Rekonstitution mit 750 µg Apoprotein der Wildtyp - Mutante C3.2h durchgeführt und die resultierenden Komplexe auf Ni - Sepharose - Säulen immobilisiert. Danach folgte mehrfaches Waschen mit je einem Säulenvolumen OG - Puffer (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.3.5). Der Säulendurchfluss dieser Waschungen wurde aufgefangen und zusammen mit allen anderen vor- und nach der Waschung erhaltenen Eluate der Sepharose - Säule nach Lipidextraktion (Material und Methoden - Abschnitt 2.6.4) auf einem Dünnschichtchromatogramm analysiert.

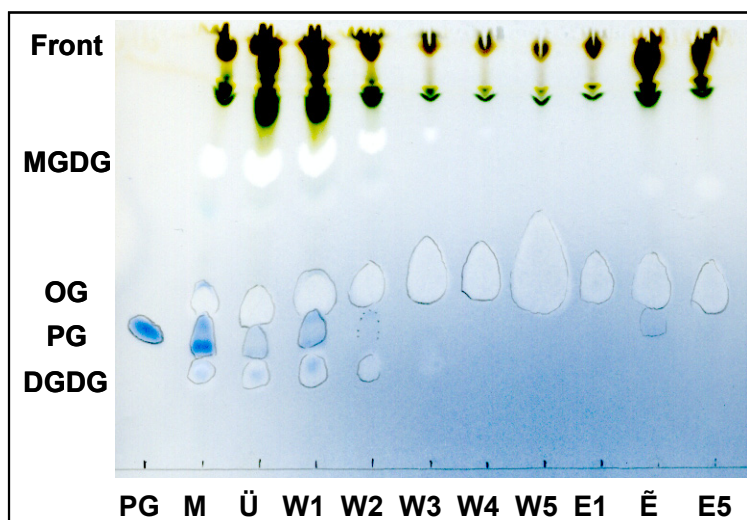


Abb. 24: Waschversuch zum Entfernen von frei assoziiertem PG von den Komplexen auf der Ni-Sepharose - Säule: Nach der Lipidextraktion wurde neben einem 6 µg DPPG - Standard ein Aliquot der Rekonstitution vor der Säule (M), der Überstand nach 30 min Säuleninkubation (Ü), 5 OG - Waschfraktionen (W1 - W5), der Vorlauf der Eluatfraktion (E1), die eluierten Komplexe (E) und ein nahezu farbloser Nachlauf (E5) aufgetragen.

Nach bereits drei Waschschrritten mit OG - Puffer ist in den Eluaten kein Lipid mehr per Dünnschicht nachweisbar. Auch die durch den Totalpigmentextrakt in den Versuchsansatz mit eingeführten anderen Thylakoidlipide wie MGDG und DGDG lassen sich durch den Einsatz des OG - Puffers entfernen. Erst in der Eluatfraktion, in der sich auch die LHCII - Komplexe befanden (PAA - Gel, nicht gezeigt), ist PG wieder in geringen Mengen nachweisbar.

Um diesen schwachen Nachweis von PG besser optisch zeigen zu können, wurde das gesamte Ansatzvolumen der Rekonstitution von 750 µg auf 1 mg Proteingehalt gesteigert. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis:

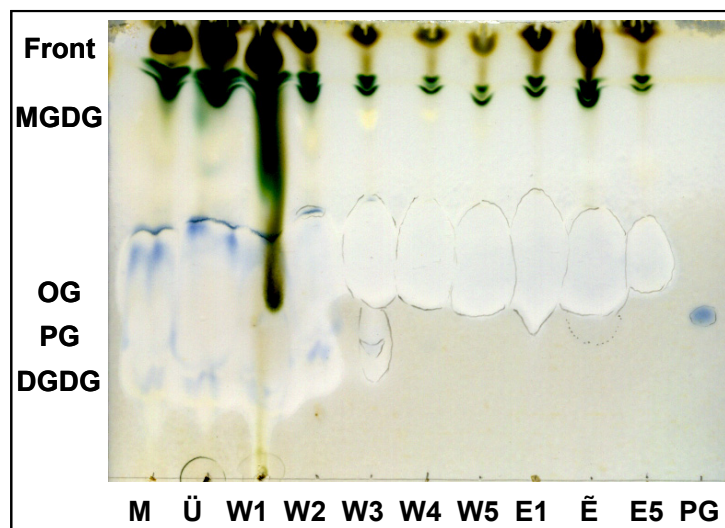


Abb. 25: Chromatogramm mit Eluaten eines 1 mg Rekonstitutionsansatzes mit C3.2h:

Nach der Lipidextraktion wurde ein Aliquot der Rekonstitution vor der Säule (M), der Überstand nach 30 min Säuleninkubation (Ü), 5 OG - Waschfraktionen (W1-W5), der Vorlauf der Eluatfraktion (E1), die eluierten Komplexe (E), ein farbloser Nachlauf (E5) und ein 6µg Aliquot eines DPPG-Standards aufgetragen.

Es ist erkennbar, dass bei einer solchen Steigerung des Ansatzvolumens auch die Detergenismenge, die nach der Lipidextraktion mit auf die Dünnschicht aufgetragen wird, deutlich erhöht wird, was schließlich zu einem veränderten Laufverhalten führt. Das in der Eluatfraktion (E) des 750 µg Ansatzes noch schwach nachweisbare PG wird im 1 mg Ansatz mit dem OG über eine größere Fläche der Dünnschicht verteilt und ist somit nicht mehr detektierbar. Dieses „Mitschwimmen“ des PG auf dem OG - Spot ist besonders gut an den Fraktionen M und Ü erkennbar.

3.1.3.4 Der Einsatz von Bio - Beads SM-2 - Ein Ausweg ?

Aufgrund des zuvor dargestellten Experiments wurde zunächst versucht, die Detergenzmenge in den Eluaten der Ni - Sepharose - Säule durch Bio-Rad Bio - Beads SM-2 zu verringern.

Zunächst wurde vorbereitend überprüft, welche Inkubationszeit mit solchen Bio - Beads nötig ist. Dazu wurde eine Lösung mit 1% OG, 0,5 mg/ml PG und 0,1 M Tris - Puffer (pH 7.5) Endkonzentration hergestellt, die somit alle Komponenten einer später aufzureinigenden Probe enthielt. Von ihr wurden je 100 μ l mit 40 mg entgasten Bio - Beads SM-2 inkubiert. Alle 5 Minuten wurde ein 5 μ l Aliquot aus diesem Ansatz entnommen und später nach Lipidextraktion auf einer gemeinsamen Dünnschicht analysiert.

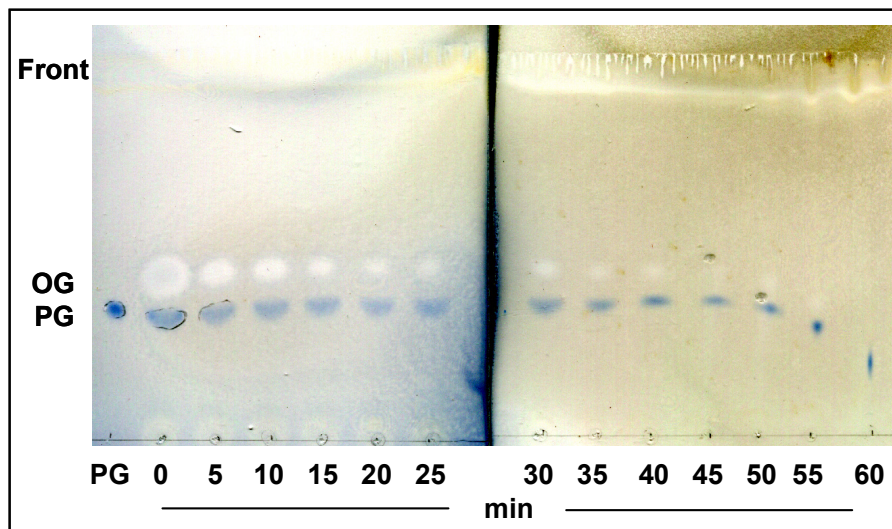


Abb. 26: Bio - Beads SM-2 - Vorversuch: Wie lange muss man Säuleneluat von der Ni - Sepharose - Säule mit Bio - Beads inkubieren, um effektiv OG abzureichern?: (von links nach rechts) Neben einem 2,5 μ g DPPG - Standard wurden jeweils alle 5 Minuten 5 μ l Aliquots aus einem mit 100 μ l Stamm mit 1% OG, 0,5 mg/ml PG und 0,1 M Tris - Puffer (pH 7.5), welcher mit 40 mg entgasten Bio - Beads inkubiert wurde, entnommen und nach Extraktion per Dünnschicht analysiert.

Aufgrund obiger Ergebnisse wurde für alle weiteren Versuche mit Bio - Beads SM-2 30 Minuten als ausreichende Inkubationszeit festgelegt, da nach dieser Zeit ca. 50% des Octylglycosids aus dem Ansatz entfernt werden konnten.

Als weiteres Kontrollexperiment wurde überprüft, ob PG nach der Bio - Beads Inkubation irreversibel an den Beads haften bleibt und somit für den darauf folgenden Nachweis verloren geht. Hieraus ging hervor, dass die Bio - Beads zwingend mit einem Volumen Wasser nachgewaschen werden müssen, da ansonsten PG an ihnen hängen bleibt. (Daten nicht gezeigt)

Anhand dieser Erkenntnisse folgte ein Versuch mit 750 μ g C3.2h Apoprotein, bei dem alle Eluate der Ni - Sepharose - Säule vor der Lipidextraktion mit entgasten Bio - Beads (50 mg auf 100 μ l Lösung) für 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert wurden.

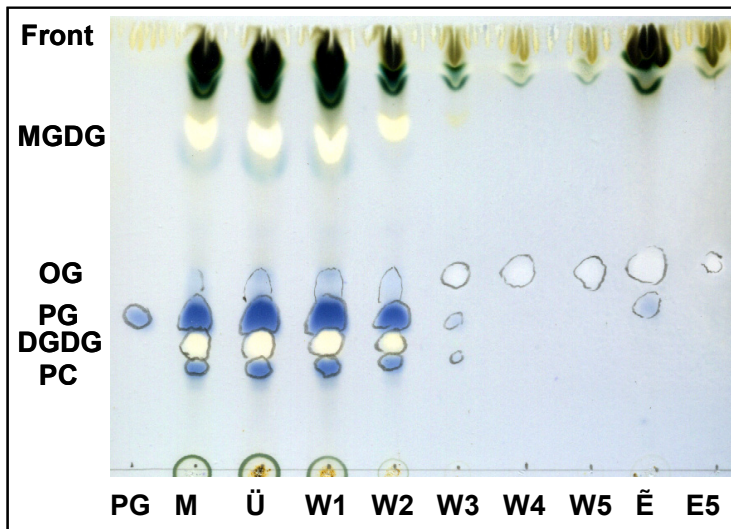


Abb. 27: Einsatz von Bio - Beads SM-2:

Es wurden alle Eluate einer 750 µg Rekonstitution der Wildtyp-Mutante C3.2h nach der Extraktion nach dem gleichen Schema wie in Abb. 24 per Dünnschichtchromatographie analysiert.

Vor der Lipidextraktion wurden alle Fraktionen zusätzlich 1h mit Bio - Beads SM-2 behandelt (50 mg auf 100 µl Lösung).

Es zeigt sich, dass durch den Einsatz von Bio - Beads auch aus einem Rekonstitutionsansatz ca. 50% des im Ansatz befindlichen OG abgereichert werden können. Zudem wird in obigem Chromatogramm das durch den Totalpigmentextrakt im Rekonstitutionsansatz befindliche zweite Phospholipid Phosphatidylcholin (PC) deutlich aufgelöst. Deutlich erkennbar ist, dass es durch das Abreichern des Detergens wieder möglich ist, in der komplex - enthaltenden Fraktion PG (wenn auch nur schwach) nachzuweisen.

Aufgrund dieses experimentellen Teilerfolgs wurde in einem bereits weiterführenden Schritt zunächst versucht, die PG - Bindung für monomeren und trimeren LHCII für die Wildtyp-Mutante C3.2h einzeln nachzuweisen.

Dazu wurde das Eluat der Ni - Sepharose - Säule einer zuvor hergestellten Rekonstitution mit 1 mg der Mutante C3.2h per Saccharose - Dichtegradientenzentrifugation über Nacht aufgetrennt und die dadurch separierten LHCII - Monomere und Trimere nach Bio - Beads - Behandlung und Extraktion einzeln per Dünnschicht auf ihren PG - Gehalt hin untersucht.

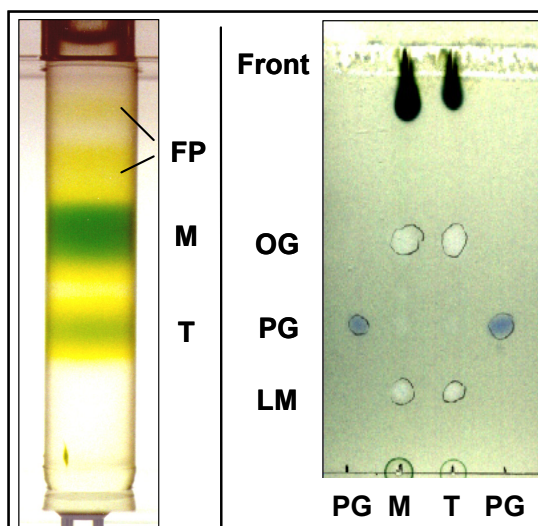


Abb. 28: Ergebnis der Trennung von monomeren und trimeren LHCII und Dünnschichtchromatogramm der entnommenen Banden.

Links: Ergebnis der Auftrennung von monomeren und trimeren LHCII nach 20 Stunden Ultrazentrifugation mit einem 0,4 M Saccharose Dichtegradient bei 30.000 UpM und 4°C. Neben verbliebenem freiem Pigment (FP) erkennt man deutlich eine Monomer- (M) und Trimerfraktion (T). **Rechts:** Dünnschichtchromatogramm der abgesaugten Komplexbanden nach Bio - Beads - Behandlung und Lipidextraktion. Flankierend wurde DPPG - Standard aufgetragen.

Wie das Chromatogramm zeigt, war es bei diesem Ansatzvolumen (1 mg Protein bei der Rekonstitution) nicht möglich, gebundenes PG als Molybdänblau an den aufgetrennten Monomeren und Trimeren nachzuweisen. Deutlich erkennbar sind lediglich die beiden Detergenzkontaminationen der Proben, dem OG aus dem Rekonstitutionsansatz und dem LM aus der Gradientenlösung, die trotz der Bio - Beads - Behandlung nicht vollständig vermieden werden konnten.

Auch das weitere Erhöhen des Ansatzvolumens auf 1,5 mg Protein führte nicht zum gewünschten Nachweiserfolg, wie die folgende Abbildung zeigt.

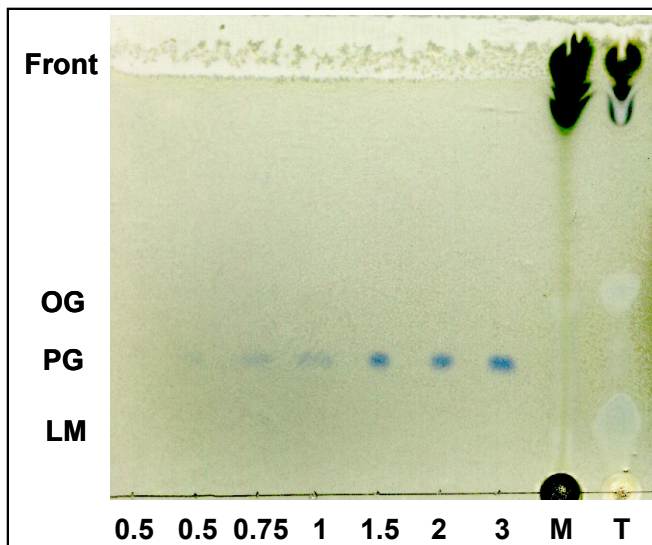


Abb. 29:

Analyse eines 1,5 mg C3.2h - Experiments nach Trennung der Komplexe per Dichtegradientenzentrifugation, Bio - Beads - Behandlung und anschließender Lipidextraktion:

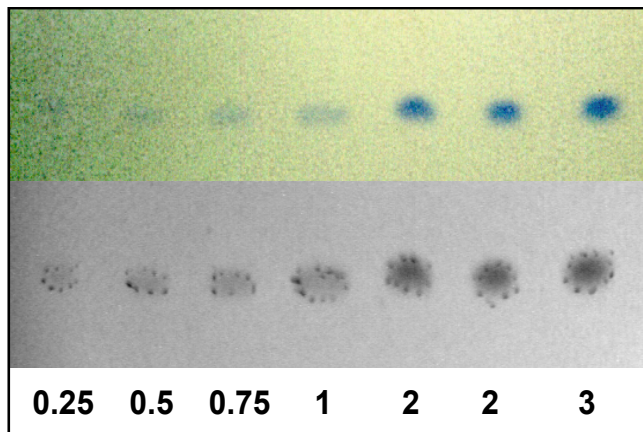
Neben steigenden Mengen an DPPG - Standard wurden monomerer- (M) und trimerer LHCII (T) getrennt nach Beads - Behandlung und Lipidextraktion auf ihren PG - Gehalt hin untersucht.

Erkennbar ist, dass ab dieser Ansatzgröße ein neues Problem entsteht, nämlich die Beeinflussung der Trennleistung der Dünnschicht durch die bei der Lipidextraktion mitextrahierten komplexgebundenen Pigmente. Diese können ab einer gewissen Konzentration im Rekonstitutionsansatz durch das Laufmittel nicht mehr sauber abgetrennt werden und stören dann, ähnlich wie zuvor die Detergenzien, den Nachweis der Lipide.

3.1.3.5 Versuche mit DPH - Farbstoff

Da eine weitere Steigerung der Ansatzgröße aufgrund der oben genannten Problematik zunächst nicht möglich schien, wurde versucht, den bislang eher schwachen PG - Nachweis durch ein geeignetes Agens zu verstärken. Hierbei wurde der Einsatz von DPH - Farbstoff²¹ nach Müthing und Radloff (1998) getestet. Dieser Farbstoff soll zusammen mit dem bereits verwendeten Nachweis des PG per Molybdänblau die Nachweisgrenze für das Lipid auf 0,06 µg herabsetzen und somit als eine Art „Verstärker“ für den Molybdänblau-Nachweis fungieren. Hierzu soll der kristalline DPH - Farbstoff in Hexan gelöst auf zuvor mit Molybdän besprühte Dünnschichten aufgetragen werden. Danach erfolgt die Analyse des Fluoreszenzsignals durch Anregung bei 370 nm und Detektion der Emission bei größer 460 nm.

²¹ DPH = 1,6 Diphenyl-1,3,5-Hexatrien. (Siehe auch Material und Methoden - Teil, Abschnitt 2.6.6.1.)

**Abb. 30:**

Versuche mit DPH - Farbstoff: Es wurden steigende Mengen an DPPG - Standard (Angaben in μg) auf eine Dünnschicht aufgetragen und zunächst mit Molybdän besprüht (oben). Danach wurde die Dünnschicht zusätzlich mit DPH - Farbstoff (0.2 mg/ml in Hexan) besprüht und per Bio-Rad Versa Doc - System analysiert. Die Excitation erfolgte bei 302 nm (unten). Die Spots wurden nachträglich umrandet.

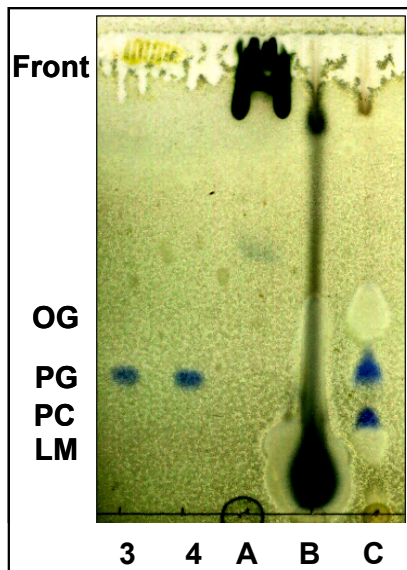
Es zeigt sich, dass durch das zusätzliche Aufsprühen des DPH - Farbstoffes kein stark verbesserter PG - Nachweis geführt werden kann. Es kommt lediglich zu einer Art Kontrastverstärkung, die aber weniger auf den Farbstoff selbst, als auf die Konvertierung des zuvor farbigen Scans (24Bit) der Dünnschicht durch die Software der Bio-Rad Versa Doc zu einem 256 Graustufenbild (8 Bit) zu erklären ist.

Nachdem auch einige Parallelexperimente bzgl. des Einsatzes von DPH - Farbstoff (Daten nicht gezeigt) nicht zu einer deutlich sichtbaren Verbesserung des Nachweises für Phosphatidylglyzerin auf der Dünnschicht führten, wurde für den weiteren Verlauf der Arbeit auf den Einsatz dieses Farbstoffs verzichtet.

3.1.3.6 Reinigung von Ni - Säuleneluat per Kieselsäure - Säule

Da weiterhin das Problem bestand, dass der erzielte PG - Nachweis auf den durchgeführten Dünnschichtchromatogrammen nicht sehr deutlich ausfiel und auch die Verstärkung des Nachweises mittels DPH - Farbstoff, wie oben beschrieben, nicht gelang, wurde alternativ der Einsatz von Kieselsäure - Säulen zum Abreichern sowohl der Detergenzien (Ersatz der Bio - Beads) als auch des Pigments aus den Ni - Säuleneluat und abgesaugten Saccharose - Dichtegradientenbanden, gemäß Rouser *et al.* (1967), versucht.

Hierzu wurde ein Aliquot von 125 μg Totalpigmentextrakt in 50 μl Ethanol gelöst und zu 1 ml einer wässrigen Lösung bestehend aus 0,5 M Saccharose, 0,01% LM und 5 mM Tricine / NaOH (pH 7,8) gegeben. Zu dieser Mischung wurden zusätzlich 4 μg synthetisches DPPG und Octylglukosid (1% Endkonzentration) zugesetzt. Nach der Lipidextraktion dieser Lösung wurde der resultierende Extrakt wieder in Chloroform gelöst und auf einer Kieselsäure - Säule mit 1 g Säulenmaterial (gemäß Material und Methoden: Abschnitt 2.6.5) aufgetragen und aufgereinigt. Folgende Abbildung zeigt das Ergebnis eines Testversuchs.

**Abb. 31:**

Vorversuch zum Einsatz von Kieselsäure - Säulen zum Abreichern der störenden Detergenzien und Pigmente vor der Dünnschichtchromatographie:

Neben einem 3- und 4 µg Aliquot eines DPPG - Standards wurden die zuvor eingeeengten Eluate der Kieselsäure - Säule aufgetragen.

Fraktion **A**: Chloroform - Fraktion mit dem Hauptanteil an komplexgebundenen Pigmenten;

Fraktion **B**: Aceton - Fraktion mit restlichem Pigment und den Detergenzien;

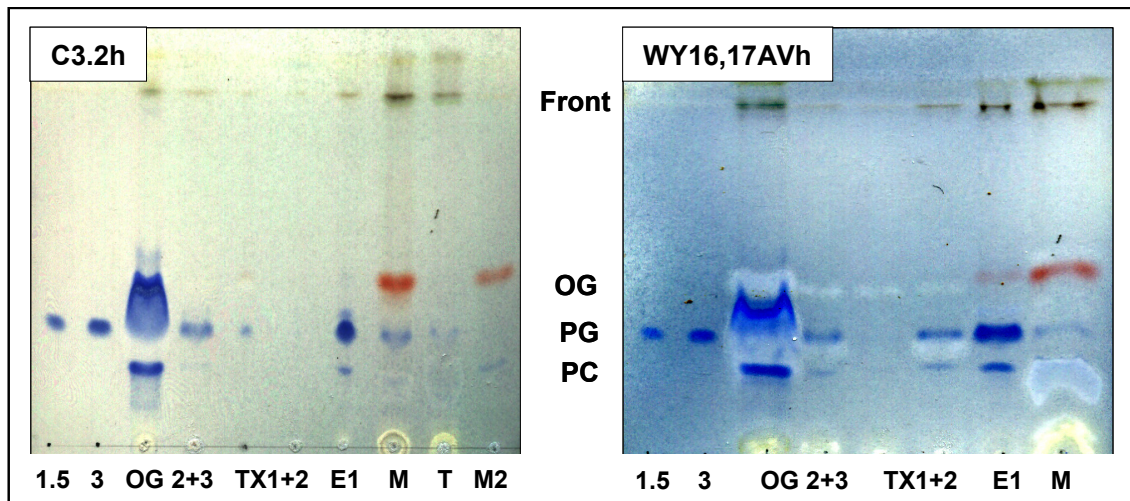
Fraktion **C**: Methanol - Fraktion mit dem komplexgebundenen Lipiden und restlichen Detergenzien.

Man kann erkennen, dass es durch die Kieselsäure - Säule prinzipiell möglich ist, die Hauptmenge an Detergenz und Pigmenten aus Ni - Säuleneluat bzw. abgesaugten Dichtegradienten zu entfernen. Die Hauptmenge an Pigmenten eluiert bereits mit dem zugesetzten Chloroform. Detergenzien lassen sich anschließend fast völlig durch das zugesetzte Aceton entfernen. Das eingesetzte Phospholipid verbleibt zunächst auf der Kieselsäure - Säule und löst sich erst mittels Methanol von der Säule. Durch diese Prozedur ist es möglich, das Ansatzvolumen bei der Rekonstitution weiter zu steigern, um so den Phospholipidnachweis auf der Dünnschicht deutlicher veranschaulichen zu können.

Die folgenden Abbildungen kennzeichnen das Ende der durchgeführten Vorversuche.

Es wurden zwei Rekonstitutionsansätze mit jeweils 2,25 mg Protein durchgeführt, einmal mit dem Wildtyp - Klon C3.2h, einmal mit der Trimerisierungsmotiv - Mutante WY16,17AVh.

Nach erfolgter Waschung der Detergenzwechsel - Rekonstitutionen auf der Ni - Sepharose - Säule folgte die Trennung der entstandenen Komplexe per Saccharose - Dichtegradientenzentrifugation. Anschließend wurden die Proben nach der Lipidextraktion per Kieselsäure - Säule von Detergenzien und komplexgebundenem Pigment befreit. Schließlich folgte das Auftragen auf zwei versch. Dünnschichtchromatogramme und Färben mit Molybdän.

**Abb. 32:**

Chromatogramme mit zwei 2,25 mg - Rekonstitutionsansätzen der Mutanten C3.2h und WY16,17AVh: **Links:** Neben zwei DPPG - Standards von 1,5 und 3 μg wurden die Ni- Sepharose - Säuleneluat OG2 und OG3, TX1 und 2, die erste Eluatpuffer - Fraktion E1 und die aufgetrennten Komplexe als M und M2 (Monomere) und T (Trimere), isoliert aus den folgenden vier Eluatfraktionen, aufgetragen. Vor dem Auftrag wurde eine Reinigung mittels Kieselsäure - Säule durchgeführt. **Rechts:** Analog zum Ansatz mit C3.2h wurden die Fraktionen des WY16,17AVh - Ansatzes aufgetragen. Da nur Monomere nach der Ultrazentrifugation gewonnen werden konnten, hier nur der Auftrag einer Monomerfraktion (M). Auch hier erfolgte vor der Dünnschicht eine Kieselsäure-Säule - Reinigung der Proben.

Man kann erkennen, dass in beiden Ansätzen bereits in der Fraktion E1, also der ersten Eluatpuffer - Fraktion, in der sich eigentlich noch keine Komplexe befinden sollten (Pufferwechsel), PG zu finden ist. Dies ist auf ein ungenaues Auffangen der eigentlichen Komplexfraktion zurückzuführen. Um ein molares PG zu Protein - Verhältnis zu berechnen, müsste man dieses PG der Fraktion E1 zu den Komplexfraktionen hinzurechnen, beziehungsweise auch für die Fraktion E1 den PG und Proteingehalt bestimmen. Zudem erkennt man orange-farbene Flecken auf der Dünnschicht, die auf Verunreinigungen der Proben durch Dichtungsgummi während der Kieselsäure- Säulen - Aufreinigung zurückzuführen sind. Dennoch scheint die durch diese beiden Versuche experimentell bestätigte Methode der Probenaufreinigung nach erfolgter Rekonstitution und Ni - Säulenwaschung für weitere Versuche sinnvoll zu sein und wurde deshalb in Folgeversuchen wieder benutzt.

3.1.3.7 Vergleichender Lipidnachweis mittels Dünnschichtchromatographie und Auswertung mit Raytest AIDA

Mit Hilfe der während der Vorversuche entwickelten Methode wurden weitere Versuche durchgeführt. Um dabei nach erfolgreichem PG - Nachweis auf der Dünnschichtchromatographie neben rein qualitativen auch vergleichende quantitative Aussagen über den so nachgewiesenen Phospholipidgehalt verschiedener extrahierter und aufgereinigter LHCII - Komplexe zu machen, wurde eine densitometrische Auswertung und Quantifizierung des PG - Gehalts per Raytest AIDA - Software im Anschluss an die Chromatographie eingeführt.

Dazu erfolgte direkt nach der Lipidextraktion eine Quantifizierung des Pigmentgehalts nach Porra *et al.* 1988. Anhand der so ermittelten absoluten Chlorophyllmenge der Proben konnte unter der Annahme, dass pro LHCII - Monomer 12 Chlorophylle gebunden sind, auf den Proteingehalt und somit absoluten Gehalt an LHCII - Komplexen (in nmol) zurückgeschlossen werden (vgl. zu Nußberger *et al.* 1993). Danach folgte, wie bereits beschrieben, die Probenaufreinigung per Kieselsäure - Säule, und die Auftrennung per Dünnschichtchromatographie. Die erhaltenen Chromatogramme wurden nach der Entwicklung mit Molybdän direkt mittels eines Scanners digitalisiert. Mit den so erhaltenen Bildern konnte später die densitometrische Auswertung mit dem Programm AIDA (vgl. Material und Methoden Abschnitt 2.6.7) vorgenommen werden. Am Ende dieser Auswertung konnte anhand einer (mittels zusätzlich auf der Dünnschicht aufgetragener DPPG - Standards erstellten) Eichgerade ein absoluter Wert für das aus den LHCII - Komplexen extrahierte und nachgewiesene Phospholipid bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Quantifizierung wurde anschließend ein molares PG zu Protein - Verhältnis für die verschiedenen analysierten LHCII - Komplexe berechnet.²²

Vor Versuchsdurchführung wurde zunächst eine Vereinfachung vorgenommen: Bereits während der Vorversuche hatte sich gezeigt, dass nach stringenter Waschung der rekonstituierten Komplexe kaum noch freies (nicht komplexgebundenes) Pigment von der Ni - Säule eluiert werden konnte (Verfälschung der nach Porra berechneten Proteinmenge). Zudem konnten selbst für die eigentlich trimerisierungsfähige Wildtyp - Mutante C3.2h durch Immobilisierung auf der Ni - Säule nur wenige Trimere (maximal ~10%) erhalten werden²³. Deshalb wurden zunächst vereinfachend alle weiteren Versuche ohne Auftrennung der resultierenden Komplexe per Saccharose - Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dadurch sollte der präparative Aufwand für diese vergleichende PG - Bindungsstudie von Wildtyp- und Trimerisierungsmotivmutanten minimiert werden. Das Problem, dass durch diese Vereinfachung für die Wildtyp - Mutante C3.2h leicht (durch geringe Trimeranteile) verfälschte PG - Werte für den monomeren LHCII resultieren, wurde minimiert, indem bei allen folgenden Experimenten die

²² Zum besseren Verständnis der Methode wurde im Material und Methoden - Teil Abschnitt 2.6.11 ein Muster für diese Art der Auswertung angegeben.

²³ Das Immobilisieren auf Ni - Säulen dient im Fall des LHCII häufig nicht der Reinigung der Komplexe, wie während dieser Arbeit verwendet, sondern wird vor allem zur Oligomerisierung von trimerisierungsfähigen LHCII - Mutanten, gemäß Rogl (2000), verwendet. Dazu wird den Komplexen auf der Ni - Säule zusätzlich synthetisches DPPG angeboten, was zur Trimerbildung auf der Ni - Säule führt. Gibt man kein DPPG zu, werden, wie hier gezeigt, nur vernachlässigbare Mengen an LHCII - Trimeren gebildet.

Waschmenge an OG - Puffer auf der Nickel - Sepharose - Säule von drei auf sieben Säulenvolumen erhöht wurde. Dadurch wurden bei der Mutante C3.2h auf der Ni - Sepharose - Säule noch weniger (das Ergebnis „verfälschende“) Trimere gebildet.

Zum Test der AIDA - Auswertungsprozedur wurde aber zuvor noch einmal ein Versuch mit der Wildtyp - Mutante C3.2h und der Trimerisierungsmotiv - Mutante WY16,17AVh, ähnlich der zuvor bei den Vorversuchen beschriebenen Versuchsreihe mit der „alten“ Waschprozedur auf der Ni - Sepharose - Säule („3xOG + 2xTX“) durchgeführt. Nach Quantifizierung der Proben (Prinzip siehe oben), Lipidextraktion und Reinigung per Kieselsäure - Säule folgte das Auftragen der wichtigsten Fraktionen auf mehreren Dünnschichten, wobei erstmals zahlreiche DPPG - Standards zur späteren Erstellung von Eichgeraden per AIDA mit aufgetragen wurden.

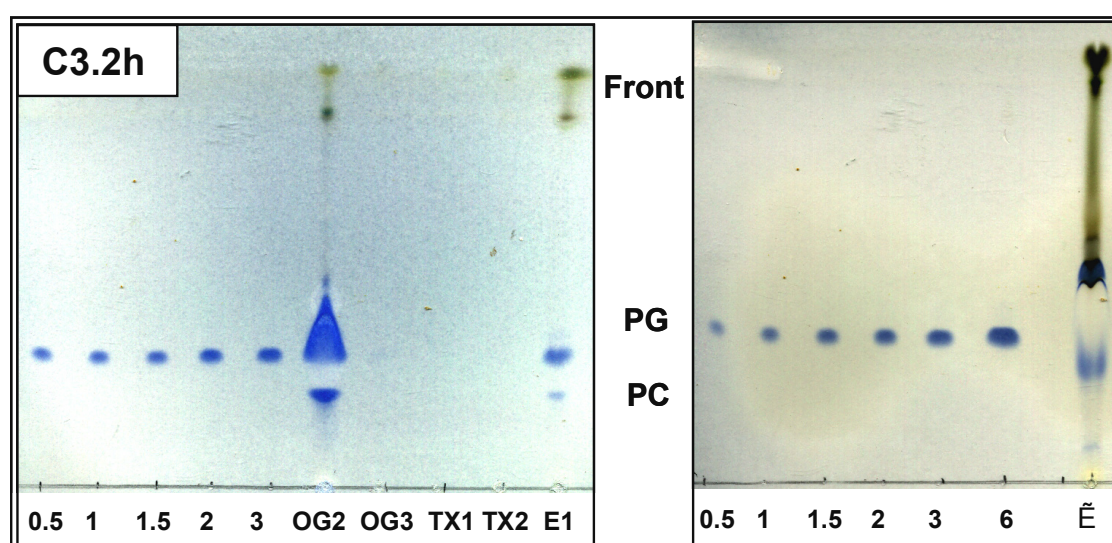


Abb. 33: C3.2h - Versuch mit 2.25 mg Protein: Neben diversen DPPG - Standards [Angabe in µg] zur Berechnung einer Eichreihe mit AIDA wurden wichtige Fraktionen der Kieselsäure-Säule aufgetragen. **Links:** Waschfraktionen und erste Eluatpuffer-Fraktion (E1); **Rechts:** Eluierte Komplexe (E).

Abbildung 33 zeigt die resultierende Dünnschicht des C3.2h - Ansatzes, bei der für die eluierten Komplexe eindeutig PG nachgewiesen werden konnte (rechts). Zudem findet man bereits in der Fraktion mit dem ersten Eluatpuffer Phospholipid, was wiederum auf ein ungenaues Auffangen der Komplexfraktion zurückzuführen ist. Des Weiteren ist erkennbar, dass es nicht vollständig gelungen war, mittels der Kieselsäure - Säule alles komplexgebundene Pigment vor der Dünnschichtchromatographie abzureichern. Dies führt im Fall der komplexenthaltenden Fraktion E zu einem veränderten Laufverhalten des PG und zusätzlich zu einer später durch „Schmier“ erschwerten Quantifizierung des PG - Spots.

Stellt man die Summe der mittels dieser Chromatogramme quantifizierten PG - Mengen der Fraktionen E1 (1,9 µg) und E (11,26 µg) der über die Pigmentquantifizierung berechneten Proteinmenge gegenüber, erhält man ein molares PG zu Protein - Verhältnis von **0,44** für diesen Ansatz (Formel für die Berechnung der PG zu Proteinverhältnisse: siehe Material und Methoden: Abschnitt 2.6.11). Der Korrelationskoeffizient der verwendeten DPPG - Eichreihe betrug 0,96 (linke -) bzw. 0,99 (rechte Dünnschicht).

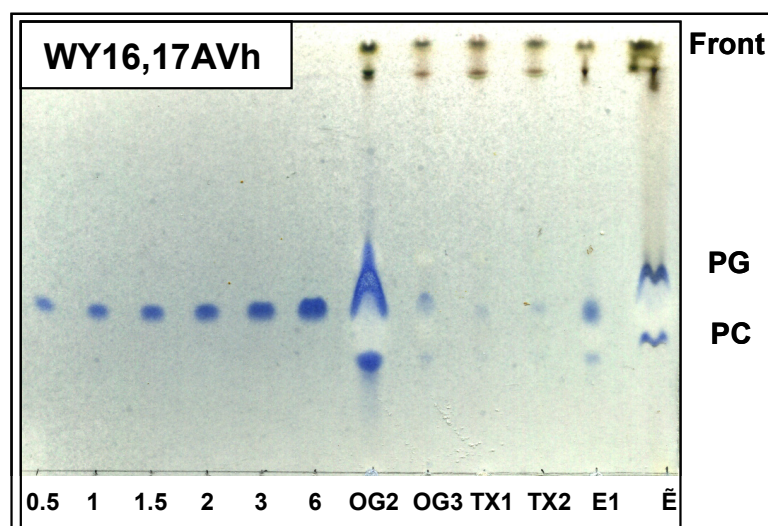


Abb. 34: WY16,17AVh - Versuch mit 2.25 mg Protein: Neben diversen DPPG - Standards [Angabe in μg] zur Berechnung einer Eichreihe mit AIDA wurden wichtige Fraktionen nach der Kieselsäure - Säule Behandlung aufgetragen.

Auch für den Klon WY16,17AVh konnte in der komplexenthaltenden Fraktion \ddot{E} und in der ersten Eluatpuffer - Fraktion E1 nach der Ni - Säule PG nachgewiesen werden. Wiederum wurde trotz der auftretenden Pigmentverunreinigungen (Schmier) der Komplexfraktion \ddot{E} eine Quantifizierung des PG - Gehalts mittels AIDA vorgenommen. Für die Fraktion E1 ergab sich eine PG - Menge von 0,3 μg , für die Fraktion \ddot{E} 2,6 μg . Daraus berechnet sich für diesen Ansatz ein molares PG zu Protein - Verhältnis von **0,23** bei einem Korrelationskoeffizient der Eichreihe von 0,96.

Aufgrund dieser beiden Ergebnisse wurde das Waschprotokoll der Komplexe auf der Kieselsäure - Säule nochmals verändert. Anstatt der ursprünglich verwendeten 5 ml wurden ab jetzt 10 ml Chloroform und anstatt der zuvor verwendeten 10 ml wurden nun 20 ml Aceton verwendet (vgl. Material und Methoden: 2.6.5), was zu einer besseren Abreicherung der „verunreinigenden“ Pigmente in den komplexenthaltenden Fraktionen führte. Die danach durchgeführten Versuche sollen hier in Form von Auswertungstabellen, nach Mutanten sortiert, dargestellt werden.

Für die Wildtyp - Mutante C3.2h ergaben sich folgende Ergebnisse:

Chlorophyllgehalt Komplexfraktion [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PG - Gehalt lt. AIDA [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Korrelationskoeffizient (R^2) der verwendeten Eichreihe
471,6	39,3	12,8	0,33	0,975
219,6	18,3	9,2	0,50	0,992
219,6	18,3	4,9	0,27	0,992
188,4	15,7	5,7	0,36	0,986

Tab. 6: Versuchsergebnisse der AIDA - Auswertung verschiedener Ansätze mit der Wildtyp - Mutante C3.2h.

Berechnet man aus dieser Tabelle ein durchschnittliches PG zu Protein - Verhältnis für die Mutante C3.2h, so ergibt sich ein Wert von **0,37** (+/- 0,08)²⁴

²⁴ Es wurde mit der Microsoft Excel - Funktion STABWN gearbeitet, die davon ausgeht, dass die ihr übergebenen Argumente der Grundgesamtheit aller Daten entsprechen. Die mathematische Formel für diese Standardabweichung lautet: $\sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n^2}}$.

Für die Trimerisierungsmotiv - Mutante WY16,17AVh ergaben sich folgende Resultate:

Chlorophyllgehalt Komplexfraktion [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PG - Gehalt lt. AIDA [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Korrelationskoeffizient (R^2) der verwendeten Eichreihe
160,8	13,4	3,4	0,25	0,984
109,3	9,11	Kein N.	---	---
219,6	18,3	3,9	0,21	0,943

Tab. 7: Versuchsergebnisse der AIDA - Auswertung verschiedener Ansätze mit der Trimerisierungsmotiv - Mutante WY16,17AVh [Kein N. == Kein Nachweis erzielt].

Berechnet man unter der Annahme, dass bei dem fehlgeschlagenen Nachweis des mittleren Experiments lediglich zu wenig Komplexe per Dünnschicht analysiert wurden, aus den beiden erfolgreich verlaufenen Nachweisversuchen ein durchschnittliches PG zu Protein - Verhältnis, so ergibt sich ein Wert von **0,23** (+/- 0,02).

Für die beiden anderen Trimerisierungsmotiv - Mutanten R21Qh und K23Qh wurden nur wenige Experimente durchgeführt. Zunächst die beiden Versuche mit der Mutante R21Qh:

Chlorophyllgehalt Komplexfraktion [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PG - Gehalt lt. AIDA [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Korrelationskoeffizient (R^2) der verwendeten Eichreihe
219,6	18,3	Kein N.	---	---
107,8	9,0	Kein N.	---	---

Tab. 8: Versuchsergebnisse der AIDA - Auswertung zweier Ansätze mit der Trimerisierungsmotiv - Mutante R21Qh.

In beiden Fällen konnte kein PG in der komplexenthaltenden Fraktion der Ni - Säule gefunden werden. Deshalb kann hier kein PG zu Protein - Verhältnis berechnet werden.

Da bereits bekannt war, dass die Aminosäure 23 (Lysin) das Ende des Trimerisierungsmotives darstellt (Hobe 1995), und sich die Mutante K23Qh somit ähnlich wie der Wildtyp verhalten sollte, wurde mit ihr lediglich ein Kontrollexperiment durchgeführt.

Chlorophyllgehalt Komplexfraktion [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PG - Gehalt lt. AIDA [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Korrelationskoeffizient (R^2) der verwendeten Eichreihe
222	18,5	3,72	0,20	0,923

Tab. 9: Versuchsergebnis der AIDA - Auswertung der Trimerisierungsmotiv - Mutante K23Qh.

Bei diesem Kontrollexperiment zeigt sich ein reduzierter PG - Gehalt der komplexenthaltenden Fraktion der Ni - Säule. Nach Berechnung folgt somit für diese Mutante ein PG zu Protein - Verhältnis von **0,2**.

Wie bereits aus den obigen Tabellen ersichtlich, wurden mehrere Einzelversuche mit dem Ziel einer vergleichenden optischen Darstellung auf einen gleichen Pigmentgehalt von 200 µg normiert und nach Aufreinigung per Dünnschichtchromatogramm analysiert. Diese Versuche sind in den Tabellen in einer anderen Farbe hinterlegt und sollen hier gezeigt werden.

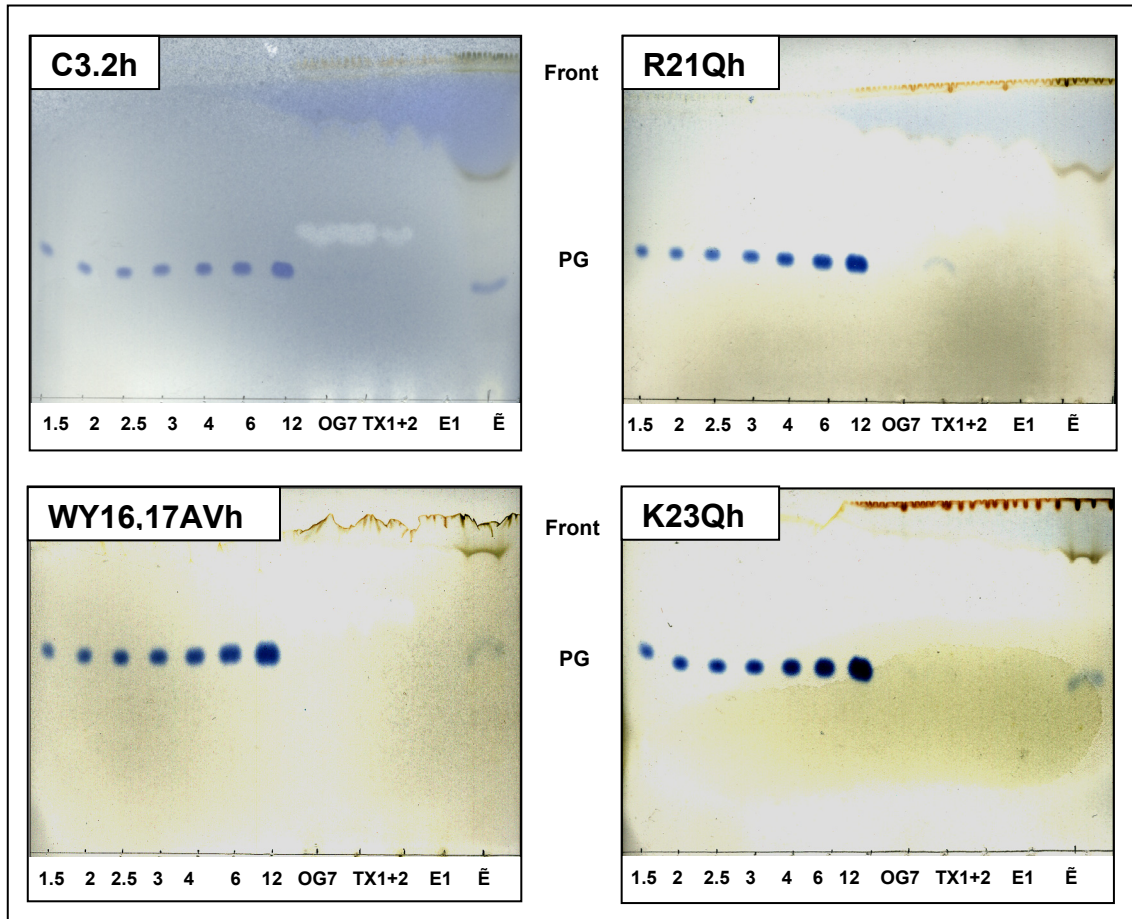


Abb. 35: Dünnschichtchromatogramme mit auf 200 µl normierten Versuchsansätzen aller relevanten Klone. Neben versch. DPPG - Standards [Angabe in µg] wurden wichtige Fraktionen der Ni - Säule nach Quantifizierung und Aufreinigung analysiert.

Man kann erkennen, dass sich die vier untersuchten Klone in ihrem Bindungsverhalten für das PG unterscheiden. Die Wildtyp-Mutante C3.2h bindet das meiste PG. Dem entgegen sieht man bei den Mutanten WY16,17AVh und K23Qh nur wenig PG, die Mutante R21Qh zeigt keinerlei PG in der komplexenthaltenden Fraktion E. Des Weiteren ist bei diesem Versuch mit der Mutante R21Qh erkennbar, dass in der Fraktion TX1, also in der ersten Waschfraktion der Ni - Sepharose Säule mit TX - Puffer, geringfügig PG nachweisbar ist. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass bei dieser Mutante evtl. nur sehr schwach an den Komplex gebundenes PG bereits bei der Zugabe des Detergens Triton - X100 abgewaschen werden konnte, was bei allen anderen Mutanten nicht der Fall war.

3.1.3.8 Modifizierter Lipidnachweis auf Dünnschichtchromatogrammen und Bio-Rad Versa Doc - Auswertung

Anhand der zuletzt gezeigten Abbildung ist erkennbar, dass der Nachweis des PG auf Dünnschichten mittels Molybdän nicht sehr einfach zu realisieren und prinzipiell als eher problematisch anzusehen ist. Alle gezeigten Chromatogramme weisen einen sehr unterschiedlichen Färbungsgrad des Hintergrundes auf, was eine densitometrische Analytik prinzipiell erschwert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Dünnschichten „von Hand“ mit dem schwefelsäurehaltigem Molybdän - Spray besprüht wurden (siehe auch: Material und Methoden 2.6.6) und danach mittels eines Heißluftföns getrocknet bzw. entwickelt wurden. Dabei ist es nicht vermeidbar, dass einzelne Regionen des Chromatogramms unterschiedlich stark mit dem Molybdän - Agens in Berührung kommen und deshalb später auch verschieden stark angefärbt werden. Ein weiteres Problem für eine densitometrische Auswertung mittels Software stellen die unterschiedlichen Formen und Größen der PG - Spots dar. Eine optimale Auswertung mit dem Programm Raytest AIDA gelang immer nur dann, wenn beide Parameter, also Spotgröße und -form aller zu analysierenden PG - Spots sehr ähnlich waren, was nicht immer realisierbar war.

Aus diesen beiden Gründen wurde die Analyseverfahren für Dünnschichtchromatogramme ein weiteres Mal modifiziert: Um ein gleichmäßiges Anfärben der Chromatogramme zu garantieren, wurden die Platten in der Folge nicht mehr „von Hand“ angesprüht, sondern mittels eines Molybdän - Tauchbades entwickelt. Dadurch konnte das Problem der unterschiedlichen Hintergrundfärbung vollständig gelöst werden. Des Weiteren wurden die zu analysierenden Proben nicht mehr manuell auf die Dünnschichtplatten aufgetüpfelt, sondern mittels eines DESAGA - Autospotter maschinell aufgebracht. Dadurch konnte eine wesentlich homogenere Größe und Form der aufgetragenen Spots erreicht werden. Die auf die Färbung folgende densitometrische Auswertung wurde mit einer Versa Doc - Anlage von Bio - Rad und dem Programm Quantity One durchgeführt, das als verbesserter Nachfolger für AIDA eingeführt wurde.

Die mittels dieser modifizierten Methode durchgeführten Versuche sollen wiederum in tabellarischer Form dargestellt werden. Zunächst die Ergebnisse für die Wildtyp - Mutante C3.2h, hier nach Trennung per Saccharose - Dichtegradientenzentrifugation für Monomere und Trimere einzeln analysiert:

LHCII	Chlorophyllgehalt Komplexfraktion [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PG - Gehalt lt. Versa Doc [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	R ² der verwendeten Eichreihe
M	220,8	18,4	0,39	0,02	0,960
T	163,4	13,6	2,39	0,18	0,960
M	209,8	17,5	1,72	0,10	0,993
T	177,2	14,8	4,24	0,29	0,993
M	198,1	16,5	Kein N.	- - -	0,989
T	150,4	12,5	Kein N.	- - -	0,989

Tab. 10: Versuchsergebnisse der Versa Doc - Auswertung verschiedener Ansätze mit der Wildtyp - Mutante C3.2h.

Die gezeigten drei Parallelversuche wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Dennoch erhält man stark streuende Ergebnisse. Berechnet man für die beiden erfolgreich verlaufenen Nachweise ein molares PG zu Protein-Verhältnis für die beiden Komplextypen des LHCII, so erhält man für die Monomere **0,06** (+/- 0,04) und für die Trimere: **0,24** (+/- 0,06)²⁵

Für die Trimerisierungsmotiv - Mutante WY16,17AVh ergaben sich folgende Werte:

Chlorophyllgehalt Komplexfraktion [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PG - Gehalt lt. Versa Doc [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Korrelationskoeffizient (R ²) der verwendeten Eichreihe
209	17,4	3,89 ²⁶	0,22	0,984
209	17,4	0,50 ²⁷	0,03	0,994
218,4	18,2	2,28	0,13	0,984

Tab. 11: Ergebnisse der Versa Doc - Auswertung für die Mutante WY16,17AVh.

Aus diesem ebenfalls stark streuenden Ergebnissen konnte ein molares PG zu Protein - Verhältnis von **0,13** (+/- 0,08) für diese Mutante berechnet werden.

Nun zu den Ergebnissen für die Mutante R21Qh:

Chlorophyllgehalt Komplexfraktion [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PG - Gehalt lt. Versa Doc [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Korrelationskoeffizient (R ²) der verwendeten Eichreihe
209	17,4	1,63	0,09	0,993
209	17,4	0,78 ²⁸	0,05	0,992
248,6	20,7	3,22	0,16	0,984

Tab. 12: Ergebnisse der Versa Doc - Auswertung für die Mutante R21Qh.

Bei allen Versuchen mit dieser Mutante wurden nur sehr geringe Mengen an PG detektiert. Daraus berechnet sich ein PG zu Protein - Verhältnis von **0,1** (+/- 0,05).

Für die Mutante K23Qh wurden in diesem Zusammenhang keine Experimente durchgeführt, da auch hier ein Ergebnis zu erwarten war, wie bei der Wildtyp-Mutante C3.2h.

Folgende beiden Abbildungen sollen die in den Tabellen bereits dargestellten Ergebnisse optisch veranschaulichen und sind mit den in den Tabellen farbig hinterlegten Einzelergebnissen identisch.

Links sind Beispiele für die Resultate der Saccharose - Dichtegradientenzentrifugation angeführt. Rechts davon sind einige der für die densitometrische Auswertung herangezogenen Dünnschichtchromatogramme abgebildet.

²⁵ Es wurde der PG - Gehalt pro Monomermolekül im LHCII - Trimer berechnet.

²⁶ Hier wurden die ermittelten Werte für die Proben TX1 und E zur Berechnung des PG - Gehalts addiert.

²⁷ Trotz der zuvor durchgeführten Kieselsäure-Säulenbehandlung war dieser Versuch aufgrund starker Chlorophyllstörungen nur sehr schlecht auswertbar.

²⁸ siehe Fußnote 26.

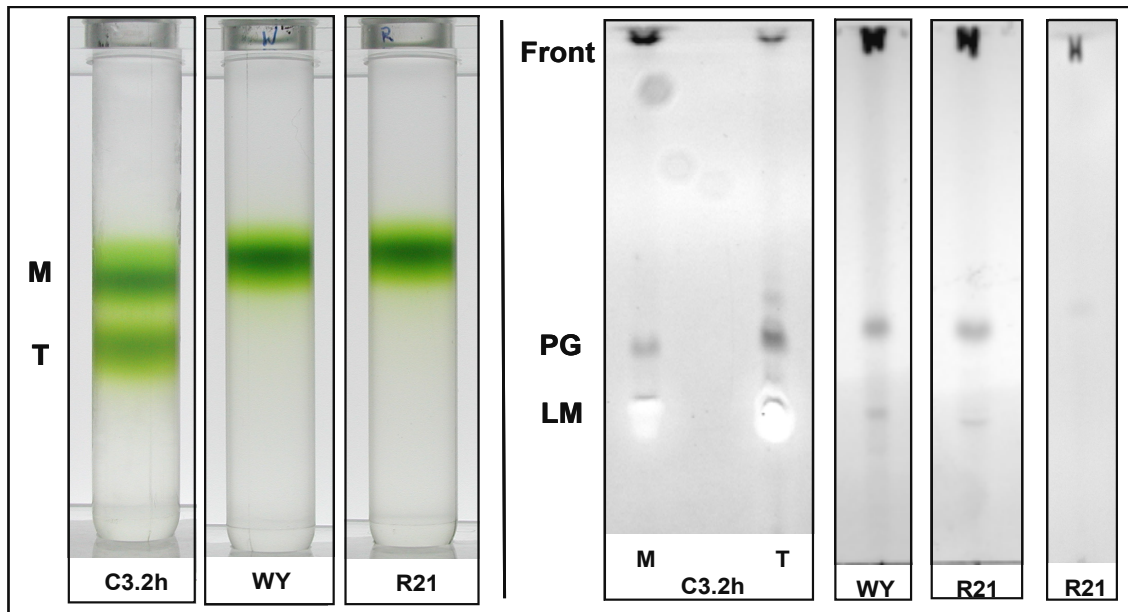


Abb. 36. Einige Beispiele für Versuchsergebnisse im Rahmen der densitometrischen Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen mittels Bio - Rad Versa Doc - Anlage. **Links** werden drei exemplarische Ergebnisse der Saccharose - Dichtegradientenzentrifugation angegeben. **Rechts** davon sind Ausschnitte der Dünnschichtchromatogramme einzelner Versuche abgebildet. Für die Mutante R21Qh werden zwei divergierende Versuchsergebnisse gezeigt.

Aufgrund der sehr unterschiedlichen Ergebnisse innerhalb der Messreihen für die einzelnen Mutanten wurde im Anschluss an die oben dargestellten vergleichenden Messungen nach latenten Fehlerquellen in der Analytik gesucht.

Ein Indiz für einen aufgetretenen systematischen Fehler bei der Probenbehandlung lieferte vor allem die Wildtyp - Mutante C3.2h, bei der in einem Fall selbst für trimerem LHCII, bei dem ein PG - Gehalt laut Literatur als sehr sicher gilt, kein PG - Nachweis mehr erzielt werden konnte. Da es trotz der stringenten Waschung der Komplexe auf der Ni - Sepharose - Säule dennoch möglich war, LHCII - Trimere für diese Mutante zu bilden, musste der Fehler nach der Ni - Säulenbehandlung und der darauf folgenden Trennung mittels Dichtegradientenzentrifugation liegen.

Es stellte sich heraus, dass während der danach durchgeführten Lipidextraktion kein komplexgebundenes PG verloren geht. Dies konnte anhand von mehreren Blindversuchen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Somit musste das analytische Problem durch das Aufreinigen der Proben auf der Kieselsäure - Säule zum Abreichern der Detergentien und komplexgebundenen Pigmente vor der Dünnschichtchromatographie entstanden sein²⁹.

²⁹ Methodenbeschreibung: siehe Abschnitt 2.6.5

Um dies zu testen wurden neben einem reinen 10 µg Aliquot DPPG (A) mehrere weitere 10 µg - Aliquots DPPG mit 300 µg Totalpigmentextrakt gemischt (B-D) und unter verschiedenen Waschbedingungen auf der Kieselsäure - Säule behandelt. Da die Vermutung nahe lag, dass sich die Bindungseigenschaften des Kieselsäurematerials durch einen unterschiedlich hohen Wasseranteil der verwendeten Lösemittel, vor allem des verwendeten selbst destillierten Acetons verändern lassen, wurden dem für die Säule verwendeten Aceton einmal kein Wasser (B), einmal 5% Wasser (C) und einmal 10% Wasser (D) hinzugefügt. Folgende beiden Abbildungen sollen das Versuchsergebnis verdeutlichen. Versuchsansatz A (ohne Pigmentverunreinigung) wurde analog zu B aufgearbeitet.

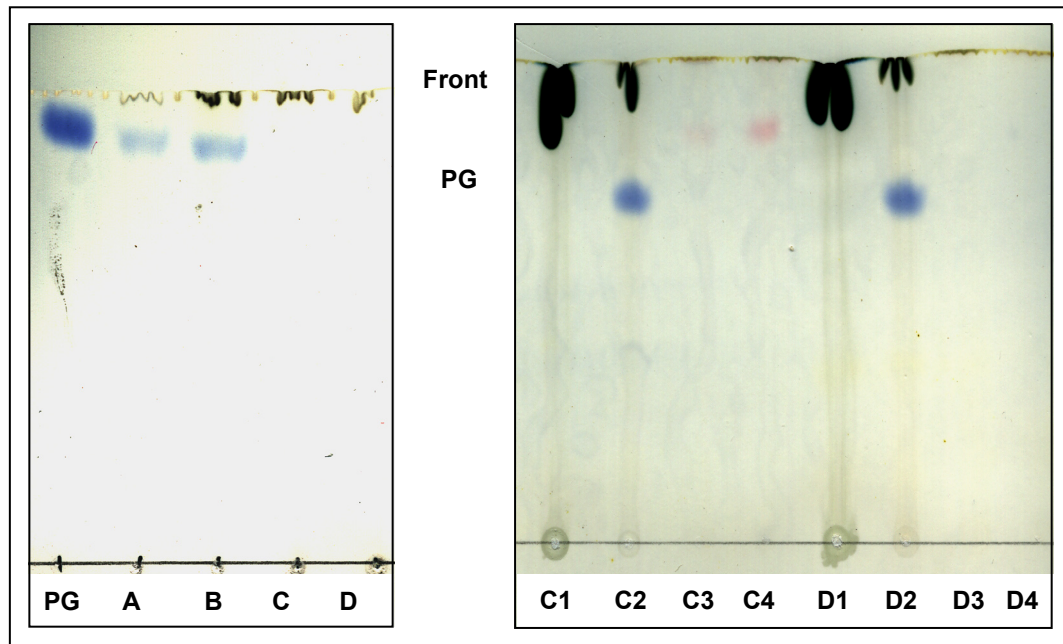


Abb. 37: Versuch zur Kieselsäure - Säulenaufreinigung: **Links:** Neben einem 10µg DPPG - Standard (PG) wurden die Eluate aus vier verschiedenen Kieselsäure - Säulenpräparationen aufgetragen: A und B: kein Wasser im Aceton; C: 5% Wasser im Aceton und D: 10% Wasser im Aceton. Das während der Säulenreinigung verwendete Chloroform und Methanol war für alle Versuche identisch. Ansatz A enthielt keine Pigmentverunreinigung, bei Ansatz B bis D waren jeweils 300 µg Totalpigmentextrakt vorab zugesetzt. **Rechts:** Auftrag der verschiedenen Waschfraktionen der Kieselsäure - Säule für die Versuche C und D: C1 und D1 stellen die aufgetragenen Chloroform-Waschritte der Versuche dar. Die Aceton - Waschschrte wurden in Aliquots zu je 10 ml gesammelt und danach analysiert .

Es zeigt sich, dass das Bindungsverhalten der Kieselsäure sich bereits unter Zusatz von 5% Wasser zum verwendeten Aceton total verändert. Zuvor an die Säulenmatrix fest gebundenes PG wird durch diese Kontamination freigesetzt und kann dadurch verfrüht von der Kieselsäure - Säule eluiert werden, wie man anhand der in der rechten Abbildung aufgetragenen Aceton - Waschfraktionen erkennen kann. Da reines Aceton leicht hygroskopisch ist, kann es deshalb vorkommen, dass unterschiedliche verwendete Chargen an selbst destilliertem Aceton auch einen unterschiedlich hohen Wasseranteil enthielten. Die Vermutung liegt nahe, dass genau dieses Problem bei einigen der durchgeführten Kieselsäure - Säulenaufreinigungen aufgetreten ist und deshalb selbst bei der Wildtyp - Mutante C3.2h einmal kein PG - Nachweis für den trimeren LHCII erzielt werden konnte. Nach diesem Experiment wurde ein Wechsel der Analytik hin zum rein anorganischen, spektroskopischen Nachweis des komplexgebundenen PG durchgeführt.

3.1.4. Vergleichender photometrischer Phospholipidnachweis von LHCII - Wildtyp und Trimerisierungsmotiv - Mutanten

Aufgrund der im vorigen Kapitel beschriebenen Schwierigkeiten mit dem Nachweis von Phosphatidylglyzerin mittels Dünnschichtchromatogrammen, wurde nach Alternativen für diese Nachweismethode gesucht. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde von Stephanie Boggasch³⁰ daraufhin ein photometrischer Nachweis für komplexgebundenes PG erarbeitet. Dieser Nachweis beruht auf dem Anfärben der Phosphat - Kopfgruppe des Lipids mittels Molybdän als Molybdänblau - Komplex (vgl. Material und Methoden Abschnitt 2.6.8). Da bei der Bindung des PG genau ein Phosphatmolekül in den Komplex eingeführt wird, kann durch die Bestimmung des Phosphat-gehalts der Komplexe auf den PG - Gehalt zurückgerechnet werden. Zuvor muss das organisch gebundene Phosphat für den Nachweis zugänglich gemacht werden. Dazu wurden die zu untersuchenden Proben, wie im Material und Methoden - Teil beschrieben, „nass“ verascht. Organisches Phosphat wird dadurch in anorganisches Orthophosphat überführt und kann danach als löslicher Molybdänblau - Komplex bei einer Wellenlänge von 815 nm photometrisch nachgewiesen werden.³¹

3.1.4.1 Vergleichender photometrischer Phospholipidnachweis mit der „Methode K“

Zur Etablierung dieser photometrischen Methode wurden zunächst von Stephanie Boggasch, ausgehend von einer Methodik nach Debuch *et al.* (1968) und unveröffentlichten Arbeiten von Dr. Peter Beutelmann verschiedene Testversuche durchgeführt. Ziel dieser Versuche war es, einen reproduzierbaren, einfach durchzuführenden Nachweis für das Phosphat zu finden und danach eingehend zu testen. Die einzelnen Ergebnisse dieser Bemühungen können in der oben angegebenen Diplomarbeit nachgelesen werden. An dieser Stelle soll nur auf die Methodik eingegangen werden, die dort als „**Methode K**“ angegeben wird. Mit dieser Methode sollte es unter Einhaltung von verschiedenen angegebenen Reinheitsregeln und Anwendung des Prinzips der Mehrfachbestimmung möglich sein, an LHCII gebundenes Phosphat (PG) eindeutig und reproduzierbar nachzuweisen.

Eine genaue Anleitung zur Durchführung dieser „Methode K“ ist dem Material und Methoden - Teil dieser Arbeit zu entnehmen (siehe Abschnitt 2.6.8.3). An dieser Stelle soll lediglich darauf hingewiesen werden, dass bei dieser Analytik keinerlei zusätzliche Probenvorbereitung, wie zum Beispiel per Kieselsäure - Säulen (siehe letztes Kapitel) nötig ist. Die nach der Lipidextraktion entstandenen Extrakte werden direkt „nass verascht“, mit den entsprechenden Agenzien inkubiert und die entstehenden farbigen Komplexe direkt photometrisch vermessen.

Gemäß Stephanie Boggasch wurden zunächst folgende Versuchsparameter verwendet:

³⁰ Stephanie Boggasch (2002) Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Mainz.

³¹ In der Folge wird diese Methode deshalb auch kurz als A₈₁₅ - Methode benannt.

Gefäß	PCA - Zugabe	Hydrolyse-Temperatur	Hydrolyse-dauer	H ₂ O - Zugabe	Molybdat - Zugabe [4%]	Ascorbat - Zugabe [5%]
Glas	200 µl	190°C	30 min	100 µl	300 µl	300 µl

Tab. 13: „Methode K“ zum photometrischen Nachweis von Phosphat in organischen Proben: aus der Diplomarbeit von Stephanie Boggasch, Mainz 2002. [PCA = Perchlorsäure]

Mit Hilfe dieser Versuchsparameter wurde (wie bereits zuvor mit der Dünnschichtchromatographie) der PG - Gehalt der Wildtyp - Mutante C3.2h und der versch. Trimerisierungsmotiv - Mutanten untersucht.

Für LHCII - **Monomere** der Wildtyp - Mutante C3.2h wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Chlorophyllgehalt Komplexfraktion [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PO ₄ ²⁻ bzw. PG - Gehalt [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Steigung der verwendeten Eichgerade	Korrelationskoeffizient (R ²) der verwendeten Eichreihe
110	9,2	3,3	0,36	0,03	0,920
110	9,2	1,5	0,16	0,11	0,987
110	9,2	1,2	0,13	0,11	0,987
92	7,7	0,9	0,12	0,11	0,987
79	6,6	2,8	0,42	0,10	0,974
79	6,6	2,1	0,32	0,10	0,974
109	9,1	4,5	0,49	0,06	0,961
107	8,9	4,2	0,47	0,06	0,961
98	8,2	4,6	0,55	0,06	0,961
87	7,3	3,9	0,54	0,06	0,961

Tab. 14: Ergebnisse der A₈₁₅ - Methodik mit „Methode K“ nach Stephanie Boggasch für C3.2h - Monomere.

Berechnet man trotz der stark streuenden Ergebnisse aus dieser Tabelle ein durchschnittliches PG zu Protein - Verhältnis für die Monomere der Mutante C3.2h, so ergibt sich ein Wert von **0,36** (+/- 0,16)³².

Für LHCII - **Trimere** der gleichen Mutante zeigt sich folgendes:

Chlorophyllgehalt Komplexfraktion [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PO ₄ ²⁻ bzw. PG - Gehalt [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Steigung der verwendeten Eichgerade	Korrelationskoeffizient (R ²) der verwendeten Eichreihe
77	6,4	5,9	0,92	0,03	0,920
53	4,4	5,1	1,16	0,11	0,987
66	5,5	2,7	0,50	0,11	0,987
63	5,2	3,5	0,67	0,10	0,974
63	5,2	3,8	0,73	0,10	0,974
20	1,7	7,3	1,06	0,06	0,908
17	1,4	6,5	1,20	0,06	0,908
20	1,7	6,7	0,98	0,06	0,908
8	0,7	5,3	0,93	0,06	0,908

Tab. 15: Ergebnisse der A₈₁₅ - Messungen mit der „Methode K“ nach S. Boggasch für C3.2h - Trimere.

³² Es wurde mit der Microsoft Excel - Funktion STABWN gearbeitet.

Auch hier wurde trotz der stark differierenden Werte mit Hilfe der Tabelle ein durchschnittliches molares PG zu Protein - Verhältnis für die C3.2h - Trimere mit einem Wert von **0,91** (+/- 0,22)³³ berechnet. Es handelt sich dabei analog zu den Berechnungen aus den densitometrisch ausgewerteten Dünnschichtchromatogrammen um den PG-Gehalt der einzelnen Monomer - Untereinheiten eines Trimers.

Für die Trimerisierungsmotiv - Mutanten WY16,17AVh und R21Qh wurden analog mehrere Versuche durchgeführt.

Zunächst die Ergebnisse der Mutante WY16,17AVh:

Chlorophyllgehalt Komplexfraction [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PO ₄ ²⁻ bzw. PG - Gehalt [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Steigung der verwendeten Eichgerade	Korrelationskoeffizient (R ²) der verwendeten Eichreihe
110	9,2	2,5	0,27	0,08	0,780
110	9,2	4,5	0,49	0,08	0,780
20	1,6	2,4	0,37	0,07	0,782
20	1,6	4,2	0,65	0,07	0,782

Tab. 16: Ergebnisse der A₈₁₅ - Messungen mit „Methode K“ für die Trimerisierungsmotiv - Mutante WY16,17AVh.

Wieder fällt die starke Streuung der Ergebnisse der Experimente auf. Für das molare PG zu Protein - Verhältnis kann ein Wert von **0,45** (+/- 0,16) berechnet werden.

Ergebnisse für die Mutante R21Qh:

Chlorophyllgehalt Komplexfraction [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PO ₄ ²⁻ bzw. PG - Gehalt [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Steigung der verwendeten Eichgerade	Korrelationskoeffizient (R ²) der verwendeten Eichreihe
120	10	2,9	0,29	0,08	0,971
120	10	4,8	0,48	0,08	0,971
77	6,4	2,1	0,33	0,07	0,782
77	6,4	2,0	0,31	0,07	0,782

Tab. 17: Ergebnisse der A₈₁₅ - Methodik mit „Methode K“ nach Stephanie Boggasch für R21Qh - Komplexe.

Hier berechnet sich aus obiger Tabelle ein PG zu Protein - Verhältnis von **0,35** (+/- 0,07).

Generell ist zu dieser Methodik allerdings anzumerken, dass trotz der hier angegebenen erfolgreich ermittelten Werte für den PG - Gehalt von LHCII - Komplexen viele Einzelexperimente mehrfach wiederholt werden mussten, bis ein auswertbares Ergebnis erzielt werden konnte. Dies wurde dadurch nötig, dass trotz der präzisen Einhaltung der von Stephanie Boggasch aufgestellten Reinheitsregeln (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.6.8.1) des öfteren stark unterschiedliche Werte innerhalb der Dreifachbestimmungen der DPPG - Standards der Eichreihe resultierten oder einfach alle verwendeten Röhrchen nach Farbstoffbildung viel zu intensiv angefärbt wurden.

³³ Ebenfalls mit der Microsoft Excel - Funktion STABWN berechnet.

Anhand der folgenden Abbildung kann diese Problematik veranschaulicht werden:

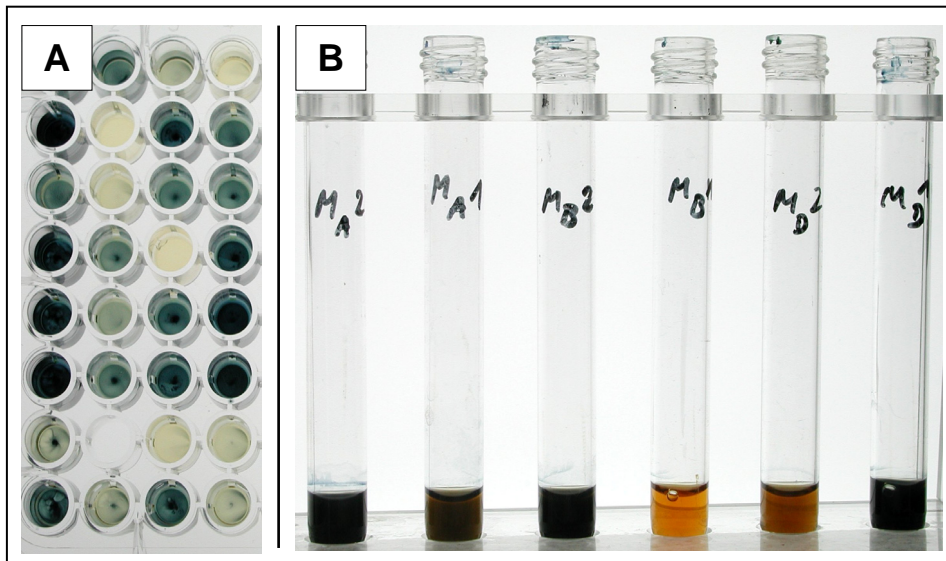


Abb. 38: Problematik bei der Durchführung der „Methode K“: Ergebnisse eines nicht auswertbaren Versuches mit der Mutante C3.2h. **A:** Aufsicht auf eine mit versch. DPPG - Standards befüllte Mikrotiterplatte. Teilweise sind die Werte für ein- und denselben DPPG - Standard verschieden. **B:** Glasröhrchen mit Lipidextrakten aus C3.2h - Monomeren. Jeweils zwei Röhrchen zeigen vor der Prozedur in zwei identische Hälften aufgeteilte Komplexextrakte. Besonders bei den beiden Proben in der Mitte wird die Problematik der extrem divergierenden Ergebnisse deutlich.

3.1.4.2 Vergleichender photometrischer Phospholipidnachweis nach einer modifizierten Methode

Nachdem sich schließlich ca. 50% aller Versuchsansätze als nicht auswertbar erwiesen hatten und auch eine systematische Überprüfung aller Versuchsparameter nicht zum Erfolg führte (Daten nicht gezeigt), konnten schließlich durch den Rückgriff auf eine unveröffentlichte Methode von Dr. Peter Beutelmann (Universität Mainz) die oben angeführten Probleme behoben werden (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.6.8.4).

Bei dieser modifizierten Methode wird durch Zugabe von deutlich mehr Wasser nach der „nassen Veraschung“ die Perchlorsäure stärker verdünnt. Zudem werden weniger Molybdat- und Ascorbatlösung zu den Ansätzen zugegeben. Folgende Tabelle zeigt die verwendeten Versuchsparameter:

Gefäß	PCA - Zugabe	Hydrolyse-Temperatur	Hydrolyse-dauer	H ₂ O - Zugabe	Molybdat - Zugabe [4%]	Ascorbat - Zugabe [5%]
Glas	200 µl	190°C	30 min	1200 µl	120 µl	120 µl

Tab. 18: Modifizierte Methode zum photometrischen Nachweis von Phosphat in organischen Proben nach unveröffentlichten Arbeiten von Dr. Peter Beutelmann . [PCA = Perchlorsäure]

Mit dieser Methode durchgeführte Experimente zeichneten sich bereits dadurch aus, dass die mittels DPPG - Standards erstellten Eichgeraden fast deckungsgleich zueinander angeordnet waren, was bei der „Methode K“ nicht zu beobachten war. Dennoch wurde bei allen Einzelexperimenten immer wieder eine neue Eichreihe aufgenommen.

Zunächst die Ergebnisse für C3.2h - **Monomere**:

Chlorophyllgehalt Komplexfraction [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PO ₄ ²⁻ bzw. PG - Gehalt [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Steigung der verwendeten Eichgerade	Korrelationskoeffizient (R ²) der verwendeten Eichreihe
83	6,9	2,3	0,34	0,0261	0,967
83	6,9	2,7	0,40	0,0261	0,967
60	5,0	1,9	0,39	0,0298	0,987
60	5,0	2,3	0,47	0,0298	0,987
71	5,9	2,3	0,40	0,0287	0,994
71	5,9	2,6	0,44	0,0287	0,994

Tab. 19: Ergebnisse der A₈₁₅ - Messungen für C3.2h - Monomere. Es wurde eine Methode nach Dr. Beutelmann verwendet.

Es ergibt sich ein durchschnittliches molares PG zu Protein - Verhältnis für die C3.2h - Monomere mit einem Wert von **0,41** und einer sehr geringen Standardabweichung von +/- 0,04³⁴.

Für C3.2h - **Trimere** zeigt sich folgendes:

Chlorophyllgehalt Komplexfraction [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PO ₄ ²⁻ bzw. PG - Gehalt [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Steigung der verwendeten Eichgerade	Korrelationskoeffizient (R ²) der verwendeten Eichreihe
67	5,6	5,2	0,89	0,0261	0,967
70	6,2	3,7	0,59	0,0298	0,987
50	4,2	2,1	0,51	0,0287	0,994
50	4,2	2,2	0,54	0,0287	0,994

Tab. 20: Ergebnisse der A₈₁₅ - Methodik für C3.2h - Trimere. Methode nach Dr. Beutelmann.

Hier kann man erkennen, dass der oberste Wert besonders stark von den ansonsten ähnlichen anderen Werten abweicht. Berechnet man dennoch mit allen Werten ein molares PG zu Protein - Verhältnis, erhält man **0,63** (+/- 0,27)³⁵.

Die Trimerisierungsmotiv - Mutante WY16,17AVh zeigt mit dieser Methode folgende Ergebnisse:

Chlorophyllgehalt Komplexfraction [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PO ₄ ²⁻ bzw. PG - Gehalt [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Steigung der verwendeten Eichgerade	Korrelationskoeffizient (R ²) der verwendeten Eichreihe
121	10,1	3,4	0,34	0,0314	0,998
69	5,8	2,2	0,39	0,0311	0,991
69	5,8	2,2	0,38	0,0311	0,991

Tab. 21: Resultate der A₈₁₅ - Messungen für WY16,17AVh nach der modifizierten Methode von Dr. Beutelmann.

³⁴ Es wurde mit der Funktion STABWN von MS EXCEL gearbeitet.

³⁵ Es handelt sich wieder um den PG - Gehalt der monomeren Untereinheiten des Trimers.

Es kann mit diesen Werten ein PG zu Protein - Verhältnis von **0,35** (+/- 0,12) berechnet werden.

Für die Mutante R21Qh ergibt sich schließlich:

Chlorophyllgehalt Komplexfraktion [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PO ₄ ²⁻ bzw. PG - Gehalt [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Steigung der verwendeten Eichgerade	Korrelationskoeffizient (R ²) der verwendeten Eichreihe
81	6,8	3,0	0,45	0,0314	0,0998
105	8,8	2,1	0,23	0,0314	0,998
68	5,6	1,9	0,33	0,0311	0,991
68	5,6	2,5	0,44	0,0311	0,991

Tab. 22: Ergebnisse der A₈₁₅ - Methodik nach Dr. Beutelmann für die Mutante R21Qh.

Für R21Qh lässt sich ein Verhältnis von **0,31** (+/- 0,12) bestimmen.

Es fällt auf, dass mit dieser Methode für alle untersuchten LHCII - Monomere (Wildtyp wie Trimerisierungsmotiv - Mutanten) ein mehr oder minder gleiches molares PG zu Protein - Verhältnis berechnet werden kann. Gerade für die Mutante R21Qh war dies ein unerwartetes Ergebnis. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse mittels Dünnschichtchromatographie wurde erwartet, dass hier ein niedrigeres PG zu Protein - Verhältnis im Vergleich zu Wildtyp und WY16,17AVh resultieren würde. Zunehmend stellte sich die Frage, ob eventuell ein systematischer Fehler vorlag. Um dies herauszufinden, wurde in folgenden Experimenten versucht, eine Art „Nullkontrolle“ für all diese photometrischen Messungen zu entwickeln.

Nußberger beschrieb bereits 1993, dass ein Verdau von nativem LHCII mittels immobilisiertem Trypsin und Chymotrypsin dazu führte, dass die ersten N - proximalen 49 bis 51 Aminosäuren vom LHCII - Komplex abgedaut werden. Mit Hilfe dieser Methode wurden Trimere irreversibel in ihre Monomeruntereinheiten überführt. Die anschließende Lipidanalyse dieser unvollständig verdauten Komplexe mittels Dünnschichtchromatographie zeigte, dass selbst PG, das unter anderen von Nußberger verwendeten Methoden immer stringent an den LHCII gebunden blieb, nach dieser Prozedur nicht mehr an den Monomeren nachgewiesen werden konnte. Dieses Experiment sollte nun nachvollzogen werden und die daraus resultierenden Komplexe mittels des photometrischen Nachweises auf ihren PG - Gehalt hin überprüft werden.

Zu diesem Zweck wurden Komplexe aus Detergenzwechsel - Rekonstitutionen der Mutante C3.2h gemäß der im Material und Methoden - Teil Kapitel 2.6.8.5 angegebenen Verdaumethode unterschiedlich lang bei 0°C mit einer 1:1 - Mischung von Trypsin und Chymotrypsin verdaut. Nach dem Abstoppen der Reaktion mittels PMSF erfolgte der Auftrag der nun teilweise verdauten Komplexe auf Ni - Sepharose - Säulen. Danach folgte das Waschen der Komplexe mit Detergenz zum Entfernen von überschüssigem und durch den Verdau evtl. abgelöstem PG. Bereits nach einigen Detergenz - Waschschritten zeigte sich jedoch, dass keine Komplexe mehr auf den Säulen verblieben.

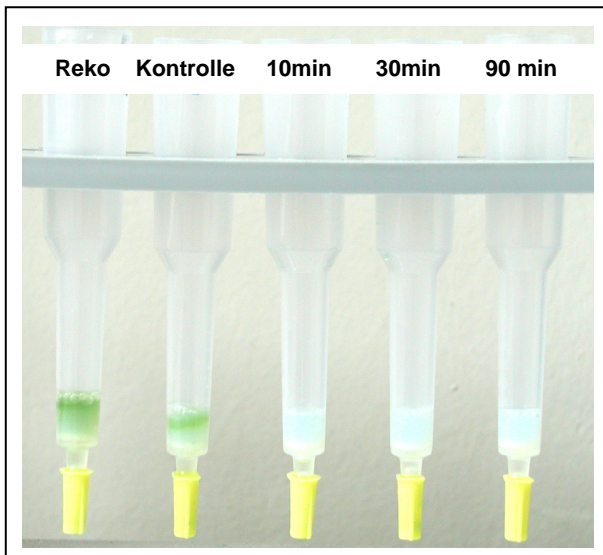


Abb. 39: Ni - Sepharose - Säulen mit Chymotrypsin/Trypsin verdauten C3.2h - Komplexen nach Säulenauftrag und einigen Detergenz - Waschschritten: Neben einer unverdauten Detergenzwechsel - Rekonstitution (Reko) wurden drei verschiedene Verdauansätze (10 -, 30 - und 90 min. Inkubation mit Enzym) und eine gleich behandelte Kontrolle ohne Zusatz der Enzyme aufgetragen.

Da bereits nach kurzer Inkubation mit den beiden Enzymen keine Bindung der Komplexe mehr an die Ni - Sepharose möglich schien, lag die Vermutung nahe, dass der C - terminale His₆ - Tag von dem Verdau mit betroffen wurde. Dies wurde experimentell überprüft.

Aliquots verschiedener Verdauansätze wurden vor dem Auftrag auf die Sepharose - Säulen per denaturierender Gelelektrophorese, Western Blotting und anschließendem Nachweis des His₆ - Tag durch einen spezifischen Antikörper untersucht (siehe wiederum Abschnitt 2.6.8.5 dieser Arbeit). Dabei wurde zum Vergleich eine Reihe nur mit Chymotrypsin und eine weitere Reihe wieder mit der Mischung aus Chymotrypsin und Trypsin behandelt. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der PAGE und das des anschließenden Antikörper - Nachweises nach dem Western - Blotting.

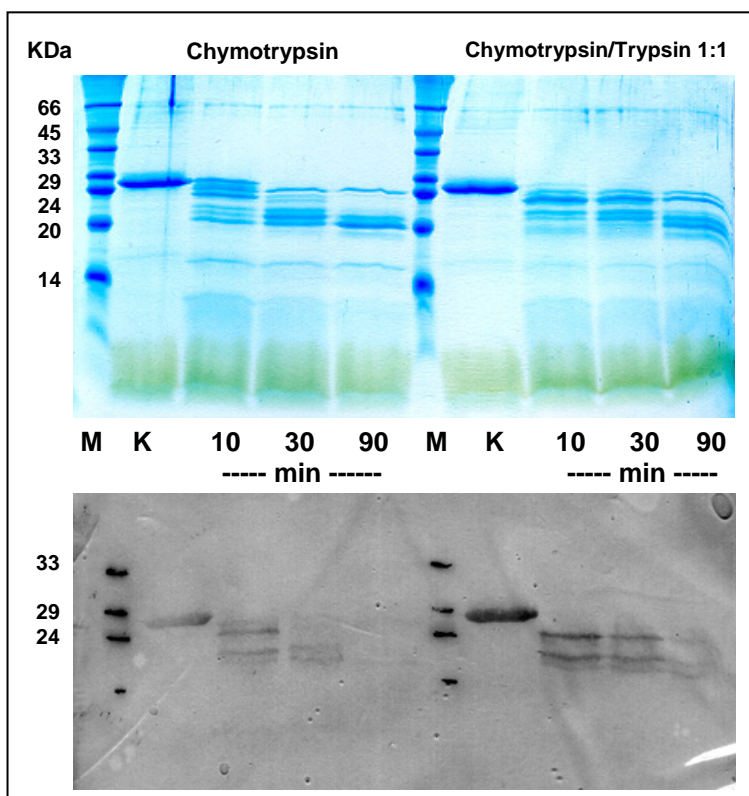


Abb. 40: Denaturierende PAGE (**oben**) und Anti - His₆ - behandelter Western Blot (**unten**) mit verdauten C3.2h Rekonstitution vor Auftrag auf die Ni - Sepharose - Säule: Neben einem Marker (M) wurden je drei Verdauansätze nach 10-, 30- und 90 Minuten Enzyminkubation und eine gleichbehandelte Kontrolle (K) aufgetragen. Links wurde nur mit Chymotrypsin, rechts mit einer Mischung aus Chymotrypsin und Trypsin im Verhältnis 1:1 gearbeitet.

Anhand der denaturierenden PAGE kann man erkennen, dass die meisten LHCII - Komplexe bereits nach 10 Minuten Verdau mit den eingesetzten Enzymen deutlich verkürzt werden. Mittels des anschließend durchgeführten Western Blots und der Behandlung mit dem Anti - His₆ - Antikörper zeigt sich zudem, dass bereits nach 10 Minuten und noch deutlicher nach 30 Minuten ein großer Teil der verdauten Komplexe keinen per Antikörper nachweisbaren His₆ - Tag mehr aufweist. Nach 90 Minuten ist praktisch kein Signal mehr zu erkennen. Dies erklärt das in der vorherigen Abbildung gezeigte Bindungsverhalten auf der Ni - Sepharose - Säule. Geht der His₆ - Tag beim Enzymverdau verloren, ist eine darauf folgende Bindung an Ni - Sepharose einfach nicht mehr möglich.

Somit wird auch der C - terminale Bereich des gefalteten LHCII - Komplexes durch den Verdau mit Chymotrypsin und Trypsin angegriffen.

Da es jedoch für die hier zu untersuchende Fragestellung maßgeblich erschien, freies bzw. durch den Enzymverdau frei gewordenen PG nach Immobilisierung der Komplexe auf der Ni - Sepharose - Säule von den Komplexen abzuwaschen, wurde im Anschluss versucht, zuerst die LHCII - Komplexe an Sepharose zu binden und erst danach, also auf der Säule, den Enzymverdau durchzuführen. Es zeigte sich, dass nach dieser Prozedur trotz Verdau Komplexe auf der Ni - Sepharose - Säule verblieben und somit für einen späteren photometrischen Nachweis zugänglich wurden. Zur Kontrolle wurden wiederum Aliquots der enzymbehandelten Komplexe auf eine denaturierende PAGE aufgetragen. Analog zur Abb. 40 zeigten sich ähnliche Verdauemuster, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass trotz vorheriger Immobilisierung der Komplexe der Verdau erfolgreich durchgeführt werden konnte (Abbildung nicht gezeigt). Zudem zeigte eine Auftrennung der entstandenen Komplexe auf Saccharose - Dichtegradienten, dass nach der Trennung über Nacht keinerlei Trimere mehr nachweisbar waren. Unterstützend folgte die Analyse per CD - Spektroskopie und eine HPLC - Analyse der komplexgebundenen Pigmente. Beide Analysen zeigten keine Auffälligkeiten im Bezug auf gleiche Analysen nicht - verdauter Komplexe (Daten nicht gezeigt).

Im Anschluss an diese Kontrollen folgte die nasse Veraschung und anschließende photometrische Analyse des PG - Gehalts der so behandelten Komplexe. Folgende Tabelle zeigt das Ergebnis mehrerer durchgeführter Experimente:

Chlorophyllgehalt Komplexfraktion [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	PO ₄ ²⁻ bzw. PG - Gehalt [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]	Steigung der verwendeten Eichgerade	Korrelationskoeffizient (R ²) der verwendeten Eichreihe
68	5,7	3,1	0,55	0,0298	0,987
42	3,5	1,7	0,49	0,0287	0,994
42	3,5	1,6	0,46	0,0287	0,994
103	8,6	3,7	0,43	0,0276	0,996

Tab. 23: Ergebnisse der A₈₁₅ - Messungen mit Trypsin/Chymotrypsin verdauten C3.2h - Komplexen. Es wurde die Methodik nach Dr. Peter Beutelmann angewendet.

Aufgrund dieser Messwerte kann ein PG zu Protein - Verhältnis von **0,48** (+/- 0,15) für die verdauten C3.2h - Komplexe berechnet werden.

Selbst für verdaute Wildtyp - Komplexe kann somit mit dieser Methode PG nachgewiesen werden. Es ergibt sich dadurch ein Widerspruch zu Nußbergers Aussagen.

Da Nußberger allerdings Dünnschichtchromatogramme zur Auswertung des Lipidgehalts verwendete, wurde im Anschluss noch einmal ein Experiment durchgeführt, bei dem die nach dem Verdau resultierenden Komplexe mittels Dünnschichtchromatographie und Molybdännachweis analysiert wurden. Während der für diese Auswertungsmethode nötigen Vorreinigung der Lipidextrakte per Kieselsäure - Säule wurden identische Chargen von Lösemitteln benutzt, so dass davon auszugehen ist, dass, wenn überhaupt, bei verdauten und unverdauten Proben gleiche Mengen an PG bei diesem Reinigungsschritt verloren gingen (vgl. zu der bereits beschriebenen Problematik).

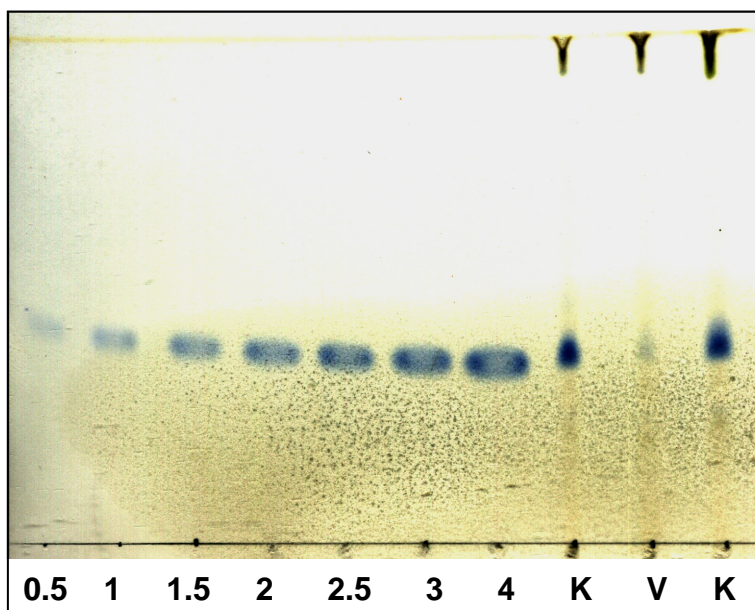


Abb. 41: Dünnschichtchromatogramm zur Vergleich der photometrischen PG - Nachweismethode mit der Dünnschichtchromatographie: Es wurden neben DPPG - Standards zwei unverdaute C3.2h Monomere (K) und ein verdauter C3.2h Komplex (V) analysiert. Dabei war die Menge an aufgetragenem Komplex bei den Kontrollen 14 nmol Protein und beim verdauten Komplex: 10 nmol.

Anhand obiger Abbildung kann man erkennen, dass auch auf Dünnschichten für verdaute C3.2h - Komplexe einen PG - Nachweis erzielen werden kann. Allerdings muss man dazu die Dünnschicht sehr intensiv mit Molybdän anfärben. Der so erzielte Nachweis ist sehr schwach und gleicht in keinem Maße den beiden aufgetragenen unverdauten Kontrollen. Somit ergibt sich hier eine Diskrepanz zu den Ergebnissen mittels der photometrischen A_{815} - Nachweismethode. Nußberger hat laut Veröffentlichung wesentlich geringere Mengen an Komplexen per Dünnschicht analysiert (ca. 1/10 der hier verwendeten Menge). Wahrscheinlich konnte er aufgrund der Nachweisgrenze deshalb für verdaute Komplexe den oben gezeigten schwachen Nachweis nicht erzielen.

Die Frage, warum gemäß photometrischer Nachweismethode gleich viel PG pro Protein für alle analysierten Komplexe und auch für verdaute Komplexe gefunden wurde, konnte auch in weiteren Experimenten nicht eindeutig geklärt werden.

Eine Vermutung zur Klärung dieser Frage ergibt sich lediglich aus einem Experiment, bei dem C3.2h Monomere einmal mit- und einmal ohne Kieselsäure - Säule vorgereinigt wurden und danach allerdings per photometrischer Nachweismethode analysiert wurden (Daten nicht gezeigt). Dieses Experiment stellt also eine Art Querbezug zwischen beiden Analysetechniken dar. Hier konnte für die Komplexe, die auf der Kieselsäure - Säule mit wesentlich mehr Lösungsmittel in Berührung kamen auch ein erheblich höherer PG (genauer Phosphat-) - Wert ermittelt werden. Liegt also der Grund für die nahezu gleichen Ergebnisse für alle Mutanten in der Tatsache, dass bei dieser Nachweismethode nur der Phosphatgehalt der Lösemittel, die während der Lipidextraktion verwendet wurden, analysiert wurde und nicht der Phosphatgehalt der Proben aufgrund des eventuell unterschiedlich an den Komplexen gebundenen PG ?

Mit dieser offenen Frage endeten die Bemühungen zur A_{815} - Nachweismethode. In weiteren Versuchen wurde versucht, mittels eines spezifischen PG - Antikörpers und des so genannten Slot - Blottings zu neuen Erkenntnissen zu gelangen.

3.1.5 Vergleichender Phospholipidnachweis mittels eines spezifischen PG - Antikörpers

Nachdem sowohl die Methode der Dünnschichtchromatographie als auch die photometrische A_{815} - Methode zur Bestimmung des Phospholipidgehalts von verschiedenen LHCII - Komplexen zu keinen einheitlichen Ergebnissen geführt hatten, wurde im Anschluss versucht, komplexgebundenes Phospholipid durch einen spezifischen Antikörper nachzuweisen.

Diese Versuche verblieben weitgehend im Anfangsstadium, sollen aber aus Gründen der Vollständigkeit dennoch erwähnt werden.

In verschiedenen Arbeiten von Olaf Kruse (Kruse *et al.* 1995 bzw. 2000) wird auf einen Antikörper für Phosphatidylglyzerin eingegangen. Dieser Antikörper ist in der Lage, sehr spezifisch Phosphatidylglyzerin nachzuweisen und zeigt keine Kreuzreaktionen mit anderen Phospholipiden oder gar mit den weiteren Lipiden der Thylakoidmembran MGDG, DGDG und SL. Es sollte also möglich sein, mit Hilfe dieses Antikörpers eventuell auftretende Unterschiede in der PG - Bindung zwischen Wildtyp - Mutante und Trimerisierungsmotiv - Mutanten nachzuweisen. Der Antikörper und ein Kontrollserum wurden freundlicherweise von Olaf Kruse zur Verfügung gestellt.

Um die Spezifität des Antikörpers zu untersuchen, wurde zunächst gemäß der Veröffentlichung von Kruse (1995) versucht, verschieden große molare Mengen an nativen LHCII³⁶ mittels einer Slot Blot - Apparatur auf PVDF - Membranen zu binden (vgl. Material und Methoden Abschnitt 2.6.9). Danach folgten, analog zu den später geplanten Versuchen mit einem Immobilisierungsschritt auf einer Ni - Sepharose - Säule, mehrere Waschschriffe mit detergenschaltigen Puffern. Auch hier sollte so sichergestellt werden, dass nur fest an LHCII gebundenes PG per Antikörper nachgewiesen wird. Nach Blockierung von freier Membran erfolgte die Inkubation mit dem gelieferten Anti - Rabbit - PG - Antikörper, gefolgt von der Inkubation mit einem zweiten, dem Anti - Rabbit - Alkalische Phosphatase - Antikörper. Die so eingeführte Alkalische Phosphatase wurde schließlich per Chemilumineszenz - Farbstoff mittels der Bio - Rad Versa Doc Geldokumentationsanlage nachgewiesen.

Ansatz	1	2	3	4	5	6
Menge LHCII [μg]	5	10	15	20	30	50
Proteinmenge [nmol]	0,2	0,4	0,6	0,8	1,2	2
Berechnete Menge an PG [μg] ³⁷	0,15	0,3	0,5	0,6	1	1,5

Tab. 24: Auftragschema für den Slot Blot - Versuch mit nativen Trimeren. Es wurden insgesamt sechs Fraktionen von 0,2 bis 2 nmol Protein aufgetragen.

³⁶ Die nativen, per Saccharose - Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigten LHCII - Komplexe wurden für diesen Versuch zur Verfügung gestellt. Vor Versuchsdurchführung wurden sie spektroskopisch auf ihre Intaktheit hin überprüft und anschließend photometrisch quantifiziert.

³⁷ Dieser Angabe liegt eine Berechnung unter Annahme eines molaren PG zu Protein - Verhältnisses von 1 zu 1 zugrunde.

Die Analyse der so erzeugten Slot Blots ergab folgendes Bild:

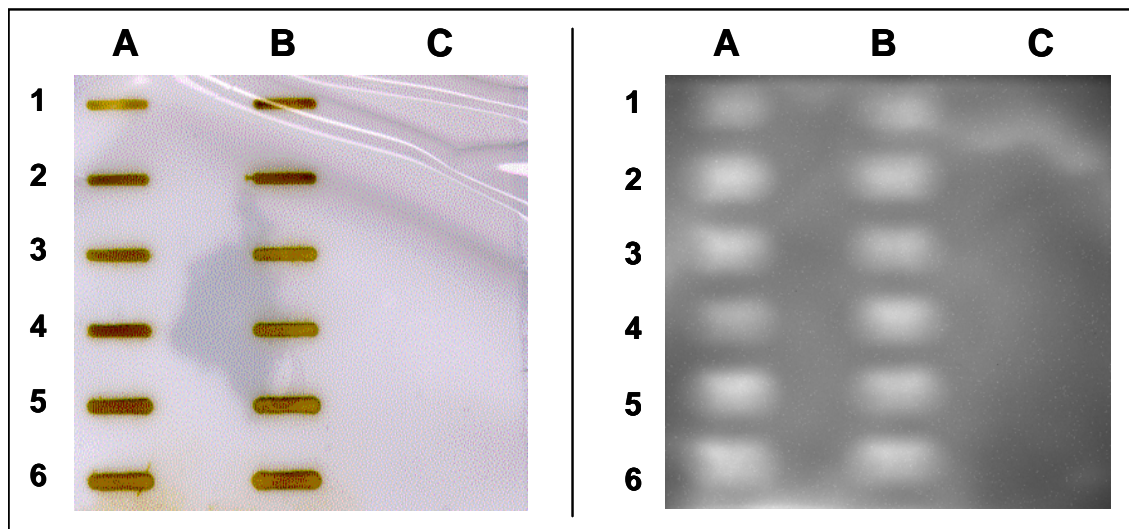


Abb. 42: Ergebnis des Slot Blot - Versuches mit nativem LHCII. **Links:** Foto des Slot Blots vor Antikörper - Behandlung; **Rechts:** Chemilumineszenz - Aufnahme nach 30 min. Belichtung; Folgende Fraktionen wurden aufgetragen: A1 bis A6: Native Trimere gemäß obiger Tabelle; B1 bis B6: Gleiche Mengen einer anderen LHCII - Präparation zum Vergleich; C1 bis C6: Aliquots an DPPG ohne Protein;

Man kann erkennen, dass an allen Stellen des Blots, an dem LHCII aufgetragen wurde, auch ein Chemilumineszenz - Signal resultiert. Allerdings ist die von Zeile 1 nach Zeile 6 vorgenommene Steigerung der Auftragsmenge nicht auf dem Blot nachvollziehbar. Anhand von Spur C ist zudem erkennbar, dass freies PG nicht an den Blot gebunden hat und somit auch nicht nachgewiesen werden konnte.

In einem nächsten Schritt wurde versucht, zu überprüfen, ob mit Chymotrypsin und Trypsin verdaut native LHCII - Komplexe, also nach Nußberger LHCII - Monomere, an denen kein PG mehr gebunden sein soll, mittels PG - Antikörper auch ein „Nullsignal“ ergeben. Des Weiteren sollte ein Vergleich zwischen Slot Blotting und Western Blotting durchgeführt werden.

Zu diesem Zweck wurden mehrere Aliquots mit nativem LHCII mit einem Proteingehalt von 10 µg gemäß Material und Methoden Abschnitt 2.6.9 mit Trypsin, Chymotrypsin und einer 1:1 Mischung beider Enzyme für unterschiedlich lange Zeit inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit PMSF gestoppt und eine Hälfte der Ansätze per Slot Blot Apparatur direkt auf PVDF - Membran aufgetragen. Die zweite Hälfte der Ansätze wurde per denaturierender PAGE analysiert und danach per Western Blotting auf einer PVDF - Membran immobilisiert.

Zudem wurde vor dem Aufteilen der Ansätze zur Überprüfung der Restriktion aus jedem Verdauansatz ein geringes Aliquot auf einer weiteren denaturierenden PAGE aufgetragen, die anschließend mit Coomassie angefärbt wurde.

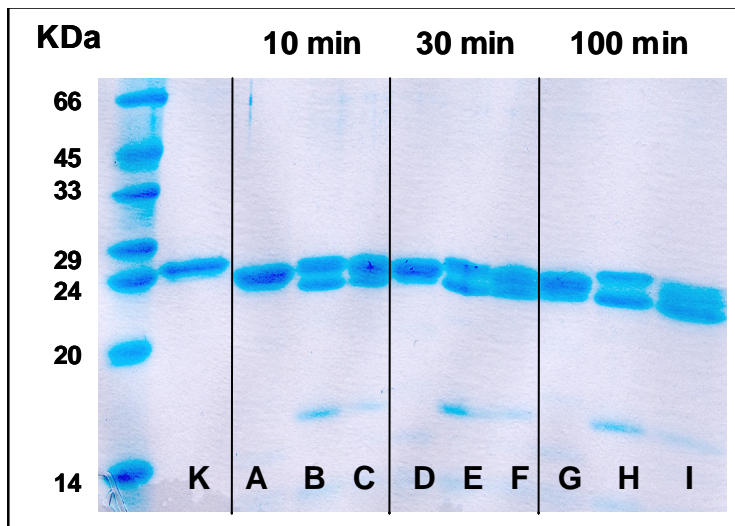


Abb. 43: Denaturierende PAGE mit verschiedenen Verdauansätzen vor der Analytik per Slot Blot bzw. Western Blot.

Versuche A, D und G wurden mit Trypsin, Versuche B, E und H mit Chymotrypsin und Versuche C, F und I mit einer Mischung beider Enzyme inkubiert. Zusätzlich wurde eine unverdaute Kontrolle (K) mit aufgetragen.

Die obige Abbildung lässt erkennen, dass alle Verdauansätze erfolgreich waren. So zeigen die Banden A, D und G die typische Abbaubande bei ca. 22 KDa, wie sie beim Verdau von Trimeren zu erwarten ist. Wird Chymotrypsin bzw. eine Chymotrypsin enthaltende Enzymmischung verwendet, erhält man, ein noch weiter verkürztes Fragment, welches aus einer Verkürzung um etwa 49 bis 51 Aminosäuren resultiert (vgl. Nußberger *et al.* 1993). Da Chymotrypsin selbst ein Molekulargewicht von etwa 23 KDa aufweist, sieht man zudem eine Bande an dieser Position.

Nachdem mit dieser PAGE der Erfolg des durchgeführten Verdau bestätigt werden konnte, folgte im Anschluss die Analyse der Komplexe mittels Slot bzw. parallel mittels Western Blottings.

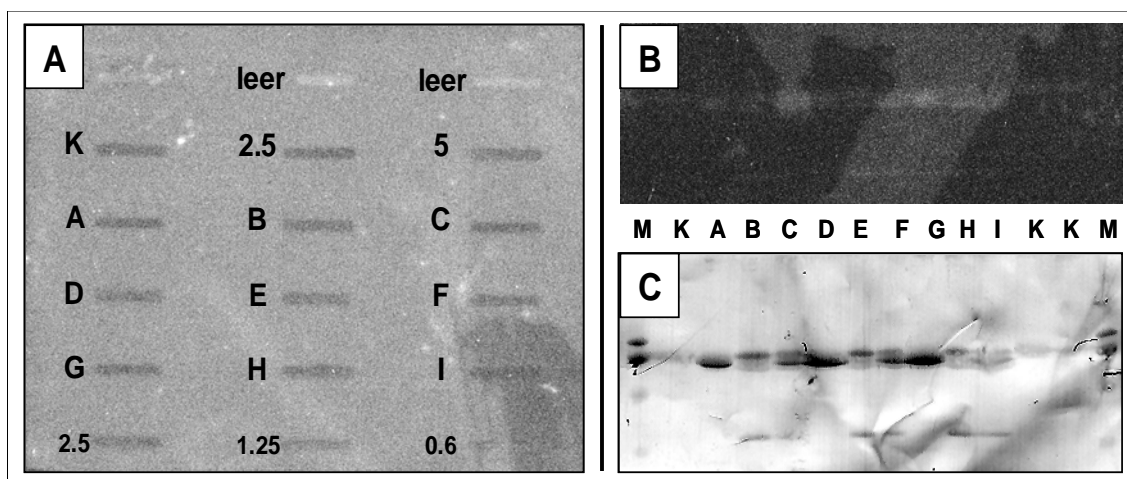


Abb. 44: Ergebnis des vergleichenden Versuches mit Slot Blot und Western Blot - Methode: **A** zeigt die Chemilumineszenz - Aufnahme des Slot Blots. Neben den Proben K und A bis I wurden mehrere unverdaute native Trimere aufgetragen [Angabe in μg LHCII]. **B:** Chemilumineszenz - Aufnahme des Western Blot nach 60 min. **C:** Mit Coomassie gefärbte PVDF - Membran des Western Blot - Versuchs. Neben einem Proteinlängenmarker wurden neben mehreren unverdauten Kontrollen (K) die Proben A bis I aufgetragen.

Anhand der Abbildung A kann man erkennen, dass es bei diesem Versuch nicht möglich war, ein Chemilumineszenz - Signal für die aufgetragenen Komplexe zu erhalten. Selbst für die unverdauten Kontrollen konnte keinerlei Signal erhalten werden, was auf einen systematischen Fehler bei der angewendeten Prozedur schließen lässt. Lediglich das „Signal“ der auf den Blot aufgetragenen Pigmente ist zu erkennen. Auf Abbildung B, also der per Western Blot behandelten PVDF - Membran kann man sehr schwache Chemilumineszenz - Signale nachweisen. Hier konnte zudem anhand einer Coomassie - Färbung zusätzlich überprüft werden, ob genügend Protein per Elektrotransfer auf die Membran gebunden werden konnte. Da dies der Fall war (siehe Abbildung C), bestätigte sich dadurch die Vermutung, dass ein systematischer Fehler bei der Behandlung beider PVDF - Membranen aufgetreten war. Leider brachte auch eine Wiederholung des Experiments keine neuen Erkenntnisse. Bei diesem Experiment (Daten nicht gezeigt) wurde zusätzlich ein Teil der PVDF - Membran vor der weiteren Behandlung mit Ethanol gewaschen, um eventuelle Sigananteile durch komplexgebundene Pigmente auszuschließen. Leider verlief auch hier der finale Chemielumineszenz - Nachweis des komplexgebundenen PG's negativ.

Da also der während des ersten Experiments erzielte Nachweis des PG in mehreren Folgeexperimenten nicht reproduzierbar erschien und dieser Nachweis zudem offensichtlich nicht konzentrationsabhängig verlaufen war, wurde bereits an dieser Stelle eine weitere Erforschung dieser Nachweismethode aufgegeben.

3.1.6 Vergleichender Phospholipidnachweis per Gaschromatographie

Nach der kurzen Versuchsreihe mit dem PG - Antikörper wurde nun versucht, eine Methode zum vergleichenden Phospholipidnachweis mittels Gaschromatographie zu etablieren.

Alle bislang in dieser Arbeit beschriebenen Nachweismethoden für Phosphatidylglyzerin zielen auf den Nachweis der Lipidkopfgruppe (Phosphat) ab. Die Zusammensetzung der an dieses PG gebundenen Fettsäuren spielte dabei keine Rolle. Natürliches PG, aber auch alle anderen Lipide der Thylakoidmembran weisen eine Vielzahl verschiedener Fettsäurezusammensetzungen auf (Trémolières 1991). Neben diversen gesättigten und ungesättigten Typen mit einer Kettenlänge von meist 16 und 18 (u.a.) findet man zudem beim nativen PG zusätzlich die typische 16:1 Δ^3 trans- Fettsäure (Dubacq und Trémolières 1983). Ein Gaschromatograph (GC) detektiert lediglich die Gesamtmenge an einzelnen Fettsäure - Spezies, kann also nicht zwischen einzelnen Lipidtypen an sich unterscheiden. Will man nur PG als einzelnes an einen Komplex assoziiertes Lipid analytisch per GC nachweisen, müsste man entweder ganz spezifisch die für das PG typische trans - Fettsäure neben ihrer eigenen cis - Form nachweisen, was präparativ sehr schwierig ist, oder vor der Analyse mittels GC sicherstellen, dass wirklich nur noch PG an den Komplex gebunden ist und alle anderen Lipide restlos entfernt wurden. Dies ist ebenfalls nur schwer realisierbar. Im ersten Fall müsste man anschließend anhand von Literaturdaten von der detektierten Menge an 16:1 Δ^3 trans - Fettsäure auf die gesamte PG - Menge hochrechnen, im anderen beschriebenen Fall alle ermittelten Fettsäuren addieren und in molare Mengen PG umrechnen.

Zudem wurde bei den bereits beschriebenen Experimenten zusätzlich zu dem natürlichen Lipiden, die mit den Pigmenten in den Rekonstitutionsansatz eingeführt wurden, ein Überschuss an Dipalmitoyl - PG, also 16:0 - PG verwendet. Der Vorteil dieses synthetischen PG liegt vor allem im relativ günstigen Preis. Nachteilig ist aber, dass die so eingeführte Fettsäure 16:0 sehr häufig in der Natur vorkommt und dadurch Fremdverunreinigungen der zu analysierten Proben fast unvermeidbar sind. Dies waren die Gründe, dass die Methode der Gaschromatographie zunächst nicht die Methode der Wahl darstellte.

Erst die Markteinführung eines 17:0 - PG durch die Firma Avanti Polar Lipids führte dazu, dass die Möglichkeit für einen einfachen spezifischen PG - Nachweis per Gaschromatographie entstand.

Wenn man vor der *in vitro* - Rekonstitution des LHCII sicherstellt, dass das eingesetzte Pigment phospholipidfrei ist, was durch den Einsatz einer Kieselsäurenreinigung der Pigmente (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.4.3) erreicht werden kann, ist es möglich durch Zusatz von 17:0 - PG ganz spezifisch nur einen PG - Typ in einen Ansatz einzuführen. Nach Rekonstitution, anschließenden Reinigungsschritten und der Lipidextraktion kann dann (nach Transmethylierung unter Zusatz eines internen Standards [15:0]) speziell diese 17:0 - Fettsäure auf dem Gaschromatographen nachgewiesen werden. Da keines der natürlichen Lipide der Thylakoidmembran eine solche „exotische“ Fettsäure enthält, kann aus dem Gehalt an 17:0 - Fettsäure direkt auf den PG - Gehalt der Probe geschlossen werden. Andere Lipide der Thylakoidlipide stören

bei dieser Analytik nicht und müssen deshalb auch nicht aus den Ansätzen entfernt werden.

Nachdem in zwei vorbereitenden Versuchen unter Verwendung von phospholipidfreien Pigmenten überprüft wurde, dass der Austausch der Fettsäuren des PG keinen Einfluss auf die Ausbeute und Beschaffenheit von rekonstituiertem LHCII hat (Daten nicht gezeigt), wurden in einem ersten Schritt Vorversuche zum Setup des Gaschromatographen durchgeführt.

Der vorhandene DANI - Gaschromatograph wurde vor diesen Versuchen zum groben Quantifizieren von Gesamtlipid und eigenen Lipidpräparationen verwendet und war dazu so eingestellt, dass möglichst schnell Ergebnisse abgelesen werden konnten.³⁸ Die Ofentemperatur war konstant auf 195°C eingestellt, so dass nach 15 Minuten alle Fettsäuren bis zu einer Kettenlänge von 20 relativ eng nebeneinander detektiert werden konnten. Auf eine exakte Basislinientrennung zwischen den einzelnen Fettsäuren wurde dabei verzichtet. In mehreren Schritten wurde deshalb zunächst versucht, eine solche Basislinientrennung der einzelnen Fettsäuren zu erzielen (Daten nicht gezeigt). Eine optimale Trennleistung ergab sich bei einer Ofentemperatur von 170°C. Anschließend musste der Integrator des Chromatographen auf die durch diese Temperaturerniedrigung veränderten Retentionzeiten der einzelnen Fettsäuren neu „geeicht“ werden.

Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis der neuen Einstellungen anhand der GC - Analyse eines synthetischen Fettsäurestandard - Gemisches:

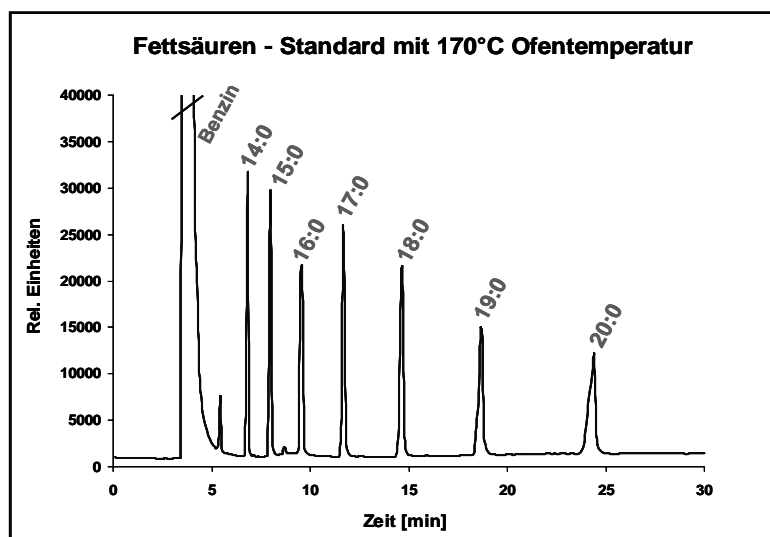


Abb. 45:

GC - Chromatogramm eines gesättigten Fettsäurestandards nach Änderung der Ofentemperatur des GC auf 170°C. Neben dem Lösemittel - Peak des Benzin sind Fettsäuren der Kettenlänge 14 bis 20 zu erkennen. Die Fettsäure 15:0 dient als Interner Standard für die Quantifizierung des angeschlossenen Integrators.

Wie zu erkennen ist, führte die Änderung der Ofentemperatur des Gaschromatographen zu der erwünschten Basislinientrennung für alle untersuchten Fettsäuren.

³⁸ Die genauen Einstellungen des Geräts und ein kurzer Abriss der Methode der Gaschromatographie sind dem Material und Methoden Teil, Abschnitt 2.6.10 zu entnehmen.

In einem folgenden Versuch wurden Lipidextrakte eines Rekonstitutionsversuchs mit Wildtyp - Protein C3.2h per Gaschromatograph analysiert. Bereits dieser Versuch zeigte, dass auch die Trennleistung des Gaschromatographen limitiert ist. Ähnlich zu den Problemen bei der Dünnschichtchromatographie wird auch hier die Trennleistung durch die starke „Verunreinigung“ der Lipidextrakte durch mitextrahierte komplexgebundene Pigmente beeinflusst. Folgende Abbildung zeigt ein extremes Beispiel für diesen Effekt:

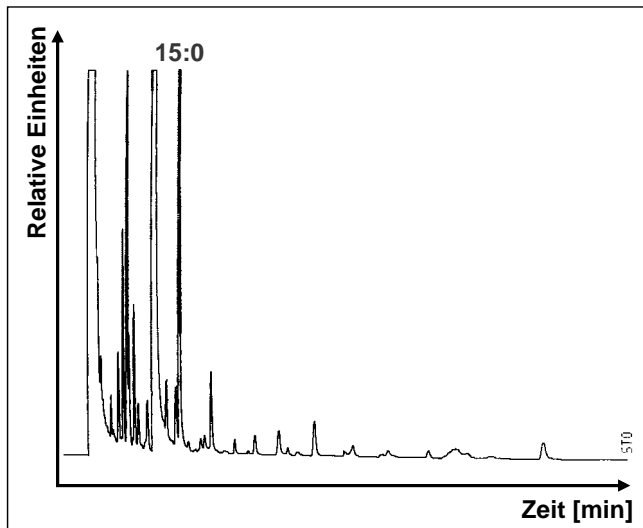


Abb. 46: GC - Chromatogramm eines nicht vorgereinigten Lipidextraktes von C3.2h - Monomeren, rekonstituiert mit 17:0 - PG und phospholipidfreien Pigmenten. Zur besseren Übersicht ist die Fettsäure 15:0 (interner Standard) markiert.

Man kann erkennen, dass gerade im Bereich kürzerer Fettsäuren mit einer Länge bis etwa 17:0 deutlich Störungen durch die Pigmente hervorgerufen werden. Diese Störungen können die Integration des Chromatogramms, vor allem des internen Standards (15:0) negativ beeinflussen und sollten deshalb möglichst beseitigt werden.

Zu diesem Zweck wurde wie schon zuvor bei der Nachweismethode der Dünnschichtchromatographie ein Reinigungsschritt per Kieselsäure - Säule gemäß Rouser *et al.* 1967 eingeführt. Direkt nach der Extraktion der Lipide wurden die entstandenen Extrakte auf einer solchen Säule aufgetragen und anschließend mittels Lösemittel von Detergenzien und Pigmenten befreit. Danach folgten die Transmethylierung und alle weiteren Vorbereitungsschritte der Lipide für den GC.

Unter Berücksichtigung der Erfahrungen mit diesem Reinigungsschritt (siehe Kapitel 3.1.3.8) wurde an dieser Stelle zusätzlich eine Änderung in der Analytik vorgenommen. Um den eventuellen Verlust an Lipid während dieser Säulenbehandlung von Anfang an einbeziehen bzw. ausgleichen zu können, wurde bereits vor diesem Schritt ein interner Fettsäurenstandard in Form von synthetischem 15:0 - Phosphatidylcholin (PC) zu den Proben hinzu gegeben. Unter der Annahme, dass sich dieses 15:0 - PC ähnlich zu dem später zu analysierenden 17:0 - PG auf der Säulenmatrix verhält, kann dadurch ein Verlust an Lipid ausgeglichen werden. Geht PG verloren, so sollte gleichzeitig auch gleich viel interner Standard verloren gehen. Da bei der späteren Integration der Peaks im Integrator des Gaschromatographen die erhaltene Menge des internen Standards automatisch wieder auf die ursprünglich vor der Säulenreinigung zugeetzte Menge von 100 nmol hochgerechnet wird, kann dadurch ein eventueller

Verlust an Lipid während dieser Kieselsäure - Reinigung herausgerechnet werden.

Die folgende Abbildung zeigt ein GC - Chromatogramm einer nach dieser Methode aufgereinigten C3.2h - Probe:

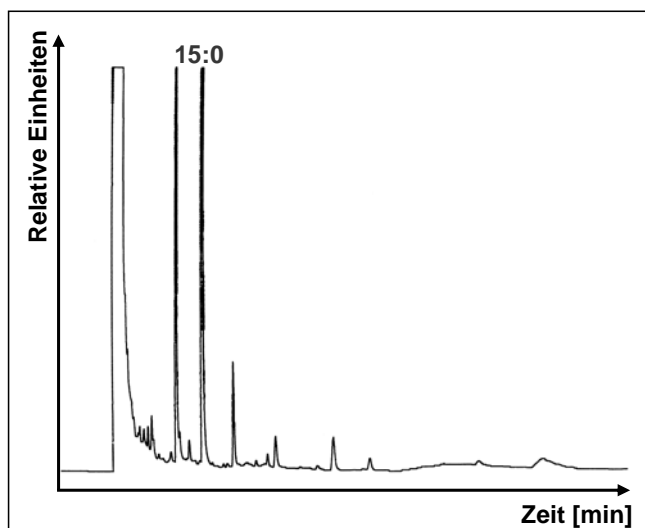


Abb. 47:

GC - Chromatogramm eines mittels Kieselsäure - Säule vorgereinigten Lipidextraktes von C3.2h - Monomeren, rekonstituiert mit 17:0 - PG und phospholidfreien Pigmenten. Zur besseren Übersicht ist die Fettsäure 15:0 (interner Standard) markiert.

Anhand des Chromatogramms zeigt sich, dass es möglich ist, mittels einer Vorbehandlung per Kieselsäure - Säule die Hauptmenge an störenden Pigmentverunreinigungen aus den per GC zu analysierenden Proben zu entfernen.

Im Anschluss an dieses Experiment wurden analog zu den Versuchen, die schon im Zusammenhang mit der Analytik der Dünnschichtchromatographie und der photometrischen Nachweismethode beschrieben wurden, wieder vergleichende PG - Bindungsstudien mit der LHCII - Wildtyp - Mutante C3.2h und der Trimerisierungsmotiv - Mutante WY16,17AVh durchgeführt.

Für die Mutante C3.2h konnten für **Monomere** folgende Ergebnisse erzielt werden:

Chlorophyllgehalt Komplexfraktion [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	Detektierte Menge 17:0 FA [nmol]	Berechnete Menge an PG [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]
759	63	6,2	3,1	0,05
844	70	32,0	16	0,23
935	78	21	10,5	0,13
666	56	22,3	11,2	0,20
453	38	5,0	2,5	0,07

Tab. 25: Ergebnisse der PG - Analyse von C3.2h Monomeren mittels Gaschromatographie. (FA = Fettsäure)

Analog zu den Versuchen der vorherigen Kapitel wurde auch hier trotz der starken Streuung der Ergebnisse ein durchschnittliches molares PG zu Protein - Verhältnis von **0,14** (+/- 0,07) errechnet.

Für die C3.2h - **Trimere** ergeben sich ähnlich streuende Ergebnisse:

Chlorophyllgehalt Komplexfraktion [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	Detektierte Menge 17:0 FA [nmol]	Berechnete Menge an PG [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]
330	28	4,2	2,1	0,08
584	49	3,7	1,8	0,04
452	38	12,2	6,1	0,16
276	23	3,7	1,9	0,08
190	16	3,5	1,8	0,11

Tab. 26: Ergebnisse der PG - Analyse von C3.2h Trimeren mittels Gaschromatographie. (FA = Fettsäure)

Aus diesen Werten berechnet sich ein molares PG zu Protein - Verhältnis von **0,09** (+/- 0,04) für die drei Monomeruntereinheiten im Trimer.

Für die Mutante WY16,17AVh wurden nur zwei Experimente durchgeführt:

Chlorophyllgehalt Komplexfraktion [nmol]	Berechneter Proteingehalt [nmol]	Detektierte Menge 17:0 FA [nmol]	Berechnete Menge an PG [nmol]	PG zu Protein - Verhältnis [mol/mol]
853	71	14,7	7,4	0,10
768	64	9,9	5,0	0,08

Tab. 27: Ergebnisse der PG - Analyse der Mutante WY16,17AVh per Gaschromatographie.

Mittels dieser beiden Werte kann ein molares PG zu Protein - Verhältnis von **0,09** (+/- 0,01) berechnet werden.

Innerhalb der angegebenen Standardabweichungen ergibt die Analyse aller Komplexe per Gaschromatographie gleiche Werte.

Dies widerspricht in grobem Maße der Literatur (vgl. Nußberger 1993). Es ist auch hier zu vermuten, dass bei der Durchführung der Versuche bzw. der Probenaufarbeitung vor der eigentlichen Analyse mittels GC ein systematischer Fehler entstanden ist, der die Berechnung korrekter Werte verhindert. Eventuell ist für die große Streuung der Ergebnisse, wie sie vor allem für die Wildtyp - Mutante C3.2h gezeigt werden konnte, doch der bereits bei der Analyse mittels Dünnschichtchromatographie in Frage gekommene Reinigungsschritt auf der Kieselsäure - Säule verantwortlich. Dies ist an späterer Stelle noch zu diskutieren.

3.2 Distanzmessungen an rekombinantem LHCII mittels Elektronenspin - Resonanz - Spektroskopie

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich beschrieben, ist es mittels der Elektronenspin - Resonanz (ESR) möglich, intramolekulare Distanzmessungen am rekombinanten LHCII durchzuführen. Mit Hilfe dieser Messungen sollte versucht werden, den bislang im 3D - Strukturmodell des LHCII von Kühlbrandt (1994) nur bis zur Aminosäure 26 bzw. durch Liu *et al.* (2004) bis Aminosäure 14 aufgelösten N - Terminus näher räumlich festzulegen. Des Weiteren sollte die räumliche Anordnung der luminalen Schleife zwischen Helix C und B besser bestimmt werden.

3.2.1 Konstruktion von fünf LHCII - Doppelmutanten

Zur Durchführung von intramolekularen Abstandsmessungen per Elektronenspin - Resonanz muss der LHCII mit zwei paramagnetischen „Spin - Labels“ (hier: TEMPO) ausgestattet werden (siehe dazu Material und Methoden Abschnitt 2.7.1). Später kann dann die Distanz zwischen diesen beiden TEMPO - Gruppen per ESR bestimmt werden.

Das TEMPO - Label wurde dabei bereits vor der *in vitro* - Rekonstitution über eine Iodacetamid - Kopplungsgruppe an zuvor gentechnisch am LHCII eingeführte Cysteine des LHCII - Apoproteins gebunden.

Zu diesem Zweck wurden zunächst fünf LHCII - Doppelmutanten hergestellt, bei denen an unterschiedlichen Positionen des Apoproteins über einen Austausch von Serin durch Cystein jeweils zwei neue Cysteine eingeführt wurden. Eine weitere Mutante (S106C,V229C), bei der Valin nahe dem C - Terminus durch Cystein ersetzt wurde, wurde freundlicherweise von Manuel Lion zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung gestellt.

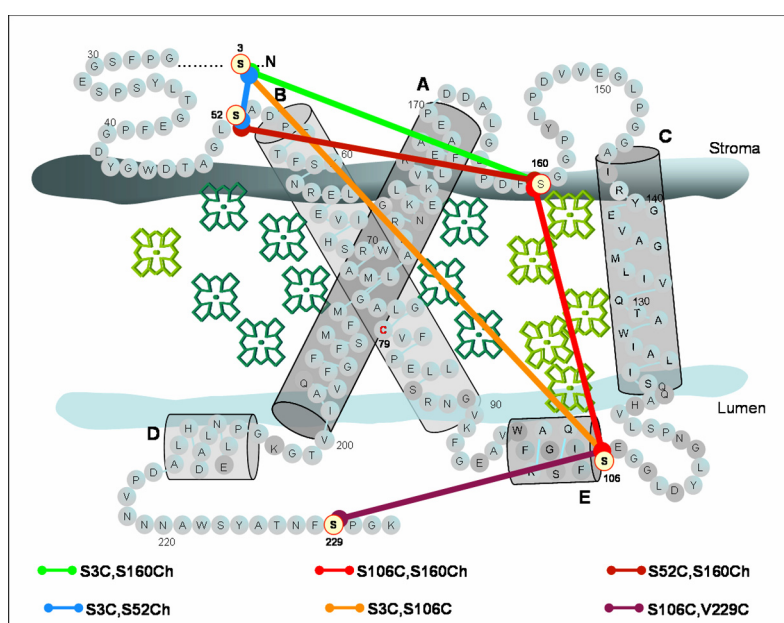


Abb. 48: LHCII - Doppelmutanten im Überblick: Für die geplanten ESR - Messungen wurden sechs verschiedene Mutanten mit zwei über einen Aminosäure - Austausch neu eingeführte Cysteine verwendet. Die farbigen Linien sollen die später zu bestimmenden Abstände verdeutlichen. Die markierten Aminosäuren wurden gegen Cystein ausgetauscht. (Abb. mit freundlicher Erlaubnis von Sonja Geister; verändert)

Die Konstruktion der Doppelmutanten erfolgte analog zu der bereits beschriebenen Konstruktion der Mutante $\Delta N22h$ über Restriktion und Religation bereits vorhandener Mutanten mit einer einzelnen gentechnisch eingeführten Cystein - Aminosäure, bei denen zuvor das einzige natürlich im LHCP vorkommende Cystein an Position 79 gegen Serin ausgetauscht wurde.

Die dadurch entstandenen Doppelmutanten wiesen somit zwei eindeutig positionierte Markierungen auf, so dass ein ESR - Signal klar diesen Positionen zugeordnet werden kann. Zudem wurde durch den strukturverwandten Austausch von Serin (OH - Gruppe) gegen Cystein (SH - Gruppe) sichergestellt, dass durch die diese Klonierung keine Konformationsveränderung hervorgerufen wird.

Aus Vereinfachungsgründen soll hier nur die Konstruktion der Mutante S3C,S160Ch ausführlicher beschrieben werden. Zunächst eine Abbildung zur Verdeutlichung der molekularbiologischen Methode.

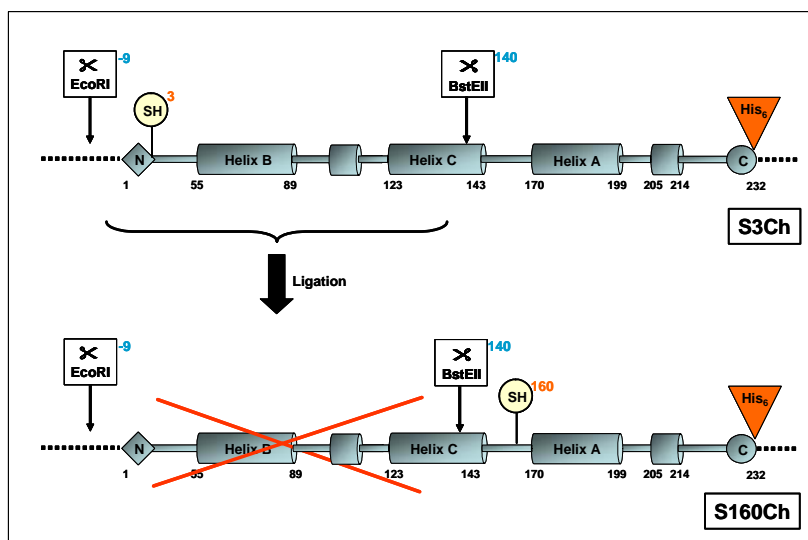


Abb. 49: Konstruktion der Mutante S3C,S160Ch: Die Mutanten S3Ch und S160Ch wurden jeweils mit EcoRI³⁹ und BstEII⁴⁰ restringiert. Danach wurde das erhaltene kurze Fragment (447 Bp) der Mutante S3Ch in ein Plasmid der Mutante S160Ch, dem der entsprechende Gen - Ausschnitt fehlte (3812 Bp), einligiert.

Das Ausgangsmaterial für die Klonierung bildeten die Mutanten S3Ch und S160Ch (Huschenbett 2001). Beide Mutanten weisen neben einem C - Terminal eingeführten His₆ - Tag jeweils eine neu eingeführte Cystein - Aminosäure auf. Bei S3Ch befindet sich diese Aminosäure an Position 3, bei S160Ch an Position 160, also zwischen Helix C und A. Durch die in der obigen Abbildung veranschaulichte Restriktion mit anschließender Religation war es möglich, eine Kombination aus beiden Mutanten herzustellen, die folglich an Position 3 und 160 ein Cystein enthält. Der C - terminale His₆ - Tag blieb bei dieser Klonierung erhalten.

Die Präparation der Mutante wurde analog zur Herstellung der Mutante $\Delta N22h$ durchgeführt. Deshalb kann an dieser Stelle auf eine detaillierte Beschreibung verzichtet werden.

³⁹ Die Restriktionsendonuklease EcoRI schneidet die verwendete DNA neun Aminosäuren - Positionen vor der eigentlichen mit dem Startcodon Methionin beginnenden codieren Sequenz.

⁴⁰ BstEII schneidet die DNA innerhalb der Helix C an Aminosäure - Position 140.

Auch die anderen vier Doppelmutanten mit zwei eingeführten Cysteinen wurden nach diesem präparativem Schema erzeugt. In der folgenden Tabelle soll deshalb nur die Angabe der verwendeten Ausgangsmutanten und Enzym - Kombinationen für diese Klonierungen erfolgen.

Ausgangsklone	Restriktionsendonukleasen	Fragmentlänge (Bp)	Cysteinposition
S106C,S160Ch			
S106C	EcoRI / BstEII	447	106
S160Ch	EcoRI / BstEII	3812	160
S52C,S160Ch			
S52Ch	EcoRI / BstEII	447	52
S160Ch	EcoRI / BstEII	3812	160
S3C,S52Ch			
S3Ch	XhoI ⁴¹ / SacI ⁴²	147	3
S52Ch	XhoI / SacI	4112	52
S3C,S106C			
S3Ch	XhoI / SacI	147	3
S106Ch	XhoI / SacI	4112	106

Tab. 28: Ausgangsmutanten und verwendete Restriktionsendonukleasen der weiteren vier zusätzlich zur Mutante S3C,S160Ch konstruierten Doppelmutanten mit zwei eingeführten Cysteinen.

Drei der vier hergestellten LHCII - Doppelmutanten weisen einen His₆ - Tag auf, da dieser bei der Klonierung erhalten blieb. Bei der Mutante S3C,S106C ging der Tag während der Klonierung hingegen verloren. Die Mutante S106Ch, welche als späterer Vektoranteil benutzt wurde, weist einen His₆ - Tag nahe dem N - Terminus, genau zwischen zwei SacI - Schnittstellen auf, der deshalb als kurzes, 18 Basenpaare langes Fragment bei der Restriktion mit SacI verloren ging (siehe Sequenzausschnitt im Anhang). Von der Mutante S3Ch wurde hingegen nur der N - terminale Bereich als späteres Insert verwendet, so dass ihr C - terminaler His₆ - Tag nicht in der späteren Doppelmutante erscheint.

Nach erfolgreicher Überprüfung der fünf erfolgten Klonierungen mittels DNA - Sequenzierung (die Sequenzen sind dem Anhang zu entnehmen) wurden von allen neuen Klonen Inclusion Bodies hergestellt.

Mittels einer Proberekonstitution und anschließender Analyse der entstandenen LHCII - Komplexe per Fluoreszenzmessung, CD - Spektroskopie und Pigmentanalyse per HPLC wurde überprüft, ob durch die Neueinführung der zweiten Cysteine Veränderungen in Funktion bzw. Zusammensetzung der resultierenden LHCII - Komplexe hervorgerufen wurden (Daten nicht gezeigt). Hier konnten keinerlei Veränderungen im Vergleich zu Daten der Wildtyp - Mutante C3.2h festgestellt werden.

⁴¹ Die Nuclease XhoI schneidet die DNA noch vor der eigentlichen codierenden Sequenz an Aminosäure - Position 38.

⁴² SacI schneiden an Aminosäure - Position 12 der codierenden Sequenz, also noch vor der ersten Helix.

3.2.2 Markierung von LHCII - Doppelmutanten mit TEMPO - Label

Zur Durchführung der ESR - Spektroskopie müssen paramagnetische TEMPO - Label an den rekombinanten LHCII gebunden werden. Diese Kopplung erfolgt über eine Bindung an Cystein (vgl.: Material und Methoden Abschnitt 2.7.1) auf Ebene des Apoproteins. Die Markierungseffizienz ist dabei direkt proportional zu dem später erhaltenen ESR - Signal, ebenso wie das Verhältnis zwischen Nutz- und Hintergrundsignal (Rauschen), auch als Modulationstiefe bezeichnet. Genauer betrachtet skaliert das Signal - Rausch - Verhältnis mit dem Quadrat der Markierungseffizienz, da nur solche Proteinmoleküle zum Nutzsignal beitragen, bei denen zuvor zwei Positionen markiert wurden. Es ist daher wichtig, möglichst quantitativ TEMPO - Label an LHCP zu binden.

Aus diesem Grund wurde in einem Vorversuch untersucht, mit welcher Effizienz vorhandenen Cysteine in einem Proteinansatz mit TEMPO markiert werden können. Dazu wurde exemplarisch ein Nachmarkierungs-experiment mit der Mutante S3C,S160Ch durchgeführt, d.h. Apoprotein der Mutante wurde zunächst mit TEMPO markiert und danach noch mit einem weiteren, ebenfalls über die gleiche Kopplungschemie bindenden Fluoreszenzfarbstoff (BODIPY) inkubiert.⁴³ Im Anschluss wurde über die densitometrische Auswertung des zusätzlich zum TEMPO gebundenen Farbstoffes die Markierungseffizienz für das TEMPO - Label errechnet. Zum besseren Vergleich wurde gleichzeitig Protein nur mit TEMPO bzw. nur mit BODIPY markiert. Zudem wurden ebenfalls die beiden Ausgangsmutanten S3Ch und S160Ch mit je nur einer zugänglichen Cystein - Aminosäure, und eine Mutante (C79S), die kein markierbares Cystein enthält, untersucht.

Das Protokoll für die durchgeführten Markierungen und anschließenden Probenbehandlung ist dem Material und Methoden - Teil dieser Arbeit (2.7.1 und 2.7.2) zu entnehmen. Die darauf folgende Nachmarkierung eines Teiles der Ansätze mit BODIPY - Farbstoff wurde nach exakt der gleichen Methodik vorgenommen. Nach dieser zweiten Markierung wurden alle unterschiedlichen Ansätze äquimolar auf eine denaturierende PAGE aufgetragen. Nach dem Auftrennen der Proteine wurde das Gel mittels Versa Doc - Geldokumentationsanlage densitometrisch untersucht und anschließend mit Coomassie - Brilliant Blue gefärbt.

⁴³ Aus Vorversuchen innerhalb der Arbeitsgruppe war bekannt, dass BODIPY annähernd vollständig, d.h. zu fast 100% an LHCP gebunden werden kann.

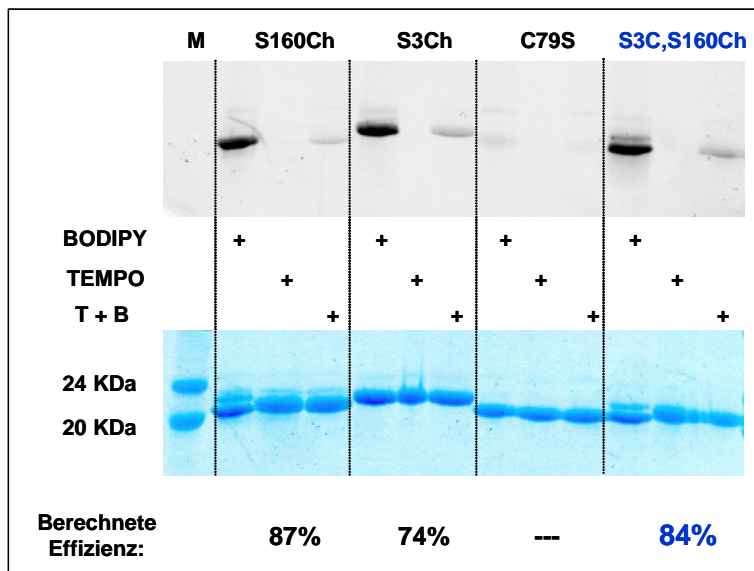


Abb. 50: Untersuchungen zur Markierungseffizienz mit TEMPO - Label: Unterschiedliche Mutanten wurden jeweils mit BODIPY, TEMPO und beiden Substanzen nacheinander (T+B) inkubiert. Aus der densitometrischen Auswertung des Gels kann die Markierungseffizienz für TEMPO errechnet werden. **Oben:** Versa Doc - Auswertung; **Unten:** Coomassie - Färbung des Gels. [M = Marker]

Man kann erkennen, dass es bei keiner der eingesetzten Mutanten möglich war, 100% Markierungseffizienz für das TEMPO - Label zu erreichen. Bei allen untersuchten Mutanten ist es möglich, noch freie Cysteinpositionen mit Farbstoff nachzumarkieren. Zudem ist erkennbar, das BODIPY unter den verwendeten Bedingungen auch bei der Mutante C79S, also einem Klon ohne jedes Cystein, artifiziell nachweisbar ist. Der für diese Mutante ermittelte Graustufenwert wurde als unspezifisches Markierungsartefakt bei allen Mutanten abgezogen. Für die neue erstellte Doppelmutante wurde so eine Markierungseffizienz von 84% erreicht. Diese Effizienz ließ sich bei späteren Experimenten auf größer 95% steigern, indem die Inkubationszeit für die TEMPO - Markierung „über Nacht“ vorgenommen wurde (Daten nicht gezeigt).

Da die hier erreichte Markierungseffizienz für erfolgreiche ESR - Messungen ausreichte, wurde keine weitere Optimierung der Markierungsbedingungen vorgenommen.

3.2.3 Effekte der Probenaufkonzentrierung von TEMPO - markierten LHCII - Komplexen vor der ESR - Messung

Zur erfolgreichen Durchführung von ESR - Distanzmessungen mit rekonstituiertem LHCII ist es nötig, stark konzentrierte Proben einzusetzen. Bereits nach ersten Messversuchen am MPI für Polymerforschung zeigte sich, dass eine starke Aufkonzentrierung der rekonstituierten und mittels Saccharose - Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigten LHCII - Komplexe unumgänglich war (Daten nicht gezeigt). Zu diesem Zweck wurden im weiteren Verlauf der Arbeit alle aus den Saccharose - Dichtegradienten entnommenen LHCII - Komplexe mit Centricon - YM - 30 Zentrifugalfiltereinheiten, gemäß Material und Methoden Kapitel 2.7.3, ungefähr um den Faktor 40 aufkonzentriert (meist von ca. 2000µl auf etwa 50µl Endvolumen).

Um konformative und funktionelle Effekte dieser starken Aufkonzentrierung ausschließen zu können, wurde zunächst experimentell überprüft, ob es allein durch diese Konzentrierung zu Veränderungen der LHCII - Komplexe kommt.

Aus vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass es durch eine starke Einengung von LHCII - haltigen Proben zu einer spontanen Trimerisierung des LHCII kommen kann. Dieser Effekt konnte auch hier mit Hilfe der CD - Spektroskopie und nativen Polyacrylamidgelen nachgewiesen werden. So wurden etwa 5 - 10% der bei der Konzentrierung eingesetzten LHCII - Monomere zu Trimeren oligomerisiert (Daten nicht gezeigt). Wie sich später während der ESR - Messungen herausstellte, geht dieser geringe Trimersignalanteil allerdings im Hintergrundrauschen der Messung verloren und beeinflusst somit nicht die intramolekulare Distanzmessungen von LHCII - Monomer - Proben, so dass dieser Effekt im weiteren Verlauf der Arbeit vernachlässigt werden konnte.

Anhand durchgeführter Fluoreszenzmessungen und Pigmentanalysen mittels HPLC konnte zudem gezeigt werden, dass es durch die Aufkonzentrierung der Proben zu keiner funktionellen Veränderungen der LHCII - Komplexe kam (Daten nicht gezeigt). Lediglich bei der CD - Spektroskopie konnte ein Effekt durch die Konzentrierung der Proben nachgewiesen werden.

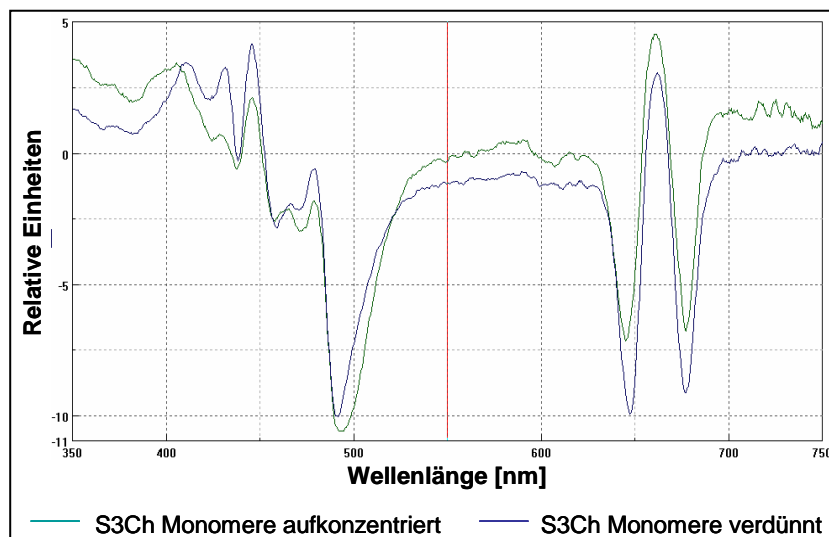


Abb. 51: CD - Spektroskopie von stark aufkonzentrierten LHCII - Monomeren (grün) im Vergleich zu der gleichen Probe nach Verdünnung mit Dichtegradientenlösung auf die Ausgangskonzentration vor der Centricon - Behandlung (blau). Die Spektren wurden zudem auf die gleiche Signalintensität normiert.

Neben den für monomeren LHCII typischen Maxima bei ~650- und ~680 nm kann man erkennen, dass sich die beiden Spektren vor allem im Bereich von 480 nm unterscheiden. Hier kommt es durch die Konzentrierung der Proben zu einer deutlichen Verbreiterung des Peaks. Auch untersuchte aufkonzentrierte Trimerfraktionen zeigten diese Peakverbreiterung. Dort war der Effekt in einem Fall so stark ausgeprägt, dass die ansonsten bei Trimeren auftretenden negativen Maxima bei 460 und 480 nm in einem breiten Maximum zusammenfielen (Daten nicht gezeigt). Da aber auch dieser Effekt durch die Verdünnung der Proben zurück auf die Ausgangskonzentration vor der Centrikon - Behandlung wieder beseitigt werden konnte, wurde diesem Phänomen im weiteren Verlauf der Untersuchungen keine Bedeutung beigemessen.

3.2.4 Ergebnisse der ESR - Distanzmessungen mit rekonstituiertem LHCII

3.2.4.1 ESR - Messungen von monomerem LHCII

Nach den zuvor beschriebenen vorbereitenden Versuchen wurden größere Mengen an LHCII - Apoprotein aller neu erstellten Doppelmutanten mit TEMPO - Label markiert.

Danach erfolgte eine Detergenzwechsel - Rekonstitution unter Standardbedingungen, gemäß Material und Methoden Abschnitt 2.3.4, d.h. mit dem aus Erbsen extrahierten lipidhaltigen Pigmenten, dem sog. Totalpigmentextrakt (siehe Material und Methoden 2.4.1). Um genügend Ausgangsmaterial für die spätere Aufkonzentrierung der Proben zu erhalten, mussten alle *in vitro* - Rekonstitutionen mit mindestens 2 mg Apoprotein (d.h. ca. 80 nmol Protein) begonnen werden. Nach der Aufreinigung der hergestellten LHCII - Komplexe mittels Saccharose - Dichtegradientenzentrifugation folgte, wie bereits beschrieben, die Aufkonzentrierung der Proben mittels Centrikon - Zentrifugalfiltern YM - 30. Danach wurde photometrisch die Konzentration der Proben bestimmt (vgl. Material und Methoden, Kapitel 2.3.7). Die meisten der anschließend per ESR vermessenen Proben wiesen nach dieser Prozedur eine LHCII - Konzentration von etwa 200 bis 400 μM auf.

Vor der Distanzmessung in speziellen Glasröhrchen wurden diese Proben nochmals 1:1 mit 80% Glycerin verdünnt, um ein „glasartiges Erstarren“ der Proben bei 50 K zu gewährleisten, so dass Endkonzentrationen von 100 bis 200 μM entstanden.

Die eigentliche ESR - Distanzmessung erfolgte in einem bei X-Band - Frequenzen (~9,3 - 9,4 GHz) betriebenen Bruker Elexsys 580 Spektrometer am MPI für Polymerforschung durch Dr. Gunnar Jeschke und Dr. Grazyna Panek.

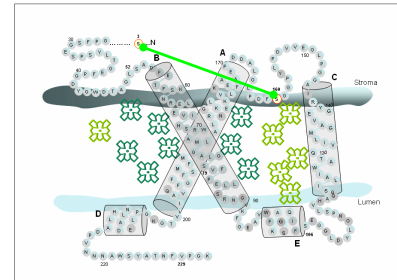
Zur Bestimmung der Distanz zwischen den beiden komplexgebundenen TEMPO - Nitroxylradikalen wurde ein Vier - Puls - DEER Experiment benutzt. Die dipolare Evolutionszeit⁴⁴ wurde meist zwischen 1,5- und 2,5 μs gewählt. (Eine kurze Beschreibung des Experiments ist dem Material und Methoden - Teil dieser Arbeit, Abschnitt 2.7.4 bzw. Jeschke *et al.* 2003 zu entnehmen.) Nach mehrstündiger Messzeit (zwischen 20 - und 80 Scan - Wiederholungen) erfolgte die Auswertung der aufgenommenen Daten mittels Direkter Transformation und mit von Dr. Jeschke selbst erstellten Programmen. Die in dieser Arbeit dargestellten Abstandsverteilungen sind durch Werte an 9 (1.Ordnung) bzw. 17 (2.Ordnung) äquidistanten Stützstellen definiert und zwischen den Stützstellen durch kubische hermitesche Polynome (vgl. Jeschke *et al.* 2004 a und b) interpoliert. Die Werte an den Stützstellen wurden durch Minimierung der quadratischen Abweichung zwischen dem experimentellen Signal und dem für die interpolierte Abstandsverteilung simulierten Signal angepasst. Diese Datenanalyse wird im Folgenden vereinfacht als Hermit - Interpolation 1. bzw. 2. Ordnung bezeichnet. Anhand mehrerer systematischer Vergleichsmessungen mit anderen bezüglich des Abstands wohl definierten organischen Systemen hatte sich in

⁴⁴ Im weiteren Verlauf auch Beobachtungszeit genannt.

Vorversuchen herausgestellt, dass eine Hermit - Interpolation 1. Ordnung für die meisten LHCII - Proben eine sinnvolle Abstandsauswertung erlaubt (siehe auch Jeschke *et al.* 2003), so dass meist mit dieser Methode ausgewertet wurde. Lediglich für die Mutante S106C,S160Ch ergab die Hermit - Interpolation 2. Ordnung eine deutlich verringerte quadratische Abweichung zum experimentellen Signal und wurde deshalb vorgezogen.

3.2.4.1.1

Ergebnisse für die Mutante S3C,S160Ch



Mit der Mutante S3C,S160Ch wurden zahlreiche Messungen mit unterschiedlichen Chargen an markierten Protein bzw. versch. Pigmentpräparationen durchgeführt. Hier exemplarisch die Ergebnisse einer Messung.

Folgendes DEER - Spektrum konnte aufgezeichnet werden:

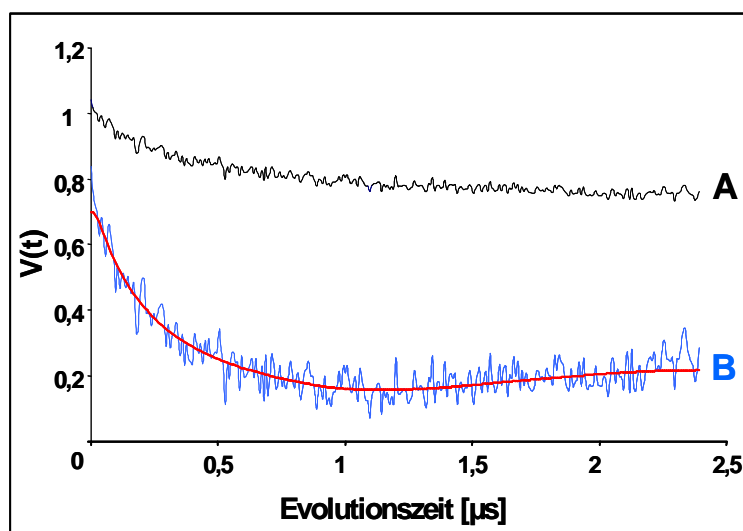


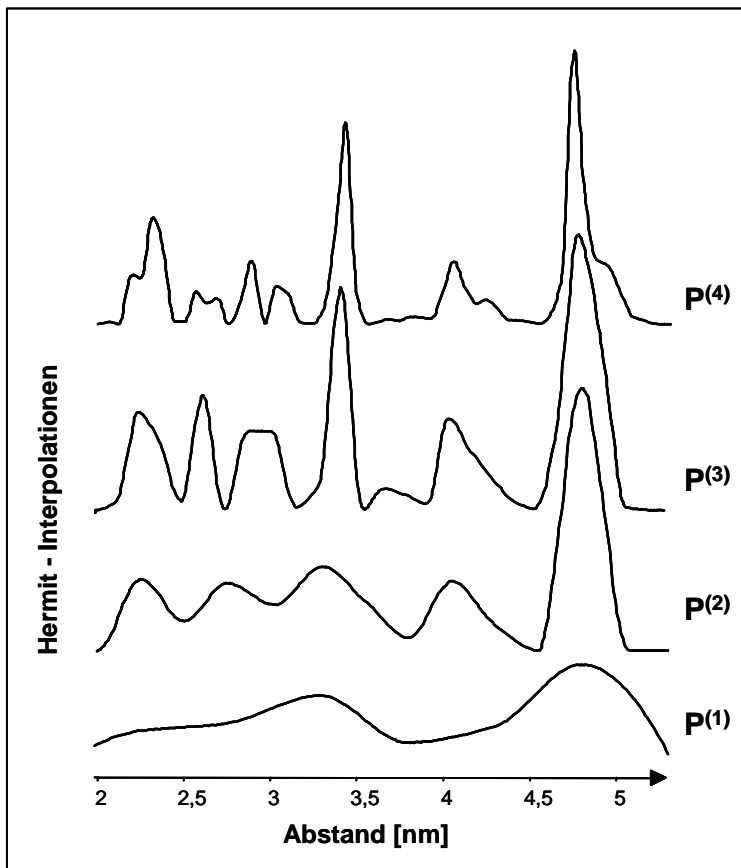
Abb. 52:

DEER - Spektrum der Mutante S3C,S160Ch: Es wurde die auf den Zeitpunkt $T=0$ normierte Signalintensität $V(t)$ gegen die Evolutionszeit in μs aufgetragen: **A**: Rohdaten der Messung ohne Korrektur; **B**: Daten der Messung nach Abzug des unmodulierten Hintergrundes. Die rote Linie stellt die Anpassung nach einer Hermit - Interpolation 1. Ordnung (9 Stützstellen zwischen 1,75 und 5 nm) dar.

Danach folgte die Auswertung mittels Interpolation gemäß Jeschke *et al.* 2003.

Zum besseren Verständnis der verschiedenen mathematischen Auswertungsmöglichkeiten soll für diese Mutante eine grafische Gegenüberstellung aller möglichen Interpolationsmethoden gezeigt werden.⁴⁵

⁴⁵ Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde mit Ausnahme der Mutante S106C,S160Ch nur noch mit den Ergebnissen der Hermit - Interpolation 1. Ordnung gearbeitet.

**Abb. 53:**

Verschiedene mathematische Hermit - Interpolationen zur Auswertung des in Abb. 52 gezeigten DEER - Spektrums für die Mutante S3C,S160Ch. Es wurden die Ergebnisse von Hermit - Interpolationen 1. bis 4. Ordnung (mit 9, 17, 33, und 65 Stützstellen) gestaffelt aufgetragen.

Anhand der Abbildung kann man erkennen, dass eine Auswertung mittels einer Hermit - Interpolation ab einer Ordnung größer 1 eine unrealistisch hohe Auflösung vortäuscht. So werden bei einer Interpolation 4. Ordnung zwar viele einzelne, distinkte Abstände für die Mutante ermittelt, ein Vergleich mit durchgeführten Modellrechnungen zeigt aber deutlich, dass diese einzelnen Abstandsinformationen nicht der Realität entsprechen. Ähnliche Resultate können mit simulierten Daten für Modellverteilungen mit nur einem breiten Peak erhalten werden, wenn im simulierten Signal durch Addition von so genannten „weißem Rauschen“ ein ähnliches Signal - Rausch - Verhältnis wie im experimentellen Spektrum eingestellt wird. Die wahrscheinlichste Interpretation der experimentellen Daten ist daher eine breite Verteilung, so dass eine Angabe in einem Bereich von 2 bis 5 nm sinnvoll erscheint.

Um diesen relativ großen Bereich näher einzugrenzen, wurden nachfolgend 17 unabhängig voneinander unter gleichen Bedingungen aufgenommene Datensätze für separat präparierte Proben miteinander verglichen. Nach Auswertung mit einer Hermit - Interpolation 1. Ordnung ergab sich daraus eine gemittelte Abstandsverteilung gemäß folgender Abbildung:

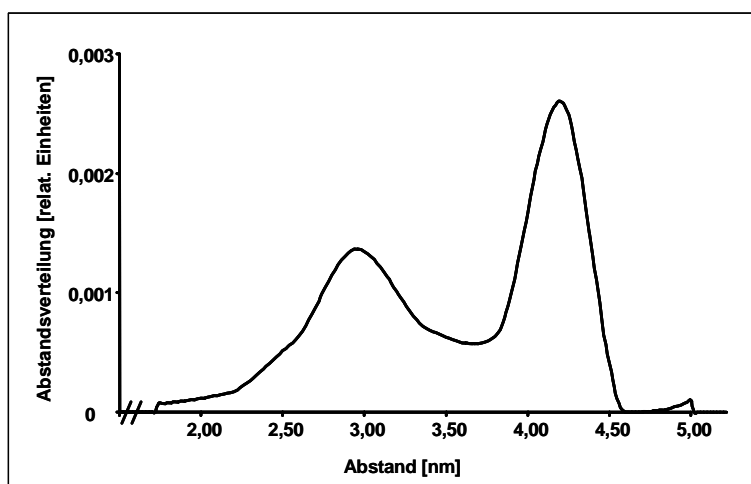


Abb. 54: Gemittelte Abstandsverteilung für die Mutante S3C,S106Ch. Mittels einer sog. Maximum - Likelihood - Schätzung der mittleren Verteilung wurde aus allen Datensätzen eine gemittelte Abstandsverteilung errechnet.⁴⁶

Mittels dieser vergleichenden Auswertung der für die Mutante S3C,S160Ch durchgeführten Experimenten konnte man folgende Angaben bzgl. des Abstands zwischen den TEMPO - Labeln an Position 3 und 160 machen:

Mittlerer Abstand [nm]	3,57
σ_r [nm]	0,06
Standardabweichung [nm]	0,67
σ_{Std} [nm]	0,06
Asymmetrie der Verteilung [nm ³]	-0,13
σ_v [nm]	0,07
$\Gamma_{0,5}$ [nm]	1,17
$\sigma_{\Gamma_{0,5}}$ [nm]	0,07
$\Gamma_{0,9}$ [nm]	1,96
$\sigma_{\Gamma_{0,5}}$ [nm]	0,16

Tab. 29: Abstandsinformationen aus der vergleichenden Analyse aller Datensätze für die Mutante **S3C,S160Ch**.⁴⁷ Die Auswertung erfolgte mittels Hermit - Interpolation 1. Ordnung. Neben dem mittleren Abstand und dessen Standardabweichung wurde auch die Breite des Bereichs angegeben, indem sich 50% [$\Gamma_{0,5}$] bzw. 90% [$\Gamma_{0,9}$] aller gefundenen Spin - Spin - Distanzen befunden haben. Zu allen Werten erfolgt zusätzlich die Angabe des Bestimmungsmaßes mit σ .

Trotz breiter Verteilung der gefundenen Abstandsinformationen kann natürlich ein mittlerer Abstand für die Mutante berechnet werden. Dieser ist allerdings, wie schon anhand des Graphen mit der gemittelten Abstandsverteilung zu erkennen war, nur unter Vorbehalt zu benutzen. Unter Zuhilfenahme der angegebenen Standardabweichung kann man aber ein sinnvolles Intervall für den gemessenen Abstand zwischen der Position 3 und 160 von **2,9 nm bis 4,2 nm** angeben.

⁴⁶ Dabei gehen die einzelnen Messungen mit dem Kehrwert von [Fehlerquadratabweichung Simulation / experimentelle Daten] gewichtet ein.

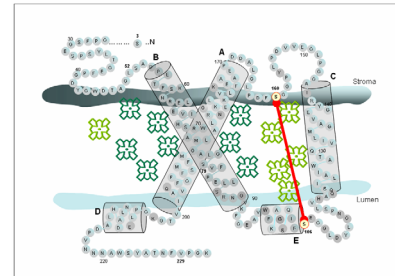
⁴⁷ Anmerkung: Hier wurde vor allem mit Messungen mit einer Beobachtungszeit von 1,5 μ s gearbeitet. Bei einer Beobachtungszeit von 2,5 μ s, wie sie anhand der beiden zuvor angegebenen Abbildungen grafisch dargestellt wurde, führt aufgrund einer etwas verbesserten Hintergrundkorrektur zusätzlich zu mehr längeren Abständen, so dass man dann 3,7 nm als mittleren Abstand angeben würde.

Alternativ kann zur Bestimmung dieses Intervalls auch der Wert $\Gamma_{0,5}$, also die Angabe der Breite der Verteilung, bei der 50% aller gefundenen Abstandsinformationen beinhaltet sind, benutzt werden. Rechnet man mit dieser Angabe ein Intervall für die gefundenen Abstände aus, erhält man eine Verteilung von **3,0 nm bis 4,2 nm** für den Abstand der Position 3 nach Position 160.

Da sich diese Intervallangaben nur sehr wenig unterscheiden, wird im Folgenden nur noch eine Intervallberechnung mit Hilfe der Standardabweichung gezeigt.

3.2.4.1.2

Ergebnisse für die Mutante S106C,S160Ch



Auch für diese Mutante wurden mehrere Rekonstitutionen unter Standardbedingungen durchgeführt und anschließend per ESR vermessen.

Exemplarisch zunächst auch hier ein für alle Messungen repräsentatives DEER - Spektrum, aufgenommen mit einer Beobachtungszeit von 2,5 μs .

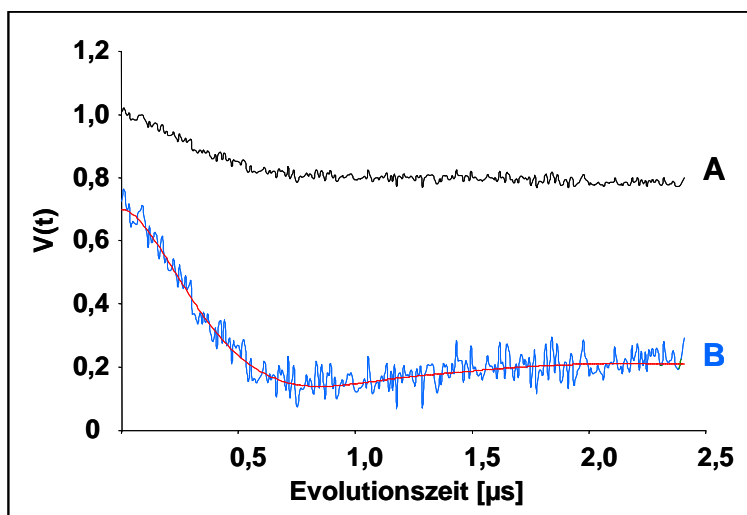


Abb. 55:

DEER - Spektren für die Mutante S106C,S160Ch. Es wurde $V(t)$ gegen die Evolutionszeit in μs aufgetragen: **A:** Rohdaten der Messung ohne Korrektur; **B:** Daten der Messung nach Abzug des unmodulierten Hintergrundes. Die rote Linie stellt die Anpassung nach einer Hermit - Interpolation 2. Grades mit 17 Stützstellen zwischen 1,75 und 7,35 nm) dar.

Wie bereits beschrieben, erfolgte bei dieser Mutante eine Auswertung mit einer Hermit - Interpolation 2. Ordnung.

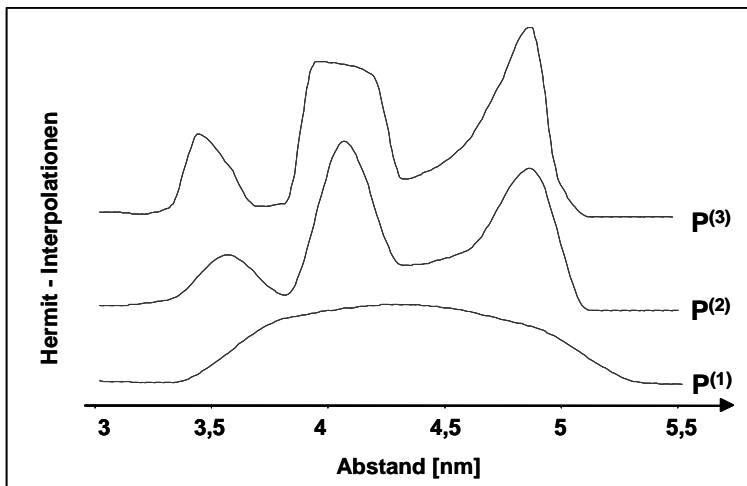


Abb. 56: Verschiedene mathematische Hermit - Interpolationen zur Auswertung des in Abb. 55 gezeigten DEER - Spektrums für die Mutante S106C, S160Ch. Die Ergebnisse der Hermit - Interpolationen 1. bis 3. Ordnung wurden gestaffelt aufgetragen.

Anhand der Abbildung ist erkennbar, dass diese Auswertung noch zu einem sinnvollen Ergebnis führt. Dies ist aufgrund der besser definierten DEER - Daten (vgl. Abb. 55) möglich.

Im Anschluss an mehrere Messungen konnte durch eine vergleichende Analyse von 12 individuellen Datensätzen eine gemittelte Abstandsverteilung für die Mutante errechnet werden.

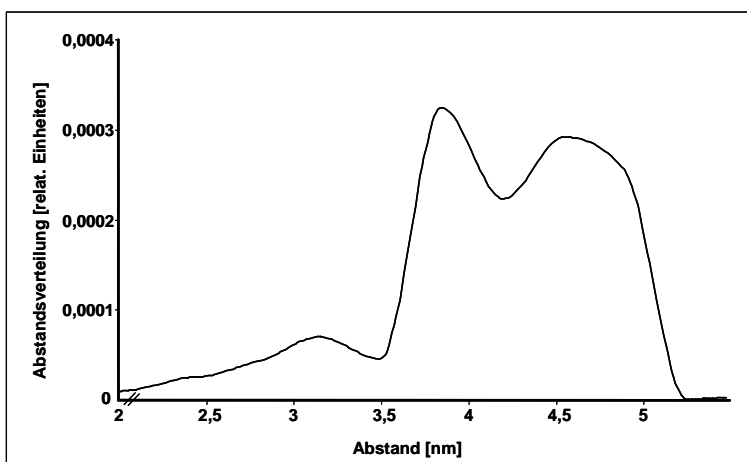


Abb. 57: Gemittelte Abstandsverteilung für die Mutante S106C, S106Ch. Es wurde wie zuvor mittels einer Maximum - Likelihood - Schätzung der mittleren Verteilung eine gemittelte Abstandsverteilung errechnet.

Schließlich konnten folgende Angaben für den Abstand zwischen den beiden Loop - Positionen 106 nach 160 gemacht werden:

Mittlerer Abstand [nm]	4,17
σ_r [nm]	0,05
Standardabweichung [nm]	0,66
σ_{Std} [nm]	0,05
Asymmetrie der Verteilung [nm ³]	-0,13
σ_V [nm]	0,07
$\Gamma_{0,5}$ [nm]	0,88
$\sigma_{\Gamma 0,5}$ [nm]	0,06
$\Gamma_{0,9}$ [nm]	2,04
$\sigma_{\Gamma 0,5}$ [nm]	0,20

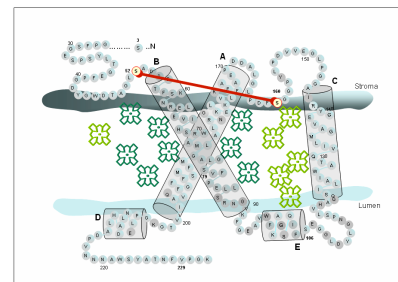
Tab. 30:

Abstandsinformationen aus der vergleichenden Analyse von 12 Datensätzen für die Mutante **S106C,S160Ch**. Die Auswertung erfolgte mittels Hermit - Interpolation 2. Ordnung.

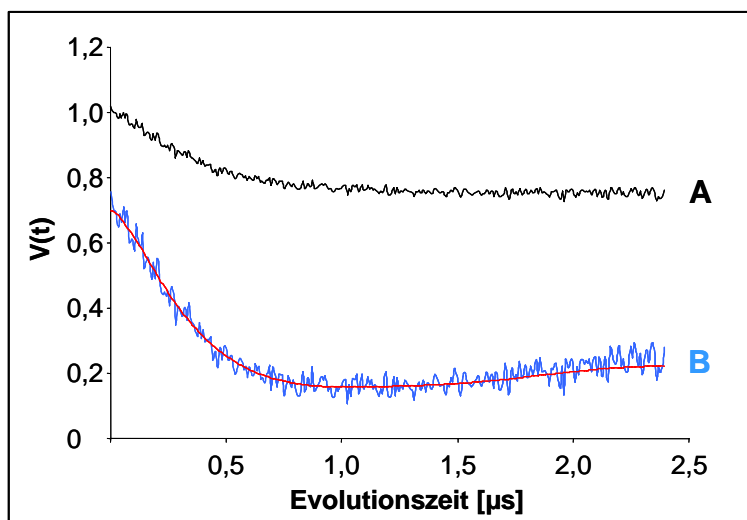
Anhand dieser Daten kann auch hier ein Intervall für den Abstand der Positionen 106 und 160 mit **3,5 nm bis 4,8 nm** angegeben werden.

3.2.4.1.3

Ergebnisse für die Mutante S52C,S160Ch



Für die Mutante S52C,S160Ch wurde aus Zeitgründen nur wenige Datensätze aufgenommen. Zunächst wieder exemplarisch die Angabe des DEER - Spektrums einer Messung:

**Abb. 58:**

DEER Spektren der Mutante S52C,S160Ch. Neben den nicht korrigierten Rohdaten (A) wurden die korrigierten Messdaten nach Abzug des unmodulierten Hintergrunds angegeben (B). Die rote Linie stellt wiederum das Fit - Ergebnis der Hermit - Interpolation 1. Ordnung dar.

Auch hier folgte, wie bereits beschrieben, eine Auswertung mittels Hermit - Interpolation 1. Ordnung analog zu den Darstellungen zur Mutante S3C,S160Ch, so dass auf die Angabe des Graphen hier verzichtet werden soll.

Folgende gemittelte Abstandsverteilung ergab sich aus zwei parallelen Messungen:

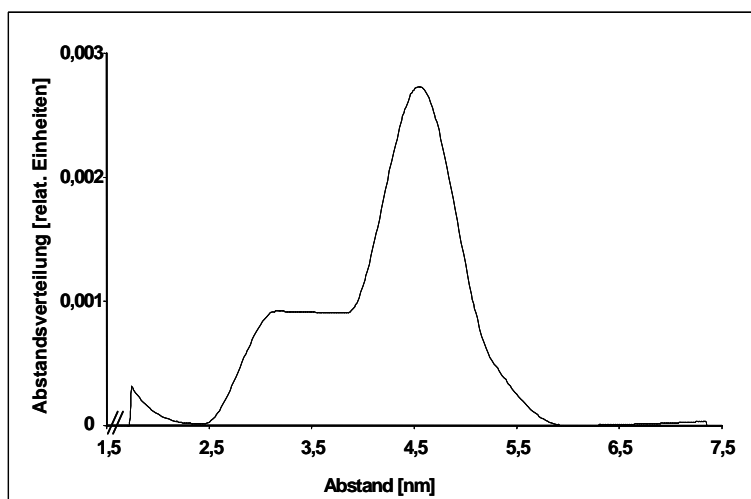


Abb. 59: Gemittelte Abstandsverteilung für die Mutante S52C,S160Ch. Nach einer Maximum - Likelihood - Schätzung der mittleren Verteilung wurde wieder eine gemittelte Abstandsverteilung errechnet.

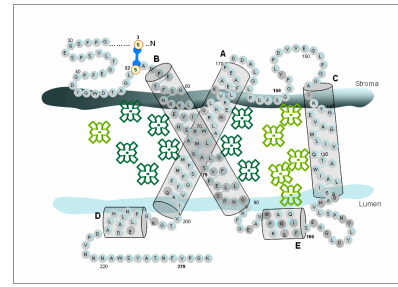
Anhand dieser Auswertung konnten anschließend wiederum konkrete Angaben für den Abstand zwischen den Positionen 52 (Nahe Helix B) und dem stromalen Loop (Position 160) ermittelt werden:

Mittlerer Abstand [nm]	4,19
σ_r [nm]	0,00
Standardabweichung [nm]	0,71
σ_{Std} [nm]	0,06
Asymmetrie der Verteilung [nm ³]	-0,31
σ_V [nm]	0,01
$\Gamma_{0,5}$ [nm]	0,96
$\sigma_{\Gamma 0,5}$ [nm]	0,11
$\Gamma_{0,9}$ [nm]	2,27
$\sigma_{\Gamma 0,9}$ [nm]	0,18

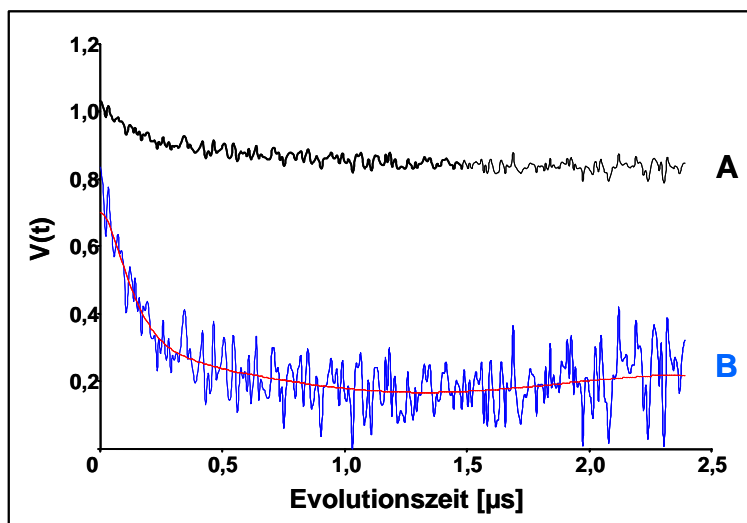
Tab. 31: Abstandsinformationen aus der Analyse der Datensätze für die Mutante **S52C,S160Ch**. Die Auswertung erfolgte mittels Hermit - Interpolation 1. Ordnung.

Aus diesen Werten ergibt sich für die Mutante eine Intervallangabe von **3,5 nm bis 4,7 nm** für den Abstand von Position 52 nach Position 160 im LHCII Monomer.

3.2.4.1.4

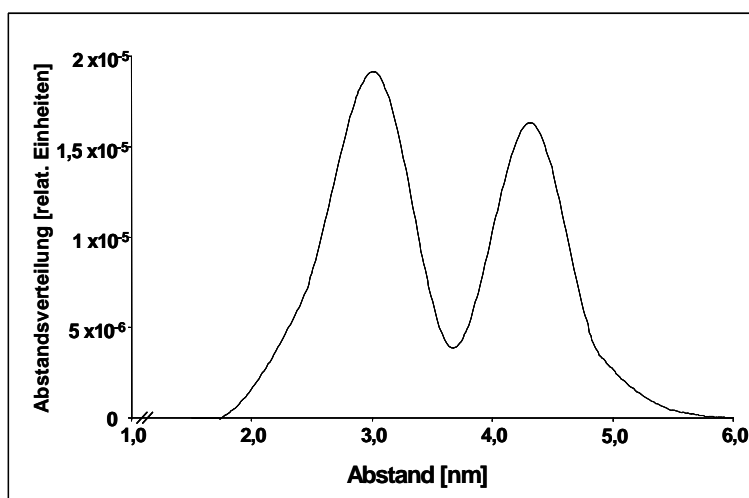
Ergebnisse für die Mutante S3C,S52Ch

Auch für diese Mutante wurde nur wenige Messungen durchgeführt. Daraus ergab sich folgendes charakteristisches DEER - Spektrum:

**Abb. 60:**

DEER - Spektren der Mutante S3C,S52Ch. Neben den nicht korrigierten Rohdaten (A) wurden wieder die korrigierten Messdaten nach Abzug des unmodulierten Hintergrunds angegeben (B). Die rote Linie stellt wiederum das Fit - Ergebnis der Hermit - Interpolation 1.Ordnung dar.

Mittels Hermit - Interpolation 1.Ordnung und der Verwendung zweier Datensätze konnte folgende gemittelte Abstandsverteilung errechnet werden.

**Abb. 61:**

Gemittelte Abstandsverteilung für die Mutante S3C,S52Ch. Es wurde wiederum mit einer Maximum - Likelihood - Schätzung der mittleren Verteilung eine gemittelte Abstandsverteilung errechnet.

Diese gemittelte Abstandsverteilung legt, ähnlich zu den erhaltenen Verteilungen für die Mutanten S3C,S160Ch und S52C,S160Ch (siehe dort) eine bimodale Verteilung der Abstände, übertragen auf die Struktur also zwei konkret voneinander unterscheidbare Konformationen nahe. Auf diesen Zusammenhang soll später noch ausführlich eingegangen werden.

Zunächst wurden zum besseren Vergleich aller untersuchten Mutanten wiederum anhand der gemittelten Abstandverteilung über den gesamten Bereich konkrete Angaben für den Abstand zwischen den Positionen 3 und 52 berechnet:

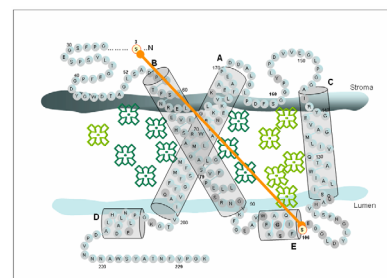
Mittlerer Abstand [nm]	3,56
σ_r [nm]	0,05
Standardabweichung [nm]	0,81
σ_{Std} [nm]	0,05
Asymmetrie der Verteilung [nm ³]	0,12
σ_v [nm]	0,08
$\Gamma_{0,5}$ [nm]	1,39
$\sigma_{\Gamma 0,5}$ [nm]	0,07
$\Gamma_{0,9}$ [nm]	2,41
$\sigma_{\Gamma 0,5}$ [nm]	0,2

Tab. 32: Abstandsinformationen aus der Analyse der Datensätze für die Mutante **S3C,S52Ch**. Die Auswertung erfolgte mittels Hermit - Interpolation 1. Ordnung.

Aus diesen Werten ergibt sich für die Mutante eine Intervallangabe von **2,7 nm bis 4,2 nm** für den Abstand von Position 3 nach Position 52.

3.2.4.1.5

Ergebnisse für die Mutante S3C,S106C



Auch für diese Mutante mit einer sehr langen Distanz zwischen den TEMPO - Labeln wurden mittels DEER - Messungen Abstandsinformationen ermittelt. Dazu musste allerdings die Evolutionszeit während der Messungen auf über 3 μ s erhöht werden, was zu einer deutlichen Verlängerung der gesamten ESR - Messzeit führte.

Schließlich konnte folgendes DEER - Spektrum erhalten werden:

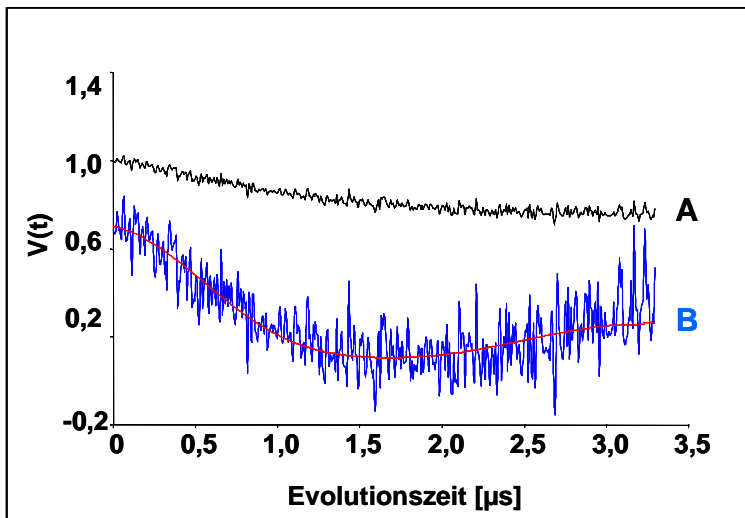


Abb. 62: DEER Spektren der Mutante S3C,S106C. Wiederum eine Darstellung der nicht korrigierten Rohdaten (A) neben den korrigierten Messdaten nach Abzug des unmodulierten Hintergrunds (B). Die rote Linie zeigt wieder das Fit - Ergebnis der Hermit - Interpolation 1.Ordnung.

Auch aus diesem infolge der erforderlichen längeren Beobachtungszeit etwas stärker verrauschten Signal konnte mittels Hermit - Interpolation eine Abstandsverteilung errechnet werden, die in der folgenden Abbildung gezeigt werden soll.

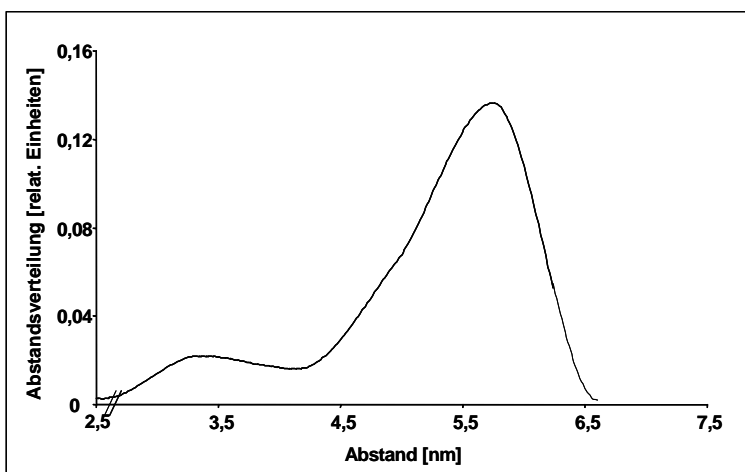


Abb. 63: Errechnete Abstandsverteilung für die Mutante S3C,S106C.

Aus dieser Verteilung konnten folgende Abstandsinformationen für die Mutante S3C,S106C extrahiert werden:

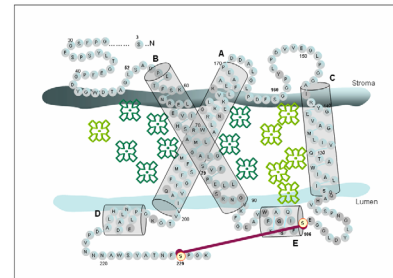
Mittlerer Abstand [nm]	5,26
σ_r [nm]	---
Standardabweichung [nm]	0,78
σ_{Std} [nm]	---
Asymmetrie der Verteilung [nm ³]	-0,6
σ_v [nm]	---
$\Gamma_{0,5}$ [nm]	0,91
$\sigma_{\Gamma 0,5}$ [nm]	---
$\Gamma_{0,9}$ [nm]	2,33
$\sigma_{\Gamma 0,5}$ [nm]	---

Tab. 33: Abstandsinformationen aus der Analyse der Datensätze für die Mutante **S3C,S106C**. Die Auswertung erfolgte mittels Hermit - Interpolation 1. Ordnung.

Daraus ergibt sich ein Intervall für den gefundenen Abstand von Position 3 nach 106 von **4,8 nm bis 6,0 nm**. Eine Angabe der entsprechenden Sigma - Werte fehlt an dieser Stelle, da nur eine Messung in die Auswertung einging. Zudem ist an dieser Stelle bereits zu bemerken, dass die hier angegebenen Werte aufgrund des schlechteren Signal - Rausch - Verhältnisses eher als Schätzung anzusehen sind. Eine ESR - Messung von Distanzen größer 5 nm ist aufgrund der dazu nötigen langen Beobachtungszeit eher als grenzwertig anzusehen. Auf diesen Punkt soll in der Diskussion noch eingegangen werden.

3.2.4.1.6

Ergebnisse für die Mutante S106C,V229C



Auch mit dieser Mutante, die zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit für ESR - Messungen zur Verfügung gestellt wurde, wurden nach *in vitro* - Rekonstitution unter Standardbedingungen mehrere DEER - Experimente durchgeführt.

Folgendes charakteristisches DEER - Spektrum ergab sich:

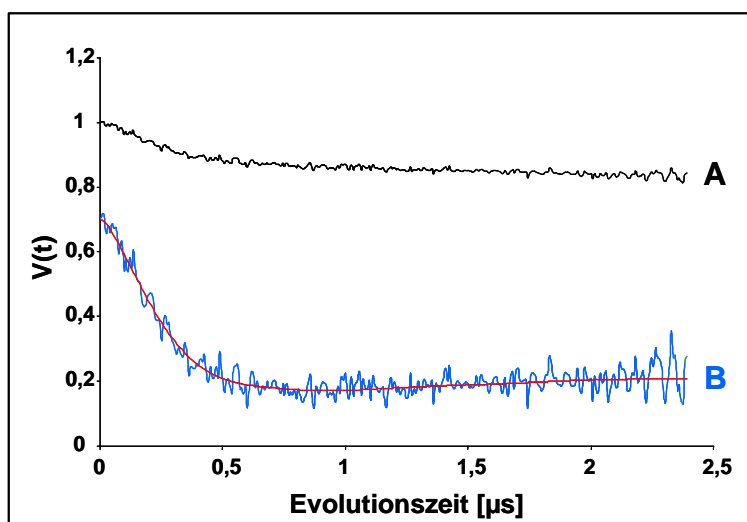


Abb. 64: DEER Spektren der Mutante S106C,V229C. Auch hier eine Darstellung der nicht korrigierten Rohdaten (A) neben den korrigierten Messdaten nach Abzug des unmodulierten Hintergrunds (B). Die rote Linie zeigt zudem erneut das Fit - Ergebnis der Hermit - Interpolation 1. Ordnung.

Im Anschluss erfolgte wieder eine Auswertung mehrerer Messungen und die Ermittlung einer gemittelten Abstandsverteilung.

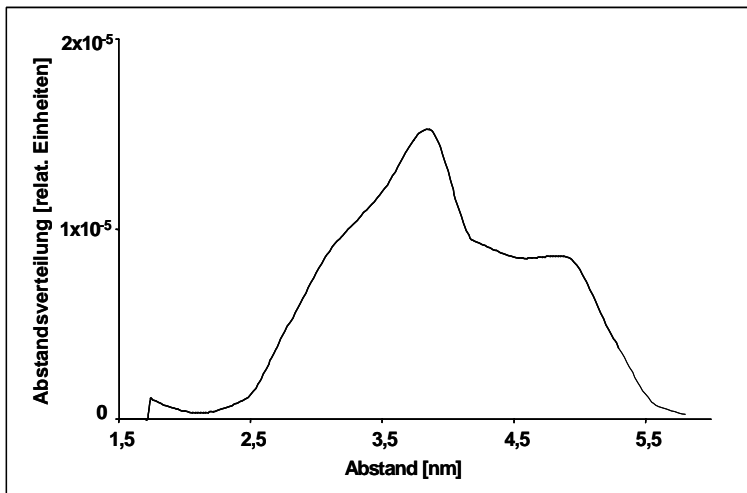


Abb. 65: Gemittelte Abstandsverteilung für die Mutante S106C,V229C. Es wurde wiederum mit einer Maximum - Likelihood - Schätzung der mittleren Verteilung eine gemittelte Abstandsverteilung errechnet.

Mit Hilfe dieser Abbildung konnten anschließend folgende Abstands-
informationen für die Mutante erhalten werden:

Mittlerer Abstand [nm]	3,93
σ_r [nm]	0,04
Standardabweichung [nm]	0,75
σ_{Std} [nm]	0,02
Asymmetrie der Verteilung [nm ³]	0
σ_V [nm]	0,05
$\Gamma_{0,5}$ [nm]	1,11
$\sigma_{\Gamma 0,5}$ [nm]	0,00
$\Gamma_{0,9}$ [nm]	2,42
$\sigma_{\Gamma 0,5}$ [nm]	0,05

Tab. 34: Abstandsinformationen aus der Analyse der Datensätze für die Mutante **S106C,V229C**. Die Auswertung erfolgte mittels Hermit - Interpolation 1. Ordnung.

Daraus ergibt sich folgende Intervallangabe für den Abstand der Loop - Position 106 Richtung C - Terminus (Position 229) von **3,2 nm bis 4,7 nm**.

Zum besseren Überblick aller mit Hilfe der sechs LHCII - Doppelmutanten erhaltenen Abstandsdaten soll an dieser Stelle eine zusammenfassende Abbildung gezeigt werden:

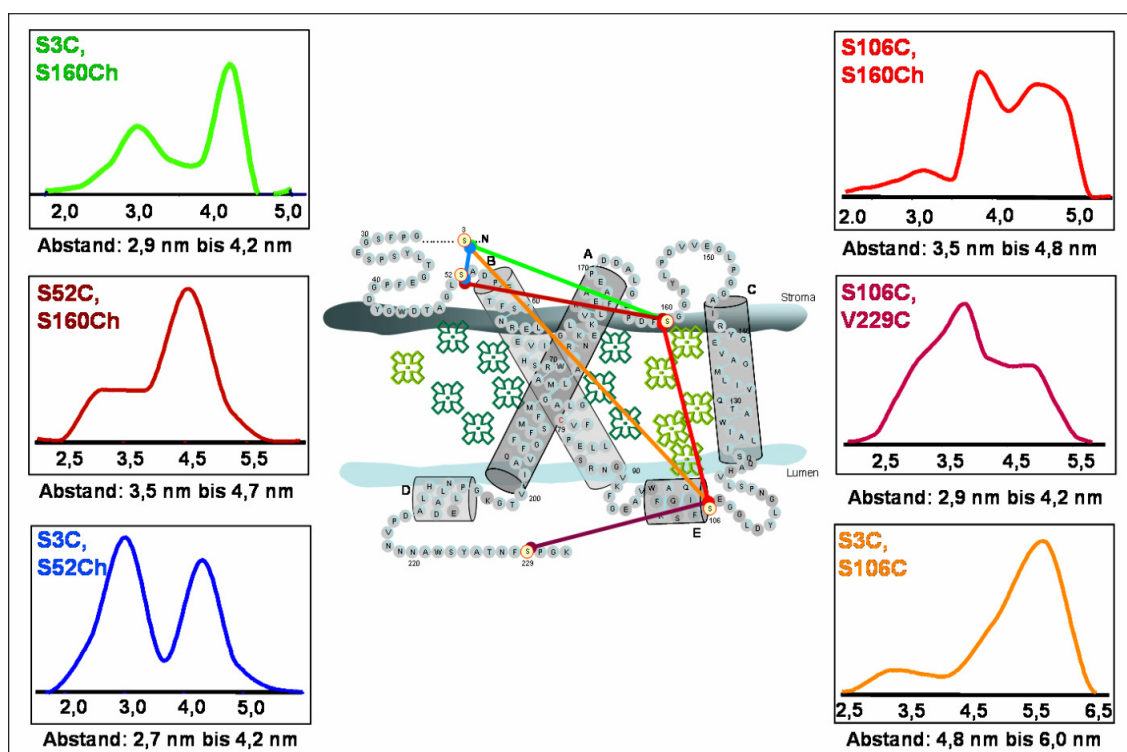


Abb. 66:

Überblick der mittleren Abstandsverteilungen der verschiedenen unter Standardbedingungen rekonstituierten LHCII - Monomere. (Auf eine Eintragung von Y-Achsen konnte verzichtet werden, da es sich hier um die Angabe der Abstandsverteilung in relativen Einheiten handelt.)

Anhand der Abbildung sind bereits einige generelle Trends erkennbar. So zeigen sich mit Hilfe der Mutanten S3C,S160Ch und S3C,S52Ch bimodale Verteilungsmuster für die betreffenden Distanzen, ebenso in schwächerer Form für die Mutante S52C,S160Ch. Die erhaltenen Muster mit zwei eindeutig unterscheidbaren Maxima deuten auf zwei diskret voneinander unterscheidbare Konformationsensembles in der N - terminalen Struktur der Mutanten hin. Über die mögliche Bedeutung dieser Entdeckung für die biologische Funktion des N -Terminus muss später im Rahmen der Diskussion noch gesprochen werden. Die übrigen drei untersuchten Klone scheinen keine solchen bimodalen Verteilungen für die Distanzen zwischen den betreffenden Aminosäuren aufzuweisen. Hier deuten die mittels der ESR - Messungen berechneten mittleren Abstandsverteilungen eher auf ein breites monomodales Ensemble der betreffenden Mutanten hin. Das heißt, dass hier wahrscheinlich nur ein konformativer Zustand der betreffenden Monomere zu beobachten ist, und die Breite der Verteilungen lediglich auf eine noch zu diskutierende konformative Freiheit des TEMPO - Labels bzw. auf eine dennoch auftretende schmalere und monomodale Verteilung der Konformationen der luminalen und stromalen Schleife zurückzuführen ist. Von zwei diskret voneinander unterscheidbaren konformativen Zuständen kann hier aber nicht gesprochen werden.

Zudem ist anhand aller ermittelten Datensätze prinzipiell zu beobachten, dass die Standardabweichung der ermittelten Distanzen der verschiedenen LHCII - Monomere einen recht konstanten Wert von $\pm 0,8$ nm um den angegebenen mittleren Abstandswert aufweisen. Diese Unschärfe kann nicht allein aufgrund der Variationsbreite der Konformation der gebundenen TEMPO - Label entstanden sein. Es muss vielmehr anhand der ESR - Daten vermutet werden, dass

die Ursache dieser breiten Verteilungsmuster mehrere mögliche Konformationen des LHCII - Komplexes ist. Eine solche dynamische Konformation wurde gerade im Hinblick auf den Aminoterminus des LHCII schon im Vorfeld dieser Arbeit in der Literatur mehrfach vorgeschlagen (vgl. Ausführungen in der Einleitung), konnte aber nie klar bewiesen werden. Mit Hilfe der hier durchgeführten DEER - Abstandsmessungen ergibt sich ein deutlicher experimenteller Hinweis für diese Annahme.

3.2.4.2 ESR - Messungen von speziell rekonstituiertem bzw. behandeltem monomerem LHCII

3.2.4.2.1 Einfluss von Licht auf die Konformation des N - Terminus

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, führt die Starklichtbestrahlung einer Pflanze u.a. zur Phosphorylierung des LHCII und dadurch zum Abwandern der LHCII - Antenne vom Photosystem II hin zum Photosystem I. Dieser Prozess, der auch als „state transition“ beschrieben wird (Allen und Forsberg 2001), ist völlig reversibel. Dabei scheinen sowohl die Interaktion des LHCII mit der Kinase als auch die Aktivierung der Kinase sehr genau durch Licht reguliert zu werden. Licht fördert beide Prozesse. Bezüglich des LHCII hat Zer (1999) zudem beobachtet, dass die Bestrahlung mit Licht zu einer besseren Zugänglichkeit des N - Terminus für die Protease Trypsin führt. Auch dieser Prozess ist in Dunkelheit völlig reversibel.

Diese Kenntnisse und Beobachtungen führen zu der Vermutung, dass Licht zu einer konformativen Änderung der N - terminalen Region des LHCII führt. Nur so können beide beschriebenen Phänomene (Interaktion mit der Kinase bzw. Proteasezugänglichkeit) erklärt werden.

Im folgenden Experiment sollte deshalb versucht werden, diese konformative Änderung mit Hilfe von ESR - Abstandsmessungen nachzuvollziehen.

Wiederum wurden LHCII - Monomere der Mutante S3C,S160Ch rekonstituiert und aufgearbeitet und nach der Konzentrierung mit Centrikon Zentrifugalfiltern in zwei Hälften aufgeteilt. Alle Arbeiten wurden dabei unter stark lichtreduzierten Bedingungen durchgeführt.

Anschließend wurde eine Hälfte der Proben im Dunkeln direkt 1:1 mit 80% Glycerin vermischt und in ESR - Proberöhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die zweite Probenhälfte wurde nach Befüllen des Röhrchens vor dem Schockgefrieren zusätzlich 1,5 Minuten bei 100 μ E mit Licht bestrahlt.

Die Einstellungen des Vier - Puls - DEER - Experiment entsprachen den bisher besprochenen Versuchen.

Die erhaltenen DEER - Spektren aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden in der folgenden Abbildung in direktem Vergleich

mit einer unter Standardbedingungen hergestellten LHCII - Monomerprobe der gleichen Mutante gestaffelt dargestellt.

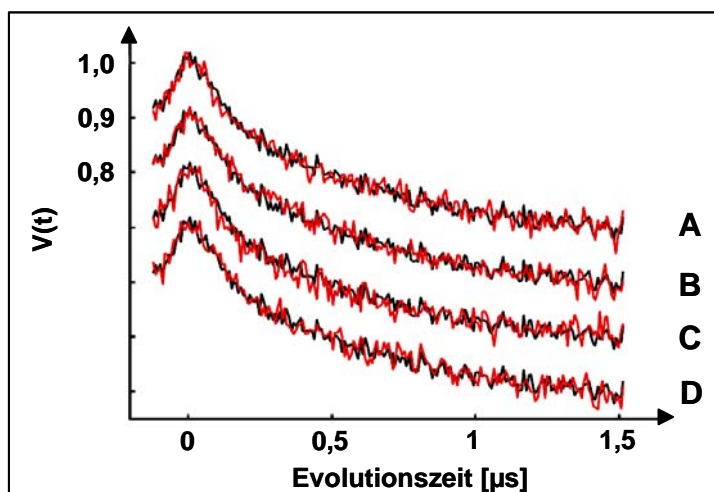


Abb. 67: Gestaffelte Darstellung aller DEER - Spektren des Lichtexperiments mit der Mutante S3C,S160Ch: **A** und **B** (rot) stellen die Ergebnisse der Dunkelkontrollen dar; **C** und **D** (rot) zeigen die bestrahlten Proben. Alle Daten wurden über ein entsprechendes DEER - Spektrum einer unter Standardbedingungen rekonstituierten Probe der gleichen Mutante gedruckt. Die Skalierung der Ordinate wurde beispielhaft für die Probe A angegeben.

Zum besseren Vergleich der erhaltenen DEER - Spektren wurden zusätzlich Differenzspektren (DEER der Probe minus DEER des Standards) ermittelt, die in folgender Abbildung aufgetragen wurden:

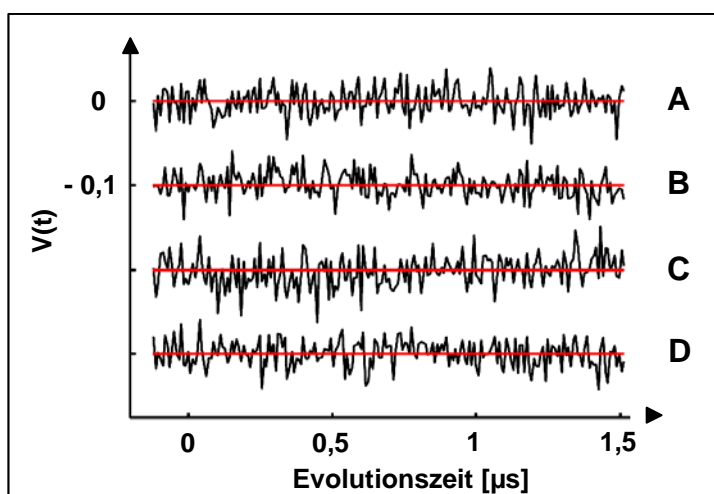


Abb. 68: Darstellung der berechneten Differenzspektren aller erhaltenen DEER - Spektren des Lichtexperiments mit der Mutante S3C,S160Ch: **A** und **B** (schwarz) stellen die Ergebnisse der Dunkelkontrollen dar; **C** und **D** (schwarz) zeigen die bestrahlten Proben. Alle Daten wurden über ein entsprechendes Differenzspektrum einer unter Standardbedingungen rekonstituierten Probe der gleichen Mutante gedruckt. Die Skalierung der Ordinate wurde beispielhaft für die Probe A angegeben.

Anhand dieser Differenzspektren ist erkennbar, dass es durch die Bestrahlung mit Licht zu keinerlei signifikanten Unterschieden zwischen den erhaltenen DEER - Spektren der bestrahlten und unbestrahlten Proben der Mutante S3C,S160Ch kommt.

Somit gelten für alle Proben die Abstandsangaben, wie sie bereits für die Mutante S3C,S160Ch angegeben wurden.

Ein ergänzendes Experiment mit intensiverer Bestrahlung bzw. mit einer anderen LHCII - Mutante, wie zum Beispiel mit der Mutante S3C,S52Ch, bei der neben der strukturkonservierten Position 52 (nahe Helix B) auch die N - terminale Position 3 enthalten ist, wurde aus Zeitgründen nicht durchgeführt.

3.2.4.2.2 Einfluss verschiedener Carotinoide auf die Konformation des LHCII

Carotinoide sind für die Funktion und den Aufbau des LHCII sehr wichtig. In der Einleitung dieser Arbeit wurde bereits auf diesen Aspekt näher eingegangen. Während der eigenen Diplomarbeit (Bender 2000 (Diplomarbeit) bzw. Hobe *et al.* 2000) hatte sich bereits gezeigt, dass es durch die Rekonstitution von LHCII mit einem einzigen Carotinoid (in der Diplomarbeit als Einzelxanthophyll - Komplexe bezeichnet) im Pigmentangebot zu Veränderungen des rekonstituierten Komplexes kommen muss. Dabei ließen vor allem die Ergebnisse der nativen Gelelektrophorese darauf schließen, dass sich durch den Einbau verschiedener Carotinoide die Konformation des gesamten Komplexes verändert. So zeigten Lutein - und Zeaxanthin - Komplexe ein deutlich verändertes Laufverhalten während der nativen Gelelektrophorese (vgl. der Abbildung 8 in der Einleitung dieser Arbeit).

Mit Hilfe der ESR - Spektroskopie sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, einen Erklärungsansatz für dieses veränderte PAGE - Laufverhalten zu geben. Dazu wurden analog zu den Versuchen während der Diplomarbeit LHCII - Komplexe der Mutanten S3C,S160Ch und S106C,S160Ch mit nur einem Carotinoid hergestellt und anschließend per DEER vermessen. Die Probenpräparation und -vorbereitung für das DEER - Experiment erfolgte dabei nach dem gleichen Prinzip wie für die bereits beschriebenen Experimente, so dass hier nicht näher darauf eingegangen werden soll.

Ergebnisse für Einzelcarotinoid - Komplexe der Mutante S3C,S160Ch:

Mit dieser Mutante wurden Einzelcarotinoid - Komplexe mit den Carotinoiden Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin hergestellt und anschließend mit einer Präparation mit Totalpigmentextrakt verglichen.

Zum besseren visuellen Darstellung der Ergebnisse, wurden die erhaltenen DEER - Spektren wieder in direktem Vergleich mit der mit Totalpigmentextrakt hergestellten LHCII - Monomerprobe der gleichen Mutante gestaffelt aufgetragen.

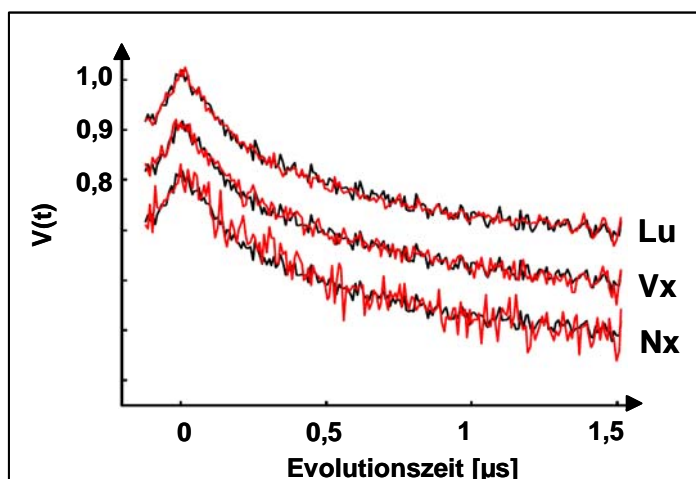


Abb. 69: Gestaffelte Darstellung der DEER - Spektren der Einzelcarotinoid - Komplexe der Mutante S3C,S160Ch:

Die Spektren des Lutein (Lu)-, Violaxanthin (Vx)- und Neoxanthin (Nx) - Komplexes wurden über ein entsprechendes DEER - Spektrum einer Rekonstitution mit Totalpigmentextrakt der gleichen Mutante gedruckt. Die Skalierung der Ordinate wurde beispielhaft für die Lu - Probe angegeben.

Es folgte die Berechnung der Differenzspektren.

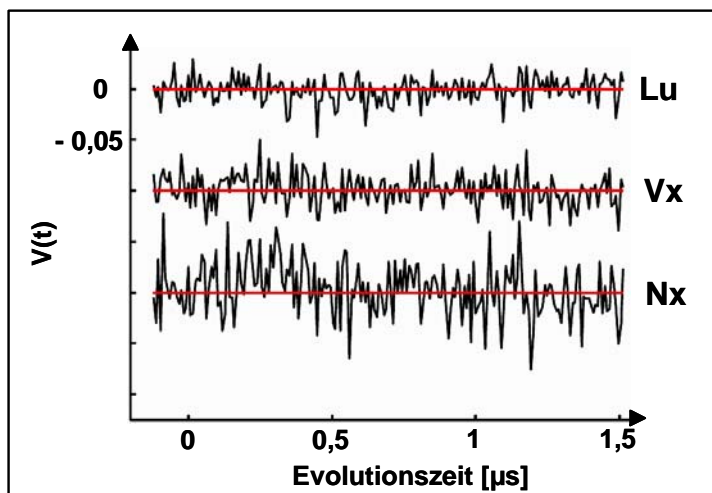


Abb. 70: Darstellung der berechneten Differenzspektren der Einzelcarotinoid - Komplexe der Mutante S3C,S160Ch: Die Daten des Lutein (Lu)-, Violaxanthin (Vx)- und Neoxanthin (Nx)- Komplexes wurden über ein entsprechendes Differenzspektrum einer unter Standardbedingungen rekonstituierten Probe der gleichen Mutante gedruckt. Die Skalierung der Ordinate wurde beispielhaft für die Lu - Probe angegeben.

Anhand der Differenzspektren kann man erkennen, dass es durch die Rekonstitution des LHCII mit Violaxanthin bzw. mit Neoxanthin als einzigen Carotinoiden zu geringen Veränderungen im Vergleich zur unter Standardbedingungen hergestellten LHCII - Präparation kommt. Der Lutein - Komplex zeigt hingegen keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu diesem Standard.

Um den eventuellen Einfluss der Carotinoide auf den Abstand zwischen der N - terminalen Position 3 und der Position 160 noch genauer abschätzen zu können, wurden nachfolgend mittels einer Hermit - Interpolation 1. Ordnung die Abstandsverteilungen für die verschiedenen LHCII - Präparationen berechnet.

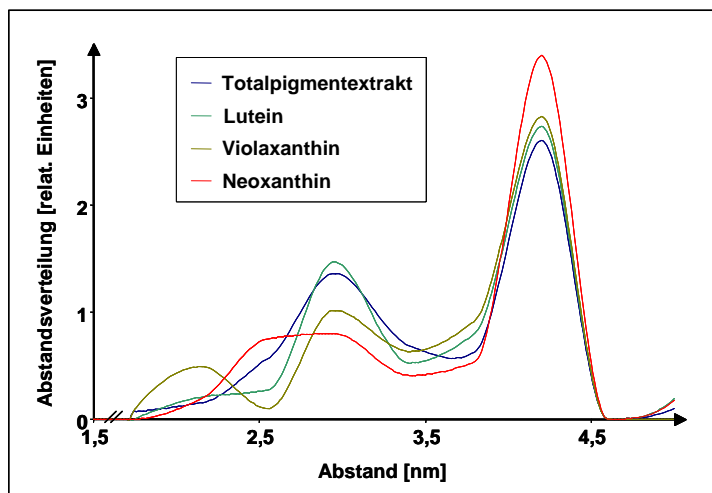


Abb. 71: Mittels Hermit - Interpolation 1. Ordnung berechnete Abstandsverteilungen für Einzelcarotinoid - Komplexe der Mutante S3C,S160Ch nach Normierung auf das gleiche Integral.

Man erkennt, dass es hier zu keiner zuverlässig quantifizierbaren Veränderung innerhalb der auftretenden Abstandsverteilung kommt. Selbst die zuvor im Differenzspektrum leicht abweichend wirkenden Komplexe mit Neoxanthin und Violaxanthin weisen im Rahmen der Messgenauigkeit gleiche Muster auf. Lediglich bei Einzelcarotinoid - Komplexen mit Violaxanthin könnte möglicherweise zusätzlich eine Population von LHCII - Monomeren existieren, die kurze

Abstände bis 1,8 nm aufweisen. Beim Neoxanthin - Komplex scheint auch die Verteilung geringfügig zu kurzen Abständen hin verschoben zu sein.

Somit gelten im Rahmen der Messgenauigkeit auch hier die Abstandsinformation und das angegebene Abstandsintervall, wie es bereits angegeben wurde.

Ergebnisse für Einzelcarotinoid - Komplexe der Mutante S106C,S160Ch:

Auch mit dieser Mutante, bei der die markierten Positionen wie bereits angegeben auf der stromalen (160) bzw. luminalen Schleife (106) liegen, wurden Einzelcarotinoid - Komplexe per ESR vermessen. Dabei wurden wieder Komplexe mit den Pigmenten Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin hergestellt und mit einer Präparation mit Totalpigmentextrakt verglichen. Zusätzlich wurden LHCII - Monomere mit Zeaxanthin, dem Endprodukt des Violaxanthin - Zyklus vermessen.

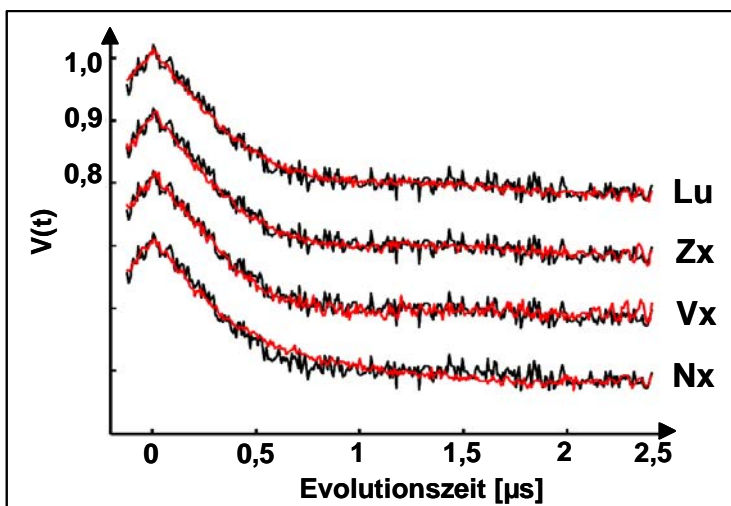


Abb. 72: DEER - Spektren der Einzelcarotinoid - Komplexe der Mutante S106C,S160Ch: Die Spektren des Lutein (Lu)-, Zeaxanthin (Zx)-, Violaxanthin (Vx)- und Neoxanthin (Nx)-Komplexes wurden über ein entsprechendes DEER - Spektrum einer Rekonstitution mit Totalpigmentextrakt der gleichen Mutante gedruckt. Die Skalierung der Ordinate wurde beispielhaft für die Lu - Probe angegeben.

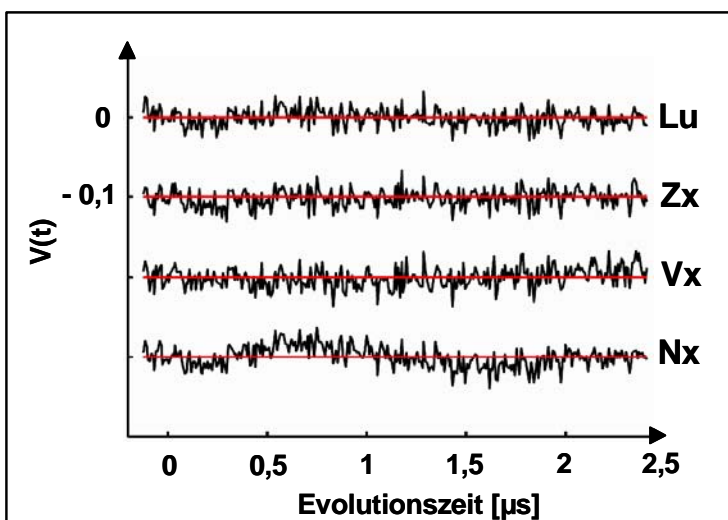


Abb. 73: Darstellung der berechneten Differenzspektren der Einzelcarotinoid - Komplexe der Mutante S106C,S160Ch: Die Daten des Lutein (Lu)-, Zeaxanthin (Zx)-, Violaxanthin (Vx)- und Neoxanthin (Nx)- Komplexes wurden über ein Differenzspektrum einer unter Standardbedingungen rekonstituierten Probe der gleichen Mutante gedruckt. Die Skalierung der Ordinate wurde beispielhaft für die Lu - Probe angegeben.

Man kann anhand der Differenzspektren erkennen, dass sich die Spektren der Lutein-, Zeaxanthin- und Violaxanthin - Komplexe kaum voneinander unterscheiden. Lediglich der Komplex mit Neoxanthin zeigt ein verändertes Differenzspektrum.

Um die eventuellen Unterschiede in Bezug auf die Abstandsverteilungen der vermessenen Komplexe weiter herauszuarbeiten, wurden im Anschluss Hermit - Interpolationen 2. Ordnung berechnet und die Abstandsverteilungen ermittelt.

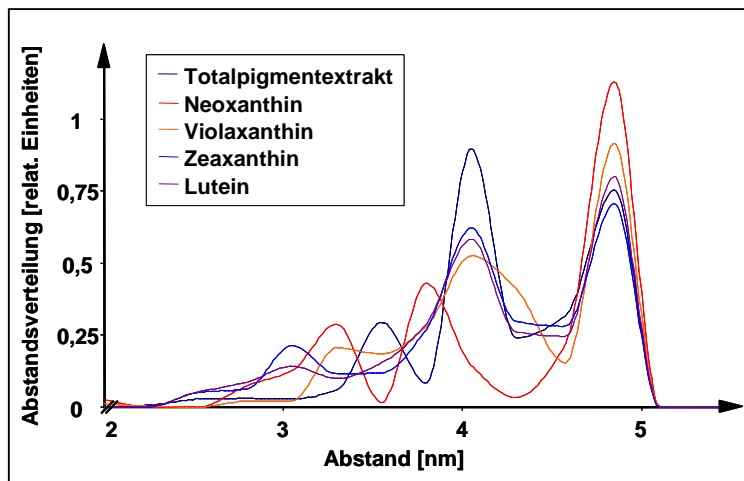


Abb. 74: Mittels Hermit - Interpolation 2. Ordnung berechnete Abstandsverteilungen für Einzelcarotinoid - Komplexe der Mutante S106C,S160Ch, nach Normierung auf das gleiche Integral.

Anhand der Abbildung wird ersichtlich, dass es auch bei dieser Mutante durch die Veränderung des Carotinoidangebots bei der Rekonstitution zu keinen sicher quantifizierbaren Veränderungen der gemessenen Abstände zwischen den beiden Schleifenpositionen 106 und 160 kommt. Allerdings muss an dieser Stelle bemerkt werden, dass die Analyse der Differenzspektren empfindlicher bezüglich kleiner Änderungen ist und gleichzeitig einen zuverlässigeren Vergleich der Daten ermöglicht, da bei ihr keine fehlerhaften Zwischenschritte der Datenanalyse eingehen.

Daraus folgt, dass die Strukturänderung durch das Angebot von Neoxanthin als einzigem Carotinoid bei der Rekonstitution als signifikant angesehen werden kann. Aufgrund der von vornherein breiten Abstandsverteilung und des begrenzten Signal-Rausch Verhältnisses der Messung ist diese Strukturänderung allerdings nicht quantifizierbar. Die Momentanalyse der Abstandsverteilung in Form der Hermit - Interpolation legt allenfalls eine leichte Zunahme der Standardabweichung für Neoxanthin nahe. Alle Abstandsverteilungen ergeben im Rahmen der Messgenauigkeit somit die Abstandsinformationen, wie sie bereits zuvor angegeben wurden.

Abschließend kann für beide untersuchten Mutanten S3C,S160Ch und S106C,S160Ch ein Einfluss der Carotinoide auf die Abstände zwischen den untersuchten Positionen und somit auf die Konformation der Komplexe ausgeschlossen werden.

3.2.4.2.3 Einfluss verschiedener Lipide auf die Konformation des LHCII

In Ergänzung zu der vergleichenden Untersuchung der PG - Bindestelle am LHCII wurde im Anschluss an die eben dargestellten Untersuchungen mit verschiedenen Carotinoiden versucht, auch den Einfluss verschiedener Lipide auf die Konformation des LHCII zu bestimmen. Dabei wurden die Lipide MGDG, DGDG und PG näher auf ihren konformativen Einfluss hin untersucht. Das pflanzliche Sulfolipid SL stand zum Zeitpunkt der Messungen nicht zur Verfügung und wurde deshalb nicht analysiert.

Für diese Untersuchungen wurden verschiedene Rekonstitutionen mit den Mutanten S3C,S160Ch und S106C,S160Ch durchgeführt.

Um wirklich nur den Einfluss einer Lipidspezies auf die Konformation des LHCII zu untersuchen, wurden für diese Messungen speziell augereinigte Pigmente verwendet, die mittels HPLC -Trennung lipidfrei gemacht worden waren (siehe Material und Methoden Abschnitt „Pigmente“). Im Anschluss an diese chromatographische Reinigung wurde mit diesen Einzelpigmenten wieder ein „künstlicher“ Totalpigmentextrakt mit exakt gleichen molaren Pigmentverhältnissen⁴⁸ wie in der nativen Mischung gemischt. Zu diesem lipidfreien Totalpigmentextrakt wurde während der Rekonstitution eine Mischung aus Einzellipid und Protein zugegeben. Dabei betrug das molare Protein zu Einzellipid - Verhältnis 1:50. Die eingesetzten Lipide MGDG und DGDG stammten aus Spinat und wurden speziell für diese Versuche kommerziell erworben. Vor dem Einsatz wurden sie per Dünnschichtchromatographie auf ihren Reinheitsgrad hin überprüft. PG wurde als synthetisches DPPG der Firma Avanti benutzt.

Zusätzlich zu diesen Lipiden wurde bei beiden Klonen auch eine LHCII - Präparation ohne jegliche Lipidzugabe während der Rekonstitution vermessen.

Die Probenpräparation und -vorbereitung für das DEER - Experiment erfolgte ansonsten nach dem gleichen Prinzip wie bereits in den vorigen Kapiteln beschrieben.

Ergebnisse für Einzellipid - Komplexe der Mutante S3C,S160Ch:

Zur besseren Darstellung der Ergebnisse wurden die erhaltenen DEER - Spektren wiederum in direktem Vergleich mit einer mit lipidhaltigem Totalpigmentextrakt hergestellten LHCII - Monomerprobe der gleichen Mutante gestaffelt aufgetragen.

⁴⁸ Diese molaren Pigmentverhältnisse wurden zuvor aus der Messung von Totalpigmentextrakt mittels analytischer HPLC ermittelt.

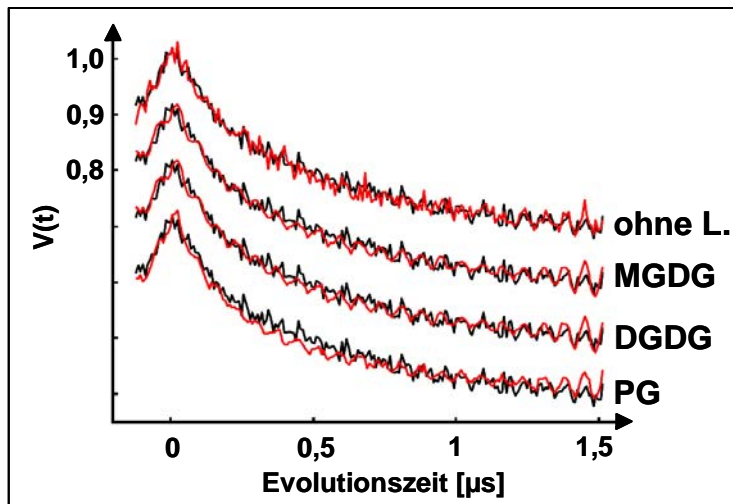


Abb. 75: DEER - Spektren der Einzellipid - Komplexe der Mutante S3C,S160Ch: Die Spektren der Komplexe mit MGDG, DGDG, PG und ‚ohne Lipid‘ wurden über ein entsprechendes DEER - Spektrum einer Rekonstitution mit lipidhaltigem Totalpigmentextrakt der gleichen Mutante gedruckt. Die Skalierung der Ordinate wurde beispielhaft für die ‚ohne Lipid‘ - Probe angegeben.

Analog zu allen anderen Versuchen dieses Kapitels wurden zunächst Differenzspektren bestimmt.

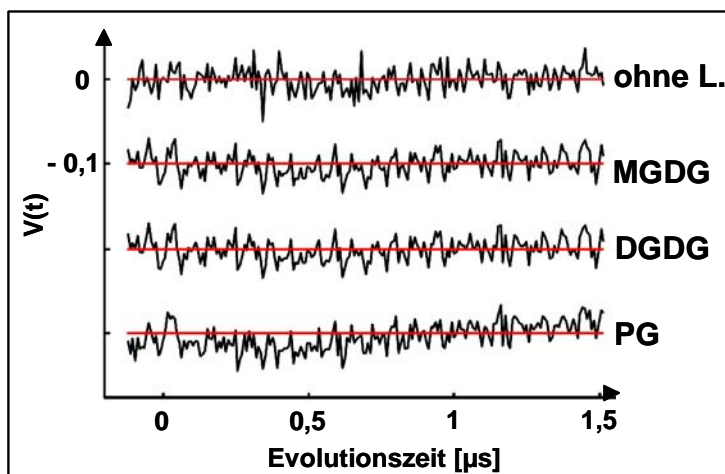


Abb. 76: Darstellung der berechneten Differenzspektren der Einzellipid - Komplexe der Mutante S3C,S160Ch: Die Spektren der Komplexe mit MGDG, DGDG, PG und ‚ohne Lipid‘ wurden über ein entsprechendes Differenzspektrum einer Rekonstitution mit lipidhaltigem Totalpigmentextrakt der gleichen Mutante gedruckt. Die Skalierung der Ordinate wurde auch hier für die ‚ohne Lipid‘ - Probe angegeben.

Das Differenzspektrum des PG - Komplexes ließ vermuten, dass sich hier eine Änderung in der Abstandsverteilung bzgl. des Referenzspektrums mit lipidhaltigem Totalextrakt ergeben würde. Zudem konnte dieses Ergebnis in zwei unabhängigen Versuchen eindeutig reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Um diese Vermutung zu klären wurde im Anschluss mittels Hermit - Interpolation 1. Ordnung für alle Einzellipid - Spektren eine Abstandsverteilung errechnet.

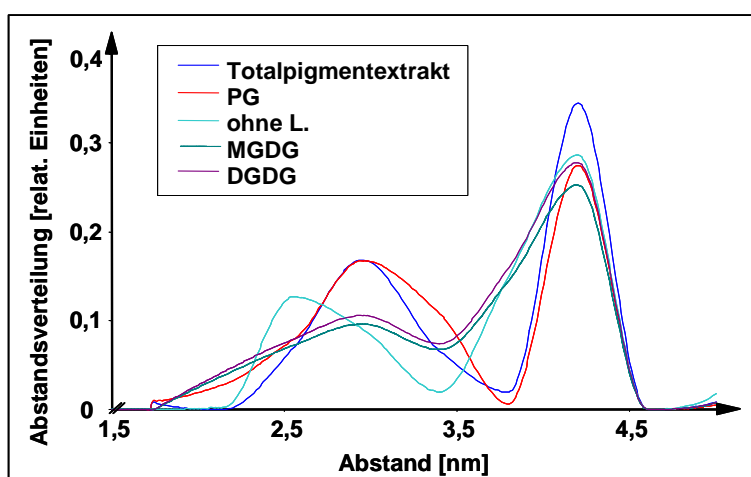


Abb. 77:
Mittels Hermit - Interpolation 1. Ordnung berechnete Abstandsverteilungen für Einzel-lipid - Komplexe der Mutante S3C,S160Ch, nach Normierung auf das gleiche Integral.

Anhand dieser vergleichenden Darstellung der Abstandsverteilungen aller untersuchten Komplexe zeigt sich, dass es durch die Rekonstitution des LHCII mit PG als einzigem zugesetztem Lipid nicht zu einer Verbreiterung oder Verschmälerung des gesamten Abstandsbereichs kommt, wohl aber zu einer Änderung der relativen Anteile kürzerer und längerer Abstände. Wegen der Breite der Abstandsverteilung führt das nur zu einer relativ geringen Änderung des mittleren Abstands, der für die Referenzprobe 3,59 nm, für MGDG 3,57 nm, für DGDG ebenfalls 3,57 nm und für PG 3,51 nm beträgt. Ferner ändert sich $\Gamma_{0,5}$, das für die Referenzprobe, für MGDG und für DGDG bei 1,09 nm, für PG hingegen bei 1,19 nm liegt. Diese Änderungen sind signifikant, schließen aber ein regelrechtes „Schalten“ zwischen zwei wohldefinierten Konformationen der N - terminalen Schleife aus. Es scheint aber dennoch zu einer geringfügigen Verschiebung innerhalb des Konformationsensembels zu kommen.

Alle untersuchten Lipide führen somit im Rahmen der Messgenauigkeit wiederum zu ähnlichen Abstandsverteilungen, wie sie bereits in den vorherigen Abschnitten für Standard - Rekonstitutionen mit dieser Mutante angegeben wurde.

Ergebnisse für Einzellipid - Komplexe der Mutante S106C,S160Ch:

Auch für diese Mutante wurden Versuche mit den Lipiden MGDG, DGDG und PG durchgeführt und mit einer Kontrolle ohne Lipidzugabe verglichen. Zusätzlich wurde eine künstliche Lipidmischung gemäß den in der Literatur (Allen 1971) angegebenen prozentualen Lipidverhältnissen gemischt und per ESR vermessen.

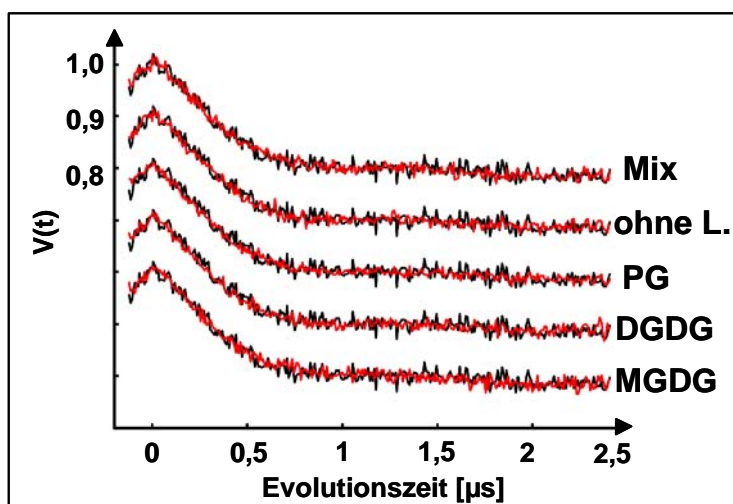


Abb. 78: DEER - Spektren der Einzellipid - Komplexe der Mutante S106C,S160Ch: Die Spektren der Komplexe mit MGDG, DGDG, PG, künstlicher Lipidmischung (Mix) und „ohne Lipid“ wurden über ein entsprechendes DEER - Spektrum einer Rekonstitution mit lipidhaltigem Totalpigmentextrakt der gleichen Mutante gedruckt. Die Skalierung der Ordinate wurde beispielhaft für die ‚Mix‘ - Probe angegeben.

Die Berechnung der Differenzspektren ergab die folgende Abbildung:

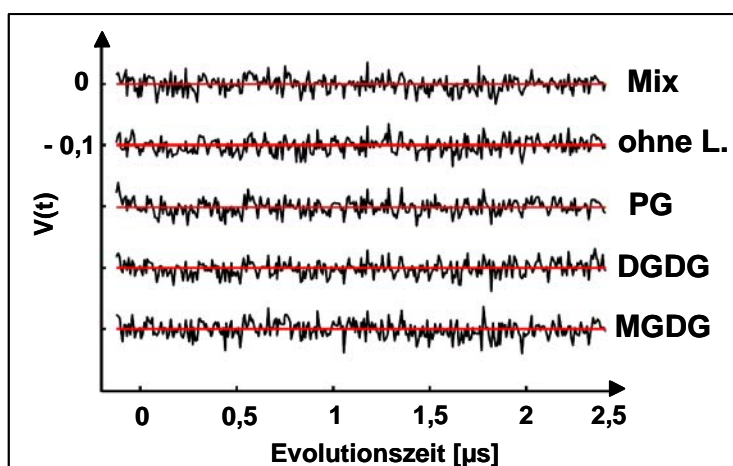


Abb. 79: Darstellung der berechneten Differenzspektren der Einzellipid - Komplexe der Mutante S106C,S160Ch: Die Spektren der Komplexe mit MGDG, DGDG, PG, künstlicher Lipidmischung (Mix) und ‚ohne Lipid‘ wurden über ein entsprechendes Differenzspektrum einer Rekonstitution mit lipidhaltigem Totalpigmentextrakt der gleichen Mutante gedruckt.

Anhand der Differenzspektren zeigt sich bereits, dass sich die hier untersuchten Einzellipid - Komplexe der Mutante S106,S160Ch nicht in ihrer Konformation unterscheiden. Für alle untersuchten Komplexe gelten die Abstandsinformationen, wie sie bereits für unter Standardbedingungen hergestellte LHCII - Komplexe der Mutante angegeben wurden.

Auf die vergleichende Darstellung der Abstandsverteilungen kann somit an dieser Stelle verzichtet werden.

Abschließend kann hier für beide Mutanten S3C,S160Ch und S106C,S160Ch ausgesagt werden, dass sich durch die Änderung der Lipidzusammensetzung bei der Rekonstitution keinerlei Veränderungen bezüglich des Abstandsreichs zwischen den jeweils gemessenen Positionen ergibt. Das Konformationsensemble der vermessenen Komplexe der Mutante S3C,S160Ch wird durch die Zugabe von PG geringfügig verschoben, drastische Änderungen treten aber für keines der Lipide auf.

3.2.4.3 ESR - Messungen an trimerem LHCII

Mit Hilfe von ESR - Distanzmessungen von LHCII - Trimeren sollte untersucht werden, welche räumliche Position die N - Termini der drei Monomeruntereinheiten im Trimer zueinander einnehmen. Zusätzlich wurde überprüft, welchen Abstand die stromalen Schleifenregionen im Trimer zueinander aufweisen.

Für diese Untersuchungen wurden keine LHCII - Doppelmutanten verwendet, sondern Mutanten mit nur einem markierbaren Cystein, so dass pro Trimer drei TEMPO - Label im Komplex eingeführt wurden. Dadurch lässt sich das später erhaltene DEER - Spektrum eindeutig den drei Label - Positionen zuordnen. Nach Markierung des Apoproteins und Detergenzwechsel - Rekonstitution, gemäß Material und Methoden Abschnitt 2.3.4 folgte im Anschluss die Trimerisierung der rekonstituierten Monomere auf Ni - Sepharose - Säulen gemäß Material und Methoden 2.3.5. Um später genügend Trimere für die ESR - Messung zur Verfügung zu haben, wurde bei der Rekonstitution mit 6 mg Apoprotein (d.h. etwa 240 nmol Protein) begonnen. Im Anschluss wurde analog zu der Behandlung der Monomere eine Saccharose - Dichtegradientenzentrifugation und das Aufkonzentrieren der Komplexe mittels Centrikon YM-30 - Filtereinheiten (siehe Material und Methoden, Kapitell 2.7.3) durchgeführt. Dabei wurde auch hier versucht, eine LHCII - Endkonzentration von größer 200 μM zu erreichen, da auch diese Proben vor der eigentlichen ESR - Messung 1:1 mit 80% Glycerin verdünnt werden mussten. Die Beobachtungszeit während Vier -Puls - DEER - Experiments des betrug hier zwischen 1,5- und 3,5 μs .⁴⁹

Danach folgte eine Auswertung der erhaltenen DEER - Spektren mittels einer Hermit - Interpolation 1. Ordnung (S3Ch) bzw. 2.Ordnung (S160Ch), die sich auch hier als besonders sinnvolle Methode herausgestellt hatte.

3.2.4.3.1 Messung von LHCII - Trimeren der Mutante S3Ch

Mit dieser Mutante sollten die Abstände der N - Termini im LHCII - Trimer zueinander untersucht werden. Auch hier wurden mehrere Messungen mit unabhängig voneinander präparierten LHCII - Trimeren durchgeführt.

Zur Kontrolle wurden zudem LHCII - Monomere der Mutante per DEER vermessen. Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse beider Messungen, normiert auf die gleiche Signalstärke zur Beginn der Beobachtungszeit.

⁴⁹ Alle anderen Geräteeinstellungen und Versuchsparameter entsprachen denen bei der Untersuchung der LHCII - Monomere.

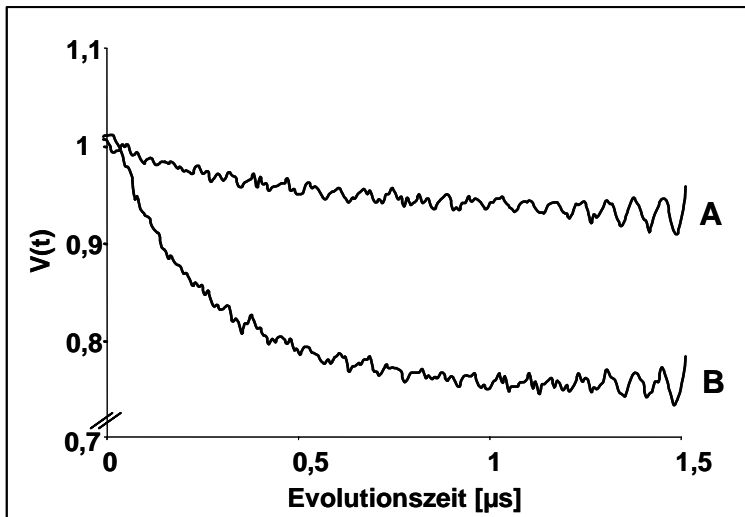


Abb. 80: DEER Spektren der Mutante S3Ch. Neben dem Spektrum für LHCII - Monomere (A) wurde ein weiteres Spektrum für Trimere der gleichen Mutante aufgetragen (B). Beide Spektren wurden zuvor auf die gleiche Signalstärke zu Beginn der Beobachtungszeit normiert.

Anhand der beiden DEER - Spektren kann man erkennen, dass Monomere und Trimere der Mutante S3Ch zu einem völlig unterschiedlichen Spektrum führen. Im Fall der Monomere ergab sich keine Abstandsinformation aus dem erhaltenen DEER - Spektrum. Da pro LHCII - Monomer nur ein TEMPO - Label eingeführt wurde, konnte bei dieser Kontrollmessung kein intramolekularer Abstand ermittelt werden. Abstände zwischen zwei benachbarten Monomeren wurden bei den hier benutzten Geräteeinstellungen nicht detektiert. Das erhaltene ESR - Signal stellt vielmehr nur einen uncharakteristischen langsamen exponentiellen Zerfall des Signals dar.

LHCII - Trimere der gleichen Mutante ergaben ein völlig unterschiedliches DEER - Spektrum, mit dem man eine klare Abstandsinformation ermitteln kann. Der Vergleich mit dem zuvor beschriebenen Spektrum für die Monomere lässt den Schluss zu, dass die aus dem Trimer - Spektrum erhaltenen Abstandsinformation von den eng benachbarten Monomer - Untereinheiten des S3Ch - Trimers herrühren.

Mit Hilfe dieses Experiments mit S3Ch - Trimeren wurde nachfolgend unter Verwendung der Hermit - Interpolation 1. Ordnung folgende Abstandsverteilung berechnet.

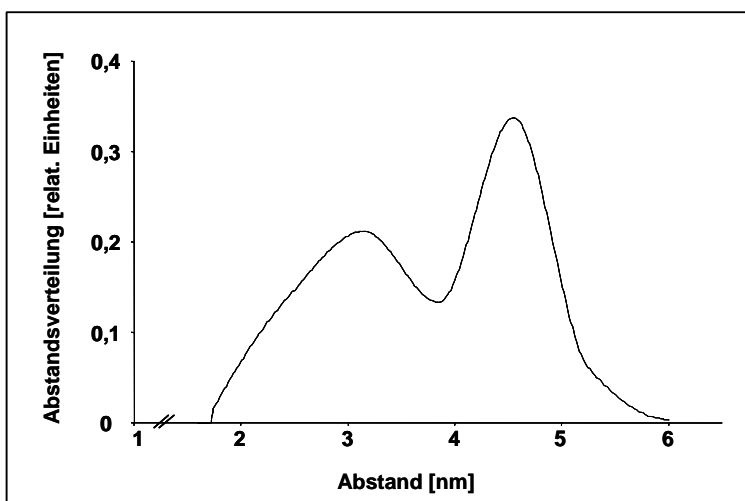


Abb. 81: Errechnete Abstandsverteilung für LHCII - Trimere der Mutante S3Ch.

Mit dieser Abstandsverteilung konnten folgende konkrete Abstandsinformationen für LHCII - Trimere der Mutante S3Ch bestimmt werden:

Mittlerer Abstand [nm]	3,78
Standardabweichung [nm]	0,92
Asymmetrie der Verteilung [nm ³]	-0,17
$\Gamma_{0,5}$ [nm]	1,53
$\Gamma_{0,9}$ [nm]	2,88

Tab. 35:
Abstandsinformationen aus der Analyse der Datensätze für Trimere der Mutante **S3Ch**. Die Auswertung erfolgte mittels Hermit - Interpolation 1. Ordnung.

Daraus ergibt sich folgende Intervallangabe für den Abstand zwischen den N - Termini benachbarter Monomer - Untereinheiten im LHCII Trimer: **2,9 nm bis 4,7 nm**.

3.2.4.3.2 Messung von LHCII - Trimeren der Mutante S160Ch

Neben der Mutante S3Ch wurden auch Trimere der Mutante S160Ch per ESR vermessen, bei der jeweils ein TEMPO - Label pro Monomer - Untereinheit an Position 160 der stromalen Schleife angebracht worden war. Wegen des langen Abstands der Positionen 160 im Trimer mussten bei diesen Messungen sehr lange Beobachtungszeiten von 2,5 bis 3,5 μ s gewählt werden. Dadurch verschlechtert sich das Signal - Rausch - Verhältnis, was die spätere Auswertung schwieriger gestaltet.

Zur Kontrolle wurden ebenfalls LHCII - Monomere der Mutante per ESR vermessen, die aber analog zu den einfach markierten LHCII - Monomeren der Mutante S3Ch zu keinem auswertbaren DEER - Signal führten. Wiederum konnte nur ein exponentieller Zerfall des Signals beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Für Trimere der gleichen Mutante ergab sich ein auswertbares Signal, welches somit charakteristisch die Abstände zwischen den Labeln zweier benachbarter Monomer - Untereinheiten widerspiegelt.

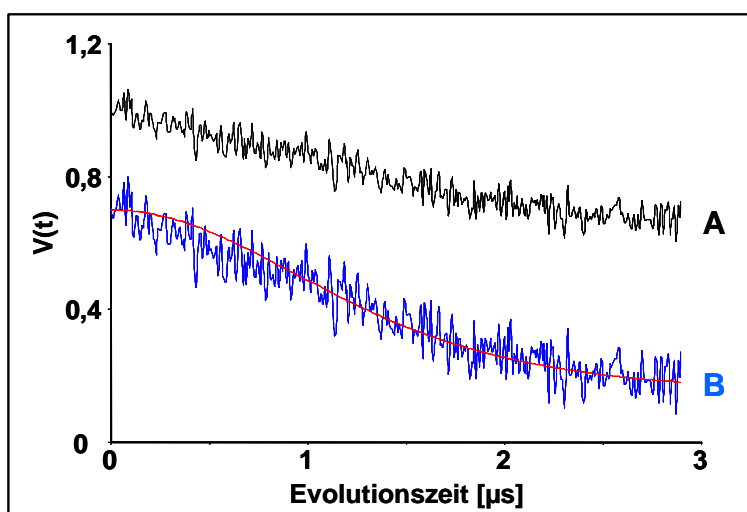


Abb. 82:
DEER Spektren von LHCII - Trimeren der Mutante S160Ch. Neben den nicht korrigierten Rohdaten (A) wurden die korrigierten Messdaten nach Abzug des unmodulierten Hintergrunds angegeben (B). Die rote Linie stellt Ergebnis einer Hermit - Interpolation 2. Ordnung dar.

Aufgrund der sehr langen Beobachtungszeit ist allerdings die Auswertung mittels Hermit - Interpolation (2. Ordnung) sehr schwierig, da sich das Signal - Rausch - Verhältnis bei zunehmender Beobachtungszeit verschlechtert und auch bei der maximal erreichbaren Beobachtungszeit für einen derart langen Abstand zudem die Hintergrundkorrektur des Signals nur noch unzureichend durchführbar ist. Diese Probe zeigt die Grenzen der ESR - Abstandsmesstechnik auf dem gegenwärtigen Stand der Technik auf. Somit ist die folgende berechnete Abstandsverteilung eher als Näherung zu betrachten und die daraus resultierenden Abstandsinformationen eher als Vorschlag anzusehen.

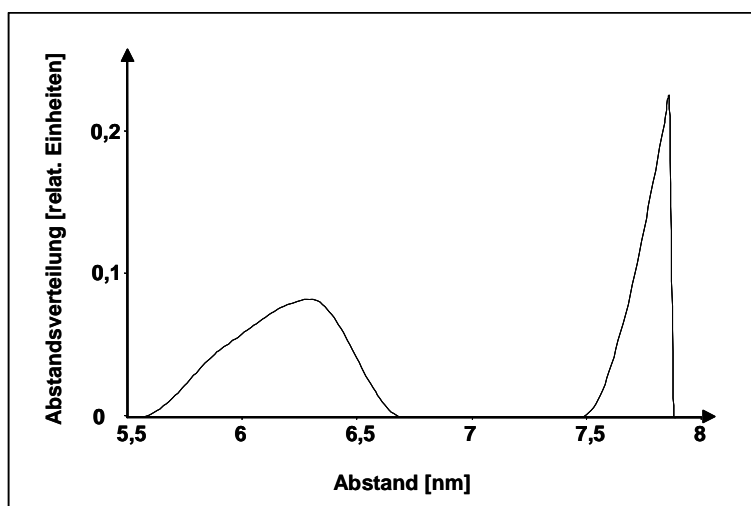


Abb. 83:
Errechnete Abstandsverteilung für LHCII - Trimere der Mutante S160Ch.

Anhand der Abbildung zeigt sich die Problematik. So ist zwar die abgebildete Verteilung zwischen 5,5 nm und ~6,7 nm probenspezifisch für die vermessenen LHCII - Trimere, der Signalanstieg ab 7,5 nm aber nicht. Dieser Anstieg resultiert aus der bereits oben erwähnten, nur noch schlecht durchführbaren Subtraktion des Hintergrunds bei sehr langen Abständen und durch die Spinrelaxation begrenzter Beobachtungszeit. Spinpaare innerhalb des gleichen Trimers und solche in benachbarten Trimeren sind deshalb für diese Mutante beim gegenwärtigen Stand der Technik nicht vollständig separierbar.

Unter Berücksichtigung des eben gesagten können folgende Abstandsinformationen aus der berechneten Abstandsverteilung extrahiert werden:

Mittlerer Abstand [nm]	6,02
Standardabweichung [nm]	0,02
Asymmetrie der Verteilung [nm ³]	-0,002
$\Gamma_{0,5}$ [nm]	0,24
$\Gamma_{0,9}$ [nm]	0,45

Tab. 36:
Abstandsinformationen aus der Analyse der Datensätze für Trimere der Mutante **S160Ch**. Die Auswertung erfolgte mittels Hermit - Interpolation 2. Ordnung.

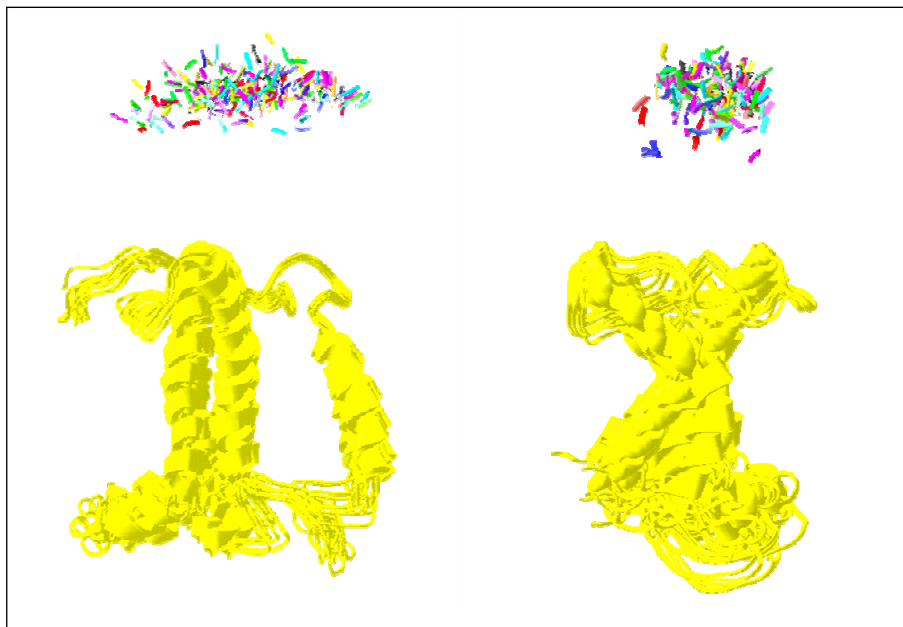
Daraus ergibt sich praktisch eine feste Angabe für den Abstand zwischen den Positionen 160 der stromalen Schleifen benachbarter Monomer - Untereinheiten im LHCII Trimer von **6 nm (bis 6,04 nm)**.

3.2.4.4 Modellierung der N - terminalen Region des LHCII

Zur weiteren Klärung der sich aus der Untersuchung der unter Standardbedingungen rekonstituierten LHCII - Monomere ergebenden Vermutungen bezüglich mehrerer aminoterminaler Konformationen wurde im Anschluss an die am MPI für Polymerforschung durchgeführten ESR - Distanzmessungen eine Modellierung des LHCII - Moleküls inklusive des Aminoterminus mit der Software *Modeller* in Zusammenarbeit mit Thorsten Schweikardt (Institut für Molekulare Biophysik der Universität Mainz) vorgenommen (vgl. Material und Methoden Abschnitt 2.7.5).

Dazu wurde das zu diesem Zeitpunkt zur Verfügung stehende Modell des LHCII - Monomers nach Kühlbrandt *et al.* (1994), das nur bis zur Aminosäureposition 26 aufgelöst ist (siehe Einleitung) als so genanntes Templat verwendet und mit Hilfe des Programms unter Berücksichtigung aller neu ermittelten Abstandsinformationen zwischen den adressierten Aminosäuren neu bis zur Position 3 des N - Terminus berechnet.^{50,51} Die mit Hilfe der Mutante S3C,S106C ermittelte Abstandsinformation wurde aufgrund ihrer Unsicherheit nicht für diese Neu - Modellierung verwendet.

Zunächst wurden 1000 unterschiedliche Modelle berechnet, die alle experimentell ermittelten Abstandsintervalle der Monomere erfüllten. Danach wurde mit Hilfe der Software DeepView aus jeweils drei gleichen Kopien dieser neuen Monomer - Modelle ein Trimer konstruiert und anschließend der Abstand zwischen den aminoterminalen Positionen 3 der einzelnen Monomer - Unter-einheiten dieses Trimers ermittelt. Mit Hilfe dieser Information konnten im Folgenden alle diejenigen Modelle herausselektiert werden, bei denen diese Distanzinformation mit dem für die S3Ch - Trimere per ESR - Messungen bestimmten Intervall von 2,9 bis 4,7 nm übereinstimmte. Auf diese Weise konnten 250 Modelle aus den ursprünglich 1000 ausgewählt werden.



⁵⁰ Spätere ähnliche Experimente mit der neueren LHCII - Struktur nach Liu *et al.* 2004 ergaben keine Veränderungen bzgl. der Modellierungen.

⁵¹ Das Programm *Modeller* variierte dabei die Gestalt der Proteinstruktur des vorgegebenen Kühlbrandt - Modelles (Templat) so lange, bis auch alle angegebenen Abstandsintervalle der Distanzmessungen (Restraints) im Modell erfüllt waren.

Abb. 84: Ergebnis der (**ersten**) durchgeführten Modellierung der N - terminalen Region des LHCII mit dem Programm *Modeller*. Es wurden alle in Abbildung 66 angegebenen Abstandsintervalle für die LHCII - Monomere bis auf dasjenige für die Doppelmutante S3C,S106C verrechnet. Danach wurden, nach Konstruktion eines Trimeres mit drei identischen Kopien je eines neu berechneten Modelles, gefolgt von der Bestimmung der Abstände der aminoterminalen Positionen 3 zueinander, mittels des für die S3Ch - Trimere ermittelten Abstandsintervalls, nur Modelle selektiert, die auch dieses Abstandskriterium erfüllten. Die Abbildung zeigt zwei Überlagerungen von jeweils 250 LHCII - Modellen dieser Selektion. Neben dem bekannten Strukturmodell von Kühlbrandt bis zur Aminosäure 26 (gelb) wurden alle ermittelten Aufenthaltsorte für die Position 3 des N-Terminus als eine Punktwolke (farbig) angegeben. **Links:** Blick von Vorne auf alle drei Helices; **Rechts:** Blick über die Helix C in Richtung des Helixkreuzes.

Eine erneute statistische Auswertung ergab, dass bei diesen 250 selektierten Modellen nie der gesamte Bereich der zuvor für die Monomere angegebenen Abstandsintervalle verwirklicht worden war. Das Programm *Modeller* schöpfte aufgrund der Kombination der Vielzahl an vorgegebenen Abstandsinformationen im Sinne einer Triangulation meist nur einen geringen Anteil der vorgegebenen Distanzintervalle aus.

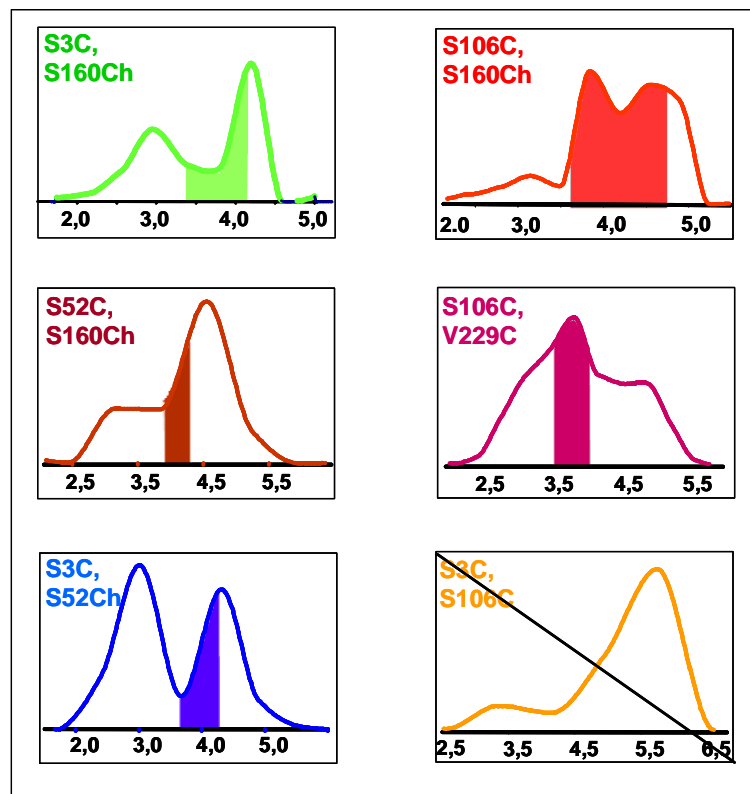


Abb. 85: Ergebnis der (**ersten**) durchgeführten Modellierung der N - terminalen Region des LHCII mit dem Programm *Modeller*. Es wurden alle zur Berechnung der neuen Strukturen verwendeten Abstandsverteilungen nebeneinander aufgetragen. Die farbigen Regionen innerhalb der Graphen repräsentieren dabei die von Modeller benutzten Intervallbereiche, die sich nach der statistischen Auswertung für die 250 Modelle ergaben. (Die mit Hilfe der Mutante S3C,S106C ermittelte Distanz von 3 nach 106 wurde für die Neu - Modellierung aufgrund ihres schlechten Bestimmtheitsgrades nicht verwendet. Die Angabe des Graphen erfolgt hier nur aus Gründen der Vollständigkeit.)

Zum Vergleich der vor der Modellierung angegebenen Distanzintervalle mit den von *Modeller* bei der Berechnung der neuen LHCII - Strukturen tatsächlich ausgeschöpften Intervallbereichen soll eine Tabelle angegeben werden:

LHCII - Mutante	Bei der Modellierung angegebene Abstandsintervall [nm]	Nach der Modellierung ermitteltes Abstandsintervall (nm)
S3C,S160Ch	2,9-4,2	3,3 - 4,2
S52C,S160Ch	3,5-4,7	3,9 - 4,2
S3C,S52Ch	2,7-4,2	3,7 - 4,2
S106C,S160Ch	3,5-4,8	3,9 - 4,8
S106C,V229C	3,2-4,7	3,7 - 4,0

Tab. 37: Vergleich der in *Modeller* für die (erste) Modellierung angegebenen Abstandsintervalle mit denen nach der Modellierung statistisch ermittelten Intervallbereichen für die 250 dargestellten Modelle.

Die durchgeführte Modellierung des LHCII zeigt, dass es mit Hilfe der durch die verschiedenen ESR - Distanzmessungen an LHCII - Monomeren bestimmten Abstandsinformationen möglich ist, die aminoterminalen Position 3 und somit den gesamten N - Terminus des LHCII - Monomers selbst im Sinne einer Punktwolke räumlich anzugeben. Es kann so ein neues dreidimensionales Modell des LHCII - Monomers berechnet werden, bei dem sich zeigt, dass der N - Terminus mit einer hohen Aufenthaltswahrscheinlichkeit in einer weit entfernten Ebene oberhalb des Helixkreuzes angeordnet ist. Diese Anordnung gilt auch im LHCII - Trimer, dessen Abstandsintervall nach der Modellierung zur Selektion herangezogen wurde. Eine noch präzisere Angabe des N - Terminus ist zur Zeit aufgrund der Datenlage nicht möglich. Dies scheint vor allem durch die konformative Dynamik dieser Region nicht möglich zu sein. Des Weiteren ist eine Angabe der N - terminalen Schleifenregion zwischen Position 3 und 26 noch nicht sinnvoll, da diese von *Modeller* aufgrund der fehlenden konkreten Daten rein nach statistischen Überlegungen berechnet würde und somit nur wenig reale Aussagekraft besitzen würde.⁵²

Neben dieser recht gut eingegrenzten räumlichen Anordnung des N - Terminus fällt zudem anhand der statistischen Auswertung der selektierten Modelle auf, dass in Bezug auf die ermittelten Abstandsinformationen in Zusammenhang mit den Positionen 3, 52 und 160 aller Mutanten im später konstruierten LHCII - Trimer offensichtlich nur Teilbereiche der bei der Modellierung angegebenen Intervalle für diese Positionen möglich zu sein scheinen (vgl. der farbige unterlegte Bereiche in den diversen Abstandsverteilungen in der Graphik). Selbst unter Berücksichtigung der konformativen Freiheit der beiden TEMPO - Label, die ebenfalls zu einer gewissen Verbreiterung der Abstandsverteilung geführt

⁵² Wie bereits erwähnt, wurde die Abstandsinformation der Mutante S3C,S106C nicht zur Modellierung verwendet. Misst man im Anschluss an die Berechnung der Strukturen dennoch den erhaltenen Abstand zwischen den Positionen 3 und 106 aller Modelle aus, erhält man Werte zwischen 6,5 - und 8 nm. Dieses Intervall liegt außerhalb des für diese Mutante angegebenen Intervalls von 4,8 bis 6 nm. Da aber, wie bereits erläutert, dieses Distanzintervall eher als Vorschlag für den tatsächlichen Abstand zwischen den beiden Positionen anzusehen ist, wurde dieser Diskrepanz keine weitere Beachtung geschenkt. Spätere Berechnungen am MPI zeigten zudem, dass es anhand einer verbesserten Rauschkorrektur des erhaltenen DEER - Spektrums möglich ist, auch Abstandswerte für diese Positionen über 6 nm zu erhalten, die mit den mittels des Programms *Modeller* gefundenen Werten gut übereinstimmen.

haben kann, verstärkt diese Beobachtung die bereits vor der Modellierung geäußerten Vermutung einer bimodalen Verteilung für die N - terminale Konformation im LHCII. Es scheint eine aminoterminalen Vorzugskonformation zu geben, die auch im LHCII - Trimer existiert. Diese ist in Abbildung 84 zu sehen. Zusätzlich könnte es dann einen zweiten konformativen Zustand des Aminoterminus des LHCII geben, der offensichtlich nur im Monomer existent ist und dessen Modelle das bei der Modellierung benutzte Auswahlkriterium des S3Ch Trimerabstandes nicht erfüllen. Würde ein solcher zweiter Zustand nicht existieren, wären die per DEER - Messung gefundenen Verteilungsmuster insbesondere für die Doppelmutanten S3C,S160Ch und S3C,S52Ch kaum erklärbar.

Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde eine weitere Modellierung mit *Modeller* vorgenommen. Es wurden 500 neue LHCII - Modelle berechnet, bei denen ganz bewusst die Intervalle, die sich aus den DEER - Messungen mit den Mutanten S3C,S160Ch, S52C,S160Ch und S3C,S52Ch ergaben, stark eingeschränkt wurden. Dabei wurden nur solche Intervallbereiche verwendet, die in den 250 ersten Modellen, die das Trimer - Kriterium erfüllten, nicht in den selektierten Modellen realisiert wurden. Graphisch bedeutet das, dass bei dieser zweiten Modellierungsrunde nun der Intervallbereich um das jeweils erste Maximum der gemittelten Abstandsverteilungen Anwendung fand. Dieses Teilintervall wurde in der vorherigen Modellierungsrunde bei keinem der erhaltenen Modelle realisiert, weil es mit dem Abstand zwischen den Labeln der Position 3 im Trimer unvereinbar zu sein scheint. Für die Mutanten S106C,S160Ch und S106C,V229C wurden wieder die gleichen Intervallangaben wie bei der ersten Modellierung angegeben. Die folgende Grafik zeigt 250 der so erzeugten LHCII - Modelle.

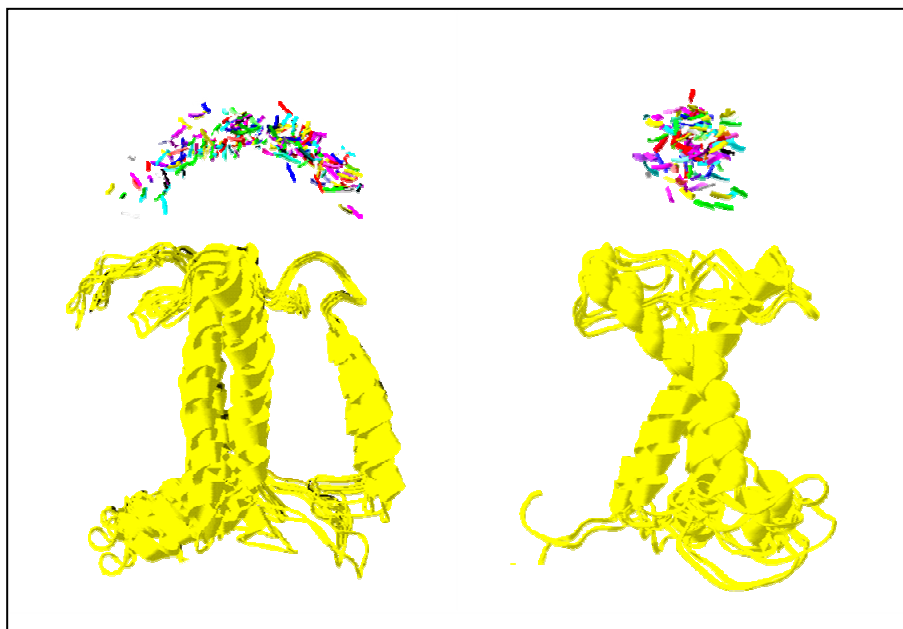


Abb. 86: Ergebnis der **zweiten** Modellierung der N - terminalen Region des LHCII unter Verwendung der im Text angegebenen neuen Abstandsintervalle. Es wurden wiederum zwei Überlagerungen von 250 neu kalkulierten Modellen angegeben, bei dem die N- terminale Aminosäure 3 aller Modelle als eine Art Punktwolke farbig gezeigt wird. Keines dieser Modelle erfüllt das Abstandsintervall, das für die S3Ch - Trimere ermittelt wurde! **Links:** Blick von vorne auf alle drei Helices; **Rechts:** Blick über die Helix C in Richtung des Helixkreuzes.

Im Anschluss an die Modellierung folgte auch hier eine statistische Auswertung der erhaltenen LHCII - Modelle.

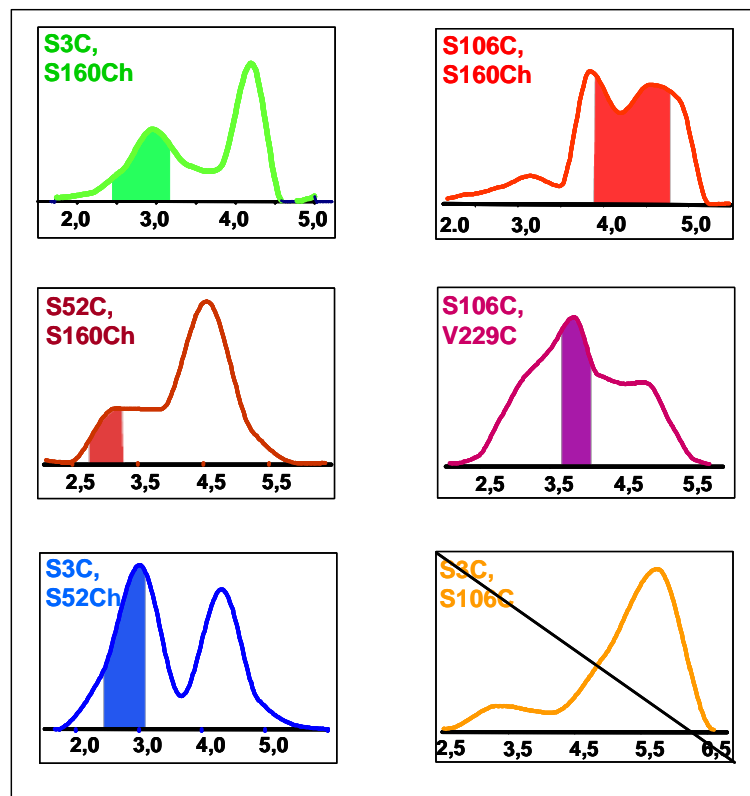


Abb. 87: Ergebnis der statistischen Auswertung der (**zweiten**) durchgeführten Modellierung der aminoterminalen Region des LHCII mit dem Programm *Modeller*. Bei der Berechnung der neuen Strukturen wurden dabei nur diejenigen Intervallbereiche der ermittelten Abstandsverteilungen angegeben, die bei der ersten Modellierungsrunde nicht in den Modellen realisiert wurden. Die farbigen Regionen innerhalb der Graphen repräsentieren dabei die von *Modeller* verwendeten Intervallbereiche, die sich nach der statistischen Auswertung für die 250 Modelle ergaben. (Die mit Hilfe der Mutante S3C,S106C ermittelte Distanz von 3 nach 106 wurde für die Neu - Modellierung aufgrund ihres schlechten Bestimmtheitsgrades nicht verwendet. Die Angabe des Graphen erfolgt hier nur aus Gründen der Vollständigkeit.)

Nach einer erneuten Konstruktion von Trimerstrukturen mit DeepView mit jeweils drei gleichen Kopien einer dieser neu erzeugten Strukturen zeigte sich, dass keines dieser Modelle der zweiten Modellierung das Intervallkriterium des LHCII - Trimers der Mutante S3Ch erfüllt. Des Weiteren wiesen die erzeugten Modelle wiederum eine Diskrepanz zwischen den vor der Berechnung in *Modeller* vorgegebenen Abständen und den in den Modellen verwirklichten Distanzen auf. Dies kann erneut durch die Angabe einer Tabelle verdeutlicht werden:

LHCII - Mutante	Bei der Modellierung angegebenes Abstandsintervall [nm]	Nach der Modellierung ermitteltes Abstandsintervall (nm)
S3C,S160Ch	2,4 - 3,2	2,4 - 3,1
S52C,S160Ch	2,8 - 4,1	2,8 - 3,2
S3C,S52Ch	2,4 - 3,1	2,5 - 3,1
S106C,S160Ch	3,5 - 4,8	3,7 - 4,7
S106C,V229C	3,2 - 4,7	3,6 - 4,1

Tab. 38: Vergleich der bei der **zweiten** Modellierung in *Modeller* angegebenen Abstandsintervalle mit den später real ermittelten Distanzintervallen für die 250 dargestellten Modelle.

Anhand der Tabelle zeigt sich, dass bei dieser zweiten Modellierung offensichtlich die Bereiche in den Abstandsverteilungen realisiert wurden, die bei der ersten Neuberechnung keine Verwendung fanden. Da diese Modelle sich nicht mit dem Trimerkriterium decken, kann daraus gefolgert werden, dass es sich hier um eine weitere mögliche Konformationen des LHCII handelt, die offensichtlich nur in Form des Monomers existent ist.⁵³

Ein Vergleich der Überlagerung der 250 während der zweiten Modellierung berechneten Strukturen mit denen der ersten Modellierung zeigt, dass es sich dabei um ermittelte Konformere handelt, bei denen sich der N - Terminus im Vergleich zur ersten Konformation im Trimer in einem engen Bogen oberhalb des Helixkreuz bewegt. Misst man den Abstand zwischen der daraus angedachten Ebene des N - Terminus in Bezug auf die Membranebene aus, so sieht man, dass bei allen Modellen der Abstand des N - Terminus zur Membran wesentlich geringer ist, als bei den in der ersten Modellierung erzeugten Strukturen.

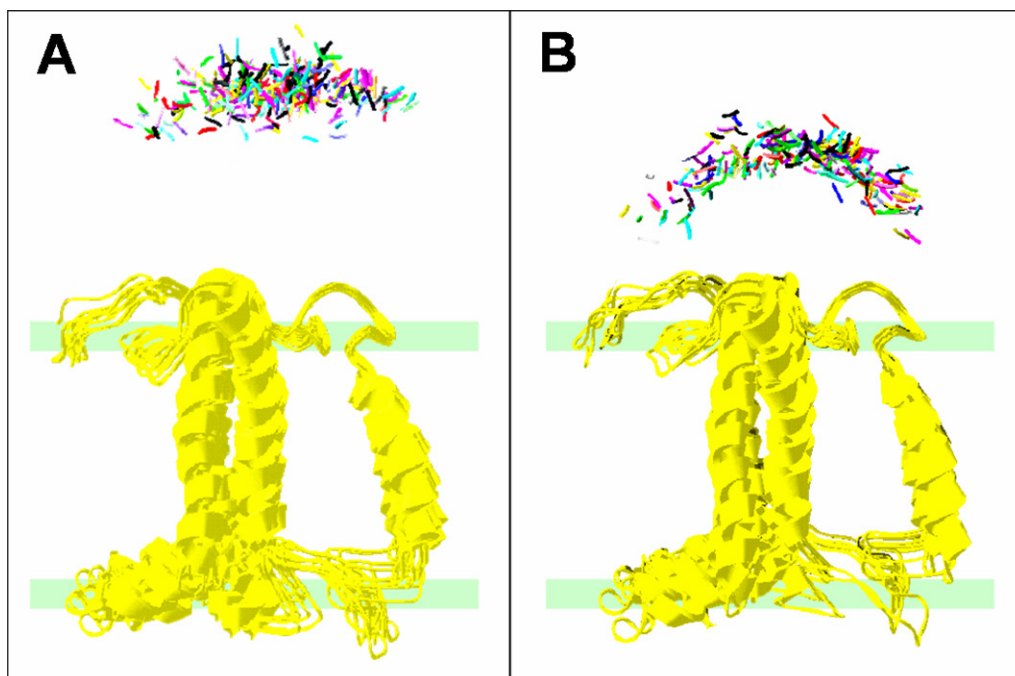


Abb. 88: Vergleich der beiden modellierten Strukturen für das LHCII - Monomer unter Angabe der Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Aminosäure 3 des N - Terminus in Form einer Punktwolke. Es wurden 250 Modelle übereinander gelegt. **A:** Ergebnis der ersten Modellierung. Alle erzeugten Modelle stimmen auch mit dem Abstandsintervall, das für S3Ch - Trimere bestimmt wurde, überein. **B:** Strukturen der zweiten Modellierungsrunde. Diese Modelle erfüllen nicht das ermittelte Abstandsintervall der S3Ch Trimere, existieren somit wahrscheinlich nur als Monomere. Der Vergleich beider Abbildungen zeigt die unterschiedliche Anordnung des N - Terminus in einer höheren bzw. niedrigeren Ebene im Vergleich zur eingetragenen Thylakoidmembran.

⁵³ Auch hier wurde das Distanzkriterium für den Abstand zwischen Position 3 und 106, wie bereits beschrieben, nicht angewendet. Misst man wiederum im Anschluss an die Berechnung der Strukturen dennoch den erhaltenen Abstand zwischen den Positionen 3 und 106 aller Modelle aus, erhält man Werte zwischen 5,6- und 7,3 nm. Dieses Intervall liegt ebenso außerhalb des für diese Mutante angegebenen Intervalls von 4,8 bis 6 nm. Auch hier gilt das Gleiche, wie bereits bei der ersten Modellierung beschrieben: Da dieses Distanzintervall eher als Vorschlag für den tatsächlichen Abstand zwischen den beiden Positionen anzusehen ist, wurde dieser Diskrepanz keine weitere Beachtung geschenkt.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der vergleichenden Bindungsstudie für das Lipid Phosphatidylglyzerin an rekombinantem LHCII

Als ein erstes Ziel dieser Arbeit sollte die Bindung des Lipides Phosphatidylglyzerin an rekombinantem LHCII im Vergleich von Wildtyp- und Trimerisierungsmotiv - Mutanten untersucht werden. Wie bereits an früherer Stelle eingehend beschrieben, ist die Bindung dieses Lipids für die Fähigkeit des LHCII zur Oligomerisierung verantwortlich (vgl. Trémolières 1991; Flachmann und Kühlbrandt 1996; Krupa *et al.* 1992). In dieser Arbeit sollte nun endgültig geklärt werden, ob es sich bei dem von Hobe *et al.* 1995 beschriebenen Trimerisierungsmotiv auch um die entscheidende Interaktions- (Binde-) stelle für das Lipid PG handelt. Des Weiteren sollte versucht werden, eine genaue PG zu Protein - Stöchiometrie für den LHCII - Wildtyp und die in diesem Zusammenhang verwendeten Trimerisierungsmotiv - Mutanten zu bestimmen.⁵⁴

Während der Untersuchung dieser Fragestellungen wurden im Rahmen dieser Dissertation mehrere verschiedene biochemische Analysemethoden verwendet, deren Durchführung und Ergebnisse im nachfolgenden Text vergleichend diskutiert werden sollen.

4.1.1 Vergleichender Phospholipidnachweis mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

4.1.1.1 Bemerkungen zu den durchgeführten Vorversuchen

Zu Beginn der eigentlichen vergleichenden Experimente mittels Dünnschichtchromatographie wurden mehrere Vorversuche durchgeführt. Dabei zeigte sich unter anderem, dass die Angaben von Nußberger *et al.* 1993 zu bestätigen sind, die darauf verwiesen, dass nach Inkubation mit Detergenzien lediglich das Phospholipid PG an den LHCII - Komplexen verbleibt. Bereits nach drei bis vier Säulenvolumina an OG - haltigem Waschpuffer enthielten keine der zuvor an Ni - Sepharose - Säulen immobilisierten LHCII - Komplexe andere Lipide mehr, außer dem komplexgebundenem PG. Zudem konnte frei assoziiertes, also nicht komplexgebundenes PG ebenfalls entfernt werden (vgl. Ergebnisse Abschnitt 3.1.3.3), wie anhand eingehender Analysen mittels Dünnschichtchromatographie gezeigt werden konnte.

An dieser Stelle zeigten sich bereits die ersten Probleme mit der Methode, da der Lipid - Nachweis mit Hilfe dieser Chromatographie eine recht hohe Probengüte voraussetzt.

⁵⁴ Diese genaue PG zu Proteinstöchiometrie war zum Zeitpunkt der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche noch nicht bekannt. In der 2004 (kurz vor der Fertigstellung dieser Dissertation) veröffentlichten Arbeit von Liu *et al.* wird mittlerweile ein exakter Wert von einem PG pro Monomer angegeben. Dieser Wert gilt allerdings streng genommen lediglich für kristallisierte LHCII - Komplexe (aus Spinat) und könnte sich bei Komplexen in Lösung (aus Erbse) anders gestalten, so dass die hier behandelte Fragestellung weiterhin Bestand hat.

Bei der Lipidextraktion mitextrahierte Detergenzien, aber auch die miteluierten komplexgebundenen Pigmente des LHCII störten mit steigender Probenkonzentration den Nachweis des PG (vgl. Ergebnisse Abb. 25 bzw. 29).

Der zunächst durchgeführte Lösungsansatz für dieses Problem mittels Bio-Rad Bio-Beads SM-2 muss hier als nicht erfolgreich eingestuft werden. Es konnte zwar ein Großteil aller Detergenzien des Ansatzes, also vor allem OG und LM entfernt werden, die komplexgebundenen Pigmente störten aber weiterhin den späteren Nachweis des PG auf der Dünnschicht. Somit ergibt sich durch den Einsatz der Beads zwar ein wichtiges Werkzeug, wenn es im Rahmen anderer Versuche darum geht, möglichst erfolgreich Detergenzien aus dem Versuchsansatz zu entfernen, für das hier vorliegende Problem sind Bio - Beads aber offensichtlich ungeeignet (vgl. Ergebnisse, Abb. 29).

Auch der Versuch, mittels eines verstärkenden DPH -Farbstoffes den Nachweis des PG auf der Dünnschicht *per se* zu verbessern, führten in diesem Zusammenhang nicht zum Erfolg (vgl. Ausführungen Abschnitt 3.1.3.5 der Ergebnisse). Hier muss allerdings angemerkt werden, dass die Anregungswellenlänge des benutzten Versa Doc - Systems mit 302 nm nicht die maximal mögliche Anregung für den Farbstoff (Excitationsmaximum bei 370 nm) ermöglichte, so dass eventuell bessere Erfolge mit dem Agens hätten erzielt werden können, wenn eine andere UV - Lampe eingesetzt worden wäre. Dies müsste aber in Zukunft durch weitere Experimente abgeklärt werden.

Als Ausweg aus der vorliegenden Schwierigkeit, gleichzeitig alle Detergenzien aber auch die Pigmente aus den komplexenthaltenden Fraktionen der Ni - Sepharose - Säule zu entfernen, wurde schließlich eine Aufreinigung per Kieselsäure - Säule gemäß Rouser *et al.* 1967 durchgeführt (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.6.5). Dieser Reinigungsschritt schien in der Folge eine einfache Lösung für das stets wieder auftretende Problem der Detergenz- und Pigment - „Verunreinigungen“ der Proben zu sein. Langjährige Erfahrungen anderer Lipidforscher der Arbeitsgruppe bestätigten diesen Eindruck. Später zeigte sich, dass dieser Schritt als äußerst sensibel einzustufen ist. Geringfügige Veränderungen in der Güte der eingesetzten Lösemittel verändern das Elutionsverhalten der Säule nachhaltig (vgl. Abb. 37 in Abschnitt 3.1.3.8). Da dies nicht von Anfang an bekannt war, wurde auf die Güte (Wassergehalt) der verwendeten Lösemittel, vor allem des in großen Mengen eingesetzten Acetons nicht geachtet, was die beobachteten starken Streuungen der erzielten Ergebnisse erklären kann.

4.1.1.2 Die Färbung von Dünnschichtchromatogrammen mit Molybdän

Auch das Anfärben von Chromatogrammen mit Dittmer - Lester Agens (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 2.6.6) stellt einen sehr sensiblen Präparationsschritt bei der Analyse der PG - Konzentration mittels Dünnschichtchromatographie dar. Es erwies sich als problematisch, dass beim Besprühen der Dünnschichten äußerst akkurat darauf zu achten war, dass die gesamte Dünnschicht gleichmäßig mit dem Agens in Berührung kam. Ansonsten entstanden während des Trocknungsprozesses äußerst starke Färbungsunterschiede, die bei der anschließenden densitometrischen Auswertung zu Problemen führten.

So wurden etwa alle in Abbildung 35, Seite 92 gezeigten Chromatogramme nach der gleichen Methode mit Molybdän besprüht. Dennoch traten unterschiedliche Hintergrundfärbungen der einzelnen Dünnschichten auf. Trotz der verhältnismäßig hohen Korrelationskoeffizienten der jeweils mit aufgetragenen DPPG - Eichreihen von größer 0,9 muss davon ausgegangen werden, dass es dadurch bei der Auswertung der zu untersuchenden Proben zu deutlichen Über- bzw. Unterbewertungen der PG - Spots gekommen ist. Zumindest waren die rein visuell zu erkennenden PG - Mengen auf der Dünnschicht oft nur schlecht mit den mittels Software ermittelten PG - Mengen in Einklang zu bringen. Es schien nicht vollständig geklärt, ob die verwendete Analysesoftware in der Lage war, diese unterschiedliche Hintergrundfärbung bei der Berechnung der Werte für die eigentlich zu analysierenden Proben richtig zu bewerten und in die Analyse der unbekanntenen Proben mit einzubeziehen.

Der Wechsel von der „Spray - Methode“ zum Auftrag des Dittmer - Lester - Agens hin zu einer „Tauchmethode“ beseitigt an späterer Stelle diese Probleme. Da gleichzeitig auch der Einsatz eines Autospotters eingeführt wurde, konnte zudem auch das zweite, bereits im Ergebnisteil beschriebene Problem der stark divergierenden Spotform bzw. Spotgröße der PG - Flecken beseitigt werden, welches ebenfalls die densitometrische Auswertung beeinflusste.

4.1.1.3 Gerätespezifische Aspekte der densitometrischen Auswertung

Vor der eigentlichen Auswertung der Chromatogramme musste stets eine Digitalisierung der Dünnschicht vorgenommen werden. Dazu wurde im Fall der zunächst durchgeführten Auswertung mit der Raytest - Software AIDA eine Aufnahme des Chromatogramms mit Hilfe eines Flachbett - Scanners (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.6.7) im 24 Bit - Farbmodus vorgenommen. Obwohl alle von der Scanner - Software vorgeschlagenen Korrekturmöglichkeiten ausgeschaltet wurden, bleibt festzustellen, dass mit Hilfe des Flachbett - Scanners mit seiner $42 \mu\text{m} \times 21 \mu\text{m}$ Pixelgröße⁵⁵ keine gleich hohe Güte der Digitalisierung erhalten werden konnte, wie auch mit der später verwendeten hochauflösenden digitalen CCD - Kamera der Bio-Rad Versa Doc - Anlage mit einer Pixelgröße von $9 \mu\text{m} \times 9 \mu\text{m}$. Hieraus ergibt sich ein weiterer systematischer Fehler der anfänglich durchgeführten Auswertungen mit der Software AIDA, der im Rahmen dieser Diskussion genannt werden sollte. Durch die größeren Einzelpixel der Scannerbilder (im Zusammenhang mit der Fotografie würde man hier vergleichend von der „Korngröße“ des Fotopapiers sprechen) ergibt sich eine Art „Unschärfe“ der zu analysierenden Chromatogramme. Feine Abstufungen der Randbereiche der PG - Spots können dadurch nicht aufgelöst werden und bleiben unberücksichtigt. Zu wie viel Prozent sich dieser Fehler auf die erzielten Ergebnisse niederschlägt, kann nicht näher bestimmt werden. Dennoch muss er an dieser Stelle angeführt werden.⁵⁶

⁵⁵ Das entspricht der vom Hersteller angegebenen (optischen) Auflösung von 600 x 1200 dpi des Gerätes.

⁵⁶ Ein ähnlicher Zusammenhang ergibt sich auch im Hinblick auf die Verwendung einer Digitalkamera! So hat eine Kamera mit 3 Millionen Pixel Auflösung (natürlich je nach Größe des CCD - Chips) etwa eine reale optische Auflösung mit einer Pixelgröße von ca. $20 \mu\text{m} \times 36 \mu\text{m}$ und ist somit eher mit der Auflösung des oben genannten Flachbettscanners vergleichbar als mit der einer speziellen CCD - Kamera.

4.1.1.4 Die Ergebnisse der beiden vergleichenden Analysen mittels Dünnschichtchromatographie

Mit Hilfe der in den vorigen Kapiteln gemachten Angaben betreffend möglicher systematischer Fehler soll im Folgenden eine Bewertung der hier durchgeführten Experimente erfolgen.

Wie bereits beschrieben, wurden zunächst mehrere Versuche durchgeführt, bei denen die resultierenden Dünnschichtchromatogramme „von Hand“ aufgetragen, mit Farbstoff - Agens besprüht, mit einem Flachbett - Scanner digitalisiert und anschließend mit der AIDA - Software der Firma Raytest ausgewertet wurden (siehe auch Ergebnisteil Abschnitt 3.1.3.7).

Diesen Versuchen können an dieser Stelle alle späteren Experimente gegenübergestellt werden, bei denen die meisten der in den vorigen beiden Kapiteln beschriebenen Quellen für systematische Fehler behoben wurden und die im Ergebnisteil dieser Arbeit im Zusammenhang mit der Auswertung mittels Bio-Rad Versa Doc - Apparatur genannt wurden (Abschnitt 3.1.3.8).

Zum Vergleich der erzielten Ergebnisse zunächst eine Abbildung mit den Resultaten beider Methoden:

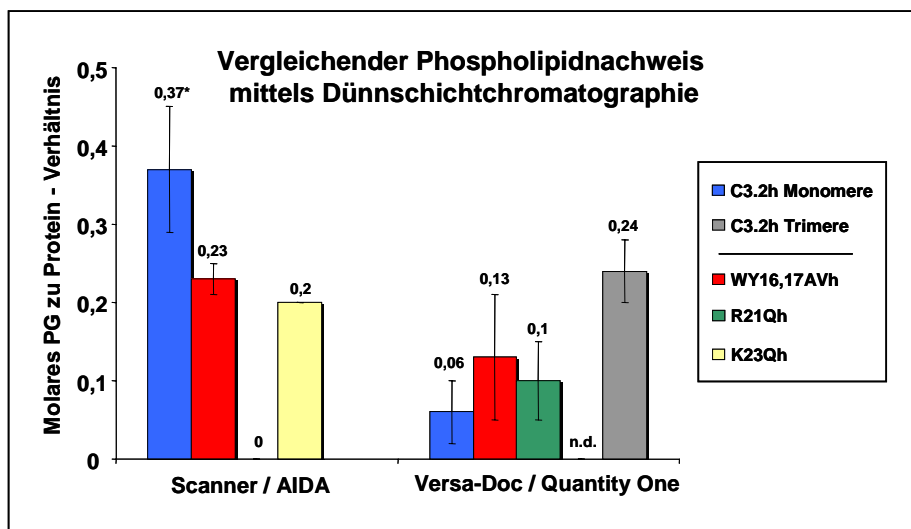


Abb. 89: Ergebnisse der beiden vergleichenden Phospholipid - Analysen für verschiedene LHCII - Komplexe im Anschluss an die Dünnschichtchromatographie. Links sind die Ergebnisse der AIDA - Messreihe zu sehen, rechts die Analyseergebnisse der Reihe mit der Versa Doc - Apparatur. Für Komplexe der Mutante R21Qh wurde während der AIDA - Messreihe kein PG detektiert, so dass sich hier der Wert Null ergibt. Dieses Ergebnis konnte mehrfach reproduziert werden. Bei der Angabe für Trimere der Mutante C3.2h wurde das molare Verhältnis von PG zu Protein der einzelnen Monomer - Untereinheiten angegeben. (n.d. = nicht durchgeführt; * = Wert gilt für LHCII - Monomeren mit einem geringen Trimer - Anteil [10%])

Die zweite Messreihe mit der Bio-Rad Versa Doc - Apparatur sollte ursprünglich nur zum Zwecke der Präzisierung und Reproduktion der zunächst als „unscharf und unpräzise“ erscheinenden Ergebnisse der AIDA - Auswertungen (siehe vorherige Kapitel) durchgeführt werden. Umso sonderbarer erschienen die starken Abweichungen der Ergebnisse im Vergleich zur ersten Versuchsreihe, wie sie in obiger Darstellung zu erkennen sind. Der Trend in der PG - Bindung der verschiedenen LHCII - Mutanten im Vergleich zum Wildtyp konnte, wie ersichtlich wird, nicht bestätigt werden. Gerade die Werte für C3.2h (Wildtyp) -

Monomere und die Mutante R21Qh differieren sehr stark.⁵⁷ So konnte für den Klon R21Qh zunächst kein PG detektiert werden (AIDA - Messreihe), was später im Rahmen der Versa Doc - Messreihe völlig different war.

Generell fällt zudem auf, dass es trotz der Berücksichtigung aller zuvor beschriebenen systematischen Fehlerquellen nicht gelungen war, die Streuung der ermittelten PG zu Protein - Verhältnisse für die einzelner Mutanten geringer zu gestalten. Dies lässt auf weitere systematische Fehler schließen.

Ein Erklärungsansatz für beide Phänomene (abweichender Trend bzw. Fehlerbalken) wurde bereits im Ergebnisteil dieser Arbeit geschildert (Ausführungen zur Kieselsäure - Säulenreinigung der Proben in Abschnitt 3.1.3.8). Da nicht für alle Säulenaufreinigungen die gleichen Chargen an Lösemittel benutzt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass der von Experiment zu Experiment unterschiedliche Wassergehalt der verwendeten Lösemittel bei beiden Versuchsreihen zu den stark streuenden Werten geführt hat. Dieses Wasser muss bei einigen Versuchen zu einer erheblichen Unterbestimmung des molaren PG zu Protein - Verhältnisses geführt haben. Dies gilt offenbar im Besonderen für die zweite durchgeführte Messreihe und könnte ergänzend dazu auch die unterschiedlichen beobachteten Trends beider Messreihen erklären.⁵⁸ Allerdings gibt es für diese spezielle Vermutung keine expliziten experimentellen Beweise.

So kann unter Berücksichtigung des eben genannten lediglich ausgesagt werden, dass es offensichtlich mit Hilfe der zweiten durchgeführten Messreihe nicht möglich war, die zunächst erzielten Resultate mit Hilfe der AIDA - Auswertungen zu bestätigen. Zwar konnten die bereits beschriebenen systematischen Fehler beim Auftrag der Proben, der Färbung mit Molybdat und der Digitalisierung der Dünnschichten behoben werden, aber wahrscheinlich führte der noch stärker auftretende Effekt der Wasserkontamination der verwendeten Lösemittel zum Scheitern dieser Reproduktionsversuche.

Es bleibt fraglich, ob man den stärker mit systematischen Fehler behafteten anfänglichen Analysen mit Hilfe der AIDA - Auswertungen große Bedeutung zumessen soll. Dennoch erscheinen diese Ergebnisse im Rahmen aller erzielten Resultate noch am vertrauenswürdigsten. Deshalb soll im folgenden Abschnitt versucht werden, mit Hilfe dieser Ergebnisse eine hypothetische Aussage bezüglich der eventuellen Unterschiede in der PG - Bindung der einzelnen Mutanten abzuleiten und diese mit den diesbezüglichen Angaben in der Literatur zu vergleichen.

⁵⁷ Im Fall der C3.2h - Monomere könnte dies allerdings auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass hier im Fall der AIDA - Messreihe eine Mischung von Monomeren und Trimeren (10% Trimer - Anteil, vgl. Abschnitt 3.1.3.7) vermessen wurde.

⁵⁸ Dies korreliert zu dem während dieser Versuche zeitgleich deutlich gestiegenen Lösemittelverbrauch innerhalb der Arbeitsgruppe aufgrund von zahlreichen Lipidpräparationen im Zusammenhang mit Experimenten zur Herstellung von Proteoliposomen anderer Labormitarbeiter. Offensichtlich führte der erheblich gestiegene Lösemittelverbrauch dieser Tage zu einer Vernachlässigung der Güte der verwendeten Lösemittel.

4.1.2 Deutung der Ergebnisse der vergleichenden Phospholipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie und AIDA -Auswertung

Bereits 1984 wurde von Remy *et al.* mit Hilfe von radioaktiv markiertem PG festgestellt, dass pro LHCII - Trimer etwa ein Molekül PG gefunden werden kann. Diese Angabe wurde von Gasser *et al.* 1999 anhand von immunologischen Experimenten bestätigt. Zusätzlich ist bereits seit den Ausführungen von Remy *et al.* 1982 bekannt, dass für native LHCII - Trimere ein drei - bis vier mal höherer Gehalt an PG zu erwarten ist als bei Monomeren dieses Lichtsammelkomplexes. Zusammengenommen würde das bedeuten, dass pro LHCII - Trimer ein molares PG zu Trimer - Verhältnis von exakt 1 zu erwarten sein müsste und in Bezug auf die Monomer - Untereinheiten rein rechnerisch ein Verhältnis von 0,33 (also ein Drittel PG pro Monomer - Untereinheit im Trimer) resultiert. Die assoziierten Monomere in einem Trimer würden sich somit hypothetisch ein PG - Molekül teilen. Die Ergebnisse der AIDA - Messreihe ergaben ein molares PG zu Protein - Verhältnis von 0,37, was im Rahmen des aufgetretenen Fehlers der Analyse zu diesen Angaben in der Literatur passen würde.⁵⁹

Aber auch weitere in der Literatur bis 2004 angegebenen Effekte könnten ansatzweise mit den ermittelten Werten der AIDA - Messreihe erklärt bzw. bestätigt werden. So wurden von Flachmann und Kühlbrandt 1996 transgene Pflanzen beschrieben, bei denen analog zur hier verwendeten LHCII - Mutante R21Qh ebenfalls ein Austausch der Aminosäure Arginin an Position 21 durch Glutamin vorgenommen worden war. Diese Pflanzen wiesen in ihren Thylakoid - Membranen keine LHCII - Trimere mehr auf, was von den Autoren mit der Vermutung des Verlusts der Fähigkeit zur Phospholipid - Bindung in Zusammenhang gebracht wurde. Diese Vermutung konnte 2000 durch NMR - Studien von Ververka *et al.* erhärtet werden, die anhand synthetischer Proteinfragmente ebenfalls feststellten, dass ein Austausch der positiven Aminosäure Arginin an Position 21 zu einer reduzierten Lipidbindung (PG - Bindung) führte. Der eventuelle Verlust an ionischen Wechselwirkungen zwischen der positiven Aminosäure Arginin und dem negativen „Phosphat-Kopf“ könnte dafür verantwortlich zu machen sein. Zu diesen Vermutungen in der Literatur passen die mittels der AIDA - Auswertung erzielten Ergebnisse für die LHCII - Mutante R21Qh gut. Bei der Untersuchung dieser Mutante konnte kein komplexgebundenes PG mehr detektiert werden (d.h. molares PG zu Protein - Verhältnis gleich Null). Dies würde die Vermutungen in der oben genannten Literatur weiter erhärten, dass die positive Aminosäure Arginin essentiell für die Bindung des PG ist.

Für die beiden anderen untersuchten Mutanten WY16,17AVh und K23Qh ergaben sich bei der AIDA - Messreihe jeweils reduzierte molare PG zu Protein - Verhältnisse.

⁵⁹ Dem gegenüber stehen die aktuellen röntgenkristallographischen Untersuchungen von Liu *et al.* (2004). Sie fanden bei 2,72 Å - Auflösung exakt ein PG - Molekül pro LHCII - Monomer, d.h. drei Phospholipide pro Trimer. Die Ursache für diese Diskrepanz zu den früheren Ergebnissen von Remy und Gasser ist an dieser Stelle nicht eindeutig klärbar, könnte aber darin begründet sein, dass es sich bei den von Liu *et al.* untersuchten Komplexen um „Detergenz - gelöste“ und im Anschluss kristallisierte Komplexe handelt. Während des Prozesses der Aufreinigung und Kristallisation könnte es dabei zu Veränderungen der PG - Stöchiometrie gekommen sein, so dass im Vergleich zu dem hier untersuchten *in vitro* - System ein höherer PG - Gehalt resultiert.

Für die Mutante K23Qh konnte hier mit Hilfe lediglich eines Experiments ein Wert von 0,2 bestimmt werden. Hobe konnte 1995 zeigen, dass diese Mutante analog zum Wildtyp fähig ist, LHCII - Oligomere zu bilden. Sie markiert das Ende des von ihm angegebenen Trimerisierungsmotives. Diese Fähigkeit konnte auch während der hier durchgeführten Experimente verifiziert werden. Eine Erklärungsmöglichkeit für das leicht reduzierte molare PG zu Protein - Verhältnis dieser Mutante könnte (im Sinne der Hypothese eines Verlustes der PG - Bindung durch einen Austausch an Position 21) dadurch gegeben werden, dass es bei der Mutante K23Qh aufgrund einer eventuell gestörten Umgebung der offensichtlich wichtigen Aminosäure Arginin durch den vorgenommenen Austausch zum Verlust an PG bei einigen LHCII - Monomeren des vermessenen Ensembles kommt. Dies würde den reduzierten Wert erklären, kann aber, wie alle anderen in diesem Abschnitt gemachten Aussagen, lediglich als Hypothese angegeben werden.

Der Wert für die Mutante WY16,17AVh entspricht nur mäßig den Erwartungen, die sich aus der Literatur ergeben. Hobe *et al.* beschrieben 1995, dass auch bei dieser Mutante keine LHCII - Trimere zu beobachten waren, was auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Abbildung nicht gezeigt). Dennoch kann bei dieser Mutante PG mit einem molaren Verhältnis von 0,23 (vgl. Abb. 35, Seite 92) zum eingesetzten Apoprotein detektiert werden. Dies könnte nur dann sinnvoll erklärt werden, wenn durch den Austausch der beiden aromatischen Aminosäuren Thryptophan (W) und Tyrosin (Y) durch Alanin (A) und Valin (V) die PG - Bindung an das LHCII - Apoprotein an sich nur eingeschränkt beeinflusst würde, eine Oligomerisierung aber aufgrund des Fehlens von anderen durch diese aromatischen Aminosäuren vermittelten Wechselwirkungen der Monomer - Untereinheiten zueinander trotzdem verhindert würde. Auch diese Annahmen sollen an dieser Stelle lediglich als Spekulation angegeben werden und wurden nicht experimentell gezeigt. Sie werden aber durch Aussagen von Ververka *et al.* (2000) bestätigt, die den Vorgang der PG - Bindung und dem der Oligomerisierung ebenfalls gedanklich in zwei Prozesse aufteilen.

4.1.3 Vergleichender Phospholipidnachweis mit Hilfe einer photometrischen Nachweismethode

In Ergänzung zu den im vorigen Kapitel beschriebenen Experimenten wurde während dieser Arbeit ebenfalls versucht, einen vergleichenden Phospholipidnachweis mit Hilfe einer photometrischen Methode zu realisieren. Diese Methode, bei der die Phosphat - Kopfgruppe des Phospholipids als Molybdänblau photometrisch nachgewiesen werden kann (vgl. Material und Methode, Abschnitt 2.6.8), ist in der Literatur in anderem Zusammenhang weit verbreitet. So wird sie z.B. bei Debuch *et al.* (1968) zu Bestimmung von Placenta - Lipiden des Menschen während der Schwangerschaft verwendet, ebenso wie bei anderen Autoren zur Bestimmung des Phosphatgehaltes in Wasser und Sedimenten (vgl. Spivakov *et al.* 1999). Dabei findet man in der Literatur ebenso viele Anwendungsmöglichkeiten der Methode wie auch Abwandlungen in Bezug auf ihre Durchführung. Während dieser Arbeit stand allerdings nicht die Etablierung der Methode selbst im Vordergrund. Versuche dazu wurden, wie bereits erwähnt, im Rahmen der Diplomarbeit von Stephanie Boggasch (Boggasch 2001) durchgeführt.

Aber auch sie testete aus Zeitgründen nicht alle in der Literatur beschriebenen Varianten, sondern ergänzte lediglich bereits durchgeführte, unveröffentlichte Experimente anderer Lipidforscher der Arbeitsgruppe analog zu der Veröffentlichung von Rouser *et al.* 1970. So kann an dieser Stelle nur schwer abgeschätzt werden, ob eine andere Variation dieses photometrischen Nachweises (vgl. Mohrig 1972; Cogan *et al.* 1999 oder Hylander *et al.* 1996) zu veränderten, eventuell präziseren Ergebnissen geführt hätte.

Wie bereits im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben, wurden zunächst alle Experimente mit Hilfe der von Stephanie Boggasch etablierten Methode („Methode K“) durchgeführt. Im späteren Verlauf wurde auf eine andere Variante zurückgegriffen, die von Dr. Beutelmann bereits früher entwickelt wurde und die sich als „problemloser“ in der Durchführung (vergleichend zu den in Kapitel 3.1.4.1 des Ergebnisteils beschriebenen Fehlexperimenten) erwiesen hatte.⁶⁰ Mit Hilfe einer grafischen Darstellung sollen zunächst die Ergebnisse beider Messreihen vergleichend dargestellt werden.

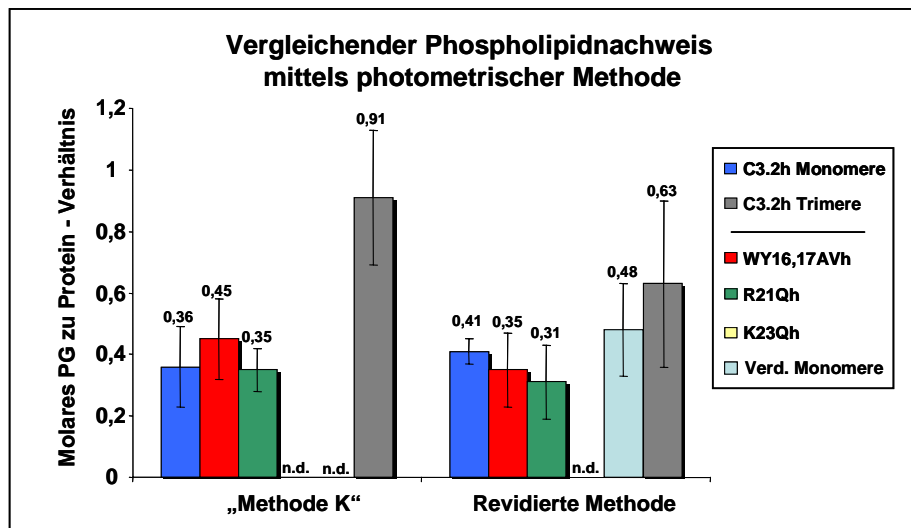


Abb. 90: Vergleich der Ergebnisse der beiden vergleichenden Phospholipid - Analysen für verschiedene LHCII - Komplexe mit Hilfe einer photometrischen Methode. Links sind die Ergebnisse der „Methode K“ nach Stephanie Boggasch aufgetragen, rechts die Analyseergebnisse mittels der revidierten Methode nach Dr. Beutelmann. Für Komplexe der Mutante K23Qh wurden während der Versuche mit beiden methodischen Varianten keine Experimente durchgeführt. Des Weiteren wurden nur mit Hilfe der Methode nach Dr. Beutelmann Protease - behandelte Komplexe untersucht. (*n.d.* = nicht durchgeführt)

In der obigen Abbildung wurden in Bezug auf die Messreihe mit der „Methode K“ nur erfolgreich durchgeführte Experimente erfasst. Trotz der im Ergebnisteil bereits beschriebenen schlechteren Korrelationskoeffizienten der für die Aus-

⁶⁰ Für die im Zusammenhang mit der „Methode K“ aufgetretenen Probleme zu stark angefärbter Proben könnte es sich im Nachhinein, analog zu den Untersuchungen von Ueda *et al.* 2001 um so genannte überreduzierte 12- Molybdophosphat - Anionen gehandelt haben, was aber an dieser Stelle nur vermutet werden kann und nicht experimentell gezeigt wurde. (Ueda verwendete zudem leicht abweichende Versuchsparemeter.) Diese Anionen entstehen als Nebenprodukt durch eine zu hohe Säure - Konzentration (Perchlorsäure) der zu analysierenden Proben nach Zugabe von Molybdän und Ascorbinsäure bei der Molybdänblau - Komplexbildung völlig unabhängig von der eigentlichen Phosphatkonzentration in der Probe. Das würde die aufgetretenen unterschiedlichen Ergebnisse von Vergleichsproben während einzelner Messreihen erklären.

wertung dieser Versuche verwendeten Eichgeraden zeigen sich im Rahmen der angegebenen Fehler sehr ähnliche Werte für alle untersuchten LHCII - Monomere im Vergleich zu den später mit höheren Korrelationskoeffizienten durchgeführten Experimenten mit der revidierten Methode nach Dr. Beutelmann (vgl. Ergebnisse Kapitell 3.1.4.2). Lediglich für die untersuchten LHCII - Trimere wurden unterschiedliche molare PG zu Protein - Verhältnisse detektiert.

Generell ist anhand der Abbildung festzustellen, dass sich bei dieser photometrischen Untersuchungsmethode für alle untersuchten monomeren Komplexe, also Wildtyp wie auch Trimerisierungsmotiv - Mutanten, praktisch gleiche molaren PG zu Protein - Verhältnisse von etwa 0,33 ergeben, also „ein Drittel PG“ pro Monomer. Eine Abstufung (Trend), wie sie speziell bei der Betrachtung der Dünnschichtchromatogramme im Rahmen der AIDA - Auswertungen zu beobachten war, ergibt sich nicht. Es stellt sich deshalb die Frage, ob es sich bei diesen gleichen Werten aller Mutanten um Proben- (bzw. Klon-) spezifische Ergebnisse handelt, oder ob diese Resultate aufgrund eines systematischen Fehlers zu beobachten waren. Diese Frage kann an dieser Stelle nicht eindeutig beantwortet werden.

Mehrere Indizien sprechen allerdings dafür, dass es sich tatsächlich um verfälschte Ergebnisse handelt.

So stehen erstens die ermittelten PG zu Protein - Verhältnisse der Protease - verdauten LHCII - Monomere von 0,48 PG pro Protein (siehe Tab. 23 des Ergebnisteils) in starkem Widerspruch zu den Angaben von Nußberger *et al.* 1993. Dort konnte gezeigt werden, dass mittels Trypsin- und Chymotrypsin verdaute LHCII - Komplexe kein PG mehr aufweisen. Selbst wenn bei diesen Versuchen von Nußberger *et al.* eventuell zu gering konzentrierte Proben per Dünnschichtchromatographie untersucht wurden und deshalb aufgrund der Nachweisgrenze des PG auf Dünnschichten kein Lipid detektiert werden konnte, erklärt dies nicht die vergleichsweise hohen PG - Funde der photometrischen A_{815} - Messungen dieser Arbeit.

Zweitens stehen die ermittelten PG - Mengen für die Mutante R21Qh ebenfalls in Widerspruch zu Ververka *et al.* (2000), die zeigten, dass ein Austausch der positiv geladenen Aminosäure Arginin an Position 21 zu einer reduzierten Lipidbindung (PG - Bindung) führt. Somit hätte man, wenn überhaupt, ebenfalls einen reduzierten PG - Gehalt im Vergleich zur Wildtyp - Mutante C3.2h erwartet. Dem entgegen konnte sogar ein im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöhtes molares PG zu Protein - Verhältnis bestimmt werden.

Ein letztes Indiz für das Auftreten eines systematischen Fehlers liefert das bereits im Ergebnisteil dieser Arbeit angesprochene Experiment mit variiertem Lösemittelmenge (vgl. Seite 106f). Dieses Experiment führt schließlich zu der Hypothese, dass bei allen durchgeführten Experimenten mit Hilfe dieser photometrischen Methode lediglich die „Phosphat- Mengen“ der verwendeten Lösemittel miteinander verglichen wurde und nicht die eigentlichen PG - Gehalte der unterschiedlichen zu analysierenden Komplexe. Dies könnte der Grund für die viel zu einheitlichen PG zu Protein - Verhältnisse von Monomeren des Wildtyps und der Trimerisierungsmotiv - Mutanten sein.

Mit dieser Annahme lässt sich zudem auch das höher detektierte PG zu Protein - Verhältnis der LHCII - Trimere erklären. Während der diesbezüglich durchgeführten Experimente wurde aufgrund der stringenten Waschungen der Ni - Sepharose - Säulenbehandlung meist ein Monomer - zu Trimer - Verhältnis zwischen 2:1 und 1:1 erzielt. Daraus resultierte bei der Präparation, dass zum Erhalt gleicher Mengen an Trimeren die doppelte bis dreifache Menge an Pro-

benvolumen aufgearbeitet werden musste, was ebenfalls die Verwendung der doppelten bis dreifachen Menge an Lösemittel bedeutete. Wenn sich gemäß der eben genannten Theorie die detektierte PG - Menge lediglich proportional zum eingesetzten Lösemittelvolumen verhalten hat, wäre dadurch eine Erklärung für das im einen Fall mit 0,63 doppelt so hohe und im anderen Fall mit 0,91 dreifach so hohe berechnete PG zu Protein - Verhältnis gegeben. Leider kann an dieser Stelle kein weiterer Beweis für diese Annahmen angeführt werden. Es bleibt aber prinzipiell zweifelhaft, ob den mit dieser photometrischen Methode ermittelten PG zu Protein - Verhältnissen für die verschiedenen LHCII - Mutanten Glauben geschenkt werden darf.

4.1.4 Vergleichende Analysen der Phospholipidbindung mittels Antikörper und Gaschromatographie

Die während dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit einem spezifischen PG - Antikörper gemäß Kruse *et al.* 1994 und 1995 sind eher als Exkurs anzusehen und sollen an dieser Stelle deshalb nur kurz kommentiert werden. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers für das Lipid Phosphatidylglycerin, welcher laut Aussagen der oben angeführten Autoren keine Kreuzreaktionen mit anderen Lipiden der Thylakoidmembran zeigt, sollte ein weiterer Versuch zur Durchführung der vergleichenden Analyse der Phospholipidbindung der verschiedenen LHCII - Mutanten ermöglicht werden. Es konnte in diesem Zusammenhang nicht klar gezeigt werden, ob die mit dem Antikörper visualisierten Chemilumineszenz - Nachweise wirklich von dem komplexgebundenen PG der Proben stammten bzw. ob dieser Nachweis auch wirklich konzentrationsabhängig durchführbar war. Letztlich blieben zudem Zweifel, ob es sich bei den mittels Versa - Doc Apparatur sichtbar gemachten Spots nicht eher um die auf die Blot - Membran aufgetragenen Pigmente der LHCII - Komplexe handelte (vgl. der Ausführungen im Abschnitt 3.1.5 der Ergebnisteils). Um endgültig zu klären, ob es mit dieser Art des Phospholipidnachweises prinzipiell möglich ist, die in dieser Arbeit adressierte Fragestellung zu klären, müssten allerdings weitere Versuche mit diesem Antikörper durchgeführt werden.

Auch mit der Nachweismethode der Gaschromatographie wurden nur einzelne Versuche durchgeführt. Diese Experimente wurden, wie im entsprechenden Kapitel dieser Arbeit bereits geschildert, erst nach der Markteinführung eines Diheptadecanoyl - PG (17:0 PG) durch die Firma Avanti Polar Lipids möglich. Bereits nach einigen Versuchen zeigte sich auch bei dieser Methode, dass die während der Lipidextraktion miteluierten komplexgebundenen Pigmente den Nachweis des PG per Gaschromatograph behindern (vgl. Abbildung 46 Seite 113). Zur Lösung dieses Problems wurde ebenfalls versucht, eine Aufreinigung der zu analysierenden Lipidextrakte mit Hilfe einer Kieselsäure - Säule durchzuführen. Die resultierenden Ergebnisse für die Mutanten C3.2h und WY16,17AVh sind wiederum, analog zu denen der photometrischen Methode sehr ähnlich, so dass auch hier davon ausgegangen wurde, dass ein systematischer Fehler aufgetreten war. Es bleibt an dieser Stelle offen, wann genau dies passiert ist. Eventuell würde es sich lohnen, in der Zukunft weitere Experimente in diesem Zusammenhang durchzuführen. Alternativ zur im Rahmen dieser Arbeit als problematisch aufgezeigten Aufreinigung der Proben mit einer Kieselsäure - Säule könnte dann versucht werden, mit Hilfe einer zweiten Lipidextraktion etwa mit einem ternären Gemisch aus Hexan, Methanol und Wasser (vgl. Christie 1982) die Hauptmenge an verunreinigenden Pigmenten zu entfernen.

4.1.5 Zusammenfassung unter Berücksichtigung der aktuellen Kristallstruktur nach Liu *et al.* (2004)

Zum Abschluss aller Betrachtungen in Zusammenhang mit der vergleichenden Bindungsstudie für das Lipid Phosphatidylglyzerin muss folgendes festgestellt werden:

Mit Hilfe der im Vergleich zu den anderen durchgeführten Analysemethoden verhältnismäßig konservativen Methode der Dünnschichtchromatographie, gefolgt von einer Auswertung mit Hilfe der AIDA - Software, ergaben sich trotz aller möglichen systematischen Fehlerquellen einige interessante Übereinstimmungen mit vielen Angaben bzw. Vermutungen der Literatur bezüglich der PG - Bindung der unterschiedlichen untersuchten Mutanten.

Die so ermittelten molaren PG zu Protein - Verhältnisse für die verschiedenen Mutanten konnten allerdings durch keine der im Anschluss durchgeführten variierten Nachweismethoden reproduziert werden, so dass es an dieser Stelle nicht möglich erscheint, eine endgültige, definitive Aussage über die unterschiedliche PG - Bindung der einzelnen Mutanten zu machen. Es können an dieser Stelle lediglich einige Hypothesen angegeben werden, deren Wahrheitsgehalt durch weitere Experimente abgeklärt werden muss.

Die kurz vor Fertigstellung dieser Dissertation veröffentlichte Kristallstruktur bei 2.72 Å nach Liu *et al.* lässt zudem eine neue, andere Vermutung für eine Bindung des PG zu. Es ergibt sich folgendes Bild:

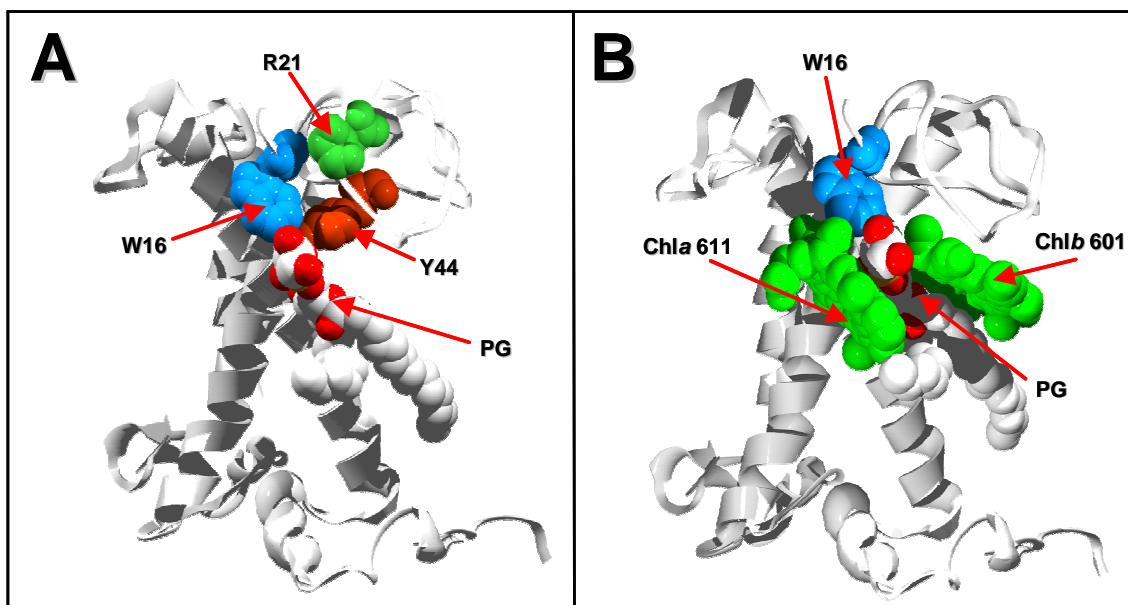


Abb. 91: Beide Abbildungen zeigen Strukturmodelle des LHCII bei einer Auflösung von 2,72 Å. Die Blickrichtung ist dabei zur besseren Darstellung vom N - Terminus in Richtung des Helixkreuzes gewählt. **A:** Modell unter Angabe der nach Liu *et al.* (2004) für eine Bindung des Phospholipids interessanten Seitenketten der Aminosäuren Thryptophan (W16) mit einem Abstand zum PG - Phosphatkopf von ~ 0,48 nm und Tyrosin (Y44) mit ~ 0,51 nm zum PG. Der positive Rest der Aminosäure Arginin (R21) ist mit ~ 1,4 nm Abstand zum PG in diesem Modell im Hinblick auf eine ionische Wechselwirkung mit dem PG zu weit entfernt. **B:** Das gleiche Modell unter Angabe der eventuell für die PG - Bindung ebenfalls verantwortlichen beiden Chlorophylle Chl a 611 mit ~ 0,4 nm und Chl b 601 mit ~ 0,86 nm - Abstand zum Phosphat des PG.

Es zeigt sich, dass neben den Aminosäureseitenketten des Trimerisierungsmotiv (Hobe *et al.* 1995) noch viele anderen Positionen an der Bindung des PG beteiligt sein könnten. So ergibt sich neben der eventuellen Interaktion mit dem Tryptophan¹⁶ (W16) ebenfalls eine Möglichkeit für Wechselwirkungen des PG mit der Seitenkette der Aminosäure Tyrosin⁴⁴ (Y44) und zwei eng benachbarten Chlorophyllen (Chl *a* 611 und Chl *b* 601). Die für diese möglichen Interaktionen des PG verantwortliche Phosphat - Kopfgruppe des Moleküls hat zu allen genannten Positionen lediglich einen geringen Abstand von etwa 0,5 nm. Hingegen scheint die Seitenkette der Aminosäure Arginin²¹ (R21) mit rund 1,4 nm Entfernung zum „PG - Kopf“ viel zu weit entfernt zu sein, um eine ionische Wechselwirkung, wie sie in der Literatur gefordert wird (Ververka *et al.* 2000), zu ermöglichen.

Anhand dieser neuen Erkenntnisse wird es somit fraglich, ob es sich bei dem Trimerisierungsmotiv um die alleinige für die PG - Bindung verantwortliche Region des LHCII handelt.

Allerdings muss man in diesem Zusammenhang die folgende Einschränkung nennen: Die oben gezeigten Modelle wurden aufgrund von röntgenkristallographischen Ergebnissen mit nativen LHCII - Komplexen erstellt. Während des dazu nötigen Prozesses der Kristallisation kann es zu konformativen Veränderungen der Schleifenregionen gerade des diesbezüglich sehr flexiblen aminoterminalen Bereiches gekommen sein.

Die meisten während dieser Arbeit bereits angegebenen Erkenntnisse und Vermutungen der weiteren Literatur, wie auch die eigenen Versuche in diesem Kontext wurden aber dem entgegen mit LHCII - Komplexen „in Lösung“ erreicht. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass es zu veränderten Ergebnissen im Vergleich zur Kristallstruktur kommt. Ein direkter Vergleich zwischen beiden möglichen Herangehensweisen an die Ursachen der PG - Bindung ist nur mit Einschränkungen möglich.

So muss bereits an dieser Stelle die Frage nach einer Diskrepanz zwischen ermittelter starrer STRUKTUR und dynamischer KONFORMATION des LHCII *in vivo* bzw. *in vitro* gestellt werden, die im weiteren Verlauf dieser Diskussion in Zusammenhang der ESR - Messungen ebenfalls noch angesprochen wird.

4.2 Diskussion der durchgeführten ESR - Distanzmessungen an LHCII

4.2.1 Elektronenspin - Resonanz - Spektroskopie: Eine neue Möglichkeit zur Konformationsanalyse des LHCII

Die Elektronenspin - Resonanz - Spektroskopie hält seit geraumer Zeit Einzug in die biologischen Wissenschaften (vgl. Einleitung dieser Arbeit). Mit der Entwicklung der punktspezifischen Spinmarkierungen von Proteinen (vgl. Hubbel *et al.* 1994 und 1998, Berliner 2000) wurden auch Strukturcharakterisierungen und Untersuchungen zur Dynamik von Strukturen ursprünglich diamagnetischer nicht - kristalliner Systeme in einem Bereich von 0,5 bis 5 nm Distanz möglich. Auch im Zusammenhang mit den ESR - Messungen am rekombinanten LHCII konnte diese Zielsetzung erfolgreich verfolgt werden.

Bevor nun die eigentlichen Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert werden, soll zunächst ein kurzer Versuch einer allgemeinen Bewertung der Puls - ESR - Messmethode in Bezug auf die Anwendbarkeit im Zusammenhang mit der Konformationsanalyse des LHCII vorgenommen werden. Die Fragestellungen: „Wo liegen die Grenzen dieser ESR - Analytik“ und „Wie sicher ist die Interpretation der erzielten Messdaten im Hinblick auf eine Konformationsanalyse des LHCII“ bzw. „Wo liegen die Vorteile eine solchen Vorgehensweise“ sollen erörtert werden.

4.2.1.1 *Grenzen der ESR - Spektroskopie in Zusammenhang mit der Analyse von rekombinantem LHCII*

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, bietet sich die intramolekulare Distanzmessung mit Hilfe der Puls - ESR - Spektroskopie (vgl. Material und Methoden Abschnitt 2.7.4) immer dann an, wenn Distanzen innerhalb eines Moleküls vermessen werden sollen, die in einem Intervall von 2 bis 5 nm liegen. In diesem Bereich versagt die bei kürzeren Abständen experimentell einfachere und sensitivere *continuous wave* (cw) - Methode (vgl. Hubbel *et al.* 1994 und 2000; Altenbach *et al.* 2001 bzw. Steinhoff *et al.* 1997). Zudem erlauben Puls - ESR - Techniken eine Distanzangabe mit einer höheren Auflösung und somit eine detailliertere Charakterisierung der zu ermittelnden Distanzverteilung innerhalb der zu vermessenden Proben (Jeschke 2002).

Zwar ist diese Methode z.B. im Vergleich zur alternativen Methode der Fluoreszenz - Resonanz - Energietransfer - Messung (FRET) (siehe Einleitung dieser Arbeit) deutlich unsensitiver, aber Messungen der eigenen Arbeitsgruppe in Zusammenhang mit analogen Energietransfermessungen zwischen zwei am LHCII angebrachten Fluoreszenzfarbstoffen haben gezeigt, dass es immer wieder zu „Fehlenergieübertragungen“, im Sinne von Interaktionen mit den komplexgebundenen Chlorophyllmolekülen kam, so dass keine exakte Auswertung der Experimente mehr möglich war. Ein weiterer Nachteil der Messungen mit solchen meist hochmolekularen Fluoreszenzfarbstoffen war, dass die Bindung eines derart „voluminösen“ Farbstoffes einen stark invasiven Eingriff in die Struktur des LHCII bedeutete. Hingegen stellt die hier etablierte Bindung eines TEMPO - Spin Labels von der Größe einer Aminosäureseitenkette keinen solchen Eingriff dar und wird die Struktur des LHCII kaum beeinflussen.

Aufkonzentrierung der LHCII - Proben

Zur Durchführung von Puls - ESR - Experimenten an rekombinantem LHCII mussten stark konzentrierte Proben eingesetzt werden, da sich die Konzentration der TEMPO - markierten Probe entscheidend auf das Verhältnis zwischen erhaltenem Nutzsignal und dem gerätespezifischen Grundrauschen des erhaltenen ESR - Spektrums auswirkte. Dies führte im Zusammenhang mit der Vermessung von Membranproteinen zu deutlichen Problemen:

Im Gegensatz zu chemischen Syntheseprodukten, deren Konzentration in einem organischen Lösemittel mehr oder minder frei eingestellt werden kann, ergeben sich bei der Einstellung einer bestimmten Konzentration eines Membranproteins naturgegebene Grenzen. Solche Proteine müssen in einer Detergenzhülle lösbar gemacht werden. In wässriger Lösung würde sofort eine Aggregation des Proteins erfolgen. Desgleichen können keine organischen Lösemittel verwendet werden, da sie zur sofortigen Denaturierung und im Hinblick auf den LHCII zu einer Konformationsänderung in Zusammenhang mit dem Verlust der komplexgebundenen Pigmente führen würden.

Die Detergenzkonzentration, in der das betreffende Protein gelöst werden muss, kann zudem nicht frei gewählt werden. Wird diese Konzentration zu niedrig gewählt, kommt es ebenfalls zur Aggregation, da dann die so genannte CMC, die *Critical Micellar Concentration* unterschritten wird, also die Konzentration an Detergenz, bei der gerade noch Detergenz - Protein - Mizellen gebildet werden. Dieser Wert kann als eine Art Materialkonstante für jedes Detergenz angegeben werden und muss strikt im Sinne eines Grenzwertes eingehalten werden. Aber auch eine zu hohe Detergenzkonzentration kann im Zusammenhang von intramolekularen Distanzmessungen des LHCII zu Problemen führen. In diesem Fall muss klar unterschieden werden, ob es sich bei den ermittelten Distanzen um intramolekulare- oder intermolekulare Abstände handelt.

Um dies für die Messungen des LHCII zu testen, wurden im Zusammenhang mit der Vermessung der S3Ch bzw. S160Ch - Trimere auch gleich präparierte S3Ch (und S160Ch) - Monomere per ESR vermessen (siehe Ergebnisteil 3.2.4.3). Diese Monomere wiesen nur ein gebundenes TEMPO - Label auf und sollten somit keine intramolekulare Abstandsinformation liefern. Hätte man doch einen Abstand bestimmen können, hätte dieser von der Interaktion von TEMPO - Labeln eng benachbarter LHCII - Moleküle (also intermolekular) stammen müssen. Dies konnte allerdings nicht beobachtet werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass trotz starker Aufkonzentrierung aller vermessenen LHCII - Proben (mit Ausnahme der vermessenen LHCII - Trimere) nur intramolekulare Abstände innerhalb eines Moleküls in einer Detergenzhülle vermessen wurden. Die Abstände zwischen zwei benachbarten Detergenzhüllen waren offensichtlich noch so groß, dass keine Interaktionen zwischen benachbarten LHCII - Molekülen aufgetreten waren.

Die hohe Aufkonzentrierung der LHCII - Proben könnte aber auch zu anderen Effekten am LHCII selbst führen. Um dies auszuschließen, wurden flankierend zu den meisten LHCII - Präparationen vor der eigentlichen ESR - Messung CD- und Fluoreszenzspektroskopie - Untersuchungen durchgeführt. Zusätzlich wurde die Pigmentstöchiometrie der einzelnen LHCII - Komplexe per HPLC bestimmt.

Es konnte gezeigt werden (vgl. Ergebnisse Abschnitt 3.2.3), dass auch während der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente durch den Prozess der Probenkonzentrierung etwa 5 bis 10% Oligomere (in Bezug auf das eingesetzte

Protein) entstanden. Diese geringe Menge war aber im Zusammenhang mit den nachfolgend durchgeführten ESR - Messungen vernachlässigbar, da das ESR - Nutzsignal der 90% an vermessenen LHCII - Monomeren der Probe um eine Größenordnung stärker war als das Signal der 5 - 10% LHCII - Trimere, welches dadurch im Hintergrundrauschen der Messungen verloren ging. Nur so war es möglich, trotz der als „Nebenprodukt“ auftretenden LHCII - Trimere Aussagen über intramolekulare Abstände von verschiedenen LHCII - Monomeren zu machen.

Des Weiteren zeigte sich, dass es durch die Konzentrierung der Proben nicht zu einer schleichenden Zerstörung des LHCII gekommen war. Eine derartige Veränderung der Probe hätte zu einem veränderten Fluoreszenzverhalten (vgl. Material und Methoden Abschnitt 2.5.2) im Sinne einer verminderten Energieübertragung von Chlorophyll *b* auf Chlorophyll *a* bzw. zu veränderten Pigment zu Pigment - Stöchiometrien im Vergleich zu unbehandelten Proben führen müssen, was aber nicht beobachtet werden konnte. Lediglich anhand der aufgenommenen CD- Spektren konnte eine geringfügige Abweichung der aufkonzentrierten im Vergleich zu nicht - aufkonzentrierten Proben gezeigt werden (vgl. Abb. 51, Seite 121). Da sich diese Veränderung allerdings nach Verdünnung der Probe als reversibel herausstellte, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit davon ausgegangen, dass es durch die Centrifugation - Behandlung zu keinen funktionsrelevanten Strukturveränderungen der LHCII - Komplexe kam.

Markierung von LHCII mit TEMPO - Spin - Label

Neben dem bereits beschriebenen grundsätzlichen Problem der Proben- (Protein-) Konzentration zur Durchführung von Puls - ESR - Messungen muss an dieser Stelle ein weiteres Problem diskutiert werden. Für die durchgeführten Distanzmessungen im Rahmen dieser Arbeit war nicht die generell eingesetzte LHCP - Proteinkonzentration für das Verhältnis von ESR - Nutz - zu Rausch - Signal verantwortlich, sondern vielmehr die absolute Konzentration an gebundenem Label. Es musste demnach sicher gestellt werden, dass bei der Markierung des Apoproteins mit TEMPO - Spin - Label (vgl. Beschreibung unter 2.7.1) möglichst an jedes Protein zwei TEMPO - Label gebunden wurden, da nur solche Proteine später zum ESR - Nutzsignal im Sinne einer Distanzmessungen beitragen. Einfach gelabelte Proteine ergaben, wie bereits im Zusammenhang mit den S3Ch- bzw. S160Ch - Monomeren beschrieben, kein auswertbares Signal für die Abstandsmessung (siehe Ergebnisse im Zusammenhang der Trimer - Messungen), vielmehr führt ihr Betrag zu einer verringerten Modulationstiefe, wodurch die Genauigkeit der Analyse negativ beeinflusst wird.

Anhand des unter 3.2.2 dargestellten Experiments konnte gezeigt werden, dass es durch eine längere Markierungszeit mit TEMPO möglich ist, über 90% aller über Cystein - Austausch am Protein eingeführten freien SH - Gruppen mit TEMPO zu erreichen. Eine 100 prozentige Markierung mit TEMPO war erwartungsgemäß nicht möglich.⁶¹

⁶¹ Diese Tatsache ist allerdings nicht als problematisch anzusehen, da wie bereits im Ergebnisteil ausführlich beschrieben, unmarkierte bzw. nur einfach markierte Proteine die nachfolgende ESR - Messung nicht verfälschen. Sie liefern keinen Anteil zum Nutzsignal des DEER - Spektroms. Somit tritt hier keine „Verfälschung“ der Messergebnisse auf, wie sie bei anderen Methoden zu erwarten wäre.

Nur durch diese hohe Markierungseffizienz war es in der Folge möglich, mit den mit ca. 200 μM immer noch gering konzentrierten LHCII - Proben (Endkonzentration vgl. Kapitel 3.2.4.1) ausreichend starke ESR - Signale zu erhalten, die später zur Bestimmung von intramolekularen Abstandsinformationen herangezogen werden konnten. Auch im Hinblick auf spätere Folgeexperimente ist also immer darauf zu achten, diese hohe Markierungseffizienz zu erreichen.

Konformationen des TEMPO - Spin - Label am Proteingrundgerüst

Im Rahmen der Auswertung von ESR - Distanzmessungen muss prinzipiell auch die eigene Konformation des TEMPO - Spin - Labels und dessen räumliche Ausrichtung am Proteingrundgerüst beachtet werden. Bereits in anderen Arbeiten, wie etwa von Borbat *et al.* (2002), wurde auf diesen Zusammenhang näher eingegangen. Bei der Auswertung der dort beschriebenen Distanzmessungen im Zusammenhang mit der Strukturbestimmung des T4 - Lysozyms in schockgefrorener Lösung wurde für den Abstand zwischen den beiden dort verwendeten Methanethiosulfonat - Spin Labels (MTSSL) eine Varianz von 0,6 nm angegeben. Diese sollte allein eine Folge von verschiedenen Konformeren des TEMPO durch Rotation der Label um die an das radikal - tragende Ringsystem angrenzende C-C - Bindungsachse sein und wurde bei der weiteren Auswertung der Messergebnisse mit eingerechnet (siehe dazu Borbat *et al.* 2002).

Die Ergebnisse dieser Arbeit führten unter anderem zur Wahl des Iodacetamido - TEMPO - Labels für die hier durchgeführten Versuche, da dieses Label im Vergleich zum anfänglich alternativ verwendeten Maleimido - TEMPO einen geringeren Spacerabstand zum Proteingrundgerüst aufwies (vgl. Material und Methoden Abschnitt 2.7.1). Dies sollte die zu erwartende Varianz der Distanzmessungen gering halten, da so weniger relevante C-C - Drehachsen im Molekül vorhanden sein sollten. Dennoch zeigten eigene Strukturvorhersagen begleitend zu den durchgeführten Experimenten, dass auch für das Iodacetamido - TEMPO ein ähnliches Verhalten wie beim MTSSL zu erwarten war (Daten im Einzelnen nicht gezeigt).

Später ergaben alle Auswertungen der ESR -Distanzmessungen mit rekombinantem LHCII relativ breite Verteilungsmuster der ermittelten Abstände. Dies kann sicherlich zu einem gewissen Teil auf diese Konformationsverteilung des TEMPO - Labels selbst zurückgeführt werden. Gerade im Zusammenhang mit der Mutante S106C,S160Ch, mit ihren beiden TEMPO Labels an stromaler und luminaler Schleife, könnte dies der Fall sein. Hier sollte die Distanz der beiden vermessenen TEMPO - Label mehr oder minder den bereits bekannten Membranabstand innerhalb der Thylakoidmembran widerspiegeln. Dennoch resultierte eine breite Abstandsverteilung, was somit eventuell auf verschiedene Konformere der beiden Label zurückzuführen sein könnte. Zur endgültigen Klärung dieser Vermutung müssten weitere Experimente mit dem Iodacetamido - TEMPO gemacht werden, die aus Zeitgründen hier nicht durchgeführt wurden.

**Abb. 92:**

Mögliche Konformationen des TEMPO - Label am Beispiel des an Position 106 gebundenen Spin-Labels der Mutante S106C,S160Ch. Das gebundene TEMPO - Label wurde dabei in Form eines Kalottenmodells dargestellt. (LHCII - Modell mit freundlicher Genehmigung von Thorsten Schweikardt).

Allerdings ist es auch für diese Mutante, wie auch für alle anderen vermessenen Doppelmutanten im Rahmen der bereits gemachten Erfahrungen mit biologischen Proben wahrscheinlicher, dass die gefundenen breiten Abstandsverteilungen eher von einem breiten Konformationsensemble des LHCII an sich herrühren und die hier beschriebene Konformationsvarianz des verwendeten TEMPO - Labels eher eine untergeordnete Rolle spielt und bei weiteren Betrachtungen vernachlässigbar ist. Insbesondere legt bereits die elektronenkristallographische Strukturbestimmung von LHCII (Kühlbrandt 1994) nahe, dass die luminal Schleife im Bereich um den Aminosäurerest 106 fehlgeordnet ist. Eine Interpretation der breiten Konformationsensemble wird später noch diskutiert werden.

Möglicher Messbereich

Wie bereits erwähnt wurde, sind Distanzmessungen mittels der Puls - ESR - Methode prinzipiell in einem Bereich von 0,5 bis 5 nm durchführbar. Während dieser Arbeit wurde auch eine LHCII - Doppelmutante vermessen, bei der dieses Abstandsintervall überschritten wurde. So wurde für die Mutante S3C,S106C ein mittlerer Abstand von 5,26 nm (+/- 0,78 nm) ermittelt. Zur Bestimmung dieses Abstandes musste die Beobachtungszeit für die dipolare Evolution auf 3,5 μ s erhöht werden. Wie man bereits an Abbildung 62, Seite 132 sehen kann, führte dies zu einem stärker verrauschten DEER - Spektrum. Dadurch wird die anschließende Auswertung mittels einer Hermit - Interpolation nur noch sehr schwer durchführbar, und die sich daraus ergebenden Abstandsinformationen sind nur als Abschätzung zu betrachten. Aus den Daten kann allerdings sicher geschlossen werden, dass der Abstand nicht *kleiner* als 5 nm sein kann.

Prinzipiell ist eine Distanzmessung von LHCII - Doppelmutanten mit einem erwarteten Abstand von größer 5 nm demnach nur noch bedingt aussagekräftig. Auch eine Erhöhung der Proben (Label-) - Konzentration würde keine entscheidende Verbesserung der Auswertung bewirken, da ab einer Beobachtungszeit von größer 3 μ s bereits die willkürliche Relaxation einzelner Spin (vgl. Beschreibung der ESR - Spektroskopie in der Einleitung) beginnt, was zu einer Reduzierung des ESR - Nutzsignals führt. Dies sollte in der Zukunft bei der Auswahl neuer LHCII - Mutanten berücksichtigt werden.

Interpretation der erhaltenen DEER - Spektren

Wie schon im Ergebnisteil dieser Arbeit kurz beschrieben, wurden die mittels der Vier - Puls - ESR - Messung erhaltenen DEER - Spektren mit von Dr. Jeschke selbst erstellten Programmen im Sinne einer Direkten Transformation in die bereits dargestellten Abstandsverteilungen umgerechnet. Dabei wurden Hermit - Interpolationen benutzt. Wie in Abbildung 53 und 56 des Ergebnisteils gezeigt, führte eine Auswertung der Spektren mit Interpolationen höherer Ordnung zu unrealistischen Ergebnissen. Hier wurde eine unreal hohe Auflösung erhalten, bei der die distinkten Maxima der Abstandsverteilung als rein mathematisches Artefakt anzusehen sind. Dies konnte, wie im Ergebnisteil schon angeführt, mit Hilfe von Simulationen mit Modellverteilungen verifiziert werden. Schließlich ergab sich, dass für alle Mutanten außer des Klons S106C,S160Ch, dessen DEER - Spektren eine Auswertung 2. Ordnung erlaubten, nur Interpolationen 1. Ordnung zu sinnvollen Ergebnissen führten. Bei Interpolationen 1. Ordnung wurden zunächst 9 äquidistale Stützstellen definiert und danach die Abstandsverteilung zwischen diesen Stützstellen durch hermitesche Interpolation angenähert. Bei Auswertungen nach 2. Ordnung wurden 17 solcher Stützstellen verwendet. Die Werte an den Stützstellen wurden durch Minimierung der quadratischen Abweichung zwischen dem experimentellen Signal und dem für die interpolierte Abstandsverteilung simulierten Signal angepasst. Zudem wurde anhand mehrerer systematischer Vergleichsmessungen mit bezüglich des Abstands wohl definierten synthetischen organischen Systemen sichergestellt, dass durch diese Art der Auswertung sinnvolle, probenspezifische Abstandsverteilungen resultierten, und eine Überinterpretation der Rohdaten somit vermieden wurde (vgl. Jeschke *et al.* 2004a *in press*). Dennoch bleiben gewisse Bedenken bei der Interpretation der DEER - Spektren. Die Wahl der Position der Stützstellen kann die spätere Gestalt der Abstandsverteilungen beeinflussen. Ist das Nutz- zu Rauschsignal - Verhältnis, wie am Beispiel der Mutante S3C,S106C bereits beschrieben, zu gering, ist die Angabe einer Abstandsverteilung nur noch unter Vorbehalt möglich.

Eine Sicherheit in Bezug auf die Angabe solcher Verteilungen ergab sich allerdings aus der Tatsache, dass für alle übrigen vermessenen LHCII - Doppelmутanten mehrere Datensätze (von 2 bis 17) ermittelt wurden, die im Anschluss zur Bestimmung mittlerer Abstandsverteilungen benutzt wurden.⁶² Solche gemittelten Verteilungen können mit größerer Genauigkeit angegeben werden, da sich hier Unsicherheiten einzelner Messungen zum Einen durch den Vergleich der einzelnen Datensätze abschätzen lassen und zum Anderen im Endergebnis zumindest teilweise ausmitteln. Durch diese Mehrfachbestimmung war es im Anschluss an die Auswertung der Ergebnisse im Rahmen des Ergebnisteils möglich, den charakteristischen Verlauf einzelner Abstandsverteilungen näher zu beschreiben. Es konnte zwischen monomodalen und bimodalen Verteilungsmustern differenziert werden, das heißt zwischen Mustern, die auf eine bzw. zwei diskret voneinander unterscheidbare Konformationen des LHCII hinweisen.

⁶² Dies war aufgrund der geringen Streuung der verschiedenen Einzelmessungen möglich. So betragen die σ_r - Werte der verschiedenen Mutanten (als Maß für die Streuung der einzelnen Datensätze) meist nur +/- 0,05 nm (vgl. der Tabellen 28 - 38 des Ergebnisteils), was ein eindeutiges Indiz für die hohe Güte der durchgeführten ESR - Messungen darstellt.

Diese Hinweise aus den erhaltenen DEER - Spektren konnten in der Folge mittels einer Re - Modellierung der Struktur mit dem Programm *Modeller* überprüft werden. Dabei wurde in einem ersten Schritt zunächst anhand bekannter, konformativ mehr oder minder festgelegter Abstandsintervalle (wie zum Beispiel dem Intervall der Mutante S106C,S160Ch, welches näherungsweise dem bekannten Membranabstand zwischen beiden Bestandteilen der Thylakoidmembran entspricht), die prinzipielle Gültigkeit der ermittelten ESR - Daten überprüft und danach in einem zweiten Schritt versucht, unaufgelöste Strukturbereiche mit Hilfe der neuen Abstandsinformationen aufzuklären. Eine solche Vorgehensweise erscheint als dringend erforderlich, um die zuvor im Text geäußerten Unsicherheiten der Auswertung der ESR - Spektren endgültig zu überwinden und so definierte Aussagen bezüglich der Konformation des LHCII aus diesen Messungen herauszuarbeiten.

4.2.1.2 Vorteile der ESR - Spektroskopie

Das seit 1994 bekannte Strukturmodell des LHCII gilt streng genommen nur für Kristalle nativer Trimere. Über die definitive Struktur von LHCII - Monomeren gibt es bislang keine genauen Angaben. Die Grundzüge der von Kühlbrandt angegebenen Struktur gelten zwar sicherlich auch für Monomere, dennoch ist es denkbar, dass Teilstrukturen in dieser Vorform des Trimeres nicht die gleiche Konformation aufweisen. Solche Strukturen würden dann während des Prozesses der Oligomerisierung ihre Form verändern. Dies ist aufgrund neu auftretender Wechselwirkungen zwischen den Monomer - Untereinheiten im LHCII - Trimer sogar sehr wahrscheinlich. Zudem ist davon auszugehen, dass in der oligomeren Form des Trimeres prinzipiell eine wesentlich dichtere (kompaktere) und starrere Packung der Proteinstruktur der Monomeruntereinheiten vorliegt. Hier werden alle zuvor mehr oder minder beweglichen Strukturen, wie die jeweiligen Termini und Schleifenregionen **wahrscheinlich** generell wesentlich starrer angeordnet und ihre Freiheit somit stark eingeschränkt sein. Gerade die aminoterminalen Region wird von solchen konformativen Veränderungen während der Oligomerisierung stark betroffen sein. Wie bereits beschrieben, liegen hier funktionell wichtige Bereiche, wie das Trimerisierungsmotiv (vgl. Hobe 1995) oder die Kinase - Bindestelle (vgl. Allen 1992 a und b). So ist es ein entscheidender Nachteil der bislang durchgeführten Kristallographie, dass gerade diese Region nicht aufgelöst werden konnte.⁶³ Mit Hilfe der Vier - Puls - DEER - Messungen am LHCII ist es im Zusammenhang mit dieser Arbeit möglich geworden, neue Erkenntnisse über diese wichtige aminoterminalen Region zu sammeln.

Dabei ist allen weiteren Überlegungen voranzustellen, dass diese Methode einen wichtigen Vorteil gegenüber der elektronenkristallographischen Strukturklärung (vgl. Kühlbrandt) aufweist. Alle ESR - Distanzmessungen können „in Lösung“ durchgeführt werden.

Das bedeutet, dass hier keine eventuell strukturverändernde Kristallisation im Vorfeld der Untersuchungen steht und es gerade dadurch möglich wird, den

⁶³ Auch das 2004 von Liu *et al.* veröffentlichte neue Strukturmodell des LHCII bei 2.72Å kann dies nicht leisten. Mit Hilfe der dort gezeigten Röntgenstruktur des LHCII konnte der Aminoterminus lediglich bis zur Aminosäure Serin¹⁴ angegeben werden.

LHCII in einer „nativeren Form“ zu analysieren als im Kristall. Es ist zu vermuten, dass so eine höhere Vielfalt an verschiedenen Konformationen erfasst werden kann, die eventuell zuvor bei anderen Methoden wie der Elektronenkristallographie bereits im Vorfeld der Messungen verloren ging. Da zu Beginn der ESR - Messungen zudem alle Proben bei 15 Kelvin schockgefroren werden, kann davon ausgegangen werden, dass zuvor erzeugte konkrete konformative Zustände des LHCII auf diese Art und Weise „festgehalten“ werden können und sich anschließend während der Messung nicht mehr verändern. Ein solcher weiterer Vorteil gegenüber der Kristallisation könnte in Zukunft dazu benutzt werden, Zwischenstufen der Faltung dieses Pigment - Proteinkomplexes konkret zu untersuchen.

Ideal wäre es natürlich, den LHCII in einer natürlichen Lipidumgebung, analog zum Aufbau der Thylakoidmembran zu untersuchen. Dies scheint aber zum momentanen Zeitpunkt nicht möglich zu sein. Bislang ist es nicht realisierbar, solche hoch konzentrierte Proben an TEMPO - gelabelten LHCII in Proteoliposomen (als Analogon zur Thylakoidmembran - Umgebung) zu inserieren.⁶⁴ Die ESR - Distanzmessung von LHCII - Proben *in Detergenzlösung* stellt somit zum momentanen Zeitpunkt die beste Möglichkeit für eine solche Konformationsanalyse dar.

4.2.2 Die Konformation des Aminoterminus des LHCII

Nach dieser eher methodischen Erörterung der während dieser Dissertation durchgeführten ESR - Distanzmessung soll nun die Diskussion der erzielten Ergebnisse erfolgen.

Ein erklärtes Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse bezüglich der dynamischen Konformation des Aminoterminus des LHCII zu gewinnen.

Diese Region des LHCII hat sehr vielfältige Aufgaben. Zwar haben sowohl eigene in anderem Zusammenhang durchgeführte Experimente, als auch Ergebnisse anderer Forscher (etwa Nußberger *et al.* 1993) gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist, den N - Terminus des LHCII mittels Proteasen vollständig zu entfernen, ohne dass davon die Physiologie des LHCII - Monomers betroffen würde. Der Komplex ist weiterhin in der Lage, Energie von Chlorophyll *b* nach Chlorophyll *a* zu übertragen und verliert zudem auch nichts von seiner Pigmentausstattung. Selbst die Orientierung der Pigmente am Proteingrundgerüst scheint davon unbetroffen, was anhand von CD - Spektren (Daten nicht dargestellt) gezeigt werden konnte.

Dennoch erscheint der N - Terminus in anderem Zusammenhang interessant. Er vermittelt offenbar verschiedene Interaktionen des Pigment - Protein Komplexes mit seiner Umgebung, die hier nochmals kurz in Erinnerung gerufen werden sollen:

Erstens werden über solche Interaktionen, wahrscheinlich in direktem Zusammenhang mit der Bindung des Phospholipids PG über das Trimerisierungsmotiv an Aminosäure - Position 16 bis 21 (Hobe *et al.* 1995), die drei Monomer - Untereinheiten des Trimers miteinander verknüpft.

⁶⁴ Im Rahmen einer Dissertation von Frau Stephanie Boggasch wird dieses Problem gerade in der Arbeitsgruppe Paulsen der Universität Mainz bearbeitet.

Zweitens ist bekannt, dass die Phosphorylierung des LHCII im Rahmen der „state transition“ über einer Threonin - Kinase - Bindestelle an Position 5 des Aminoterminus vermittelt wird (vgl. Allen 1992 a und b).

Drittens wird der Prozess der Grana - Stapelung wahrscheinlich über die Exposition von negativ geladenen Aminosäuren zwischen Aminosäure 29 und 53 in Zusammenhang mit Magnesium - Ionen vermittelt (Trémolières 1998).

Was ist die gemeinsame Voraussetzung für solche Interaktionen des Aminoterminus mit seiner Umgebung ?

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die räumliche Exposition dieser Region im Zusammenhang mit diesen vielfältigen Wechselwirkungen prinzipiell von besonderer Bedeutung sein könnte. Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass man bei der Modellierung des LHCII - Monomers mit Hilfe der ESR - Distanzmessungen eine distinkte Struktur finden kann, bei der der N - Terminus in einer höheren, exponierteren Ebene oberhalb der gedachten Membran in einem relativ eng begrenzten räumlichen Bereich angeordnet ist (vgl. Ergebnisteil Abb. 88: Modell A). Wie bereits im Zusammenhang der Beschreibung dieser Modellierung gezeigt wurde, existiert diese Struktur auch im LHCII - Trimer. Eine solche räumliche Festlegung könnte unter anderem eine generelle Voraussetzung für die Interaktion des Pigment - Protein - Komplexes mit seiner Umgebung sein.

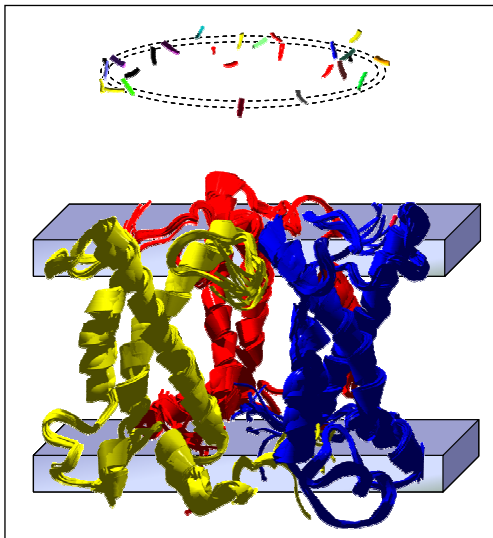


Abb. 93:

Darstellung einer aus mehreren Einzelmodellen der ersten Modellierung (unter der Annahme, dass sich die drei Aminotermini der Monomer - Untereinheiten im Trimer konformativ gleich verhalten) zusammengesetzten Trimer - Struktur. Zur besseren Orientierung wurde die Thylakoidmembran schematisch eingefügt. Die aminoterminalen Positionen 3 der Monomer - Untereinheiten sind als Punktwolke dargestellt und ordnen sich ringförmig oberhalb des Trimers an.

Wie die Abbildung zeigt, sind die N - terminalen Positionen 3 der Monomer - Untereinheiten ringförmig oberhalb des Trimers räumlich eng begrenzt angeordnet. Neben dieser Konformation des LHCII - Monomers, die auch im Trimer existent ist, wurde, wie bereits im Kontext der zweiten Modellierung im Ergebnisteil geschildert, ein zweites Konformer gefunden, das es offenbar nur in Form des LHCII - Monomers gibt. Wie anhand der Abb. 88 des Ergebnisteils zu erkennen ist, ist bei diesem Modell der Aufenthaltsort des Aminoterminus in einer niedrigeren Ebene im Vergleich zur Membran angeordnet und scheint insgesamt schlechter definiert zu sein (breitere Verteilung im Raum) als bei dem oben beschriebenen Typ A.

Warum findet man zwei distinkt unterscheidbare Konformere und nicht ein Kontinuum aus vielen unterschiedlichen Formen oder lediglich eine klar definierte Struktur?

Auf diese Frage kann anhand der experimentellen Befunde keine konkrete Antwort gegeben werden. Offensichtlich handelt es sich bei den beiden ermittelten Strukturen um zwei aminotermiale Vorzugskonformationen, die sich begünstigt bei Rekonstitutionen unter Standardbedingungen bilden.⁶⁵ Dass sich nur zwei distinkt unterscheidbare Konformere bilden und nicht mehr oder weniger, kann funktional allerdings sinnvoll sein, wenn man noch einmal konkret an die bereits genannten Wechselwirkungen des LHCII mit seiner Umgebung denkt. Alle beschriebenen Interaktionen, angefangen von der Grana - Stapelung bis hin zur Phosphorylierung bedingen nicht nur eine starke Exposition des Aminoterminus, wie sie bereits genannt wurde, sondern zusätzlich eine weitere eng definierte räumliche Festlegung der Struktur. Um Interaktionen mit einem Enzym, also einem weiteren Protein- bzw. Proteinkomplex zu ermöglichen, sollte seine Zielstruktur nicht „irgendwie“ im dreidimensionalen Raum angeordnet sein. Eine effiziente Interaktion innerhalb kurzer Zeit, wie sie etwa im Zusammenhang mit dem Prozess der *state transition* gefordert werden muss, wird nur dann effizient ablaufen können, wenn sich beide Reaktionspartner, also Aminoterminus und Kinase (bildlich gesehen) schnell finden. Dazu ist unter anderem auch eine klar definierte Konformation des „Targets“ LHCII notwendig. Ein Kontinuum aus vielen verschiedenen Strukturen würde einen solchen Prozess erschweren.⁶⁶

Umgekehrt wäre es auch ungünstig, wenn es nur eine einzige Konformation des Aminoterminus gäbe. Dies würde die Möglichkeiten von Interaktionen dieser Region zu stark begrenzen. Zum Beispiel bewiesen Yang *et al.* im Jahr 2000, dass eine unterschiedliche Zugänglichkeit des Aminoterminus bezüglich der Chloroplasten - eigenen natürlichen Proteasen bei Monomeren und Trimeren gegeben ist. Dies führt dazu, dass vor allem Monomere verstärkt von solchen Enzymen angegriffen werden können. Trimere sind weitgehend geschützt. Eine solche abgestufte Reaktivität ist nur durch das Vorhandensein verschiedener Konformationen des N-Terminus möglich. Mit nur einer einzigen 3D - Struktur für beide Komplextypen wäre dies nicht zu bewerkstelligen. Bei dem hier gewählten Beispiel könnte eine Änderung der Konformation das entscheidende Startsignal für einen von der Pflanze gewollten Abbau des LHCII, etwa nach starken Beschädigungen des Systems durch Starklicht oder anderer Prozesse wie z.B. dem Blattabwurf sein. Solche Vorgänge sind für die Pflanze essentiell und müssen sehr genau reguliert werden. Neben der Aktivierung und Deaktivierung der beteiligten Enzyme wäre dazu auch eine Regulation der Konformation des Zielproteins denkbar.

⁶⁵ Zudem ist natürlich denkbar, dass sich unter den beiden beobachteten und hier diskutierten Vorzugskonformationen beliebig viele kleinere Subpopulationen verbergen, die nur aufgrund der „Rest-Unschärfe“ der Messungen für den Betrachter verborgen bleiben.

⁶⁶ Zu Bedenken wäre, dass ein völlig „ungeordneter“ Aminoterminus in seinem entfalteten Zustand aufgrund seiner reinen Kettenlänge viele verschiedene aminotermiale Aufenthaltswahrscheinlichkeiten in der räumlichen Form einer Kugel mit einem Radius von etwa 3 bis 4 nm (überschlagsweise gerechnet von Aminosäure 1 bis 14) um einen gedachten Mittelpunkt bei Aminosäure 13 herum zulassen würde (Einschränkungen aufgrund von Wechselwirkungen mit der Membran etc. einmal ausgenommen).

Warum findet man bereits bei der Untersuchung von LHCII - Monomeren zwei konformative Spezies und nicht nur die lediglich als Monomer existente Form?

Auch hier kann anhand der durchgeführten Versuche nur eine Vermutung angegeben werden. Offenbar liegt bereits bei der Vermessung von LHCII - Monomeren ein Konformationsgleichgewicht zweier energiegelicher Strukturen vor. Ein Erklärungsansatz für dieses Phänomen wäre, dass in dem für die *in vitro* - Rekonstitution benutzten Totalpigmentextrakt noch genügend mit den Pigmenten mitextrahiertes Phosphatidylglyzerin enthalten war (vgl. Material und Methoden Abschnitt 2.4), so dass ein Teil des Apoproteins eventuell bereits während der Rekonstitution PG aufnehmen konnte. Dies müsste nachfolgend zur Veränderung der aminoterminalen Struktur der resultierenden Komplexe geführt haben. Bezogen auf den gesamten Versuchsansatz wäre dann bei der ESR - Messung ein konformatives Gleichgewicht zwischen energiegelichen Komplexen mit- und ohne PG zu erwarten, da vor der eigentlichen Distanzmessung keine Trennung der beiden Spezies erfolgte. Dies ist wahrscheinlich ein Grund für die beobachteten bimodalen Verteilungen der Mutanten S3C,S160Ch, S3C,S52Ch und S52C,S160Ch, kann aber nicht eindeutig experimentell bewiesen werden. Allerdings ergaben sich durch ein weiteres Experiment dieser Arbeit deutliche Hinweise, welche die oben genannte These unterstützen. So zeigte sich bei der Untersuchung des Einflusses von Einzellipiden während der Rekonstitution im Zusammenhang mit der Mutante S3C,S160Ch, dass es nur durch die Zugabe von PG zu einer signifikanten konformativen Änderung der aminoterminalen Region kommt. PG führt zu einer leichten Verschiebung des Abstandensembles hin zu kürzeren Abständen. Mit anderen Lipiden der Thylakoidmembran, insbesondere dem für die Kristallisation wichtigen DGDG, ist eine solche Veränderung nicht erkennbar (vgl. Kapitel 3.2.4.2.3).

Konsequent weitergedacht, könnte diese Interaktion mit PG zu einem „Schalten“ zwischen den beiden ansonsten energetisch gleichen Konformeren führen. Je nachdem, wie viel PG im Ansatz vorhanden ist, findet eine solche Konversion mehr oder minder vollständig statt. Da aber selbst ausschließlich mit PG rekonstituierte LHCII - Komplexe im Rahmen dieser Arbeit immer noch beide Konformere zeigen, ist davon auszugehen, dass noch weitere Effekte für diesen „Switch“ verantwortlich sind.

Prinzipiell wird aber durch diese Befunde die strukturelle Bedeutung des Phospholipids PG in Bezug auf die Konformation und Organisation des LHCII (vgl. Tremolieres 1991 und Kruse 2001) weiter untermauert: Die Bindung des PG scheint zu einer Konformationsänderung des Aminoterminus und so zu einer deutlicheren Exposition dieser Region der drei Monomer - Untereinheiten zu führen. Dadurch werden diese Termini so entscheidend zusammengeführt, dass eine Oligomerisierung möglich wird. PG könnte dann während des darauf folgenden eigentlichen Prozesses der Trimerisierung als eine Art „Klebstoff“ zwischen den Monomeren fungieren, wie es bereits von Kruse *et al.* in anderem Zusammenhang gezeigt werden konnte (vgl. Kruse et al. 2000).

Welche weiteren Faktoren beeinflussen die Konformation des Aminoterminus ?

Wie bereits beschrieben, vermuten einzelne Forscher im Zusammenhang mit dem Prozess der LHCII - Phosphorylierung im Rahmen der „*state transition*“ eine konformative Änderung des Aminoterminus des LHCII (Zer 1999, Ohad 2001). In diesem Zusammenhang werden zwei Prozesse genannt, die während dieses Vorgangs durch Licht vermittelt und reguliert werden sollen: Erstens die Interaktion des LHCII mit der Kinase selbst im Sinne einer Konformationsänderung (Nilsson *et al.* 1997) und zweitens die Aktivierung des Enzyms (Zer 1999). Zur Untermauerung dieser Vermutung wurden meist Versuche mit Proteasen angeführt. So zeigte sich, dass eine Bestrahlung mit Licht zu einer besseren Zugänglichkeit des Aminoterminus für die Protease Trypsin führte. Auch diesem Prozess wird eine Reversibilität in der Dunkelheit zugeschrieben.

Leider war es im Zusammenhang mit dieser Arbeit nicht möglich, phosphorylierten LHCII in direktem Vergleich mit nicht - phosphorylierten LHCII zu vermessen. Ähnlich wie im Zusammenhang mit LHCII - Proteoliposomen ist hierbei die für die ESR - Untersuchung geforderte hohe Probenkonzentration zur Zeit nicht experimentell erzielbar. Zudem ist es bislang nur unzureichend gelungen, beide Spezies voneinander zutrennen, um wirklich „sortenreine“ Komplexe vor und nach einer Phosphorylierung vermessen zu können. Auch hier ergeben sich aber interessante Möglichkeiten für zukünftige Experimente.

Alternativ zu diesen Experimenten wurde während dieser Arbeit versucht, den Einfluss des Lichts auf den Aminoterminus des LHCII direkt zu erforschen (vgl. Ergebnisse Kapitel 3.2.4.2). Hierbei zeigte sich allerdings, dass eine Bestrahlung von 100 μE für 1,5 Minuten keinen Effekt auf die Konformation des LHCII ausübte. Völlig dunkel gelagerte Proben verhielten sich ebenso wie die bestrahlten Varianten. In diesem Zusammenhang stellt sich allerdings die Frage, ob dieser „Nicht-Befund“ lediglich aufgrund von ungünstigen Reaktionsbedingungen bzw. einem zu Wenig an Licht zustande kam. Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben (vgl. Abschnitt 3.2.4.2.1), wurde die eigentliche Bestrahlung der aufkonzentrierten LHCII - Proben in den ESR - Röhrchen durchgeführt. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass LHCII - Komplexe im Zentrum dieser Röhrchen geringeren Mengen an Licht ausgesetzt waren als den oben angegebenen 100 μE . Nur für Komplexe direkt an der Glaswand der Röhrchen kann definitiv von einer Bestrahlung mit exakt 100 μE ausgegangen werden. Zudem könnte die Bestrahlung des LHCII mit dieser Lichtmenge für 1,5 Minuten prinzipiell zu gering ausgefallen sein. Die hier benutzte Lichtintensität wurde vor allem aufgrund von Experimenten und Anleitungen von Itzhak Ohad (vgl. Ohad 2001) und Carmen Herchenhein⁶⁷ gewählt und sollte laut deren Erfahrungen prinzipiell ausreichen, um eine Konformationsänderung des Aminoterminus hervorzurufen. Andererseits findet man in den oben bereits genannten Veröffentlichungen andere experimentelle Befunde, die darauf hindeuten, dass erst eine Bestrahlung von 400 μE zu einer konformativen Änderung des N - Terminus des LHCII führt. Zer *et al.* stellten in diesem Zusammenhang fest, dass es bei einer solchen Bestrahlungsintensität nach 20 Minuten zu

⁶⁷ Carmen Herchenhein ist zur Zeit ebenfalls Doktorandin der Arbeitsgruppe und bearbeitet folgendes Dissertationsthema: „*Konformationsänderung des Haupt-Licht-Sammlerkomplexes (LHC II) aus der Erbse durch die Phosphorylierung des N-Terminus*“. Sie wurde als Experte für diese Art von Experimenten hinzugezogen.

einem drastischen Abfall der Phosphorylierungsrate von Proben kam, was sie auf eine Konformationsänderung der N - Termini des LHCII zurückführte (Zer *et al.* 1999).

Somit kann aufgrund des eben genannten und der derzeitigen experimentellen Lage bislang noch nicht endgültig darüber entschieden werden, ob überhaupt und wenn ja, welche Bestrahlungsintensität nun exakt zu einer konformativen Änderung des Aminoterminus geführt hätte bzw. ob den hier erzielten experimentellen Ergebnissen Glauben geschenkt werden darf. Dies müsste in erneuten, systematischeren Experimenten mit unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten und -zeiten und zunächst unter wenn möglich exakt gleichen Versuchsparametern wie bei Zer *et al.* angegeben, geprüft werden. Es sei an dieser Stelle aber darauf hingewiesen, dass die während dieser Arbeit etablierte Methode der ESR - Messungen am LHCII offenbar ein hohes Erfolgspotential für eine solche Fragestellung aufweist.

Dennoch ergeben sich bereits jetzt interessante Parallelen der eigenen Ergebnisse mit Befunden bzw. Vermutungen der Literatur. Nilsson *et al.* beschrieben 1997 recht exakt eine hypothetische Änderung der drei - dimensionalen Struktur des Aminoterminus des LHCII in Folge der lichtabhängigen Phosphorylierung.

Wie in der Einleitung dieser Arbeit bereits angesprochen, führte die Zugabe von Phosphat bei synthetischen Peptiden mit einer Sequenzhomologie zum Aminoterminus des LHCII zu einer Zunahme der α - Helikalität dieser Region. Es wird vermutet, dass durch diese N - terminale Phosphorylierung die Interaktion mit dem Lipid PG verloren geht (Verlust der Trimerseigenschaft bei phosphoryliertem LHCII) und es infolge einer vollständigen Umkehr der Isomerisierung der beiden Proline 15 und 19 in direkter Nachbarschaft des Trimerisierungsmotives zu einer Konformationsänderung kommt. Dadurch wird der Aminoterminus des LHCII in Richtung der Membran „eingestülpt“. Es wird vermutet, dass daraufhin Interaktionen mit PG verloren gehen, was zum sofortigen Zerfall der Trimere führt. Der LHCII wird freigesetzt und kann daraufhin vom PSII zum PSI wandern (Prozess der *state transition*: siehe Ausführungen in der Einleitung dieser Arbeit).

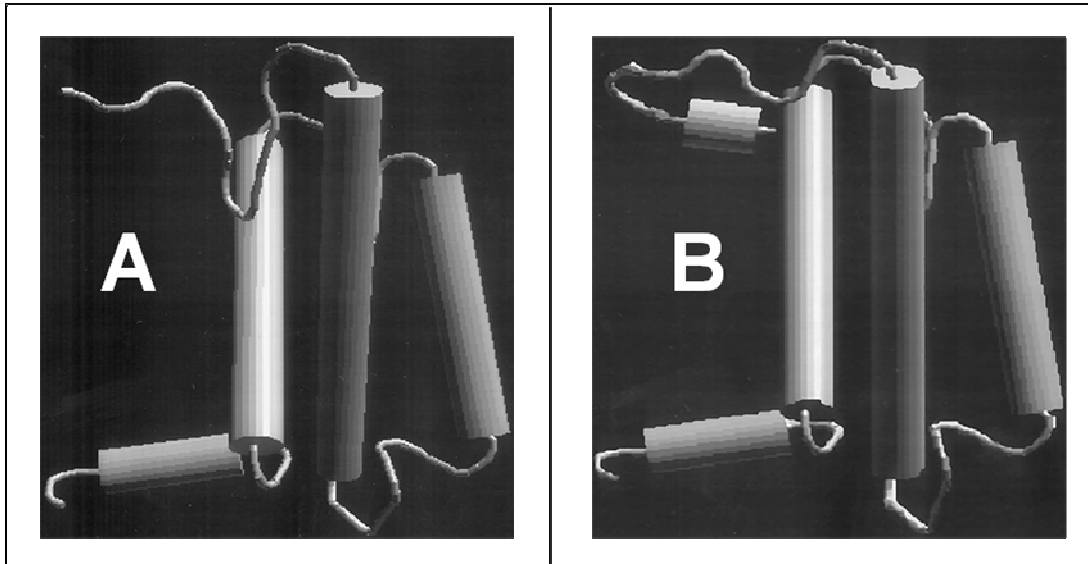


Abb. 94: Schematische Strukturmodelle des LHCII vor- und nach Phosphorylierung nach Nilsson *et al.* 1997 (verändert). **A:** Der LHCII vor der Phosphorylierung. Der Aminoterminus hat keinen Helix - Anteil. Dieses Monomer bildet aufgrund möglicher Interaktion des so exponiert angeordneten Aminoterminus Oligomere mit zwei weiteren Komplexen. **B:** Der LHCII nach der Phosphorylierung. Der Aminoterminus weist jetzt α - helikale Anteile auf und hat seine Konformation aufgrund einer möglichen Prolin - Isomerisierung verändert. Dieser Komplex kann keine Trimere mehr bilden. Dadurch wird der Komplex freigesetzt und kann so vom PSII zum PSI wandern (vgl. Nilsson *et al.* 1997).

Ruft man sich noch einmal die beiden mittels der ESR - Distanzmessungen neu modellierten Strukturen für den LHCII in Erinnerung, die bereits im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt wurden, ergeben sich sehr interessante Übereinstimmungen mit diesen von Nilsson postulierten Konformeren des LHCII.

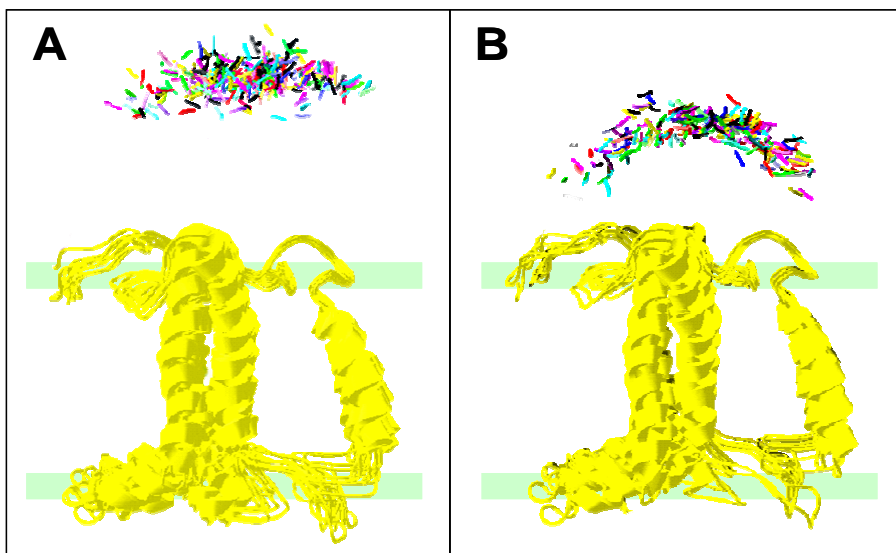


Abb. 95: Vergleich der beiden mit Hilfe der ESR - Distanzmessungen modellierten Strukturen für das LHCII - Monomer unter Angabe der Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Aminosäure 3 des N-Terminus in Form einer Punktewolke. Es wurden 250 Modelle übereinander gelegt. **A:** Ergebnis der ersten Modellierung. Diese Modelle stimmen auch mit dem Abstandsintervall, das für S3Ch - Trimere bestimmt wurde, überein. **B:** Strukturen der zweiten Modellierungsrunde. Diese Modelle erfüllen nicht das ermittelte Abstandsintervall der S3Ch Trimere, existieren somit wahrscheinlich nur als Monomere.

Wie bei dem Modell, welches Nilsson für den LHCII vor der Phosphorylierung fordert (A), kann man bei den Modellen des Typs A der eigenen Modellierung eine deutlichere Exposition des Aminoterminus erkennen. Diese Modelle erfüllen, wie bereits im Ergebnisteil erörtert, auch das Abstandsintervall des S3Ch - Trimers, und stellen somit analog zum von Nilsson beschriebenen Typ eine mögliche Konformation des LHCII dar, die zur Oligomerisierung befähigt ist. Die beiden Modelle des Typs B von Nilsson bzw. der eigenen Modellierung zeigen einen Aminoterminus, der im Vergleich zur Membranebene deutlich abgesenkt ist. Beide Typen existieren nur als Monomer, was wiederum eine starke Übereinstimmung darstellt.

Es kann somit vermutet werden, dass es sich bei den von Nilsson *et al.* mit Hilfe der Anwendung (u.a.) der NMR - Spektroskopie beschriebenen Konformeren des LHCII um eventuell die gleichen Strukturen handelt, wie sie in dieser Arbeit beschrieben werden konnten.⁶⁸ Die Kombination beider Ergebnisse erhärtet zudem die bereits angegebene Hypothese, dass es sich bei den beiden in dieser Arbeit ermittelten Konformeren um zwei reale Vorzugskonformationen des LHCII handelt. Um diese Hypothese zu klären, müssten allerdings weitere Versuche in diesem Zusammenhang durchgeführt werden.

4.2.3 Der Einfluss von Carotinoiden auf die Konformation des LHCII

Wie in der Einleitung dieser Arbeit bereits kurz angesprochen, hatte sich während der eigenen Diplomarbeit im Jahr 1999 gezeigt, dass es durch die Rekonstitution von LHCII mit nur einem einzigen Carotinoid zu Veränderungen des Komplexes gekommen war. Die Ergebnisse der nativen Gelelektrophorese, aber auch Versuche mit Proteasen ließen darauf schließen, dass sich die Konformation des gesamten Komplexes verändert haben musste (vgl. Abb. 8 der Einleitung). Komplexe, die nur mit Lutein bzw. Zeaxanthin erzeugt worden waren, zeigten dabei besonders deutliche Auffälligkeiten. Sie wiesen eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit in der durchgeführten nativen LDS - PAGE auf. Dem entgegen standen Komplexe mit Neoxanthin, Violaxanthin und Zeaxanthin die, analog zur Kontrolle mit nativer Xanthophyllmischung, diese Auffälligkeiten nicht zeigten. Gegenüber der Protease Trypsin schien das Verhalten hingegen invers zu sein. Hier zeigten die Komplexe mit Lutein und Zeaxanthin keine Veränderung, Komplexe mit Neoxanthin und Violaxanthin wurden schneller verdaut als die Kontrolle mit Gesamt-xanthophyll. Drittens zeigten Bestrahlungsversuche, dass die mittlere Lebensdauer dieser Komplexe deutlich niedriger lag, als bei den Komplexen mit Lutein, Zeaxanthin bzw. nativer Mischung der Xanthophylle.

⁶⁸ Hierzu konvenieren die Ergebnisse in Zusammenhang mit den durchgeführten Einzellipid - Versuchen: PG, also das für die Trimerisierung mit verantwortliche Lipid, führt, wie bereits beschrieben, als einziges Lipid zu einer leichten Verschiebung des Konformationsensembles hin zu kürzeren Abständen, also hin zur Membranebene. Übertragen auf die Modelle von Nilsson *et al.* würde sich daraus folgende Hypothese ergeben: Modell A (vor Phosphorylierung / LHCII - Trimer) würde dann die Konformation mit gebundenem PG darstellen und Modell B (nach Phosphorylierung / LHCII - Monomer) hätte „als Monomer“ sein PG verloren. Für diese Hypothesen existieren allerdings keine realen experimentellen Beweise.

In den Jahren 1999 und 2000 erschienen mehrere Veröffentlichungen, in denen die verschiedenen Bindestellen des LHCII für Carotinoide näher charakterisiert wurden (Croce *et al.* a und b 1999; Bassi *et al.* 2000; Jahns *et al.* 2001; Caffarri *et al.* 2001; Phillip *et al.* 2002).

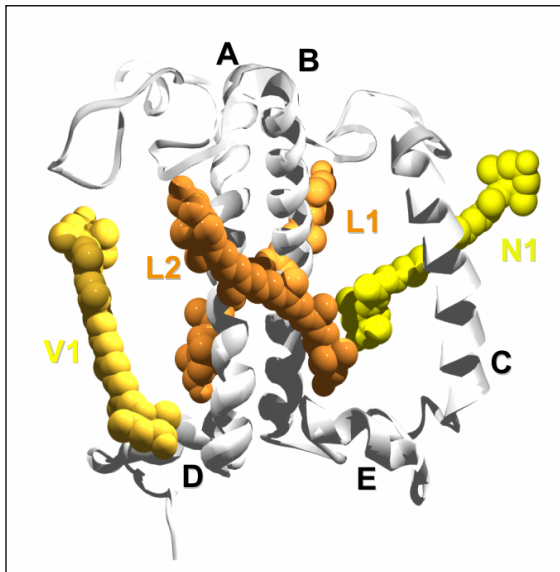


Abb. 96:

Modell des LHCII unter Angabe der 1999 bis 2002 näher charakterisierten und 2004 bestätigten Xanthophyll - Bindestellen für Lutein (L1 und L2) bzw. Neoxanthin (N1) und Violaxanthin (V1). Auf die Angabe der Chlorophyllmoleküle wurde aus Gründen der besseren Darstellung verzichtet. (siehe auch Croce *et al.* 1999 a bzw. Liu *et al.* 2004)

Diese Angaben wurden durch die 2004 veröffentlichte Kristallstruktur von Liu *et al.* weitgehend bestätigt. Neben den beiden bereits von Kühlbrandt 1994 angegebenen Lutein - Bindestellen im zentralen Helixkreuz konnte eine weitere Bindestelle für das Pigment Neoxanthin in der Nähe der Helix C beschrieben werden, ebenso eine Bindestelle für das Xanthophyll - Zyklus - Pigment Violaxanthin in der N - terminalen Region. Für jede dieser Bindestellen wurde zudem eine definierte Affinität für die einzelnen Xanthophylle angegeben. So werden in die L1- und L2- Bindestellen bevorzugt Lutein eingebaut, es können aber auch die Pigmente Violaxanthin und Zeaxanthin verwendet werden. Neoxanthin kann diese Bindestellen nicht besetzen (vgl. Croce *et al.* 1999 a).⁶⁹ Die N1 - Bindestelle bevorzugt hingegen Neoxanthin und kann die übrigen genannten Xanthophylle nur instabil aufnehmen. Des Weiteren wurden für die verschiedenen Bindestellen konkrete Funktionen beschrieben, die an dieser Stelle nicht von Bedeutung sind.

Anhand der neuen Erkenntnisse bzgl. der Xanthophyll - Bindung am LHCII kann heute folgender Erklärungsansatz für die Ergebnisse der eigenen Diplomarbeit gegeben werden. Die beiden Einzelxanthophyll - Komplexe mit Lutein und Zeaxanthin könnten aufgrund der nicht besetzten bzw. nur schwach besetzten N1 - Bindestelle ihre Konformation verändert haben, was ihre schnelle Migrationsgeschwindigkeit auf der PAGE erklären würde. Des Weiteren kann der schnellere Verdau der Neoxanthin- und Violaxanthinkomplexe in Bezug auf ihr Verhalten gegenüber Trypsin heute so erklärt werden, dass bei Ihnen die L1- und L2 - Bindestellen nur schwach bzw. nicht besetzt wurden, was zu einer besseren Zugänglichkeit der Proteinstruktur für die Protease geführt haben muss. Hier scheint die Konformation des Pigment - Protein - Komplexes nachhaltig gestört zu sein. Croce *et al.* beschreiben zwar, dass es prinzipiell nicht

⁶⁹ Lediglich in Form des nicht nativen *trans* - Neoxanthin ist eine allerdings nicht sehr stabile Bindung in die L1 - Bindestelle möglich. Das native *cis* - Isomer des Neoxanthin ist dazu, wie oben beschrieben, nicht in der Lage.

möglich sei, LHCII allein mit Neoxanthin zu rekonstituieren (1999 a). Versuche der eigenen Arbeitsgruppe haben hingegen gezeigt, dass dies mit dem *trans*-Isomer des Neoxanthins, welches unvermeidbar bei Pigmentextraktionen zu etwa 5 bis 10% aus *cis*-Neoxanthin entsteht, durchaus möglich ist. Dieses *trans*-Neoxanthin bindet sehr schwach in die L1 - Bindestelle des Komplexes, was dazu führt, dass LHCII - Komplexe entstehen können, die allerdings insgesamt äußerst instabil sind. Da es sich aber letztlich nur bei *cis*-Neoxanthin um die eigentlich native Form dieses Carotinoids handelt und dieses Pigmentisomer, wie beschrieben, präparativ in Reinform ohne Isomerisierung praktisch nicht zugänglich zu sein scheint, wurden die meisten weiteren in der Literatur beschriebenen Versuche zu diesem Thema mit binären Mischungen dieses Pigmentes mit anderen Pigmenten, wie Lutein oder Violaxanthin durchgeführt.⁷⁰

Carotinoide beeinflussen nicht die Konformation des Aminoterminus

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Homologie zu den Experimenten der eigenen Diplomarbeit erneut Rekonstitutionen mit nur einem einzigen Xanthophyll durchgeführt, um eventuelle Veränderung in der Konformation des LHCII ausgelöst durch diese spezielle Art der Rekonstitution mittels ESR - Spektroskopie zu überprüfen.

Es zeigte sich, dass im direkten Vergleich zu Rekonstitutionen mit einer Gesamt - Xanthophyll - Mischung keinerlei Veränderungen für die Distanz zwischen der aminoterminalen Position 3 und der stromalen Schleifenposition 160 zu beobachten waren (vgl. Ergebnisse, Abschnitt 3.2.4.2.2). Dies erklärt sich, wenn man das in Abb. 96 gezeigte Modell näher betrachtet. Keine der Xanthophyll - Bindestellen befindet sich in direkter Nähe des N - Terminus. Wäre es hier zu Veränderungen der Distanz gekommen, hätte das in Bezug auf die Gesamtkonformation des LHCII bedeutet, dass es durch die Veränderung der Xanthophyllbesetzung zu einschneidenden Veränderungen der Struktur gekommen sein müsste. Dies war offensichtlich nicht der Fall und würde auch im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen Kompetitionsexperimenten stehen (vgl. Jahns *et al.* 2001). Bezogen auf die oben beschriebenen drei Xanthophyll - Bindestellen bedeutet dies zudem, dass es für die vermessene Distanz von 3 nach 160 nicht von Belang ist, ob die N1 - Bindestelle des Komplexes belegt wird oder nicht. Die Veränderung der Migrationsgeschwindigkeit der PAGE bzw. die veränderte Zugänglichkeit für Proteasen lassen sich somit durch diese neu erzielten ESR - Messungen mit der Mutante S3C,S160Ch nicht erklären.

Neoxanthin beeinflusst die Konformation der Region um die Helix C

Um den Einfluss der Belegung der N1 - Bindestelle genauer zu untersuchen, wurden ebenfalls Experimente mit der Mutante S106C,S160Ch durchgeführt, bei denen die vermessene Distanz in direkter Nachbarschaft der N1 - Bindestelle des Neoxanthin lag. Hier zeigte sich, dass Neoxanthin einen Einfluss auf die gemessene Distanz hat.

⁷⁰ Zudem wird dadurch sichergestellt, dass die für die Stabilität des Komplexes so wichtige L1 - Bindestelle „richtig“ mit Lutein besetzt wird.

Alle anderen vermessenen Komplexe mit Lutein, Zeaxanthin, Violaxanthin bzw. einer Xanthophyll - Mischung zeigten keine Differenzen der Abstandsinformation zueinander. Dies spiegelt sich vor allem in der als Abbildung 74 (Seite 141) gezeigten Abstandsverteilung für die verschiedenen Komplexe wider, ist aber aufgrund der allgemeinen Breite der Verteilung bislang nur schlecht quantifizierbar. Durch dieses Resultat ergibt sich ein erster Anhaltspunkt zur Erklärung der veränderten Migration auf der PAGE im Fall der reinen Lutein- und Zeaxanthin - Komplexe. Bei ihnen bleibt die N1 - Bindestelle für Neoxanthin unbesetzt, was offensichtlich zu einer deutlichen Änderung ihrer Konformation führt. Dadurch ausgelöst, scheint sich ihr Laufverhalten auf der PAGE zu verändern.

- *Warum verhalten sich dann Komplexe mit Violaxanthin auf der PAGE nicht gleich zu denen mit Lutein bzw. Zeaxanthin ?*

Bei Komplexen mit Violaxanthin findet offensichtlich eine Besetzung der N1 - Bindestelle statt. Diese Tatsache war bereits ein Teilergebnis der eigenen Diplomarbeit aus dem Jahr 2000. Violaxanthin bindet allerdings nur sehr instabil in diese Bindestelle. Anhand der neuen Resultate von Snyder *et al.* 2004 wird dieser damalige Erklärungsansatz zudem bestätigt. Sie wiesen biochemisch nach, dass das (unnatürliche) 9' cis - Isomer des Violaxanthins ebenfalls die N1 - Bindestelle besetzen kann. Somit ist die Violaxanthin - Bindung in diese Bindestelle mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ursache für das differierende Laufverhalten der Violaxanthin - Komplexe im Vergleich zu denen mit Lutein bzw. Zeaxanthin auf der PAGE während der eigenen Diplomarbeit.

- *Warum erhält man für die Komplexe mit Violaxanthin nicht ebenfalls veränderte DEER - Spektren ?*

Offensichtlich ist für die Gesamtkonformation der Komplexe und somit für die Form der resultierenden DEER - Spektren neben der Besetzung der N1 - Bindestelle auch die Besetzung der L2 - Bindestelle von Bedeutung. Neoxanthin kann nicht in diese Bindestelle inserieren. Für Violaxanthin wird eine solche Bindung beschrieben. Dies könnte der Grund dafür sein, dass die ESR - Spektren für Violaxanthin denen mit Lutein, Zeaxanthin bzw. Gesamtxanthophyll gleichen.

Generell muss am Ende dieser Betrachtung gesagt werden, dass in Zusammenhang mit dem konformativen Einfluss der Carotinoide auf den LHCII noch sehr viele Fragen offen bleiben. Diese sollten durch Folgeexperimente, die eventuell zusätzlich mit den in der Literatur bereits beschrieben binären Gemischen an Carotinoiden durchgeführt werden müssten, gelöst werden. Eventuell kann dadurch der Einfluss der Besetzung der einzelnen Carotinoid - Bindestellen des LHCII auf dessen Konformation noch näher eingegrenzt werden.

Auf eine eigene Zusammenfassung der Diskussion der durchgeführten ESR - Distanzmessungen soll an dieser Stelle verzichtet werden. Diese soll im Rahmen der folgenden Zusammenfassung der gesamten Dissertation vorgenommen werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Struktur und Funktion des *Light - Harvesting - Complex II* (LHCII) höherer Pflanzen, jenes am häufigsten vorkommenden Membranproteins auf dieser Erde, konnte in den letzten Jahrzehnten weitgehend durch biochemische und spektroskopische Untersuchungen aufgeklärt werden. Durch die elektronen- bzw. röntgenkristallographischen Arbeiten von Kühlbrandt *et al.* (1994) bzw. Liu *et al.* (2004) können heute zudem etwa 94% der Struktur dieses Pigment - Protein - Komplexes präzise angegeben werden. Dies erlaubt unter anderem recht genaue Angaben bezüglich der Zahl und Bindungsart der komplexeigenen Pigmente, sowie des Prozesses der durch diese Moleküle bewerkstelligten Energietransfers innerhalb des Komplexes. Dennoch bleiben viele offene Fragen im Kontext des LHCII, von den zwei in dieser Arbeit angesprochen wurden.

In einem ersten Teil dieser Dissertation sollte anhand einer vergleichenden Bindungsstudie mit Hilfe von *in vitro* - Rekonstitutionen des LHCII zunächst geklärt werden, ob es sich bei dem von Hobe *et al.* bereits 1995 beschriebenen Trimerisierungsmotiv, einer kurzen N - terminalen Aminosäuresequenz des LHCII, die für die Oligomerisierung des Komplexes essentiell ist, auch um eine konkrete Interaktions- (Binde-) stelle für das Phospholipid Phosphatidylglycerin handelt. Dazu wurden verschiedene biochemische Analysemethoden durchgeführt. Des Weiteren sollte versucht werden, eine genaue Phospholipid - zu Protein - Stöchiometrie für den LHCII - Wildtyp im Vergleich zu den in diesem Zusammenhang verwendeten Trimerisierungsmotiv - Mutanten (nach Hobe *et al.* 1995) herauszuarbeiten. Diese vergleichende Bindungsstudie gestaltete sich im Rahmen der durchgeführten Arbeit als recht schwierig. Zwar ergaben sich im Zusammenhang der Analyse der verschiedenen LHCII - Komplexe per Dünnschichtchromatographie interessante Übereinstimmungen mit einigen Aussagen der Literatur, diese konnten aber im weiteren Verlauf der Untersuchungen nicht mit Hilfe anderer biochemischer Nachweismethoden reproduziert werden. Somit erscheint es an dieser Stelle nicht sinnvoll, konkrete Angaben zu den Unterschieden der PG - Bindung von LHCII - Wildtyp und den Trimerisierungsmotiv - Mutanten zu machen. Zudem lässt die erst vor kurzem veröffentlichte Kristallstruktur des LHCII bei 2.72 Å (Liu *et al.* 2004) vermuten, dass neben der hier untersuchten Interaktion des aminoterminalen Trimerisierungsmotivs noch weitere Aminosäurepositionen existieren, die für die Bindung des Phospholipids konkret verantwortlich sein könnten. Bei zukünftigen Versuchen sollte deshalb versucht werden, auch den Einfluss dieser Interaktionspartner auf die Bindung des PG zu klären. Eventuell ergeben sich daraus neue Erkenntnisse, die den Prozess der PG - Bindung endgültig aufklären.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte in Kooperation mit dem Max Planck - Institut für Polymerforschung Mainz mit Hilfe der Methode der Elektronenspin - Resonanz Spektroskopie versucht werden, konkrete Aussagen bezüglich der dynamischen Struktur des Aminoterminus des LHCII herauszuarbeiten. Diese N - terminale Region des Lichtsammlers vermittelt viele Interaktionen des Pigment - Protein - Komplexes mit seiner Umgebung und konnte in der bis zum heutigen Zeitpunkt vorliegenden Kristallstruktur nicht aufgelöst werden. Mit Hilfe von Distanzmessungen an zuvor TEMPO - markierten LHCII - Komplexen sollte während dieser Dissertation versucht werden, die Konformation dieser Region näher einzugrenzen. Zudem wurde der Einfluss verschiedener Versuchsparameter, wie etwa des Einflusses von Licht und der Wahl verschie-

dener Lipide bzw. Carotinoide während der Rekonstitution auf diese Konformation untersucht.

Anhand der erzielten Ergebnisse der ESR - Distanzmessungen und der im Anschluss an die Untersuchungen durchgeführte Re - Modellierung durch das Institut für Molekulare Biophysik der Universität Mainz zeigte sich, dass es zwei konkrete Vorzugskonformationen für den Aminoterminus des LHCII gibt. So existiert offensichtlich ein Konformationstyp des Aminoterminus (in der Arbeit Typ A genannt), den es sowohl in der Form des Monomers als auch der des Trimers gibt. Dieses Konformer weist einen etwas weiter oberhalb der Thylakoidmembran - Ebene exponierten Aminoterminus auf. Des Weiteren existiert ein Konformer (Typ B), bei dem dieser N - Terminus in einer etwas flacheren Ebene oberhalb der Membran angeordnet ist. Diese zweite Form existiert zudem nur in der monomeren Form des Komplexes. Anhand der ebenfalls durchgeführten Messreihe mit der Zugaben von einzelnen Lipiden während der Rekonstitution ergibt sich darüber hinaus ein erster Verdacht, dass das Lipid Phosphatidylglyzerin für die Konversion zwischen beiden Konformeren verantwortlich sein könnte. Dies müsste aber in weiteren Versuchen noch geklärt werden. Zudem könnten weitere Untersuchungen darüber Aufschluss geben, ob es sich bei den beiden ermittelten Konformationen des Aminoterminus um die einzig existierenden Formen dieser Region handelt, oder ob noch weitere Konformere in Abhängigkeit anderer Versuchsparameter beobachtet werden können. Gleichzeitig würden solche Experimente Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den ermittelten beiden Konformeren um ähnliche oder eventuell die gleichen Strukturen handelt, wie sie bereits von Nilsson *et al.* 1997 im Zusammenhang mit der Phosphorylierung des LHCII hypothetisch beschrieben wurden.

Neben diesen Untersuchungen zur Aufklärung der dynamischen Struktur des Aminoterminus des LHCII wurde des Weiteren der Einfluss verschiedener Versuchsparameter auf die Konformation des Komplexes untersucht.

So zeigte die Untersuchung des Einflusses der Zugabe verschiedener Einzelli-pide während der Rekonstitution, dass lediglich das Phospholipid PG einen geringen Einfluss auf die aminoterminal Konformation des LHCII - Komplexes hat. Andere Lipide der Thylakoidmembran führen zu keinen signifikanten Veränderungen der detektierten Abstandsverteilungen.

Welchen Einfluss Licht auf die Konformation des Aminoterminus des LHCII hat, konnte während dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Hier müssten weitere, systematische Studien vorgenommen werden. Allerdings zeigen die bereits hier vorgestellten Versuche, dass die Methode der Distanzmessung per ESR - Spektroskopie diesbezüglich ein hohes Erfolgspotential bietet und sich deshalb Folgeversuche lohnen würden.

Die Messung des Einflusses einzelner Carotinoide auf die Konformation des LHCII erbrachte zudem neue, ergänzende Erkenntnisse zu Resultaten der eigenen Diplomarbeit. So scheint sich die Konformation des gesamten Pigment - Protein - Komplexes durch die unterschiedliche Besetzung der verschiedenen Bindestellen einzelner Carotinoide im Komplex entscheidend beeinflussen zu lassen. Die Methode der *in vitro* - Rekonstitution des LHCII in Kombination mit Distanzmessungen per ESR - Spektroskopie bietet dabei eine hervorragende Möglichkeit neue Erkenntnisse bezüglich dieser Einflussnahme zu gewinnen. Auch hier sollten die bereits durchgeführten Experimente und Ergebnisse lediglich als erster Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen angesehen werden. Es ist aber auch in diesem Kontext zu erwarten, dass sich aus solchen Folgeversuchen entscheidende neue Erkenntnisse gewinnen lassen.

6 Literaturverzeichnis

Allen, F., Good, P. (1971) Acyl Lipids in Photosynthetic Systems. *Methods Enzymol.* **23**, 523-547

Allen, J. F. (1992 a) How does protein phosphorylation regulate photosynthesis? *Trends Biochem. Sci.* **17**, 12-17

Allen, J. F. (1992 b) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1098**, 275-335

Allen, J. F. & Forsberg, J. (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.* **6** (7), 317-326

Altenbach, C., Cai, K., Khorana, H. G., Hubbell, W. L. (1999) Structural features and lightdependent changes in the sequence 306-322 extending from helix VII to the palmitoylation sites in rhodopsin: a site-directed spin-labeling study. *Biochem.* **38**, 7931-7937

Altenbach, C., Marti, T., Khorana, H.G., Hubbell, W.L. (1990) Transmembrane protein structure: spin labeling of bacteriorhodopsin mutants. *Science* **248**, 1088-1092

Altenbach, C., Trabanino, R., Hideg, K., Hubbel, w. (2001) Estimation of intersidue distances in spin labeled proteins at physiological temperatures: experimental strategies and practical limitations. *Biochem.* **40**, 15471-15482

Barber, J. (1998) Photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1365**(1-2), 269-277

Barber, J. & Kühlbrandt, W. (1999) Photosystem II. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 469-475

Bassi, R., Caffarri, S. (2000) Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light harvesting function by xanthophylls. *Photosynthesis Research* **64**, 243-256

Bender, A. (2000) Xanthophyllbindung im rekombinanten Lichtsammlerkomplex: Pigmentvariation und Kompetitionsexperimente. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Mainz

Berliner, L. J., Eaton, G. R., & Eaton, S. S. (2000) Distance Measurements in Biological Systems by EPR, *Biological Magnetic Resonance* (Kluwer Academic/Plenum, New York)

Bilger, W. björkman, O. (1994) Relationships among Violaxanthin deepoxidation, thylakoid membrane conformation and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in leaves of cotton. *Planta* **193**, 238-246

Bligh, E.G., Dyer W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J. Biochem Physiol* **37**, 911-917

- Boekema, E. J., Hankamer, B., Bald, D., Kruij, J., Nield, J., Boonstra, A. F., Barber, J., Rögner, M. (1995) Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 175-179
- Boggasch, S. (2002) Entwicklung eines Phosphatidylglycerol- Assays und Liposomen aus Thylakoidlipiden mit nativem und rekombinantem Lichtsammel-Komplex II (LHCII). Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Mainz
- Borbat, P. P., Mchaourab, S. Freed, J. H. (2002) Protein Structure Determination using Long-Distance Constrains from Double-Quantum Coherence ESR: Study of T4 Lysozyme. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 5304-5314
- Bratt, C. E., Åkerlund, H., -E. (1993) Isolation of pigment-free bulk lipids from thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1165**, 288-290
- Bratt, C. E., Åkerlund (1994) Quantification of -octyl β -D-glucopyranoside and n-dodecyl β -D- maltoside in biological samples by thin layer chromatography. *Plant Phys. Biochem.* **32** (2), 313-315
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Haeuptle, M.T., Dobberstein, B. (1987) A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of protein in vivo and in vitro. *Meth. Enzymol.* **155**, 416-433
- Butler, P.J.G. & Kühlbrandt, W. (1988) Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex from chloroplast membranes. *PNAS* **85**, 3797-3801
- Caffarri, S., Croce, R., Breton, J., Bassi, R. (2001) The Major Antenna Complex of Photosystem II Has a Xanthophyll Binding Site Not Involved in Light Harvesting. *J. Biol. Chem.* **276** (38), 35924-35933
- Christie, W. W. (1982) *Lipid Analysis. Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids.* Pergamon Press GmbH, ISBN: 0-08-023791-6
- Chen, B., Przybyla, A. E. (1994) An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *BioTechniques* **17**, 657-659
- Chitnis, P.R., Thornber, J.P., (1988) The major light harvesting complex of photosystem II: Aspects of the molecular and Cell Biology. *Photosynthesis Research* **16**, 41-63
- Cogan, E. B., Birrell, G.B., Griffith, O.H. (1999) A Robotics-Based Automated Assay for Inorganic and Organic Phosphates. *Anal. Biochem.* **271**, 29-35
- Corbalan-Garcia, S., Teruel, J. A., Gomez-Fernandez, J. C. (1993) Intramolecular distances within the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum as estimated through fluorescence energy transfer between probes. *Eur. J. Biochem.* **217**, 737-744

Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (1969) *Methods in Enzymology Volume XIV: Lipids*. John M. Lowenstein (Ed.), Academic Press, New York

Croce, R., Remelli, R., Varotto, C., Breton, J., Bassi, R. (1999 **a**) The neoxanthin binding site of major light harvesting complex (LHCII) from higher plants. *FEBS Lett.* **456**, 1-6

Croce, R., Weiss, S., Bassi, R. (1999 **b**) Carotenoid - binding sites of the major light - harvesting complex of higher plants. *J. Biol. Chem.* **274** (42), 29613-29623

Davies, B., H. (1976) Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. TW Goodwin Edition, Vol. **2**, 38-165

Debuch, H., Mertens, W., Winterfeld, M. (1968) Quantitative Bestimmung der Phosphatide mit Hilfe einer zweidimensionalen dünn-schichtchromatographischen Methode. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **349**, 896-902

Dittmer, J. C., Lester, R. L. (1964) A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms *J.Lipid Res.* **5**, 126-127

Dilly-Hartwig, H., Allen, J. F., Paulsen, H., Race, H. L. (1998) Truncated recombinant light harvesting complex II proteins are substrates for a protein kinase associated with photosystem II core complexes. *FEBS Lett.* **435**, 101-104

Dreyfuss, Thornber (1994) Assembly of the light-harvesting complexes (LHCs) of Photosystem II: Monomeric LHCIIb complexes are intermediates in the formation of oligomeric LHCIIb complexes. *Plant Physiol.* **106**, 829-839

Dubacq, J.-P. Trémolières, A. (1983) Occurrence and function of phosphatidyl-glycerol containing Δ -3-trans-hexadecenoic acid in photosynthetic lamellae. *Physiol. Vég.* **21** (2), 293-312

Dumas, F., Lebrun, M. C., Tocanne, J. F. (1999) Is the protein/lipid hydrophobic matching principle relevant to membrane organization and functions? *FEBS Lett.* **458**, 271-277

Fajer, P. G. (2000) Electron Spin Resonance Spectroscopy Labeling in Peptide and Protein Analysis. In: Meyers, R. A. (ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 5723-5761

Flachmann, R., Kühlbrandt, W. (1996) Crystallization and identification of an assembly defect of recombinant antenna complexes produced in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14966-14971

Formaggio, E., Cinque, G., Bassi, R. (2001) Functional Architecture of the Major Light-harvesting Complex from Higher Plants. *J. Mol. Biol.* **314**, 1157-1166

Garnier, J., Wu, B., Maroc, J., Guyon, D., Trémolières, A. (1990) Restoration of both an oligomeric form of the light-harvesting antenna CP11 and a fluorescence state II-state I transition by Δ^3 -trans-hexadecanoic acid-containing phosphatidylglycerol, in cells of a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1020**, 153-162

Gasser, A., Raddatz, S., Radunz, A. & Schmid, G.H. (1999) Comparative immunological and chemical analysis of lipids and carotenoids of the D1-peptide and of the light-harvesting-complex of photosystem II of *Nicotiana tabacum*. *Z. Naturforsch. [C]*. **54**: 199-208.

Galla, H.-J. (1988) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Thieme

Green, B. R., Kühlbrandt, W. (1995) Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII. *Photosynthesis Research* **44**, 139-148

Green, B. R. (1996) The Chlorophyll-Carotenoid Proteins of Oxygenic Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 685-714

Green, B. R. & Pichersky, E. (1994) Hypothesis for the evolution of three-helix Chl *a/b* and Chl *a/c* light-harvesting antenna proteins from two-helix and four-helix ancestors. *Photosynth. Res.* **39**, 149-162

Hagio, M., Gombos, Z., Varkonyi, Z., Masamoto, K., Sato, N., Tsuzuki, M., Wada, H. (2000) Direct evidence for requirement of phosphatidylglycerol in photosystem II of photosynthesis. *Plant Phys.* **124** (2), 795-804

Heldt, H. W. (¹1996) *Pflanzenbiochemie*. Heidelberg

Hobe, S. (1995 Dissertation) Trimerisierung des *in-vitro*-rekonstituierten Lichtsammelkomplexes höherer Pflanzen und spektroskopische Untersuchungen zur Pigmentorganisation. Wissenschaftsverlag Mainz, Aachen

Hobe, S.; Fey, H.; Rogl, H. und Paulsen, H. (2003). Determination of Relative Chlorophyll Binding Affinities in the Major Light-harvesting Chlorophyll *a/b* Complex. *J. Biol. Chem* **278**, 5912-5919

Hobe, S., Förster, R., Klingler, J., Paulsen, H. (1995) N-proximal sequence motif in light harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex, *Biochemistry* **34**, 10224-10228

Hobe, S., Niemeier, H., Bender, A., Paulsen, H. (2000) Carotenoid binding sites in LHCIIb: Relative affinities towards major xanthophylls of higher plants. *Eur. J. Biochem.* **267**, 616- 624

Hobe, S., Prytulla, S., Kühlbrandt, W., Paulsen, H. (1994) Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *EMBO J.* **13**, 3423-3429

Howorka, S., Sára, M., Wang, Y., Kuen, B., Sleytr, U.B., Lubitz, W., Bayley, H. (2000) Surface-accessible residues in the monomeric and assembled forms of a bacterial surface layer protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 37876-37886

Hubbel, W. L., Altenbach, C. (1994) Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling. *Current Opt. in Structural Biology* **4**, 566-573

Hubbel, W. L., Cafiso, D.S., Altenbach, C. (2000) Identifying conformational changes with side-directed spin labeling. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 735-739

Hubbel, W. L., Gross, A., Langen, R., Lietow, M. A. (1998) Recent advances in site-directed spin-labelling of proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 649-656

Huner, N. P. A., M. Krol, J. P. Williams, E. Maissan, P. S. Low, D. Roberts & J. E. Thompson. 1987. Low temperature development induces a specific decrease in trans- α -3-hexadecenoic acid content which influences LHC organization. *Pl. Physiol.* **84**, 12-18

Huschenbett, C. (2001) Zugänglichkeit einzelner Domänen des Lichtsammelkomplexes LHCII: ein Vergleich zwischen Monomeren und Trimeren, Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Mainz

Hustedt, E. J., Beth, A. H. (1999) Nitroxide Spin-Spin Interactions: Applications to Protein Structure and Dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 129-153

Hylander, L. D., Svensson, H. -I, Simán, G. (1996) Different Methods For Determination Of Plant Available Soil Phosphorus. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **27** (5-8), 1501-1512

Jackowski, G., Kacprzak, K., Jansson, S. (2001) Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of photosystem II (LHCII). *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 340-345

Jahns, P., Wehner, A., Paulsen, H., Hobe, S. (2001) De-epoxidation of Violaxanthin after Reconstitution into Different Carotenoid Binding Sites of Light-harvesting Complex II. *J. Biol. Chem.* **276** (25), 22154-22159

Jansson, S. (1994) The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1184**, 1-19

Jeschke, G., Pannier, M. Godt, A. Spiess, H. W. (2000) Dipolar spectroscopy and spin alignment in electron paramagnetic resonance. *Chem. Phys. Lett.* **331**, 243-252

Jeschke, G. (2002) Distance measurements in the nanometer range by pulse EPR. *Chem. Phys. Chem.* **3**, 927-932

Jeschke, G., Panek, G., Godt, A., Bender, A., Paulsen, H. (2004 a) Data Analyses for Pulse ELDOR Measurements of Broad Distance Distributions. *Appl Magn. Reson.* **XX** *in press*

Jeschke, G., Bender, A., Paulsen, H., Zimmermann, H., Godt, A. (2004 b) Sensitivity enhancement in pulse EPR distance measurements. *J. Magn. Res.* **XX** *in press*

Joyard, J.; Maréchal, E.; Miège, C.; Block, M.A.; Dorne, A.-J.; Douce, R. (1998) Structure, distribution and biosynthesis of glycerolipids from higher Plant Chloroplasts. In: Siegenthaler, P.-A.; Murata, N. (eds) *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*, 21-52. Kluwer, Dordrecht

Kågedal, L. (1989) Immobilized metal ion affinity chromatography. Aus: *Protein Purification-Principles, High Resolution Methods and Applications* (Ed.: Janson, J.-C., Rydén, L.)

Kim J.M., Altenbach, Thurmond, R. L., Gobind Khorana, H., Hubbel, W.L. (1997) Structure and function in rhodopsin: Rhodopsin mutants with a neutral amino acid at E134 have a partially activated conformation in the dark state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14273-14278

Kuttkat, A., Grimm, R., Paulsen H. (1995) Light-harvesting chlorophyll a/b binding protein inserted into isolated thylakoids binds pigments and is assembled into trimeric light-harvesting complex. *Plant Physiol.* **109** (4), 1267-1276

Kuttkat, A. (1997) Untersuchungen zur Insertion und Assemblierung des Chlorophyll a/b- bindenden Lichtsammelproteins an isolierten Thylakoidmembranen höherer Pflanzen. *Dissertationsverlag NG Kopierladen GmbH, München*

Kosemund, K. (1999) Die Biogenese von Chlorophyll-a/b-bindenden Lichtsammelkomplexen: Topographie des Apoproteins bei der Thylakoidinsertion. *Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Mainz*

Kosemund, K., Geiger, I., Paulsen, H. (1999) Insertion of light-harvesting chlorophyll a/b protein into the thylakoid - Topographical studies. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1138-1145

Krupa, Z., Williams, J.P., Khan, M.U., Huner, N.P.A. (1992) The role of acyl lipids in reconstitution of lipid-depleted light-harvesting complex II from cold-hardened and nonhardened rye. *Plant Physiol.* **100**, 931-938

Kruse, O., Radunz, A., Schmid, G. H. (1994) Phosphatidylglycerol and β - Carotene Bound onto D1-Core Peptide of Photosystem II in the Filamentous Cyanobacterium *Oscillatoria chalybea*. *Z. Naturforsch.* **49c**, 115-124

Kruse, O., Schmid, G. H. (1995) The role of Phosphatidylglycerol as a Functional Effector and Membrane Anchor of the D1-Core Peptide of Photosystem II-Particles of the Cyanobacterium *Oscillatoria chalybea*. *Z. Naturforsch.* **50c**, 380-390

- Kruse, O., Hankamern B., Konczak, C., Gerle, C., Morris, E., Radunz, A., Schmid, G. H., Barber, J. (2000) Phosphatidylglycerol is involved in the dimerization of photosystem II. *J. Biol. Chem.* **275** (9), 6509-6514
- Kruse, O. (2001) Light-induced short-term adaption mechanisms under redox control in the PS II-LHCII supercomplex: LHCII state transition and PS II repair cycle. *Naturwissenschaften* **88**, 284-292
- Kühlbrandt, W. (1994) Structure and function of the plant light-harvesting complex, LHC-II. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 519-528
- Kühlbrandt, W., Wang, D.N., Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**, 614-621
- Kuttkat, A., Grimm, R., Paulsen, H. (1995) Light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein inserted into isolated thylakoids binds pigments and is assembled into trimeric light-harvesting complex. *Plant Physiol.* **109** (4), 1267-1276
- Kuttkat, A., Hartmann, A., Hobe, S., Paulsen, H. (1996) The C-terminal domain of light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein is involved in the stabilisation of trimeric light-harvesting complex. *Eur. J. Biochem.* **242**, 288-292
- Langen, R., Cai, K., Altenbach, C., Khorana, H.G., Hubbell, W.L. (1999) Structural features of the C-terminal Domain of bovine rhodopsin: a site-directed spin-labeling study. *Biochem.* **38**, 7918-7924
- Langen, R., Isas, J.M., Hubbell, W.L., Haigler, H.T. (1998) A transmembrane form of annexin XII detected by site-directed spin labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**, 14060- 14065
- Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Levanon, H., Möbius, K. (1997) Advanced EPR spectroscopy on electron transfer processes in photosynthetic and biomimetic model systems. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 495-540
- Li, X.-P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K.K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **403**, 391-395
- Liu, Z., Yan, H., Kuang, T., Zhuang, J., Bui, L. An, X., Chang, W. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428**, 287-292
- Mchaourab, H.S., Lietzow, M. A., Hideg, K., Hubbell, W. L. (1996) Motion of spin-labeled side chains in T4 lysozyme. Correlation with protein structure and dynamics. *Biochemistry* **35**, 7692-7704

- Marsh, D., Horvarth, L. I. (1998) Structure, dynamics and composition of the lipid-protein interface. Perspectives from spin-labelling. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, 267-296
- Martinson, T.A., Plumley, F.G., (1995) One-step extraction and concentration of pigments and acyl lipids by sec.-butanol from in vitro and in vivo samples. *Anal. Biochem.* **228**, 123-130
- Mohrig, J. R. (1972) An introductory Experiment on Phosphates in Detergents. *Environmental Chemistry* **49** (1), 15-17
- Mullet, J. E., Arntzen, C. J. (1980) Simulation of grana stacking in a model membrane system. Mediation by a purified light-harvesting pigment-protein complex from chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta* **589**, 100-117
- Mullet, J.E. (1983) The amino acid sequence of the polypeptide segment which regulates membrane adhesion (grana stacking) in chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **258**, 9941-9948
- Murata, N.; Siegenthaler, P-A. (1998) Lipids in Photosynthesis: An Overview. In: Siegenthaler, P-A.; Murata, N. (eds) *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*, 1-20. Kluwer, Dordrecht
- Murphy, D.J. (1986) The molecular organization of the photosynthetic membranes of higher plants. *Biochim. Et. Biophys. Acta* **864**, 33-94
- Müthing, J. Radloff, M. (1998) Nanogram Detection of Phospholipids. *Analyt. Biochem.* **257**, 67-70
- Nield, J. Orlova, E.V., Morris, E. P., Gowen, B., van Hell, M., Barber, J. (2000) 3D map of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis. *Nature structural biology* **7** (1), 44-47
- Nilsson, A., Stys, D., Drakenberg, T., Spangfort, M.D., Forsén, S., Allen, J.F. (1997) Phosphorylation controls the three-dimensional structure of plant light harvesting complex II. *J. Biol. Chem.* **272**, 18350-18357
- Nußberger, S., Dörr, K., Wang, D.N., Kühlbrandt, W. (1993) Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J. Mol. Biol.* **234**, 347-356
- Ohad, I., Vink, M., Zer, H., Herrmann, R. G., Andersson, B. (2001) Novel Aspects on the Regulation of Thylakoid Protein Phosphorylation. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Vol. 11: Regulation of Photosynthesis. Aro, E-M., Andersson, Bertil (Eds.). 419ff.
- Olson, J. A., Krinsky, N. I. (1995) Introduction: The colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. *FASEB Journal* **8**, 1547-1550

- Pannier, M., Schädler, V., Chöps, M., Wiesner, U., Jeschke, G., Spiess, H. W. (2000 a) *Macromolecules* **33**, 7812
- Pannier, M., Veit, S., Godt, A., Jeschke, G., Spiess, H.W. (2000 b) *Chem. Phys. Lett.* **331**, 243-252
- Paulsen, H., Hobe, S. (1992) Pigment-binding properties of mutant light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **205**, 71-76
- Paulsen, H., Rümmler, U., Rüdiger, W. (1990) Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* **181**, 204-211
- Paulsen, H., Finkenzeller, B., Kühlein, N. (1993) Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **215**, 809-816
- Peter, G. F. & Thornber, J. P. (1991) Electrophoretic procedures for fractionation of photosystems I and II pigment-proteins of higher plants and for determination of their subunit composition. Aus: *Methods in plant biochemistry* (Ed.: Rogers, L.G.), Vol. **5**, 195-210
- Persson, M., Harbridge, J.R., Hammarström, P., Mitri, R., Martensson, L-G., Carlsson, U., Eaton, G.R., Eaton, S.S (2001) Comparison of Electron Paramagnetic Resonance Methods to Determine Distances between spin Label on Human Carbonic Anhydrase II. *Biophysical Journal* **80**, 2886-2897
- Phillip, D., Hobe, S., Paulsen, H., Molnar, P., Hashimoto, H. (2002) The Binding of Xanthophylls to the Bilk Light-Harvesting Complex of Photosystem II of Higher Plants. *J. Biol. Chem.* **227** (28), 25160-25169
- Pichersky, E., Jansson, S. (1996) The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding polypeptides and their genes in angiosperm and gymnosperm species. Aus: *Oxygenic photosynthesis: the light reactions* (Ed.: Ort, D.R., Yocum, C.F.) 507-521
- Plumley, F. G. & Schmidt, G. W. (1987) Reconstitution of chlorophyll *a/b* light-harvesting complexes: xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 146-150
- Porath, J. (1992) Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification* **3**, 263-281
- 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. *Biochim. Biophys. Acta* **975**, 384-394
- Prisner, T., Rohrer, M., MacMillan, F. (2001) Pulsed EPR Spectroscopy: Biological Applications. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **52**, 279-313
- Radunz, A. (1971) Phosphatidylglycerin - Antiserum und seine Reaktionen mit Chloroplasten. *Z.Naturforsch.* **26b**, 916-919

Remelli, R., Varotto, C., Sandonà, D., Croce, R., Bassi, R. (1999) Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex. A mutation analysis of chromophore-binding residues. *J. Biol. Chem.* **274** (47), 33510-33521

Rémy, R., Trémolières, A., Duval, J.C., Ambard-Bretteville, F., Dubacq, J.P. (1982) Study of the supramolecular organization of light-harvesting chlorophyll protein (LHCP). *FEBS Lett.* **137**, 271-275

Rémy, R., Trémolières, A., Ambard-Bretteville, F. (1984) Formation of oligomeric light-harvesting chlorophyll *a/b* protein by interaction between its monomeric form and liposomes. *Photobiochem. Photobiophys.* **7**, 267-276

Rogl, H. (2000) Struktur und Funktion des Lichtsammelkomplexes LHC-II der höheren Pflanzen. Dissertation an der Universität Frankfurt am Main, Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie

Rogl, H., Kosemund, K., Kühlbrandt, W., Collinson, I. (1998) Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Lett.* **432**, 21-26

Rogl, H. & Kühlbrandt, W. (1999) Mutant trimers of light-harvesting complex II exhibit altered pigment content and spectroscopic features. *Biochemistry* **38**, 16214-16222

Rouser, G., Kritchevsky, G., Yamamoto, A. (1967) Columnchromatographic and associated procedures for separation and determination of phosphatides and glycolipids. In: Marietti, G.v. (Ed.) *Lipidchromatographic Analysis Vol. 1*. Marcel Dekker, New York, 99-192

Rouser, G., Fleischer, S., Yamamoto, A. (1970) Two dimensional thin layer chromatography separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**, 494-496

Ruban, A. V., Lee, P. J., Horton, P. (1999) Determination of the Stoichiometry and Strength of Binding of Xanthophylls to the Photosystem II Light Harvesting Complexes. *J. Biol. Chem.* **274**, 10458-10465

Ruban, A. V., Pascal, A., Lee, P.J., Robert, B., Horton, P. (2002) Molecular Configuration of Xanthophyll Cycle Carotenoids in Photosystem II Antenna Complexes. *J. Biol. Chem.* **277** (45), 42937-42942

Sánchez, Šali, A. (1998) Large-scale protein structure modeling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **10**; 95 (23), 13597-13602

Šali, A., Blundell, T. L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234** (3), 779-815

Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **74**, 5463-5467

- Schmidt, W. (2000) Optische Spektroskopie. *Wiley-VCH, Weinheim*
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaart, J. A. D., McCarty, D. r. (1997) Specific oxidative Cleavage of Carotenoids by VP 14 of Maize. *Science* **276**, 1872-1874
- Schweikardt, Thorsten (2001) 3D-Modellierung von Sequenzen auf der Basis von Röntgenstrukturen. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Mainz
- Siegenthaler, P-A. (1998) Molecular organization of acyl lipids in photosynthetic membranes of higher plants. In: Siegenthaler, P-A.; Murata, N. (eds) *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*, 119-144. Kluwer, Dordrecht
- Siegenthaler, P-A.; Trémolières, A. (1998) Role of acyl lipids in the function of photosynthetic membranes in higher plants. In: Siegenthaler, P-A.; Murata, N. (eds) *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*, 145-173. Kluwer, Dordrecht
- Siefermann-Harms, D. (1985) Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochimica and Biophysica Acta* **811**, 325-355
- Shafer, D.E., Inman, J.K., Lees, A. (2000) Reaction of Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) with Maleimide and α -Haloacyl Groups: Anomalous Elution of TCEP by Gel Filtration. *Anal. Biochem.* **282**, 161-164
- Snyder, A.M., Clark, B.M., Robert, B., Ruban, A.V. (2004) Carotenoid Specificity of Light-harvesting Complex II Binding Sites. *J. Biol. Chem.* **279** (7), 5162-5168
- Solomon, E. I., Hodgson, K. O. (1998) (Eds.) *Spectroscopic methods in bioinorganic chemistry*. Clarendon, Oxford
- Spivakow, B. ya., Maryutina, T. A., Muntau, H. (1999) Phosphorus Speciation in Water and Sediments. *Pure Appl. Chem.* **71** (11), 2161-2176
- Steinhoff, H. J., Radzwill, N., Thevis, W., Lenz, V., Brandenburg, D., Antson, A., Dodson, G., Wollmer, A. (1997) Determination of interspin distances between spin labels attaches to insulin. Comparison of electron paramagnetic data with the X-ray structure. *Biophys. J.* **73**, 3287-3298
- Standfuß, J. (2000) Untersuchungen zur Stabilisierung des Trimers von rekombinantem Light Harvesting Complex II. Diplomarbeit am MPI für Biophysik Frankfurt am Main/ im Fachbereich Biologie der Universität Mainz
- Storf, S. (2001) Ortsspezifische Markierung hydrophiler Bereiche des rekombinanten Chlorophyll-a/b-Lichtsammlerkomplexes (LHCII): Unterschiede in Monomer und Trimer. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Mainz
- Stubbe, J. van der Donk, W. A. (1998) Protein radicals in enzyme catalysis. *Chem. Rev.* **98**, 705-762

- Takaichi, S., Mimuro, M. (1998) Distribution and Geometric Isomerism of Neoxanthin in Oxygenic Phototrophs: 9'cis, a Sole Molecular Form. *Plant Cell Physiol.* **39** (9), 968-977
- Trémolières, A., Dubacq, J.-P. Ambard-Bretteville, F. Remy, R. (1981) Lipid Composition of Chlorophyll-Protein Complexes. *FEBS* **130** (1), 27-31
- Trémolières, A. (1991) Lipid-protein interactions in relation to light energy distribution in photosynthetic membrane of eukaryotic organisms. Role of trans- Δ^3 -hexadecenoic acidcontaining phosphatidylglycerol. *Trends Photochem. Photobiol.* **2**, 13-32
- Trémolières, A., Dainese, P., Bassi, R. (1994) Heterogeneous lipid distribution among chlorophyll-binding proteins of photosystem II in maize mesophyll chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **221**, 721-730
- Ueda, T., Hojo, M., Shimizu, K (2001) Determination of PhosphorusBased on the Formation of a Reduces Keggin-Tape 12-Molybophosphate Complex in an Aqueous-Organic Solution. *Analytical Science* **17**, 1431-1435
- Ververka, V., Hrabal, R., Durchan, M. Stys, D. (2000) Studies of phospholipid binding to N-terminal domain of membrane protein light-harvesting complex II. *J. Mol. Structure* **523**, 281-287
- Yang, C., Kosemund, K., Cornet, C., Paulsen, H. (1999) Exchange of pigment-binding amino acids in light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Biochemistry* **38**, 16205-16213
- Yang, D.-H., Paulsen, H., Andersson, B. (2000) The N-terminal domain of the lightharvesting chlorophyll a/b-binding protein complex (LHCII) is essential for its acclimative proteolysis. *FEBS Lett.* **466**, 385-388
- Young, A. J., Frank, H. A. (1996) Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. *Photochem. And Photobiol.* **36**, 3-15
- Zer, H., Vink, M., Keren, N., Dilly-Hartwig, H.G., Paulsen, H., Herrmann, R.G., Andersson, B., Ohad, I. (1999) Regulation of thylakoid protein phosphorylation at the substrate level: Reversible light-induced conformational changes expose the phosphorylation site of the lightharvesting complex II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8277-8282

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
Å	Anström
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Idolyolphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CD	Circular Dichroismus
Chl a	Chlorophyll a
Chl b	Chlorophyll b
DEER	Double Electron Electron Resonance
dest.	Destilliert
DGDG	Digalaktosyldiacylglycerin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ddH ₂ O	doppelt dest. Wasser
ddNTP	Dideoxynucleosidtriphosphat
dNTP	Deoxynucleosidtriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DPH	1,6 - Diphenyl - 1,3,5 - Hexatrien
dpi	dots per inch
DPPG	Dipalmitoyl - Phosphatidylglycerin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E.coli	Escherichia coli
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
<i>et al.</i>	und Andere
FRET	Fluoreszenz - Resonanz - Energie - Transfer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
KB	Kilobase
KDa	Kilo-Dalton
KOH	Kaliumhydroxid
LB	Luria-Bertani
LDS	Lithium-Dodecylsulfat
LHC	light-harvesting complex
LHCP	light-harvesting complex protein
LM	Lauryl-Maltosid (=Dodecyl- β-D-Maltosid)
Lt	Lutein
MGDG	Monogalaktosiddiacylglycerin
MPP	Midi - Präparation
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
NMR	Nukleus - Magnetic - Resonance
Nx	Neoxanthin
OD	Optische Dichte
OG	n-Octyl- β -D-glucoopyranosid
PAA	Polyacrylamid
p.A.	pro Analyti
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PELDOR	Pulsed Elektron Double Resonance
PG	Dipalmitoyl-Phosphatidylglyzerin
PS	Photosystem
PVDF	Polyvenyldifluorid
RET	Resonanz-Energie-Transfer
rel. Einh.	relative Einheiten
RM	Rhodamin-Maleimid
RT	Raumtemperatur
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RP-HPLC	reversed phase-HPLC
RT	Raumtemperatur
SD	Siedepunkt
SDSL	Side Directed Spin Labeling
SDS	Sodium - dodecylsulfate
SH	Sulfhydryl
SL	Sulfochinovosyldiacylglyzerin
TCEP	Tri -(2 cyanoethyl-)phosphin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TX	Triton X 100
U	Units
UV	Ultraviolett
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vx	Violaxanthin
V	Volt
(v/v)	Volumenprozent (volume per volume)
(w/v)	Gewichtsprozent (weight per volume)
Zx	Zeaxanthin

7.2 Sequenzen der verschiedenen hergestellten LHCII - Mutanten

7.2.1 C3.2h (LHCII - Wildtyp mit C- terminalem His₆ - TAG)

Diese Mutante wurde bereits von Kosemund *et al.* (1999) beschrieben und dient im Folgenden zum Vergleich der selbst erstellten LHCII - Klone.

```

          0          10          20          30
      XhoI |         |         |         |         |         |
      CTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACA
          40          50          60          70          80          90
      |         |         |         |         |         |         |
      ATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGAATTCATTAAAGAGGAG
          100         110         120         130         140         150
      |         |         |         |         |         |         |
      AAATTAAGCATGCGTAAATCTGCTACCACCAAGAAAGTAGCGAGCTCTGGAAGCCCATGG
          METArgLysSerAlaThrThrLysLysValAlaSerSerGlySerProTrp
          160         170         180         190         200         210
      |         |         |         |         |         |         |
      TACGGACCAGACCGTGTAAAGTACTTAGGCCATTCTCCGGTGAGTCTCCATCCTACTTG
      TyrGlyProAspArgValLysTyrLeuGlyProPheSerGlyGluSerProSerTyrLeu
          220         230         240         250         260         270
      |         |         |         |         |         |         |
      ACTGGAGAGTTCCCCGGTGACTACGGTTGGGACACTGCCGGACTCTCTGCTGACCCAGAG
      ThrGlyGluPheProGlyAspTyrGlyTrpAspThrAlaGlyLeuSerAlaAspProGlu
          280         290         300         310         320         330
      |         |         |         |         |         |         |
      ACATTCTCCAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCTATGTTGGGTGCT
      ThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAlaMETLeuGlyAla
          340         350         360         370         380         390
      |         |         |         |         |         |         |
      TTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTCGGCGAAGCTGTG
      LeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPheGlyGluAlaVal
          400         410         420         430         440         450
      |         |         |         |         |         |         |
      TGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTACTTGGGCAACCCA
      TrpPheLysAlaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyrLeuGlyAsnPro
          460         470         480         490         500         510
      |         |         |         |         |         |         |
      AGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTATCTTGATGGGA
      SerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnValIleLeuMETGly
          520         530         540         550         560         570
      |         |         |         |         |         |         |
      GCTGTGCGAAGGTTACCGTATTGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTTGATCCACTTTAC
      AlaValGluGlyTyrArgIleAlaGlyGlyProLeuGlyGluValValAspProLeuTyr
          580         590         600         610         620         630
      |         |         |         |         |         |         |
      CCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCATTTCGAGAATTG
      ProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAlaPheAlaGluLeu
          640         650         660         670         680         690
      |         |         |         |         |         |         |
      AAGGTGAAGGAACCTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTTGGATTCTTCGTT
      LysValLysGluLeuLysAsnGlyArgLeuAlaMETPheSerMETPheGlyPhePheVal
  
```

```

700      710      720      730      740      750
|        |        |        |        |
| CAAGCTATTGTA|ACTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCTGTGATCATCTTGCAGACCCA
| GlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHisLeuAlaAspPro
760      770      780      790      800      810
|        |        |        |        |
| GTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGGAAAACACCATCACCAT
| ValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLysHisHisHisHis
820      830      840      850      860      870
|        |        |        |        |
| CACCATTAACCCGGGAAATAAACACTCTTATATTTATATGTTTTTTGTGATAGTAATCTTC
| HisHis-----
880      890      900      910      920      930
|        |        |        |        |
| TTCCCAATTCAATGTGAATTATTATCATTATCATTATCATGTGGGTATGCATAGGTTTAC
940      950      960      970      980      990
|        |        |        |        |
| TAATACAAGATGATGGATGCTTTTTTTTTTACCAAATTTTGGGCTGCAGCCAAGCTTAATT
|                                     PstI
1000     1010     1020     1030     1040     1050
|        |        |        |        |
| AGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTT
|                                     <S1

```

Legende:

Grün: Startcodon und C-terminaler His₆ -Tag;
Rot: Trimerisierungsmotiv;
Orange: potentielle Markierungsstellen für die ESR - Messungen;

Die drei transmembranen Helices (A - C) wurden durchgängig unterstrichen;
Helic D und E wurden gestrichelt hervorgehoben (Liu *et al.* 2004).

Bei allen folgenden Sequenzangaben wurden nur die bezüglich C3.2h veränderten Positionen (blau) angegeben. Alle weiteren Codons entsprechen der Mutante C3.2h.

7.2.2 R21Qh

Austausch im Trimerisierungsmotiv: Arginin 21 gegen Glutamin:

```

... CCATGGTACGGACCAGACCAGGTT ...
   ProTrpTyrGlyProAspGlnVal

```

7.2.3 ΔN22h

Hier wurde der N-Terminus bis zur Aminosäure 22 verkürzt:

```

C3.2h      AAATTAAGCAATGCGTAAATCTGCTACCACCAAGAAAGTAGCGAGCTCTGGAAGC
           METArgLysSerAlaThrThrLysLysValAlaSerSerGlySer

```



```

ΔN22h      AAATTAAGC-----
C3.2h      CCATGGTACGGACCAGACCGTGTTAAGTACTTAGGCCATTCTCCGGT ...
            ProTrpTyrGlyProAspArgValLysTyrLeuGlyProPheSerGly ...
ΔN22h      -----ATGAGAGACTTAAGGCCA ...
            MetArgAspLeuGlyPro

```

7.2.4 S3C,S160Ch

Folgende Aminosäurenaustausche wurden vorgenommen:

Serin 3 nach Cystein;	Cystein 79 nach Serin;	Serin 160 nach Cystein.
...AAATG T GTGCT ... Lys Cys Ala	... GGAT C TGTGTC ... <u>GlySerVal</u>	... GGATG C TTT ... Gly Cys Phe

7.2.5 S106C,S160Ch

Hier folgte ein Aminosäurenaustausch bei:

Cystein 79 nach Serin;	Serin 106 nach Cystein;	Serin 160 nach Cystein.
... GGAT C TGTGTC ... <u>GlySerVal</u>	... TTT T GTGAG ... <u>PheCys</u> Glu	... GGATG C TTT ... Gly Cys Phe

7.2.6 S52C,S160Ch

Folgender Austausch wurde vorgenommen:

Serin 52 nach Cystein;	Cystein 79 nach Serin;	Serin 160 nach Cystein.
...CTC T GTGCT ... Leu Cys Ala	... GGAT C TGTGTC ... <u>GlySerVal</u>	... GGATG C TTT ... Gly Cys Phe

7.2.7 S3C,S52Ch

Folgende Aminosäurenaustausche wurden vorgenommen:

Serin 3 nach Cystein;	Serin 52 nach Cystein;	Cystein 79 nach Serin;
...AAATG T GTGCT ... Lys Cys Ala	...CTC T GTGCT ... Leu Cys Ala	... GGAT C TGTGTC ... <u>GlySerVal</u>

7.2.8 S3C,S106C

Es folgte ein Aminosäurenaustausch von:

Serin 3 nach Cystein;	Cystein 79 nach Serin;	Serin 106 nach Cystein.
...AAATG T GTGCT GGAT C TGTGTC TTT T GTGAG ...

LysCysAla

GlySerValPheCysGlu

Dieser Klon weist zudem keinen His₆-Tag am C-Terminus auf:

C3.2h GGAAAACACCATCACCATCACCATTAACCC
GlyLysHisHisHisHisHisHis.....

S3CS106C GGAAAA-----TAACCC
GlyLys

7.4 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und alle verwendeten Hilfsmittel angegeben habe.

Datum, Unterschrift