

Zeitaufgelöste Messung der Faltung und  
Pigmentbindung des Lichtsammelproteins LHCIIb  
anhand verschiedener spektroskopischer Monitore

Dissertation  
Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Ruth Horn  
geb. am 27.06.1975 in Bonn

Mainz 2004

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2004

*Ach was muss man oft von bösen  
Studenten hören oder lesen.  
Die anstatt durch weise Lehren  
Sich zum Guten zu bekehren,  
Oftmals noch darüber lachten  
Und sich heimlich lustig machten.  
Kollegen necken, Erbsen quälen,  
Pipetten, Kulis, Pigmente stehlen.  
Das ist freilich angenehmer  
Und dazu auch viel bequemer,  
Als im Dunkeln in der Schule (Labor)  
Festzusitzen auf dem Stuhle.  
Aber wehe-wehe-wehe  
Wenn ich auf das Ende sehe!!  
Ach das war ein spaßig Ding  
Wie es mir mit Euch erging.  
Drum ist hier, was ich getrieben  
Abgemalt und aufgeschrieben.*

*Frei nach Wilhelm Busch*

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die Organisation des Photosystems II und seiner Antennen	2
1.2 Die Struktur des LHCIIb	3
1.3 Energietransfer innerhalb des LHCII	4
1.4 Assemblierung des LHCII <i>in vivo</i>	6
1.5 Assemblierung des LHCII <i>in vitro</i>	8
1.6 Zeitaufgelöste Messung der Assemblierung des LHCII <i>in vitro</i>	8
1.7 Proteinfaltung	9
1.8 Zielsetzung der Arbeit	12
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1 Material	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Geräte	14
2.2 Methoden der Biochemie	17
2.2.1 Gewinnung der Blattpigmente aus Erbsenpflanzen	17
2.2.2 Quantifizierung der isolierten Pigmente	19
2.2.3 Herstellung von Pigment- Aliquots für die Rekonstitutionen nach der Verdünnungs- Methode	20
2.2.4 Gewinnung von Lhcb1 aus Bakterien	20
2.2.5 Konzentrationsbestimmung der Protein-Suspension bzw. Proteinlösungen	21
2.2.6 Markierung des Lhcb1 mit einem Fluoreszenzfarbstoff	22
2.2.7 Rekonstitution des monomeren LHCII	23
2.2.7.1 Rekonstitution mit der Verdünnungsmethode ausgehend von SDS- denaturiertem Lhcb1- Verwendung der „Rapid-Mixing-Device“	24
2.2.7.2 Rekonstitution mit der Verdünnungsmethode ausgehend von SDS bzw. GuHCl denaturiertem Lhcb1 - manuelles Mischen	25
2.2.7.3 Rekonstitution mit der Verdünnungsmethode ausgehend von SDS denaturiertem Lhcb1 mit Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten	26
2.2.7.4 Rekonstitution nach der Detergenswechsel Methode mit nachfolgender Aufreinigung des LHCIIb	28
2.2.8 Durchführung einer Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE)	29
2.3 Methoden der Spektroskopie	32
2.3.1 Fluoreszenzspektroskopie	32
2.3.2 Circular-Dichroismus Spektroskopie	34
2.3.3 Computergestützte Analyse der spektroskopischen Daten	36
2.4 Methoden der Molekularbiologie	38
2.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Zellen (Midi-Präp)	39
2.4.2 Enzymatischer Verdau von Plasmid-DNA	39
2.4.3 Durchführung einer Agarose-Gel Elektrophorese zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA- Fragmenten	40
2.4.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelstücken	41
2.4.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen mittels analytischer Agarose- Gelelektrophorese	41

2.4.6 Dephosphorylierung des Vektor-DNA-Fragmentes	42
2.4.7 Ligation von Vektor- und Insert- DNA- Fragment	42
2.4.8 Transformation von kompetenten E. coli- Zellen mit Plasmid- DNA	43
2.4.9 Überprüfung der Ligation von Vektor und Insert mittels PCR und „mini IB-Präparation“	44
<b>3 Ergebnisse zur zeitaufgelösten Messung der LHCIIb-Assemblierung</b>	<b>47</b>
3.1 Ausbildung der $\alpha$ - helikalen Struktur während der Pigmentbindung des LHCIIb	50
3.1.1 Das Apoprotein pLhcb1 und der funktionelle Komplex pLHCIIb zeigen unterschiedliche CD Spektren	50
3.1.2 Die Ausbildung der $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur des pLHCIIb lässt sich zeitaufgelöst anhand des CD Signal bei 222 nm beobachten	51
3.1.3 Die Ausbildung der Sekundärstruktur lässt sich ebenfalls anhand der Signaländerung bei 195 nm beobachten	55
3.1.4 Der $\alpha$ -helikale Anteil des Lhcb1 in 0.2 % SDS lässt sich nicht bestimmten Domänen im Protein zuordnen	57
3.2 Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb ausgehend von vollständig ungefaltetem Apoprotein	60
3.2.1 Die Komplexbildung ausgehend von SDS- oder GuHCl denaturiertem Lhcb1 resultiert in ähnlichen Fluoreszenz-Kinetiken	60
3.2.2 Die Ausbildung der Sekundärstruktur ausgehend von vollständig ungefaltetem Lhcb1 lässt sich nicht anhand der Änderung des CD Signals bei 222 nm beobachten	63
3.3 Erste Schritte der Pigmentbindung im Verlauf der Assemblierung des LHCIIb	66
3.3.1 Ein proteingebundener Fluoreszenzfarbstoff kann als Monitor der Pigmentbindung dienen	66
3.3.2 Wird der Farbstoff an verschiedenen Stellen im Protein gebunden, können leicht unterschiedlichen Signaländerungen während der Pigmentbindung beobachtet werden	70
3.3.3 Die Kinetiken der Chl b-Fluoreszenzen und der des proteingebundenen Farbstoffes, aufgenommen im Verlauf der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb, unterscheiden sich	73
3.3.4 Der Farbstoff als Monitor detektiert die Bindung von Pigmenten unter Bedingungen, unter denen noch kein Energietransfer zwischen Chl b und Chl a beobachtet werden kann.	75
3.4 Kinetische Experimente zur Pigmentbindung des LHCIIb, durchgeführt in zwei aufeinander folgenden Schritten	80
3.4.1 Wechselwirkungen zwischen Chl a und Lhcb1 bleiben auch während eines zweiten Mischvorgangs bestehen	80
3.4.2 Farbstofffluoreszenz als Monitor der Vorgänge bei Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten.	82
3.4.3 Chlorophyll Fluoreszenz als Monitor der Vorgänge bei Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten.	84
3.4.4 Die Ausbildung charakteristischer CD Signale eignet sich als Monitor der Vorgänge bei Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten	86
3.4.5 Ein Unterschied in den Detergensbedingungen der Proteinlösung hat keinen Einfluss auf die CD- Signale.	87

3.4.6 Die Vorgänge der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb nach Pigmentzugabe in einem Schritt unterscheiden sich von denen nach Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten	89
3.4.7 Lutein als alleiniges Carotinoid reicht aus, um nach Mischung mit Chl a und Lhcb1 die Ausbildung charakteristischer CD Signale zu beobachten.	94
3.4.8 Die Anwesenheit von Neoxanthin (und Violaxanthin) im Komplex hat einen Anteil am Signal bei 492 nm.	97
3.4.9 Nach Mischung von Chl a, Carotinoiden und Lhcb1 scheint sich schon ein Teil $\alpha$ -helikaler Struktur des Proteins auszubilden	98
<b>4 Diskussion</b>	<b>101</b>
4.1 Die Verwendung verschiedener Monitore ermöglicht die Beobachtung verschiedener Faltungsereignisse während der Assemblierung des LHCIIb	101
4.1.1 CD-Signale im UV-Bereich: ein direkter Blick auf die Ausbildung der Sekundärstruktur	101
4.1.2 Fluoreszenzsignale: ein indirekter Blick auf die Bindung der Chlorophylle	101
4.1.3 CD-Signale im sichtbaren Bereich: ein indirekter Blick auf die Bindung von Chlorophyllen und Carotinoiden	102
4.1.4 Die Faltungsereignisse gliedern sich in einen schnelleren und einen langsameren Schritt	102
4.2 Die Assemblierung des LHCIIb auf der Ebene der Proteinstruktur: UV-CD-spektroskopische Untersuchungen	103
4.2.1 Der Lhcb1 weist im SDS-denaturierten Zustand eine $\alpha$ -helikale Struktur auf	103
4.2.2 Die $\alpha$ -helikale Struktur des SDS-denaturierten Lhcb1 ist gleichmäßig über das Protein verteilt	103
4.2.3 Die Pigmentbindung ist eine Voraussetzung für die Ausbildung der $\alpha$ -helikalen Struktur	104
4.2.4 Die Ausbildung der Sekundärstruktur ist auch im weiteren Verlauf mit der Pigmentbindung gekoppelt	104
4.2.5 Die Faltung des LHCIIb entspricht nicht dem „Two-Stage-Modell“ der Faltung von Membranproteinen	105
4.2.6 Der LHCIIb faltet sich ähnlich schnell wie andere Membranproteine	106
4.2.7 Lösliche Proteine falten sich deutlich schneller als Membranproteine	107
4.3 Die Assemblierung ausgehend von vollständig ungefaltetem Lhcb1: fluoreszenzspektroskopische und UV-CD-spektroskopische Untersuchung	108
4.3.1 Die Ausbildung eines Anteils an $\alpha$ -helikaler Struktur ist nicht limitierend für die Geschwindigkeit der Pigmentbindung	108
4.3.2 Inwieweit die Ausbildung der Sekundärstruktur ausgehend von vollständig ungefalteten Lhcb1 durch die Pigmentbindung induziert wird bleibt unklar	109
4.4 Die Assemblierung des LHCIIb auf der Ebene der Pigmentbindung: fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen	110
4.4.1 Spezifische Wechselwirkungen zwischen den Pigmenten und dem Lhcb1 im Millisekunden-Bereich sind möglich	110
4.4.2 Auch ein pigment-unabhängiger Schritt wird durch den Farbstoffmonitor detektiert	110
4.4.3 Der Farbstoffmonitor detektiert frühere Ereignisse der Pigmentbindung als der Chlorophyllmonitor	111
4.4.4 Ohne Carotinoide findet keine stabile Pigmentbindung statt	112

4.4.5 In der schnelleren Phase ( $\tau_1$ ) bindet Chl a vor Chl b	112
4.4.6 Die Bindungsereignisse in der langsamen Phase ( $\tau_2$ ) benötigen die Anwesenheit von Chl b	113
4.4.7 Das System aus [Lhcb1-Chla-Lutein], freien Pigmenten und freiem Protein befindet sich im dynamischen Gleichgewicht	114
4.5 Die Assemblierung des LHCIIb auf der Ebene der Pigmentbindung: Vis-CD-spektroskopische Untersuchungen	115
4.5.1 Der CD-Monitor bei 492 nm ermöglicht die Beobachtung der Bindung von Neoxanthin, Chl b und Lutein	115
4.5.2 Der Bindung von Lutein kann anhand des CD-Monitors bei 492 nm nur ein Zeitrahmen zugeordnet werden	116
4.5.3 In der schnelleren ( $\tau_1$ ) Phase bindet Lutein mindestens so schnell wie Chl b	116
4.5.4 Chl a und Lutein sind ausreichend für die Ausbildung eines Teils der Sekundärstruktur in einer schnelleren Phase	118
4.5.5 In der langsameren Phase bindet Chl b aber nicht Neoxanthin	118
4.5.6 Die Bindung von Chl b in der schnelleren Phase wird durch Chl a und Lutein limitiert	119
4.5.7 Anhand des CD-Monitors bei 492 nm kann nicht die Bindung aller Pigmente beobachtet werden	120
4.6 Der Faltungsmechanismus des LHCIIb	121
4.6.1 Die Ereignisse der schnelleren und der langsameren Phase	121
4.6.2 Zwei grundsätzliche Modelle beschreiben die Unterteilung in zwei Phasen	122
4.7 Schlussfolgerungen für die LHCII-Assemblierung <i>in vivo</i>	124
4.8 Ausblick	127
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>129</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>131</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>138</b>
7.I Abkürzungen	138
7.II Sequenz des Klons S3C $\Delta$ C49 ( $\Delta$ Lhcb1, dLhcb1)	140
7.III Übersichtstabelle über die verschiedenen Reaktionszeiten	141
7.IV Codes für Aminosäuren	142

## 1. Einleitung

Bei der Photosynthese wird die Energie des Sonnenlichtes zur Herstellung von organischen Substanzen genutzt. In einer Lichtreaktion werden zunächst Energie- und Reduktionsäquivalente hergestellt, die anschließend in einer Dunkelreaktion zum Aufbau von Zuckern aus Kohlendioxid verwendet werden.

Der Ort, an dem die Prozesse der Photosynthese in höheren Pflanzen stattfinden, ist der Chloroplast. Dieses Organell der Pflanzenzelle besitzt zwei Hüllmembranen, die den inneren Raum, das sogenannte Stroma, umgeben. Darin liegt ein System von Membranlamellen, den Thylakoiden. Während sich die Enzyme der Dunkelreaktion im Stroma befinden, sind die Vorgänge der Lichtreaktion an Komplexe in der Thylakoidmembran gebunden.

Die Grundlage der Lichtreaktion ist die Absorption der Lichtenergie durch die Pigmente, den Chlorophyllen a und b und den Carotinoiden, die innerhalb der Thylakoidmembran an Proteine gebunden vorliegen. Zur Nutzung eines breiten Spektrums des Sonnenlichtes wird Licht verschiedener Wellenlängen über eine möglichst große Fläche von sogenannten Lichtsammelantennen (*Light-harvesting-complex*, LHC) eingefangen und die Energie bis zu den Reaktionszentren (RC) weitergeleitet. Dort wird sie zum Antrieb des Elektronentransportes und Aufbau des Protonen-Gradienten genutzt, was letztendlich die Bildung der Energie- und Reduktionsäquivalente ermöglicht. Pflanzen besitzen zwei in Reihe geschaltete Reaktionszentren mit jeweils unterschiedlichen Antennen. Die übergeordneten Komplexe Photosystem I und II (PS I und PS II) mit den assoziierten LHCs sind innerhalb der Thylakoidmembranen heterogen auf zwei Bereiche verteilt. Es sind dies Bereiche mit gestapelten Membranen, den Granathylakoiden, und Bereiche mit ungestapelten Membranen, den Stromathylakoiden (Abb. 1.1).

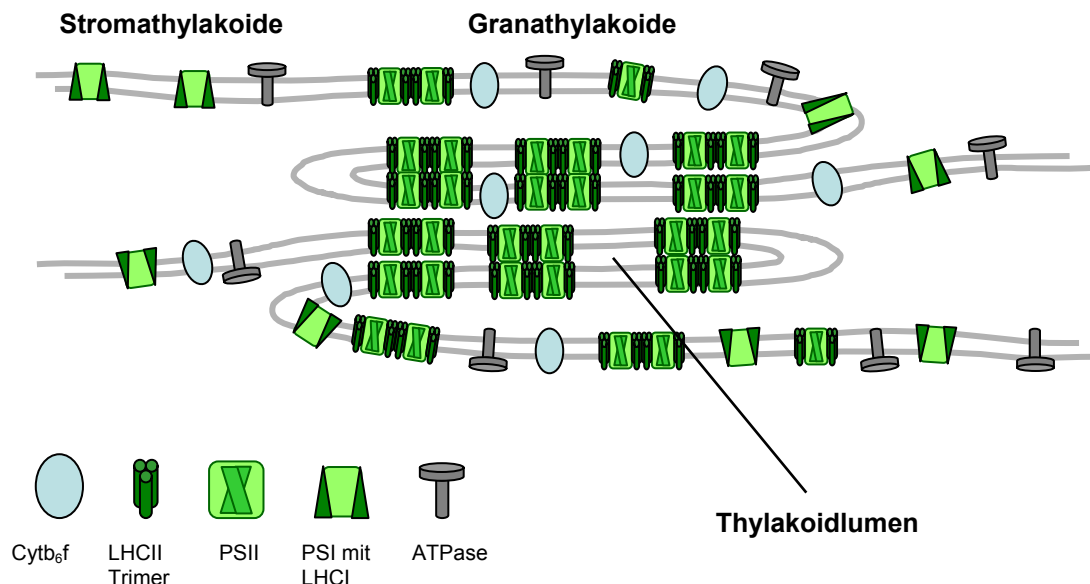


Abb. 1.1: Verteilung der Komponenten des Photosyntheseapparates im Stroma- und Grana-Bereich der Thylakoidmembran der Chloroplasten. Die ATPase und der PSI-Komplex befinden sich in den Stromathylakoiden oder den Randbereichen der Grana. Der PSII-Komplex mit den LHCII-Trimeren ist hauptsächlich in den Granathylakoiden lokalisiert. Der Cytochromb<sub>6</sub>f-Komplex befindet sich ebenfalls in den Granabereichen (nach Allen & Forsberg 2001).

Das PSII und seine Antennen-Komplexe befinden sich hauptsächlich in den Granathylakoiden, während das PSI in den Stromathylakoiden lokalisiert ist. Innerhalb der Granathylakoide kommt das PSI nur in den Bereichen der Membranen vor, die dem Stroma zugewandt sind (Allen & Forsberg 2001). Die Antennen beider Photosysteme enthalten eine Reihe von Komplexen mit unterschiedlicher Pigmentausrüstung, deren homologe Apoproteine einer Multigenfamilie angehören (Green *et al.* 1991).

### 1.1 Die Organisation des Photosystems II und seiner Antennen

Die wichtigsten Komponenten des PSII sind der so genannte Kern-Komplex (*core complex*) mit den Proteinen D1 und D2 des Reaktionszentrums und die Kern-Antennen CP47 und CP43. Umgeben wird das PSII von den peripheren Antennen-Komplexen, aufgebaut aus den Produkten der Gene *Lhcb1* bis *Lhcb6*. Die beiden häufigsten Proteine der Thylakoidmembran werden durch die Gene *Lhcb1* und *Lhcb2* codiert und bilden zusammen mit dem *Lhcb3*-Genprodukt den trimeren Hauptlichtsammelkomplex LHCII des PSII (Jansson 1994). Monomere Bestandteile der peripheren Antenne sind die minoren Antennen-Komplexe CP29, CP26 und CP24 (*Lhcb4-6*). Die höhermolekulare Organisation des PSII in der Thylakoidmembran ist die eines Dimers mit jeweils zwei Kopien der minoren Antennen-Komplexe und mindestens zwei bis vier LHCII Trimeren. Dabei konnten bisher drei verschieden stark gebundene LHCII Trimer-Populationen anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtet werden. Diese werden als fest (strong, S), moderat (moderat, m) und locker (loose, l) gebunden bezeichnet (Boekema *et al.* 1999, Yakushevskaya *et al.* 2001). In Abb. 1.2 ist als Beispiel die Aufnahme eines „Superkomplexes“ mit zwei fest und zwei moderat gebundenen LHCII-Trimeren gezeigt.

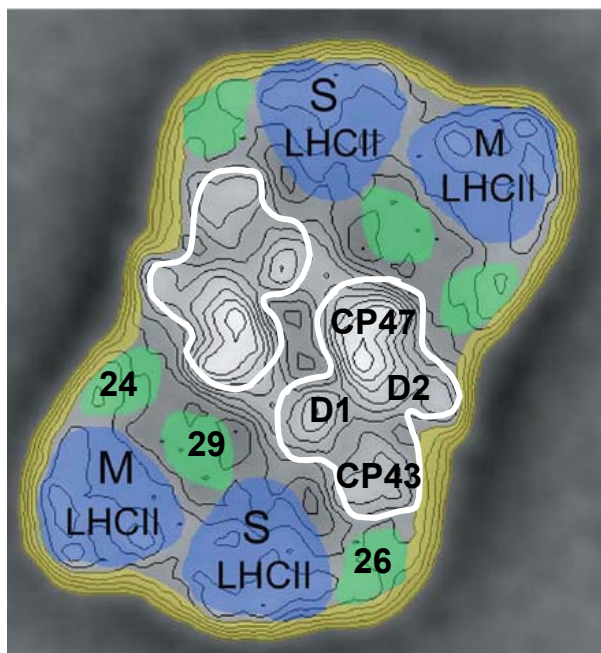


Abb. 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines PSII Superkomplexes. Blau gekennzeichnet sind die Bereiche der LHCII-Trimere (fest und moderat gebunden, S und M). Die Lage der minoren Antennen CP24, CP26 und CP29 wird durch die grünen Bereiche angegeben. Weiß umrandet ist der Kern-Bereich des Superkomplexes, die beiden Photosysteme II mit den Proteinen D1 und D2 und den Kern-Antennen CP43 und CP47 (modifiziert aus Ruban *et al.* 2003).

In der vorliegenden Arbeit gilt das Hauptinteresse dem Hauptlichtsammelkomplex des PSII, dem LHCII. Dieser ist bisher der am besten biochemisch und spektroskopisch charakterisierte Antennen-Komplex.

### 1.2 Die Struktur des LHCIIb

Die Struktur des monomeren LHCIIb konnte durch Kristallisations-Experimente bis zu einer Auflösung von 3.4 Å ermittelt werden (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Das Protein besteht aus drei transmembranen  $\alpha$ -Helices, I, II und III und einer amphiphilen  $\alpha$ -Helix IV, die sich zwischen dem hydrophoben Inneren der Thylakoidmembran und dem Thylakoidlumen befindet (in der ursprünglichen Veröffentlichung werden die Helices mit B, C, A und D benannt). Die Helices III und I bilden im Zentrum der Membran eine „Superhelix“, wobei sie durch Ionen-Brücken zwischen Glutaminsäure- und Arginin-Resten miteinander verbunden sind. Diese Ionen-Brücken leisten vermutlich einen wesentlichen Beitrag zur Stabilisierung des Proteins (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Eine weitere Ionen-Brücke befindet sich innerhalb der Helix II.

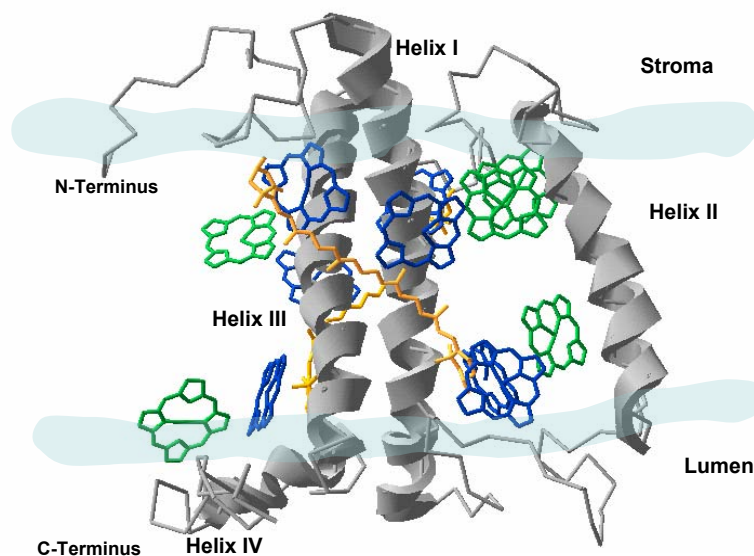


Abb. 1.3: Dreidimensionales Modell des LHCIIb nach der Kristallstruktur von Kühlbrandt *et al.* (1994). Die beiden zentralen Luteine sind gelb, Chl a blau und Chl b grün gefärbt. Die Zuordnung entspricht der von Kühlbrandt *et al.* (1994).

An den Komplex gebunden sind mindestens 12 Chlorophylle und 3 Carotinoide. In der Kristallstruktur konnten nur die zwei zentralen Lutein-Moleküle aufgelöst werden, die in ihren Bindestellen L1 und L2 eng mit den beiden Helices III und I assoziiert sind. Sie bilden eine Art Querverstrebung zwischen den Helices und gelten aus diesem Grund ebenfalls als mitverantwortlich für die Stabilität des Komplexes (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Die Bindestelle von Neoxanthin konnte durch Mutationsanalysen nahe der Helix II lokalisiert werden (Croce *et al.* 1999a). Violaxanthin wird im Monomer nur in substöchiometrischen Mengen gebunden, besitzt aber möglicherweise eine eigene Bindestelle an der Peripherie des Komplexes (Ruban *et al.* 1999). Die Aufgabe der Carotinoide liegt neben der Sammlung von Lichtenergie im Schutz vor Photooxidation durch die Eigenschaft der Löschung von Triplett-Angregungs-Zuständen von Chlorophyllen und Singulett-Angregungs-Zuständen von Sauerstoff (Young & Frank 1996).

Die Bindung der Chlorophylle an das Proteingerüst erfolgt durch die Koordination des zentralen Magnesium-Atoms mit den Seitenketten von polaren Aminosäuren oder mit Carbonylgruppen der Peptidbindung (Kühlbrandt *et al.* 1994). Es handelt sich um die Interaktion zwischen einer Lewis-Säure und einer Lewis-Base. Dabei ist es wahrscheinlich, dass auch noch andere strukturelle Eigenschaften, wie z.B. hydrophobe Bindungstaschen einen Einfluss auf die Chlorophyll-Bindung haben (Hobe *et al.* 2003). Als Liganden dienen die Aminosäuren Glutamat, Glutamin, Asparagin, Histidin und Glycin, wobei für drei der zwölf Chlorophylle bisher kein Ligand identifiziert werden konnte.

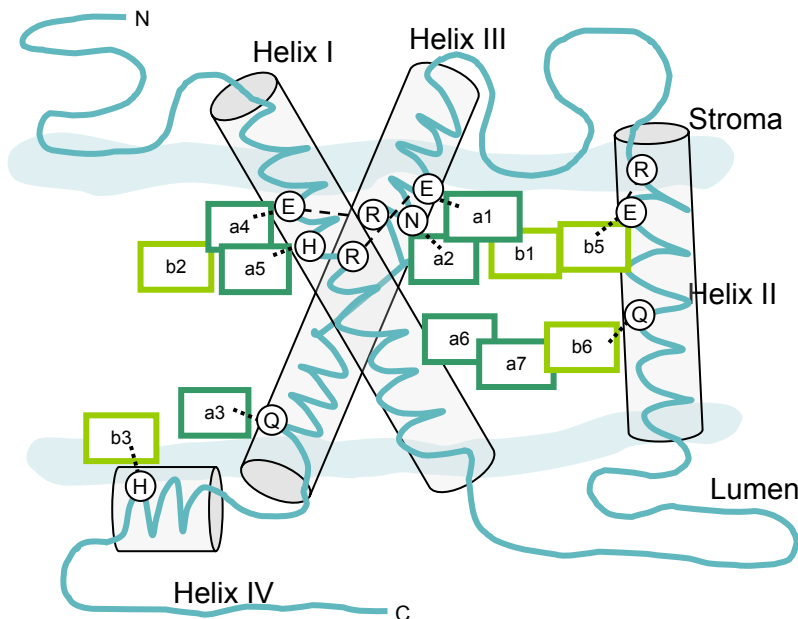


Abb. 1.4: Zweidimensionales Modell des LHCIIb nach der Kristallstruktur von Kühlbrandt *et al.* (1994). Gezeigt sind die Chlorophyll-Bindestellen mit den Liganden: Histidin (H), Glutamat (E), Glutamin (Q) und Asparagin (N). Die länger gestrichelten Linien symbolisieren die inter- bzw. intrahelikalen Ionenbrücken zwischen Glutamat (E), und Arginin (R). N und C stehen für N- bzw. C-Terminus. Die Zuordnung von Chl a (dunkelgrün) und Chl b (hellgrün) entspricht ebenfalls der von Kühlbrandt *et al.* (1994). (Schema modifiziert nach Sonja Geister).

Eine Unterscheidung zwischen Chl a oder Chl b ist anhand der Kristallstruktur nicht möglich. Die Zuordnung von Chl a zu den 7 Chlorophyllen, die sich am nächsten zu den zentralen Lutein-Molekülen befinden, erfolgte aufgrund theoretischer Überlegungen bzgl. der Anregungs-Lebenszeit von Chl a. Im Gegensatz zur Lebenszeit von Chl b ist diese lang genug, damit Chl a in einen Triplett-Zustand übergehen kann und zur Löschung dieses Zustandes ein nahe gelegenes Carotinoid-Molekül benötigt. Nach dieser Zuordnung werden die Chlorophylle mit a1 bis a7 und b1 bis b3, b5 und b6 benannt. Biochemische Untersuchungen zur Pigmentstöchiometrie des LHCIIb bestätigten nur zum Teil die ursprüngliche Zuordnung von Chl a und Chl b zu den einzelnen Bindestellen. So wurde z.B. für die Stellen a3 und b3 nachgewiesen, dass sie sowohl Chl a als auch Chl b binden können und für die Stelle b5, dass bevorzugt Chl a gebunden wird (Remelli *et al.* 1999, Rogl *et al.* 1999, Hobe *et al.* 2003). Fünf der Bindestellen, vermutlich b1, b2, b6, a6 und a7, wird eine ausschließliche Chl b-Bindung zugeordnet (Hobe *et al.* 2003).

### 1.3 Energietransfer innerhalb des LHCII

Um die Funktion einer Lichtsammelantenne erfüllen zu können, muss nach der Absorption der Lichtenergie diese möglichst effizient zunächst innerhalb des Komplexes und anschließend an

benachbarte Antennen-Komplexe weitergeleitet werden. Die Fähigkeit zur Absorption von sichtbarem Licht ist auf das ausgedehnte System an konjugierten Doppelbindungen in der chemischen Struktur der Pigmente zurückzuführen. Bei Anregung des Moleküls durch Absorption von Lichtenergie (Photonen) geht ein Elektron des konjugierten Systems aus dem Grundzustand in ein höheres Orbital über, das Molekül befindet sich im angeregten Singulettzustand. Für eine Absorption muss das Photon in der Regel mindestens die Energie des angeregten Zustands enthalten. Dabei gilt, je größer das konjugierte System, desto kleiner die erforderliche Energie. Die Chlorophylle besitzen zwei Hauptzustände  $S_1$  und  $S_2$ , die den Absorptionsbanden im roten und im blauen Wellenlängenbereich entsprechen. Die Rückkehr aus den angeregten Zuständen kann über verschiedene Wege erfolgen. Die Rückkehr aus dem  $S_2$ -Zustand in den  $S_1$ -Zustand erfolgt generell extrem schnell durch thermische Umwandlung, d.h. strahlungslos durch die Abgabe von Wärme. Ausgehend vom  $S_1$ -Zustand dagegen kann der Grundzustand sowohl durch die Emission von Fluoreszenzlicht, als auch strahlungslos erfolgen.

Eine weitere strahlungslose Möglichkeit, die für die Funktion des LHCII als Lichtsammelantenne essentiell ist, ist die Rückkehr aus dem  $S_1$  in den Grundzustand durch die Übertragung der Anregungsenergie auf ein energieärmeres Akzeptor-Molekül, welches dadurch selbst angeregt wird. Dies geschieht durch Wechselwirkungen der Dipolmomente der elektronischen Übergänge. Dabei müssen die elektronischen Übergänge von Donor und Akzeptor eine ähnliche Frequenz besitzen, d.h. eine Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrums des Akzeptors ist erforderlich (Galla 1988). Diese Art der Energieübertragung wird auch Resonanz- oder Förster-Transfer genannt und kann bis zu einem Abstand von 100 Å beobachtet werden (Sauer 1975). Zwischen den einzelnen Komplexen und zum Reaktionszentrum erfolgt der Transfer wahrscheinlich nach diesem Mechanismus (Scheer 1999).

Bei sehr kleinen Abständen der Chromophore kommt es zu einer starken Wechselwirkung zwischen den angeregten Zuständen. Man spricht dann von einer excitonischen Kopplung der Moleküle, in deren Folge sich neue angeregte Zustände bilden, die über die gekoppelten Moleküle verteilt sind (Holzwarth 1999). Innerhalb des LHCII befinden sich die Chlorophylle in einer dichten Packung, was einen Energietransfer hauptsächlich durch den Mechanismus der Excitonen-Kopplung vermuten lässt. In diesem Fall spricht man von einer Delokalisation der Anregungsenergie über den gesamten Komplex (Scheer 1999).

Die Übertragung der Energie vom energiereicheren  $S_1$ -Zustand von Chl b auf den energieärmeren  $S_1$ -Zustand von Chl a ist eine charakteristische Eigenschaft des funktionellen LHCII. Diese kann durch Messung der Fluoreszenz von Chl a bei 680 nm nach Anregung von Chl b bei 470 nm an isolierten Komplexen dokumentiert werden. Bei vollständiger Energieübertragung ist keine Fluoreszenzemission durch Chl b mehr zu beobachten, das Emissionsspektrum zeigt ein einziges Maximum bei 680 nm. Die Chl a-Fluoreszenz wird in diesem Fall als sensibilisierte Fluoreszenz (s) bezeichnet, da sie ohne direkte Anregung zu beobachten ist. Eine Schädigung des Komplexes dagegen führt zu einem Anstieg der Chl b-Fluoreszenz auf Kosten der Chl a-Fluoreszenz.

### **1.4 Assemblierung des LHCII *in vivo***

Da das Apoprotein des LHCII neben einer Reihe von weiteren Proteinen des Photosyntheseapparates im Kern codiert wird, muss es nach der Synthese an freien Ribosomen des Cytosols posttranslational als Vorläuferprotein pLhcb mit Hilfe einer Transit-Sequenz in den Chloroplasten importiert werden. Der Transport über die Hüllmembranen des Chloroplasten erfolgt über einen Translokationsapparat, der ebenso für bakterielle Membranen, das Endoplasmatische Reticulum (ER) und die Mitochondrien bekannt ist. Dieser besteht aus zwei Hauptkomplexen, dem der äußeren Hüllmembran: *translocon at the outer membrane of the chloroplast* (TOC) und dem der inneren Hüllmembran: *translocon at the inner membrane of the chloroplast* (TIC). Beide sind aus jeweils mehreren und zum großen Teil integralen Membranproteinen aufgebaut. Nach der Bindung der Transit-Sequenz an eine Komponente des TOC erfordert der weitere Transport über die beiden Translokatoren die Hydrolyse von GTP und ATP. An der stromalen Seite des TIC werden Chaperone vermutlich dafür benötigt, eine nachfolgende Faltung direkt mit der Translokation des Proteins zu koppeln und auf diese Weise das Protein in seiner gesamten Länge in das Stroma zu ziehen. Die Abspaltung der Transitsequenz erfolgt durch eine stromale Peptidase (Bauer *et al.* 2001).

#### Die Assemblierung des LHCII in der Thylakoidmembran:

Für die Insertion von Proteinen in die Thylakoidmembran bzw. den Transport über dieselbe in das Thylakoidlumen, konnten bisher vier verschiedene Wege identifiziert werden. Die Insertion des Lhcb erfolgt über den SRP-Weg (SRP: *signal recognition particle*), der auf ähnliche Weise den Transport von Proteinen in das ER vermittelt. Daran beteiligt ist die Chloroplasten-Version des eukaryotischen SRP, cpSRP, bestehend aus den Untereinheiten cpSRP54 und cpSRP43 (Tu *et al.* 1999). Nach abgeschlossenem Import bindet das Lhcb im Stroma an die Komponenten des cpSRP und bildet mit ihnen einen löslichen „Übergangskomplex“, wobei Bereiche der stromalen Schleife des Proteins vermutlich eine Rolle für die Bindung spielen (DeLille *et al.* 2000). Zusätzlich zum cpSRP werden weitere stromale Faktoren für die Insertion in die Thylakoidmembran benötigt. Es sind dies cpFtsY, die Chloroplasten-Version des SRP-Rezeptors und GTP (Tu *et al.* 1999). Innerhalb der Membran konnte bisher mit ALB3 erst eine Komponente in Zusammenhang mit der Translokation des Lhcb identifiziert werden (Moore *et al.* 2000). Es kann davon ausgegangen werden, dass noch eine Reihe weitere Faktoren beteiligt sind. Topographische Studien zur Insertion des Lhcb1 in isolierte Thylakoide zeigten, dass es sich wahrscheinlich um einen so genannten Schleifen-Mechanismus handelt, bei dem nur der C-Terminus und die luminal Schleife über die Membran transportiert werden (Kosemund *et al.* 2000).

Der Ablauf der Pigmentbindung während der Insertion des Lhcb über den cpSRP-Weg ist zurzeit noch völlig ungeklärt. Eine stabile Insertion des Proteins ist jedoch nur in Zusammenhang mit der Pigmentbindung möglich. Dies zeigte sich anhand von Versuchen an Etioplasten-Membranen *in vitro*, bei denen nur in Anwesenheit von Chlorophyll, bzw. einer analogen Struktur mit Zink als Zentralatom (Zn-Pheophytin, Zn-Phe), ein stabiler LHCII nachgewiesen werden konnte. Dabei war Zn-Phe alleine nicht ausreichend für die Insertion (Kuttkat *et al.* 1997). Die Notwendigkeit von Chl b für die Akkumulation des LHCII *in vivo* konnte ebenfalls anhand von Mutanten von *Arabidopsis thaliana* mit einer stark reduzierten Chl b-Synthese gezeigt werden, in denen die Produkte der Gene *Lhcb1-6* kaum noch

vorhanden waren (Espineda *et al.* 1999). Für die Chl b-Synthese *in vivo* wird das Enzym Chlorophyll(id) a Oxygenase (CAO) verantwortlich gemacht (Tanaka *et al.* 1999). Als Reaktionsmechanismus wird vorgeschlagen, dass Chlorophyllid a (Chlid a), die Vorstufe von Chl a ohne Phytolrest und nicht Chl a selbst, durch das Enzym zu Chlid b umgewandelt wird und erst dann durch die Chl-Synthase Chl b entsteht (Oster *et al.* 2000). Da die Umsetzung eine hydrophobe Umgebung benötigt (Porra *et al.* 1994), wird vermutet, dass sie *in situ* stattfindet, d.h., während die Pigmente schon an den Lhcb gebunden sind (Plumley & Schmidt 1995).

### Die Assemblierung des LHCII innerhalb der Chloroplasten-Hüllmembran:

Ein anderer Weg für die Assemblierung des LHCII wird von Hooper & Eggink (1999) vorgeschlagen, bei dem die Bindung der Pigmente schon parallel zur Translokation des Proteins durch die Hüllmembranen stattfindet. Die Basis des Modells bildet die Beobachtung, dass ein dauerhafter Aufenthalt des Lhcb im Chloroplasten unbedingt die Synthese von Chlorophyll erfordert und dass in dessen Abwesenheit das Vorläuferprotein erst gar nicht in den Chloroplasten importiert werden kann (White *et al.* 1996, Park & Hooper 1997).

Nach dem Modell wird die Faltung durch eine Bindung von Chlorophyllen an die Liganden a4 und a5 der Helix I zu einem Zeitpunkt initiiert, an dem das Vorläuferprotein den gesamten Translokationsapparat der beiden Hüllmembranen durchspannt, d.h. sich der C-Terminus im Cytosol und der N-Terminus, inzwischen ohne Transit-Sequenz, im Stroma befinden. Die Bindung soll den weiteren Transport zunächst unterbrechen, das Protein aber außerdem stabil innerhalb der Hüllmembranen festhalten und so daran hindern, wieder ins Cytosol zurück zu gleiten. Die Sequenz von Aminosäuren, die die Liganden enthält, wird aus diesem Grund „Retentions-Motiv“ genannt. Analog zu den Ergebnissen der pigment-abhängigen Insertion in die Thylakoidmembran, wird speziell die Bindung von Chl b als eine Voraussetzung für den Verbleib des Lhcb in der Hüllmembran gesehen (Hooper & Eggink 2001), wobei auch von einer Synthese von Chl b *in situ* (am Komplex) ausgegangen wird.

Weitere Schritte des Modells sehen vor, dass bei ausreichender Synthese von Chlorophyll die unpigmentierten Bereiche, die sich noch innerhalb der äußeren Hüllmembran befinden, zum Teil durch eine Entfernung der inneren von der äußeren Hüllmembran in den Intermembranraum gezogen werden und durch die Besetzung der Bindestellen des Retentions-Motivs der Helix III (a1 und a2) in die Membran inserieren können. An dieser Stelle wird eine Beteiligung weiterer Proteine, wie z.B. Komponenten des cpSRP angenommen. Nach der Bindung weiterer Chlorophylle wäre die funktionelle Struktur vollständig ausgebildet. Für den Transport des assemblierten LHCII zur Thylakoidmembran wird vermutet, dass er durch Lipidvesikel erfolgt.

Neben den Chlorophyllen ist auch die Synthese der Carotinoide, besonders der von Lutein, essentiell für eine Akkumulation des LHCII *in vivo* (Heinze *et al.* 1997). In Zusammenhang mit dem Modell von Hooper & Eggink (1999) wird vermutet, dass sie (1) als Quencher für die Vorstufe der Chlorophylle, die Chlorophyllid (Chl ohne Phytolrest) wirken und so für einen Schutz vor photooxidativem Schaden sorgen und dass sie (2) in Verbindung mit Proteinen wie z.B. den ELIPs (*early light induced proteins*) eine Funktion in der Anlieferung der Chlorophylle/Chlorophyllide zum Ort der Assemblierung des LHCII haben.

Nach derzeitigem Kenntnisstand scheinen demnach verschiedene Wege für die Assemblierung des LHCII *in vivo* zu existieren. Welcher der beiden Möglichkeiten in der

Pflanze stattfindet, könnte dabei z.B. abhängig vom Entwicklungszustand des Chloroplasten sein.

### **1.5 Assemblierung des LHCII *in vitro***

Der LHCIIb lässt sich *in vitro* aus seinen Bestandteilen, dem Apoprotein (p)Lhcb1 und den Pigmenten (Chl a, Chl b und den Carotinoiden) rekonstituieren (Paulsen *et al.* 1990). Dabei ist die Rekonstitution direkt abhängig von der Anwesenheit der Pigmente. Durch spektroskopische Untersuchungen und Experimente zur Kristallisation der trimeren Form des LHCII konnte gezeigt werden, dass sich der rekonstituierte Komplex kaum von dem nativen unterscheidet (Paulsen *et al.*, 1990; Hobe *et al.*, 1994). Mit der Möglichkeit der Herstellung des Komplexes *in vitro* ergeben sich große Vorteile für die genaue Aufklärung der Struktur und der Funktion des LHCIIb. So kann durch eine gezielte Veränderung der Rekonstitutionsbedingungen direkt Einfluss auf den Aufbau des Komplexes genommen werden. Die Analyse der potentiell veränderten Komplexe im Vergleich zu Komplexen, die dem nativen entsprechen, erlaubt es dann, Rückschlüsse über bestimmte Eigenschaften des Komplexes zu ziehen. Eine Untersuchung der Pigmentstöchiometrie im Komplex in Abhängigkeit des Pigmentangebotes in der Rekonstitutionslösung kann z.B. Hinweise auf Affinitäten der einzelnen Pigmentbindestellen geben. Auf diese Weise wurde von Hobe *et al.* (2000) eine hohe Affinität von zwei Carotinoid-Bindestellen für Lutein ermittelt, während eine dritte Bindestelle eine höhere Präferenz für Neoxanthin zeigte.

Ebenso können Veränderungen auf Proteinebene durch Mutationen der DNA-Sequenz eingeführt werden, um z.B. für die Komplexstabilität relevante Aminosäuren oder Proteinbereiche identifizieren zu können. Die Analyse von Mutanten des Wildtyp-Lhcb1, die in ihren Chlorophyll-Bindestellen verändert wurden, ist ein wichtiges Mittel für die genaue Zuordnung der Chlorophylle a und b zu den einzelnen Bindestellen (vgl. 1.2).

Die vollständige Aufklärung der Struktur des LHCIIb sollte zum einen das Verständnis der Funktion des Komplexes *in vivo* als effiziente Lichtsammelantenne ermöglichen, zum anderen aber auch die Strukturaufklärung der anderen weniger gut charakterisierten Komplexe erleichtern.

### **1.6 Zeitaufgelöste Messung der Assemblierung des LHCII *in vitro***

Neben der Aufklärung der Struktur des funktionellen Komplexes liefert die Rekonstitution *in vitro* auch eine Möglichkeit, den Mechanismus der Pigmentbindung und die Ausbildung der Proteinstruktur zu untersuchen. So ist in der vorliegende Arbeit weniger der fertige Komplex von Interesse, sondern vielmehr der Weg dorthin, der ausgehend vom Apoprotein (p)Lhcb1 und den freien Pigmenten beschrieben wird und in dessen Verlauf sich die  $\alpha$ -helikale Struktur ausbildet und die Chlorophylle und Carotinoide an das Proteingerüst gebunden werden. Um diesen Weg über einen bestimmten Zeitabschnitt hinweg, d.h. zeitaufgelöst beobachten zu können, müssen Merkmale existieren, in denen sich der funktionelle Komplex deutlich von den freien Pigmenten und dem freien Protein unterscheidet. Wird durch die Mischung des Proteins

mit den Pigmenten die Komplexbildung induziert, dient die zwangsläufige Veränderung des Merkmals als Monitor der Ereignisse auf dem Weg zum LHCIIb.

Die Pigmentbindung lässt sich anhand der Etablierung des für den funktionellen LHCII charakteristischen Energietransfers zwischen Chl b und Chl a beobachten (vgl. 1.3). Nach Anregung von Chl b bei 470 nm zeigt sich im Verlauf der Komplexbildung, ausgehend von freien Pigmenten und freiem Protein, die Zunahme der Chl a-Fluoreszenz bei 680 nm bei gleichzeitiger Abnahme der Chl b-Fluoreszenz bei 660 nm. Die ersten zeitaufgelösten Fluoreszenz-Messungen dieser Art ergaben für die Bindung der Pigmente zunächst nur eine Reaktionszeit von mehreren Minuten (Booth & Paulsen 1996). Durch die Optimierung der Messmethode konnte die Reaktionszeit in eine schnellere und eine langsamere Reaktionszeit ( $\tau_1$  und  $\tau_2$ ) aufgeteilt werden (Reinsberg *et al.* 2000). Durch eine Variation der Rekonstitutionsbedingungen konnte in weiteren Experimenten z.B. gezeigt werden, dass die Bildungsgeschwindigkeit sowohl durch die Chlorophyll- als auch die Carotinoid-Bindung limitiert wird. Dabei führt eine Erhöhung des Chl a/b-Verhältnisses zu einer Beschleunigung der Komplexbildung, während ein Anstieg der Chl b-Konzentration eher eine Verlangsamung bewirkt (Reinsberg *et al.* 2001).

### **1.7 Proteinfaltung**

Die native Konformation eines Proteins lässt sich anhand von drei Stufen charakterisieren. Die Sequenz der Aminosäuren bildet die Grundlage, die Primärstruktur. Die Lage benachbarter Aminosäuren entlang der Polypeptidkette ergibt sich durch die verschiedenen Sekundärstrukturen,  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ -Sheet) und Zufallsknäuel (Random Coil). In der Tertiärstruktur nimmt dann die Polypeptidkette eine spezifische räumliche Anordnung ein. Weitere Ebenen lassen sich ergänzen, wie die Bindung von prosthetischen Gruppen, z.B. der Chlorophylle des LHCII, oder eine Oligomerisierung. Ausgehend von ihrem ungefalteten Zustand scheinen Proteine eine unendliche Zahl von Möglichkeiten zu haben, ihre endgültige native Konformation zu erreichen. In diesem Fall wäre ein sehr langsamer Faltungsmechanismus zu erwarten, was in der Realität jedoch nicht zu beobachten ist. Vielmehr wird vermutet, dass Proteine einem definierten Faltungsweg folgen, in dessen Verlauf sie in ihren strukturellen Möglichkeiten eingeschränkt werden und so relativ schnell ihre endgültige Konformation erhalten. Der Zustand, der für eine endgültige Konformation präferiert wird, ist generell der Ort, bei dem sich das Protein aufgrund der Anordnung der Seitenketten und des Proteinrückgrates in seinem energetischen Minimum befindet. Der Begriff des Faltungsweges wird jedoch seit einigen Jahren vermehrt durch den Begriff eines Faltungstrichters (*folding funnel*) ersetzt, der die energetische Landschaft (*energy landscape*) darstellt, in der in einem Ensemble von ungefalteten Zuständen des Proteins über verschiedene Wege der gleiche Endzustand, die native Konformation, erreicht werden kann. Abbildung 1.6 zeigt zwei solche Faltungstrichter mit unterschiedlichen Landschaften.

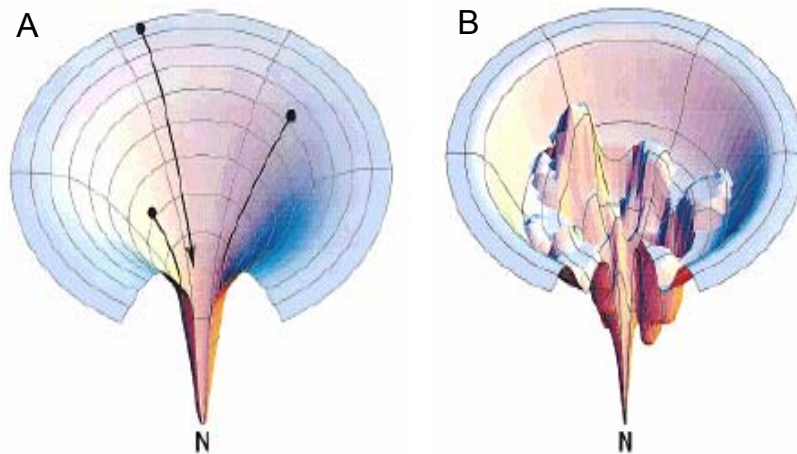


Abb. 1.6: Faltungstrichter mit verschiedenen energetischen Landschaften. Bei N liegt der Ort des energetischen Minimums, die native Konformation. Vertikale Achse: innere freie Energie einer bestimmten Konformation (Summe der Energien der Wasserstoff-Brücken, Ionen-Paare, usw). Laterale Achse: Freiheitsgrade einer Proteinkette (z.B. Drehwinkel des Proteintrückgrates). Die Beschaffenheit des Trichters bestimmt die Kinetik der Proteinfaltung (aus: Chan & Dill 1998).

Die unterschiedlichen Kinetiken, die für die Faltung von Proteinen beobachtet werden können, sind dann bestimmt durch die Beschaffenheit der energetischen Landschaft. Wie in Abb. 1.6 zu sehen ist, kann diese eher glatt oder aber eher schroff sein. Ebenso spielt die Steigung des Trichters eine Rolle für die Kinetik (Dill & Chan 1997, Chan & Dill 1998).

#### Die Faltung löslicher Proteine:

Über welche Faltungswege bzw. Faltungstrichter ein Protein in seine native Konformation gelangt, wird am Beispiel einer großen Anzahl hauptsächlich löslicher Proteine untersucht. Anhand bisheriger Erkenntnisse lassen sich zwei Arten der Proteinfaltung unterscheiden. Gelangt ein Protein ohne die Ausbildung eines Intermediats in seine native Konformation, wie z.B. das Csp B (cold-shock protein) von *Bacillus subtilis* (Schindler *et al.* 1995), spricht man von einer „Two-state“ Faltungs-Kinetik. Die energetische Landschaft des Faltungstrichters wäre in dem Fall sehr glatt (vgl. Abb. 1.6 A). Lassen sich im Verlauf der Faltung Intermediate mit teilweise gefalteter Struktur beobachten, wie z.B. bei Cytochrom c und Myoglobin (Akiyama *et al.* 2000, Chiba *et al.* 1994), ist die energetische Landschaft eher rau und mit einer Anzahl an Tälern und Hügeln ausgestattet (vgl. Abb. 1.6 B). In diesem Fall spricht man von einer „Multi-state“ Faltungs-Kinetik. Innerhalb eines Tals befindet sich die Proteinkette mit ihrer Konformation in einer „kinetischen Falle“, d.h. einem lokalen energetischen Minimum. Um aus dieser Falle zu entkommen und den Weg zum globalen Minimum weiter verfolgen zu können, muss an dieser Stelle Energie aufgewendet werden. Dadurch bedeutet das Auftreten von Intermediaten generell eine Verlangsamung der Faltungs-Geschwindigkeit.

Betrachtet man die Faltung eines Proteins mit dem Begriff des Faltungsweges, können Intermediate als produktiv oder unproduktiv angesehen werden. Ein produktives Intermediat wäre energetisch begünstigt und seine Ausbildung obligatorisch für den Faltungsweg. Ein unproduktives Intermediat dagegen würde für eine Verlangsamung der Faltung sorgen, da in seiner Struktur nicht-native Interaktionen stabilisiert werden (Baldwin & Rose 1999). Beide Möglichkeiten lassen sich mit den Begriffen „on-pathway“ und „off-pathway“ beschreiben. Mit dem Modell der trichterförmigen energetischen Landschaft können die beiden Arten von Intermediaten nicht mehr strikt unterschieden werden, da letztendlich alle Wege zum einzigen und richtigen Ziel, dem energetischen Minimum der nativen Konformation führen (Dill & Chan 1997). Experimentell konnte eine Reihe von Intermediaten gefunden werden, deren Sekundärstruktur der des nativen Zustandes schon zu einem großen Teil gleicht, bei denen

die Tertiärstruktur aber noch variabel ist. Es handelt sich dabei um die so genannte Struktur des „molten globule“ (Ptitsyn 1995). In diesem Fall würde es sich bzgl. der zeitlichen Regelung der Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstruktur um einen hierarchischen Faltungsmodus handeln. Eine andere Meinung ist die, dass eine Reihenfolge beschrieben wird, bei der zunächst eine kompakte dreidimensionale/globale Struktur in Abwesenheit von Sekundärstruktur-Anteilen angenommen wird und erst diese die Ausbildung lokaler Strukturen induziert (Baldwin & Rose 1999). Ein Faltungsmechanismus über eine Abfolge von Intermediaten lässt sich zunächst darüber identifizieren, dass für den gesamten Vorgang mehrere Reaktionszeiten aufgelöst werden können. Das Modell des Faltungstrichters macht jedoch deutlich, dass auch andere Mechanismen als Ursprung verschieden schneller Schritte in Betracht gezogen werden müssen, wenn die Untersuchungen anhand eines Protein-Ensembles durchgeführt werden. So werden Proteine, die sich im ungefalteten Zustand an unterschiedlichen Stellen des Trichters befinden, d.h. sich in ihrer Struktur unterscheiden, ihren Weg zum globalen Minimum entlang verschiedener Charakteristika der energetischen Landschaft und somit auch unterschiedlich schnell beschreiten. In diesem Fall wäre die Auflösung mehrere Zeiten nicht der Ausdruck verschiedener Schritte an einem einzelnen Protein, sondern der Ausdruck verschiedener paralleler Faltungswege.

### Die Faltung von Membranproteinen:

Theoretisch sollte für die Faltung von integralen Membranproteinen, zu denen auch der LHCII gehört, ebenfalls das Modell eines Faltungstrichters und einer energetischen Landschaft angewendet werden können. Praktisch ist jedoch über die Faltung von Membranproteinen zurzeit deutlich weniger bekannt, als über die Faltung von löslichen Proteinen. Dies liegt vor allem daran, dass bisher nur mit wenigen Vertretern dieser Proteinklasse eine Rückfaltung *in vitro* gelungen ist. Dabei lassen sich die Mechanismen möglicherweise leichter verstehen, als die von löslichen Proteinen, da sie aufgrund ihrer direkten Umgebung, der Lipid-Doppelschicht größeren energetischen Einschränkungen unterliegen (Popot & Engelman 2000). Ein großer Teil der bisherigen Erkenntnisse stammt aus Untersuchungen zur Faltung von Bacteriorhodopsin (bR), einem Membranprotein mit 7 transmembranen  $\alpha$ -Helices, dessen Struktur bis zu einer Auflösung von 1.55 Å bestimmt werden konnte (Luecke *et al.* 1999). Auf der Grundlage von Beobachtungen zur Faltung von bR entwickelten Popot & Engelman (1990) das so genannte „Two-Stage-Modell“. Das Modell geht davon aus, dass sich im ersten Stadium stabile transmembrane  $\alpha$ -Helices unabhängig voneinander ausbilden, wobei die Triebkraft der hydrophobe Effekt der Lipidumgebung und die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken-Bindungen des Proteinrückgrates ist. Die gesamte Struktur ist in diesem Stadium eher locker gepackt. Entfernt zu vergleichen wäre dies mit dem Zustand des „molten globule“ löslicher Proteine. Im zweiten Stadium kommt es zu Interaktionen der Helices, woraufhin diese eine engere Packung eingehen und die Ausbildung der Tertiärstruktur induziert wird. Als verantwortlich dafür gesehen wird z.B. die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken und Ionen-Brücken, die Interaktion von Helix-Dipolen und die Interaktion zwischen Helices und den umgebenden Lipidmolekülen. Inzwischen ist das Modell für Vorgänge, die erst nach der engeren Packung der Helices stattfinden, um ein drittes Stadium erweitert worden (Engelmann *et al.* 2003). In diesem Stadium erfolgt z.B. die Bindung von prosthetischen Gruppen, die Insertion weiterer Protein-bereiche oder die Oligomerisierung monomerer Proteine.

Um zu klären, inwieweit sich das „Two-Stage-Modell“ auf die Faltung der Membranproteine übertragen lässt, sind sicherlich eine Reihe weiterer Untersuchungen an den verschiedensten Vertretern dieser Protein-Klasse erforderlich.

### **1.8 Zielsetzung der Arbeit**

Die Struktur des LHCII ist durch eine Reihe von spektroskopischen und biochemischen Untersuchungen *in vitro* schon zu großen Teilen aufgeklärt. Auch über die Assoziation der Komplexe mit den anderen Komponenten des Photosyntheseapparates in der Thylakoidmembran werden immer mehr Daten bekannt, so dass die Prozesse, die zu einer effizienten Energieweiterleitung führen, immer besser verstanden werden können.

Dagegen ist über den Mechanismus, mit dem *in vivo* aus dem Apoprotein und den Pigmenten der funktionelle Komplex assembliert wird, zurzeit noch sehr wenig bekannt (vgl. 1.4). Die Rekonstitution des LHCII *in vitro* ermöglicht es, diesen Mechanismus unter vereinfachten Bedingungen zu beobachten, d.h. ohne die zusätzlichen Prozesse innerhalb der Chloroplasten hinsichtlich Pigmentsynthese, Transport der Pigmente, Insertion des Proteins in die Thylakoidmembran etc. mit einbeziehen zu müssen. So soll eine Aufklärung der Komplexassemblierung *in vitro* ebenfalls zu einem besseren Verständnis der Situation *in vivo* führen.

Des Weiteren können Erkenntnisse über die Faltung des LHCII auch Hinweise auf den Faltungsmechanismus von Membranproteinen im Allgemeinen liefern, über den zurzeit noch wenig bekannt ist (vgl. 1.7.2).

Im funktionellen LHCII sind mindestens 12 Chlorophylle und 3 Carotinoide an ein Proteingerüst gebunden, das aus drei transmembranen Helices und einer amphiphilen Helix besteht (vgl. Abb. 1.3). Wichtige Punkte für eine Aufklärung des Faltungsmechanismus sind demnach die Ermittlung einer Bindungsreihenfolge der Pigmente und das Verständnis darüber, wie die Ausbildung der Sekundärstruktur in Zusammenhang mit der Pigmentbindung stattfindet.

#### **Die Ausbildung der Sekundärstruktur:**

In den bisherigen Arbeiten wurde die Komplexbildung auf der Ebene der Pigmentbindung anhand der Etablierung des Energietransfers zwischen Chl b und Chl a untersucht. Da sich für die Rekonstitutionen *in vitro* gezeigt hatte, dass die Bindung der Pigmente eine Voraussetzung für die Ausbildung der Sekundärstruktur ist (Paulsen *et al.* 1993), ist ein Ziel dieser Arbeit die Beobachtung der Komplexbildung auf der Proteinebene. Ein Vergleich mit den Ergebnissen zur Pigmentbindung soll Hinweise auf die Art der Kopplung zwischen den beiden Prozessen liefern. Die Ausbildung der Sekundärstruktur wird anhand der Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) beobachtet, die es ermöglicht, anhand von Spektren im UV-Bereich, zwischen den verschiedenen Motiven wie  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Zufallsknäuel zu unterscheiden (vgl. 2.3.2). Ein Teil der Experimente wurde dabei schon im Rahmen der vorausgegangenen Diplomarbeit durchgeführt.

### Die Pigmentbindung ausgehend von vollständig ungefaltetem Lhcb1:

Wird die Rekonstitution des LHCIIb ausgehend von SDS-denaturiertem Lhcb1 durchgeführt, ist schon vor dem Start der Komplexbildung ein Teil der  $\alpha$ -helikalen Struktur vorhanden (Paulsen *et al.* 1993). Dies ist nicht der Fall, wenn das Protein in GuHCl gelöst vorliegt. Inwieweit die Ausbildung der vollständigen Sekundärstruktur ein limitierender Schritt für die Pigmentbindung ist, soll anhand der zeitaufgelösten Messung der Chlorophyll-Fluoreszenzen ermittelt werden.

### Die Beobachtung eines größeren Ausschnittes der Pigmentbindung:

Die Verwendung der Chlorophyllfluoreszenzen als Monitor erlaubt nur die Beobachtung eines begrenzten Ausschnittes der Pigmentbindung, d.h. erst ab dem Zeitpunkt an dem mindestens ein Chl b und ein Chl a-Molekül an das Protein gebunden haben, zwischen denen Energietransfer stattfinden kann. So kann die Bindung nur einzelner Chlorophyllspezies oder eine Bindung von Chlorophyllen unter Bedingungen, die noch keinen Energietransfer erlauben, nicht beobachtet werden. Ein Ziel dieser Arbeit ist es, anhand von weiteren Monitoren die Beobachtung eines größeren/anderen Ausschnittes der Pigmentbindung zu ermöglichen, um so die Aufklärung einer Bindungsreihenfolge weiter voranzutreiben.

Zu diesem Zweck soll die Rekonstitution mit einem Protein durchgeführt werden, dass mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, der in der Lage ist, im assemblierten Komplex nach Anregung seine Energie auf die gebundenen Chlorophylle zu übertragen. Für die zeitaufgelösten Messungen ist in diesem Fall die Abnahme der Farbstofffluoreszenz ein Indikator für die Pigmentbindung während der Assemblierung. Da theoretisch schon die Bindung von einem Pigment an das Protein für eine erste Änderung der Farbstofffluoreszenz aufgrund der Energieübertragung sorgen sollte, wird erwartet, dass sich mögliche frühere Bindungsereignisse der Chlorophylle beobachten lassen, als es bisher anhand der Beobachtung der Chlorophyll-Fluoreszenz der Fall war. Durch eine Bindung des Donor-Farbstoffes an jeweils unterschiedliche Stellen des Proteins soll außerdem untersucht werden, ob sich die Pigmentbindung innerhalb von begrenzten Bereichen beobachten lässt.

Ein weiterer Monitor der Pigmentbindung ist die Entstehung von CD-Signalen im sichtbaren Bereich aufgrund der excitonischen Kopplung der gebundenen Pigmente (vgl. 2.3.2). Dabei ist der Ausschnitt nicht wie bei den Fluoreszenz-Messungen auf die Bindung der Chlorophylle beschränkt, sondern in Abhängigkeit der Wahl des Signals ebenfalls auf die Bindung der Carotinoide gerichtet.

### Die Unterscheidung zwischen zwei grundsätzlichen Modellen der Faltung:

Nach den bisherigen Ergebnissen zur Assemblierung des LHCIIb *in vitro* lässt sich der Prozess auf der Ebene der Pigmentbindung in zwei unterschiedliche schnelle Schritte einteilen (Reinsberg *et al.* 2000 und 2001). Bei einer Messung anhand eines Protein-Ensembles können für den Faltungsmechanismus grundsätzlich zwei Modelle für die Vorgänge auf molekularer Ebene angenommen werden. Entweder handelt es sich um zwei Proteinp Populationen, die sich unterschiedlich schnell falten, oder es existieren zwei unterschiedlich schnelle Gruppen von Bindungsereignissen, die an einem Protein stattfinden. Die Klärung dieser zentralen Frage wird durch die Beobachtung der Komplexbildung aus verschiedenen Blickwinkeln angestrebt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien und Lösungen wurden von den Firmen Avanti (Polar Lipids, Alabaster, USA) Bachem (Biochemica GmbH, Heidelberg), ICN (Biomedicals GmbH, Eschwege), Merck eurolabs (VWR International GmbH, Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, Taufkirchen) in p. A. Qualität verwendet.

Materialien für molekular- und mikrobiologische Arbeiten wurden von den Firmen New England BioLabs® Inc. (Frankfurt a. M.), Biomol (Hamburg), Statagene (Amsterdam, Niederlande), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), peQLab Biotechnologie GmbH (Erlangen) oder Macherey- Nage (Düren) bezogen.

Aceton von der Qualität technisch wurde vor Gebrauch destilliert.

#### 2.1.2 Geräte

##### Analytische HPLC

- Gradientenmischer: LG-1580-04 Quaternay Gradient Unit  
Pumpe: PU-1580 Intelligent Pump  
Degasser : DG-1580-53, 3-Line-Degasser  
Detektor : MD-1515 UV/VIS-Intelligent Multiwavelength-Detektor  
Säule : Chromolith Speed ROD, RP 18e-50-4.6  
Spannungsgeber : LC-Net II/ ADC  
Software : Jasco-PDA, BORWIN, Version 1.5

Alle Geräte sind von der Firma Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt.

##### Autoklav

- Varioklav Typ 500 Dampfsterilisator (H+P Labortechnik GmbH)

##### CD- Spektropolarimeter

- Modell J- 810- S (Jasco Labor- und Datentechnik, GmbH Deutschland, Groß- Umstadt)

##### Fluoreszenzspektrometer

- FluoroMax-2 (Jobin Yvon, Spex Instruments S.A., Inc., Frankreich)  
Digital Thermostat Ministat Compatible Control (Huber, Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg- Elgersweiler)  
Datamax Software Version 2.24/Grams 32  
Table Curve 2D Software Version 4.0 SPSS
- SX.17MV Fluorometer mit integrierter Stopped-Flow-Einheit (Applied Photophysics, Leatherhead, U.K); Standort Labor von Paula J. Booth, Dep. of Biochemistry, University of Bristol  
Inteferenz-Bandpassfilter 546 nm; DAD 8; T<sub>0</sub> = 0.65; HWB 8 ± 2 nm, Durchm. 25 mm

##### Gelelektrophorese: Polyacrylamid

- Gel-Gieß- und Elektrophoreseapparatur: Midget- Systems (Pharmacia LKB, Schweden)
- Spannungsquelle: BioRad Power Pac 3000 (Hercules, USA)

- Kühlung: Haake G, Haake D1
- Gel Trocknung: Slab Gel Dyer (Pharmacia, Bromma, Schweden)

### Gelelektrophorese: Agarose

- Transilluminatoren:  
Versa Doc 3000 (Bio-Rad, Hercules, USA)  
Software: Quantity One, Version 4.2 (Bio-Rad, München)

### Mixer

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

### PCR

- Cycler Primus 25 (MWG Biotech, München)

### pH- Meter

- Labor pH- Meter Ino Lab pH Level 2 (WTW Weilheim)

### Photometer

- Shimadzu UV-2101 PC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)
- Microtiter-Platten-Absorptionsmessgerät: SPECTRAMaxPLUS (Molecular Devices, Sunnydale, California), Software: SOFTmax®PRO
- Jasco V-550 UV/VIS Spectrometer (Jasco Labor-und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt)

### Präparative HPLC

- Pumpen: Model 510, 501 (Waters Millipore GmbH, Eschborn)  
Interface: System Interface Module  
Säule: Waters Bondapak C 18, 125 A, 10 µm 30\*300 mm  
Software: Max 820 Waters  
Detektoren:  
Absorption: GAT LCD 500 (Gamma Analysen Technik GmbH, Bremerhaven)  
Fluoreszenz: Shimadzu RF 535 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)

### Rapid- Mixing- Device

- RX- 2000 Rapid Kintetics Accessory (Applied Phtophysics Limited, UK)

### Reinstwasseranlage

- Optilab-Standard (membraPure, Lörzweiler)

### Rotationsverdampfer

- Rotovapor RE111 (Büchi, Flawil, Schweiz)

### Schüttler

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

### Sterilbank

- Laminar Flow (SLEE Semiconductor Technik GmbH, Mainz)

### Tischrührgerät

- MS 2 Mini- Schüttler (IKA- Works Inc., Wilmington, USA)
- Vorex Genie 2 (Scientific Industries Inc., Bohemia, USA)

### Ultraschallbad

- Sonorex Super RK102H (Bandelin, Berlin)

### Waagen

- BP 2100S (Sartorius AG, Göttingen)
- Analytik A200S (Sartorius AG, Göttingen)

### Wärmeschränke

- Memmert, Schwalbach

### Wasserkocher

- HB4 basic (IKA Labortechnik, Staufen)

### Zentrifugen

- Hettich Kühlzentrifuge Universal 30 RF (Hettich, Tuttlingen)  
Rotoren: 1412, 1414
- Hettich Tischzentrifuge Mikro 24-48 (Hettich, Tuttlingen)  
Rotor: 1124
- Beckmann Kühlzentrifuge J2 HS (Beckmann Instruments GmbH, München)  
Rotoren: JLA 10500, JA 20
- Beckmann Ultrazentrifuge Optima XL-100K (Beckman Instruments GmbH, München)  
Rotor: SW60Ti
- Beckman Airfuge Ultrazentrifuge (Beckman Instruments GmbH, München)  
Rotoren A110, A95

## **2.2 Methoden der Biochemie**

### **2.2.1 Gewinnung der Blattpigmente aus Erbsenpflanzen**

#### Anzucht der Erbsenpflanzen

Die Erbsensamen werden in Wasser unter Belüftung für mindestens 6 Stunden vorgequollen und anschließend auf gut angefeuchtetem Vermiculit ausgesät. Die Aufzucht erfolgt im Klimaraum bei 20°C und 16 Stunden Belichtung. Für die Extraktion der Pigmente werden 10 bis 14 Tage alte Pflanzen verwendet.

#### Herstellung des Totalextraktes

Material:

100 % Aceton

Aufschlußpuffer: (25 mM Tris (pH 7.5), 1 mM DTT, 330 mM Sorbitol)

Aufgrund der Licht- und Temperaturempfindlichkeit der Pigmente werden alle beschriebenen Arbeiten möglichst lichtgeschützt und auf Eis durchgeführt.

Die Erbsenpflanzen werden mit Hilfe einer Schere geerntet und in 1 l kaltem Aufschlußpuffer im Waring Blendor zerkleinert (ca. 10 Impulse zu je ca. 10 Sekunden). Das Homogenat wird durch 3 Lagen Baumwollgaze in 500 ml Zentrifugenbecher filtriert und 5 min bei 4°C mit 8000 Upm zentrifugiert (Rotor 10.500, Beckmann Kühlzentrifuge). Der Überstand wird dekantiert, das Pellet zunächst in 500 ml Aceton aufgenommen und mit 100 ml nachgewaschen. Anschließend wird erneut zentrifugiert (5 min bei 8000 Upm) und die Überstände (der Totalextrakt) in einem großen Becherglas auf Eis gesammelt.

#### Dioxanfällung

Material:

Dioxan p.A.

Ether

H<sub>2</sub>O dest.

Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeiten in einem Gemisch von Aceton, Wasser und Dioxan können die Chlorophylle in diesem Schritt von den Carotinoiden abgetrennt werden.

Dem Totalextrakt (800 ml) werden auf dem Rührer unter Eiskühlung langsam 120 ml Dioxan und anschließend 254 ml H<sub>2</sub>O zugesetzt. Dabei werden die letzten 50 ml H<sub>2</sub>O nur noch tropfenweise zugegeben. Danach wird der Rührer ausgeschaltet und die Fällmischung noch eine Stunde auf Eis stehengelassen. Die Fällung wird zentrifugiert (5 min bei 4°C und 8000 Upm). Der Carotinoidüberstand wird wie unter 2.2.1.4 weiter verarbeitet.

Das Chlorophyllpellet wird in 450 ml Ether aufgenommen und im Schütteltrichter mindestens zweimal mit etwa 150 ml H<sub>2</sub>O vorsichtig ausgeschüttelt. Dabei sollte auf gute Entlüftung geachtet und Emulsionsbildung vermieden werden. Nach der Phasentrennung werden jeweils die annähernd farblosen wässrigen Phasen verworfen. Die Etherphase wird in einem Rundkolben zur Abtrennung des Restwassers über Nacht bei -20°C eingefroren.

Die Eiskristalle werden auf einer vorgekühlten Fritte abfiltriert. Das Filtrat wird anschließend im Rotationsverdampfer eingetrocknet und mit Stickstoff überschichtet. Lagerung erfolgt bei -20°C

### Isolierung und Aufreinigung der Carotinoide durch Verseifung

Material:

Ether

Ethanol p.A.

H<sub>2</sub>O dest.

60 % KOH- Lösung

5M NaCl

Zur Isolierung der Carotinoide wird der Überstand aus der Chlorophyllfällung in Ether überführt. Je 100 ml Überstand werden im Schütteltrichter mit 20 ml Ether, 30 ml H<sub>2</sub>O und 20 ml 5 M NaCl versetzt und ausgeschüttelt (wiederum gut entlüften und Emulsionsbildung vermeiden). Die wässrigen Phasen werden gesammelt und ein weiteres Mal mit Ether extrahiert. Die Etherphasen werden vereinigt und dreimal mit Wasser gewaschen. Zur Abtrennung des Restwassers wird die Etherphase über Nacht bei –20°C eingefroren.

Nach Abfiltrieren der Eiskristalle wird der Extrakt im Rotationsverdampfer eingetrocknet.

Durch Verseifung des Extraktes werden eventuell noch vorhandene Chlorophylle und Lipide durch Öffnung der Esterbindung zu wasserlöslichen Substanzen abgebaut. Die Carotinoide bleiben als einzige lipophile Verbindungen erhalten und können mit Ether extrahiert werden. Dazu wird der Rückstand in 50 ml Ethanol aufgenommen und unter Schwenken vorsichtig mit 5 ml 60 %ige KOH- Lösung versetzt. Der Ansatz wird über Nacht bei 30°C im Brutschrank inkubiert.

Die Carotinoide werden durch Zugabe von 100 ml Ether und 200 ml Wasser im Schütteltrichter aus der Verseifungslösung in die Etherphase überführt. Die Ethanolphase wird mit 50 ml-Portionen Ether nachextrahiert bis sie annähernd farblos bleibt. Die vereinigten Etherphasen werden mit Wasser solange gewaschen, bis sie selbst rein gelb und die Wasserphase farblos ist.

Die Etherlösung wird über Nacht bei –20°C eingefroren. Nach Abfiltrieren der Eiskristalle werden die Pigmente im Rotationsverdampfer eingetrocknet und mit Stickstoff überschichtet. Lagerung geeigneter Aliquots oder des Gesamtextraktes erfolgt bei –20°C

### Trennung der Chlorophylle/ Carotinoide mittels präparativer High Pressure Liquid Chromatographie (HPLC)

Material:

100 % Aceton (filtriert, entgast)

Ether

H<sub>2</sub>O (Reinstwasser, entgast, 0,2 mM HEPES pH 7)

Durch Verwendung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie lassen sich zum einen Chl a und Chl b und zum anderen die Carotinoide Neoxanthin, Violaxanthin und Lutein voneinander trennen. Dabei wird die Pigmentlösung auf eine mit unpolarem Trägermaterial gefüllte Säule aufgetragen und unter hohem Druck durch Aceton von steigender Konzentration eluiert. Die Pigmente werden entsprechend ihrer Hydrophobizität aufgetrennt.

Trennung der Chlorophyll : die eingetrocknete Chlorophyllfraktion (aus 2.2.1.3) wird in 86 ml 100 %igem Aceton aufgenommen, mit 14 ml H<sub>2</sub>O auf 86 %iges Aceton eingestellt und anschließend zentrifugiert (10 min, 11000 Upm, RT). Der Überstand wird in zwei Portionen von 50 ml luftblasenfrei in einen „Super- Loop“ eingefüllt und auf die Säule aufgebracht. Nach Entfernung des „Super- Loops“ wird das Programm „CHLGRAD“ gestartet:

- Programm Dauer: 505 Minuten
- Startet mit 86 % Aceton und fährt in 5 Minuten den Fluß auf 5 ml/min
- 100 Minuten 86 % Aceton
- In weiteren 170 Minuten auf 88 % Aceton
- In weiteren 50 Minuten auf 100 % Aceton

- Weitere 180 Minuten 100 % Aceton
- In 5 Minuten auf Flußrate = 0 ml/min

Nach ungefähr drei Stunden wird zuerst Chl b und dann Chl a von der Säule eluiert. Die einzelnen Fraktionen werden in Rundkolben aufgefangen, die Pigmente im Schütteltrichter in Ether überführt und mehrmals mit 100 ml H<sub>2</sub>O ausgeschüttelt. Die Etherphasen werden zur Abtrennung des Restwassers über Nacht bei –20°C eingefroren.

Nach Abfiltrieren der Eiskristalle werden die Pigmente im Rotationsverdampfer eingetrocknet. Zur weiteren Verwendung werden sie in 10 ml 100 %igem Aceton aufgenommen, aliquotiert und im Stickstoffstrom eingetrocknet. Lagerung erfolgt bei –20°C. Eine Verdünnung der acetonischen Lösung wird mittels HPLC auf Reinheit der Pigmente analysiert.

Trennung der Carotinoide: die eingetrocknete Carotinoidfraktion (aus 2.2.1.4) wird in 76 ml 100 %igem Aceton aufgenommen, mit 24 ml H<sub>2</sub>O auf 76 %iges Aceton eingestellt und anschließend zentrifugiert (10 min, 11000 Upm, RT). Der Überstand wird in zwei Portionen von 50 ml luftblasenfrei in einen „Super- Loop“ eingefüllt und auf die Säule aufgebracht. Nach Entfernung des „Super- Loops“ wird das Programm „Xangrad“ gestartet:

- Programm Dauer: 300 Minuten
- Startet mit 76 % Aceton und fährt in 5 Minuten den Fluss auf 5 ml/min
- 100 Minuten 76 % Aceton
- In weiteren 180 Minuten auf 100 % Aceton
- In 20 Minuten auf Flussrate = 0 ml/min

Nach 70 min wird zuerst Neoxanthin von der Säule eluiert. Violaxanthin folgt nach insgesamt einer Stunde und Lutein als letztes Pigment nach insgesamt drei Stunden Die einzelnen Fraktionen werden in Rundkolben aufgefangen und entsprechend der Vorgehensweise für die Chlorophylle weiterverarbeitet.

### **2.2.2 Quantifizierung der isolierten Pigmente**

Zur Quantifizierung werden die Pigment- Aliquots in 1 ml 100 %igem Aceton aufgenommen und vollständig gelöst. Je nach Konzentration der Lösung wird eine angemessene Verdünnung mit 80 %igem Aceton im Photometer (Dreifachbestimmung) vermessen. Als Referenz dient 80 %iges Aceton. Außerdem wird zur Kontrolle auf Intaktheit der Pigmente jeweils eine Verdünnung mittels HPLC analysiert. Für Chlorophylllösungen werden die Absorptionen der Probe bei 663,6 nm und 646,6 nm, für Carotinoidlösungen bei 440 nm gemessen. Außerdem wird ein Korrekturwert bei 750 nm aufgenommen, der mit den anderen Werten verrechnet wird und unspezifische Streuungen eliminieren soll.

Zur Berechnung des Chlorophyllgehaltes [ $\mu\text{g/ml}$ ] dienen folgende Formeln (Porra *et al.*; 1989):

$$\text{Chl a} = 12,3 \cdot A_{663,6} - 2,55 \cdot A_{646,6}$$

$$\text{Chl b} = 20,3 \cdot A_{646,6} - 4,9 \cdot A_{663,6}$$

Für Carotinoide gilt nach Davies (1976) folgender Zusammenhang: Eine Extinktion von 0,24 bei 440 nm entspricht näherungsweise einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$ .

Nach der Konzentrationsbestimmung können die Pigmente dann je nach Bedarf in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander aliquotiert und unter Stickstoff eingetrocknet werden. Die Lagerung erfolgt bei –20°C.

### **2.2.3 Herstellung von Pigment- Aliquots für die Rekonstitutionen nach der Verdünnungs- Methode**

Für die Rekonstitution nach der SDS-Verdünnungs-Methode (vgl. 2.2.7.1) werden Pigment-Aliquots mit unterschiedlichen Chl a/b- Verhältnissen und Konzentrationen an Gesamtpigment benötigt. Dafür werden die einzelnen aufgereinigten Pigmente in den gewünschten Verhältnissen wieder zusammengemischt. Da sich jedoch trotz Trennung und Aufreinigung der Chlorophylle noch Anteile des einen Pigments in den Aliquots des anderen Pigments befinden können, werden die Mischungsverhältnisse nach folgender Formel berechnet:

Ziel:  $w$  [mg] = Chla+b      Chl a/b =  $m$        $z$  [mg] = Chl a

Lösung 1 (Chl b):  $a/b < 1$ ; späteres Volumen  $x$

Lösung 2 (Chl a):  $a/b > 1$ ; späteres Volumen  $y$

Chlorophyllkonzentrationen: Chl a [mg/ml]      Chl b [mg/ml]

Lösung 1 (Chl b):       $K_1a$        $K_1b$

Lösung 2 (Chl a):       $K_2a$        $K_2b$

$$z = \frac{(m * w)}{(m + 1)} \text{ [mg]}; \quad \frac{x}{y} = \frac{K_2b - K_2a}{K_1a - K_1b} = f; \quad y = \frac{z}{(f * K_1a) + K_2a} \text{ [ml]}; \quad x = f * y \text{ [ml]}$$

Zur Minimierung von Abweichungen der Pigmentmengen zwischen den Aliquots werden bei größeren Mengen die berechneten Volumina für mehrere Ansätze zunächst zusammenpipetiert und anschließend aufgeteilt. Bei kleineren Mengen werden die Volumina für jeden Ansatz mit der Lösemittelpipette einzeln gemischt. Als abschließende Kontrolle der Pigmentzusammensetzung eines Aliquots dient eine Analyse mittels analytischer HPLC. Ergeben sich hierbei Abweichungen von über 25 % werden die Aliquots nicht verwendet. Nach Trocknen im Stickstoffstrom erfolgt die Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$ .

### **2.2.4 Gewinnung von Lhcb1 aus Bakterien**

Die Gewinnung des Apoproteins des Lichtsammelkomplexes LHCII erfolgt durch Überexpression des Lhcb1- Gens in *E. coli*. Die Bakterienzellen tragen das cab- Gen AB80 oder Derivate in einem Expressionvektor der pDS12- Reihe (Bujard et. al., 1987). Das Gen steht unter der Kontrolle des lac- Operons, so dass die Expression durch Zugabe des Galaktose- Analogs IPTG (Isopropylthiogalaktosid) induziert werden kann. Dabei wird das Protein in Form von sogenannten „Inclusion Bodies“ (IB, Einschlußkörperchen), d.h. als unlösliche Proteinklumpen angehäuft.

Zur Isolierung der Proteinpartikel werden die Bakterien unter hohem Druck aufgebrochen. Die weitere Aufreinigung erfolgt durch schwache Detergentien.

#### Herstellung der Vorkulturen und Präparation der Einschlußkörperchen

Material:  
Ampicillin (100mg/ml)  
1M IPTG  
1M  $\text{MgCl}_2$

## 2. Material & Methoden

---

1M MnCl <sub>2</sub>	
DNase	(1mg/ml) in DNase- Puffer
LB- Medium:	(1 % Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, einstellen auf pH 7.5)
DNase- Puffer:	(20 mM Tris- HCl, pH 8, 50 mM NaCl, 1mM DTE/DTT, BSA (1mg/ml), 50 % Glycerin)
Lysispuffer:	(50 mM Tris- HCl, pH 8, 25 % Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8)
Detergenspuffer:	(200 mM NaCl, 1 % Desoxycholsäure, 1 % Nonidet P40, 20 mM Tris- HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 10 mM β- Mercaptoethanol)
Tritonpuffer:	(0.5 % Triton X- 100, 1 mM EDTA, 20 mM Tris- HCl, pH 7.5, 10 mM β- Mercaptoethanol)
Trispuffer:	(50 mM Tris- HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 10 mM β- Mercaptoethanol)

An der Sterilbank wird mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze eine vereinzelte Kultur von der Platte abgenommen und diese in 50 ml LB- Amp- Medium (0.1 mg/ml Amp) überführt. Die Kulturen werden über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Die Vorkultur wird zum Animpfen von 500 ml LB- Amp- Medium verwendet. Nach einer Wachstumsphase von 1 h (37°C auf dem Kulturschüttler bei 210 Upm) wird die Expression durch Zugabe von jeweils 500 µl 1M IPTG induziert. Nach weiteren 4 h Wachstumszeit werden die Bakterienkulturen für 3 min bei 8000 Upm (Rotor 10.500, Beckmann Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Das Pellet wird in insgesamt 60 ml Lysispuffer aufgenommen und resuspendiert. Anschließend werden die Zellen mit Hilfe der French Press unter hohem Druck aufgebrochen. Die so befreiten Einschlußkörperchen und Reste der Bakterienzelle werden abzentrifugiert (5 min, 8000 Upm, Rotor JA20, Beckmann Kühlzentrifuge) und in insgesamt 20 ml Lysispuffer resuspendiert. Zur Entfernung der Bakterien- DNA wird die Suspension mit 220 µl MgCl<sub>2</sub>/MnCl<sub>2</sub> und 200 µl DNase I inkubiert (15 min bei Raumtemperatur [RT], unter Schütteln, 15 min 37°C). Nach Zugabe von insgesamt 40 ml Detergenspuffer, Zentrifugation (5min, 8000 Upm, 4°C) und Resuspension in insgesamt 40 ml Tritonpuffer folgt eine weitere Inkubationszeit (ü.N. schütteln, RT). Ist das Pellet nach Zugabe von weiteren 40 ml Tritonpuffer und Zentrifugation (5 min, 8000 Upm) rein weiß und in insgesamt 40 ml Trispuffer resuspendierbar, wird ein letztes Mal zentrifugiert und das Pellet in insgesamt 10 ml Trispuffer aufgenommen. Zur endgültigen Lagerung bei – 20°C wird die Proteinsuspension in 1,5 ml Aliquots aufgeteilt.

### **2.2.5 Konzentrationsbestimmung der Protein-Suspension bzw. Proteinlösungen**

Material:	
Protein	(IBs in Trispuffer oder gelöst in 1% SDS)
H <sub>2</sub> O dest.	
Trispuffer	
1% SDS	
A <sub>280</sub> - Puffer:	(10 mM Tris- HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 1 mM β- Mercaptoethanol)

Die verwendete Methode zur Konzentrationsbestimmung macht es sich zu Nutze, dass die in Proteinen enthaltenen aromatischen Aminosäuren ein Absorptionsmaximum im nahen UV-Bereich bei 280 nm besitzen. Die Proteine werden mit folgenden Umrechnungsfaktoren quantifiziert, für pLhcb1 und Lhcb1 nach Hobe (1995), für die Δ- Mutanten berechnet anhand der Aminosäuresequenz durch „Schepartz Lab Biopolymer Calculator“ (<http://paris.chem.yale.edu/extinct.html>)

pLhcb1:	0.1 OD <sub>280 nm, 1 cm</sub> = 61 µg/ml
Lhcb1:	0.1 OD <sub>280 nm, 1 cm</sub> = 53 µg/ml

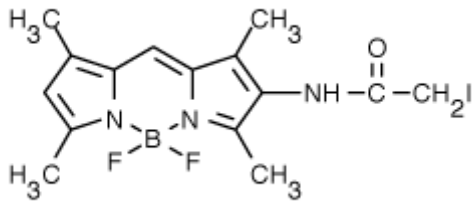
S3CΔC49

0.1 OD<sub>280 nm, 1 cm</sub> = 49 µg/ml

Für die Messung wird eine geeignete Verdünnung der Protein- Suspension (Dreifachbestimmung, vor Entnahme gut mischen, evtl. Ultraschallbad) in A<sub>280</sub> Puffer hergestellt. Als Referenz dient eine entsprechende Verdünnung des verwendeten Puffers/ Detergens in A<sub>280</sub> Puffer. Referenz und Proben werden für 2 min im Wasserbad gekocht. Nach Abkühlen können die Proben vermessen werden. Zur Kontrolle auf DNA- Verunreinigung wird ein Spektrum von 300- 200 nm aufgenommen.

### **2.2.6 Markierung des Lhcb1 mit einem Fluoreszenzfarbstoff**

Das Einbringen von Fremdmolekülen wie z.B. Farbstoffe in Proteine kann bei verschiedenen Fragestellungen von Vorteil sein, bei dem das zu untersuchende Protein oder beteiligte Prozesse vor einem größeren Hintergrund selektiv sichtbar gemacht werden müssen. In dieser Arbeit dient der Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes der Beobachtung der Pigmentbindung an das Apoprotein des LHCIIB. Ermöglicht wird dies durch die Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes in Gegenwart der Pigmente. Die Bindung des Farbstoffes an das Protein erfolgt über eine kovalente Verknüpfung der Thiol- Gruppe eines singulären Cysteins im Protein mit der Iodacetamid- Gruppe des Farbstoffes. Bei dem Farbstoff handelt es sich um ein Mitglied der Bodipy Serie (Molecular Probes, Leiden, Niederlande), Bodipy 507/545 IA (N-(4,4-difluoro-1,3,5,7- tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-2-yl)iodoacetamide) mit einem Molekulargewicht von 431 Da. Extinktions- und Emissionsmaxima in Methanol bei 508 nm bzw. 543 nm und der folgenden Strukturformel.



**Abb. 2.1:** Strukturformel des Bodipy 507/545 IA (N-(4,4-difluoro-1,3,5,7- tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-2-yl)iodoacetamide)

Bei der Markierungsreaktion wird unter Abspaltung eines Moleküls HI ein Thioether gebildet.

### **Markierungsreaktion des Farbstoffes mit einem singulären Cystein des Lhcb1**

Material:

H<sub>2</sub>O dest.

100 mM NaP Puffer, pH 7.0

2 µg/µl Lhcb1 Lösung in 1 % SDS

100 mM TCEP in DMF

Bodipy in DMSO

100 mM NaAc

100 % Aceton

Für die Markierungsreaktion wird die Proteinlösung mit 1µg/µl (Δ)Lhcb1 in 0.5 % SDS und 20 mM Natriumphosphat Puffer (pH 7.0- 7.5) zunächst mit dem Reduktionsmittel TECP (Tris-(2-carboxyethyl)phosphin, Hydrochlorid) für 1 h bei 37°C (im 15 ml Reaktionsgefäß im Drehrad) inkubiert. Anschließend wird der Farbstoff in einem 3-6 fachen molaren Überschuss hinzu gegeben und die Lösung für weitere 2-3 h bei 37°C im Drehrad inkubiert. Zur Aufreinigung des markierten (Δ)Lhcb1 wird das Protein über Nacht bei -20°C gefällt. Dazu wird der Ansatz mit dem 0.1fachem Volumen an Essigsäure angesäuert und das 2.3 fache Volumen an 100

% Aceton dazu gegeben. Das Proteinpellet wird abzentrifugiert (45 min, 15000 Upm, 4°C, Hettich) und zum Entfernen von überschüssigem Farbstoff mit 70 % Ethanol im Ultraschallbad resuspendiert und gewaschen. Ein zweiter Zentrifugationsschritt erfolgt dann in der Airfuge (5 min, 55000 Upm, RT, Beckmann). Das Proteinpellet wird anschließend nach Trocknung an der Luft in einer 1 % SDS Lösung im Ultraschallbad gelöst. Ein Teil von freiem Farbstoff, der jedoch in der SDS Lösung nicht gelöst wird, wird durch einen dritten Zentrifugationsschritt entfernt (4min, 14000 Upm, RT, Hettich Tischzentrifuge).

### Quantifizierung des farbstoffmarkierten Lhcb1

Die Quantifizierung des markierten Proteins erfolgt photometrisch über die Absorption bei 280 nm analog zur Vorgehensweise unter 2.2.2.2. Da der Farbstoff ebenfalls eine geringe Absorption bei 280 nm zeigt, muss dieser Anteil von der Gesamtabsorption der Probe abgezogen werden. Dazu wird das Verhältnis der Absorption des freien Farbstoffes bei 508 nm zu 280 nm in 1 % SDS ermittelt, so dass für jede neue Messung der Anteil der Farbstoffabsorption bei 280 nm berechnet und abgezogen werden kann. Die Quantifizierung des (gebundenen) Farbstoffes erfolgt über die Absorption bei 508 nm mit dem ermittelten Extinktionskoeffizient in 1 % SDS von  $82672 \text{ [l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}]$ . Die Markierungsausbeute kann dann über das Verhältnis der Konzentration von Farbstoff zu Protein ermittelt werden. Um auszuschließen, dass sich noch freier Farbstoff in der Lösung befindet, wird ein Aliquot auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, wo der freie Farbstoff deutlich unterhalb des markierten Proteins läuft und somit sichtbar gemacht wird. Zur Durchführung einer Gelelektrophorese vgl. 2.2.8.

### 2.2.7 Rekonstitution des monomeren LHCI

Der LHCI lässt sich *in vitro* aus seinen Bestandteilen, dem Apoprotein Lhcb1 und den Pigmenten (Chlorophyll a und b und Carotinoide) rekonstituieren. Eine Möglichkeit die Komplexbildung zu induzieren ist die Mischung von denaturiertem Protein mit den Pigmenten, die sich in einer Detergens- Lipidumgebung, d.h. einer Mizellen Umgebung befinden. Die dadurch erfolgende Verdünnung des denaturierenden Agens bewirkt, dass das Protein nicht mehr in Lösung gehalten werden kann. Es wird in die Umgebung der Detergens- Lipidmizellen und somit in die Nachbarschaft der Pigmente gezwungen, so dass die Ausbildung der Sekundärstruktur und Bindung der Pigmente stattfinden kann. Die Vorgänge der Komplexbildung werden mit Methoden der Fluoreszenzspektroskopie und der Circular Dichroismus Spektroskopie betrachtet (vgl. 2.3). Als Monitor dienen dabei die Fluoreszenzen der Chlorophylle bzw. eines proteingebundenen Farbstoffes und die Ausbildung charakteristischer CD Signale. Diese Signale verändern sich im Verlauf der Faltung und Pigmentbindung und machen somit die ablaufenden Prozesse indirekt sichtbar. Als denaturierendes Agens kann Natriumdodecylsulfat (SDS) und Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl) verwendet werden, wobei das Protein im SDS denaturierten Zustand schon einen gewissen Anteil an Sekundärstruktur besitzt, in GuHCl aber vollständig denaturiert ist. Standardmäßig wird eine Lösung des gesamten erforderlichen Pigmentangebots mit der Proteinlösung gemischt und so in einem einzelnen Schritt die Komplexbildung ausgelöst. Um weiteren Einblick in die Vorgänge der Komplexbildung zu erhalten, werden im Rahmen dieser Arbeit aber auch nur unvollständige Pigmentsätze angeboten, bzw. wird die Zugabe der Pigmente auf mehrere Schritte, in dieser Arbeit sind es zwei, aufgeteilt.

**2.2.7.1 Rekonstitution mit der Verdünnungsmethode ausgehend von SDS-denaturiertem Lhcb1- Verwendung der „Rapid-Mixing-Device“**

Material:

Lhcb1- Stammlösung	(SLa: 1 mg/ml, SLb: 2mg/ml) in 1 % SDS
PG/ OG- Lösung	(0.4 % PG in 10 % OG)
H <sub>2</sub> O dest. (Reinstwasser)	
2fach Rekonstitutions- Puffer Standard	(10 mM DTT (erst direkt vor Messung dazugeben), 25 % Saccharose, 200 mM Lithiumboratpuffer (pH 9))
2fach Rekonstitutions- Puffer für UV- CD Messung	(1 mM DTT (erst direkt vor Messung dazugeben), 10 % Glycerin, 200 mM Natriumboratpuffer (pH 9))

Ethanol p.A.  
Eingetrocknete Pigmente

Bei der Verwendung der Rapid-Mixing-Device (Experimente unter 3.1 und 3.3) werden zunächst in 15 ml Falcon-Röhrchen eine Protein- und eine Detergens/ Lipidlösung mit einem Endvolumen von jeweils 1500 µl nach dem folgenden Pipetierschema vorbereitet (einzelne Lösungen vor Entnahme gut auf dem Tischrührgerät mischen).

<i>Detergens/Lipid- Lösung</i>			<i>Protein- Lösung</i>		
<i>Lösungen</i>	<i>Volumen</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Lösungen</i>	<i>Volumen</i>	<i>Konzentration</i>
PG/ OG	300 µl	OG: 2% PG: 0.08 %	(3.3) Protein- SL a	300 µl	0.2 µg/µl (7.9 µM)
			(3.1) Protein- SL b	300 µl	0.4 µg/µl (13.6 µM)*
H <sub>2</sub> O	450 µl		H <sub>2</sub> O	450 µl	SDS: 0.2 %
2fach Reko- Puffer	750 µl	1 fach	2fach Reko- Puffer	750 µl	1 fach
Σ	1500 µl		Σ	1500 µl	

\* Die Experimente unter 3.1 wurden dem Vorläuferprotein pLhcb1 durchgeführt.

Die vorbereitete Detergens/ Lipid- Lösung wird für 15 min im Ultraschallbad sonifiziert. Währenddessen wird die Protein- Lösung für 2 min im Wasserbad gekocht und anschließend zum Abkühlen stengelassen. Das vorbereitete Pigment- Aliquot, wird in 30 µl Ethanol aufgenommen, vollständig gelöst (evtl. Ultraschallbad) und kurz anzentrifugiert. Die Pigmentlösung wird unter kräftigem Mischen in die Detergens/ Lipid- Lösung überführt. Die verwendeten Pigmentmengen sind in den jeweiligen Ergebnisteilen aufgeführt.

Rapid-Mixing- Device

Bei der „Rapid- Mixing- Device“ handelt es sich um eine Vorrichtung, die es erlaubt, definierte Mengen zweier Lösungen direkt in einer Mess-Küvette zu mischen. Auf diese Weise kann die Reaktion der Partner mit einer geringen Totzeit spektroskopisch vermessen werden. Für die Durchführung werden die Protein- und die Detergens/ Lipid- Lösung in die dafür vorgesehenen Spritzen der „Rapid- Mixing- Device“ eingefüllt. Dabei wird zunächst mit 330 µl die Küvette gespült und anschließend der Rest der Lösungen möglichst luftblasenfrei aufgezogen. Für eine Rekonstitution werden jeweils 200 µl der Lösungen, d.h. 1:1 gemischt, so dass mit einem Ansatz von jeweils 1500 µl bis zu fünf Rekonstitutionen durchgeführt werden können. Um einen deutlichen Injektionspeak als Startpunkt der Rekonstitution zu erhalten, werden die beiden Lösungen bei der Messung über ein Zeitintervall von 700 s erst

2.5 sec nach Start des jeweiligen spektroskopischen Messprogramms gemischt. Da der Start des Mischvorgangs jedoch nicht automatisiert abläuft, sondern von Hand gestartet wird, muss von einer etwas größeren Variation in den einzelnen Startpunkten ausgegangen werden. Für den späteren Auswertevorgang (vgl. 2.3.3) werden deswegen die ersten 4 Sekunden der Messung verworfen. Da die Rekonstitution aber erst nach  $\approx 2$  s durch die Mischung der beiden Lösungen induziert wird, gehen von den Vorgängen der Komplexbildung nur die ersten 2 Sekunden verloren, es ergibt sich eine experimentelle Totzeit von  $\approx 2$  s. Wird nur über ein Zeitintervall von 100 s gemessen, werden die beiden Lösungen innerhalb der ersten Sekunde nach dem Start des spektroskopischen Messprogramms gemischt. In diesem Fall wird für den späteren Auswertevorgang die erste Sekunde verworfen, so dass die Totzeit  $\approx 1$  s beträgt. Während der gesamten Messung sind sowohl die Probenspritzen als auch die Küvette auf  $24^{\circ}\text{C}$  temperiert. Insgesamt sollte die Messzeit 1.5 h nicht überschreiten, damit Aggregationsprozesse der Pigmente in der Lösung möglichst gering gehalten werden können.

Ein Teil der Messungen wurde mit einem Fluoreszenzspektrometer mit integrierter Stopped-Flow-Einheit durchgeführt, bei der die Mischung der Protein- und Pigment-Lösung und der Start der Messung automatisch erfolgen, so dass die experimentelle Totzeit nur  $\approx 1.4$  ms beträgt. Der Vorschub der Probenspritzen erfolgt per  $\text{N}_2$ -Druck.

**2.2.7.2 Rekonstitution mit der Verdünnungsmethode ausgehend von SDS bzw. GuHCl denaturiertem Lhcb1 - manuelles Mischen**

Material:

Lhcb1- Stammlösung (3.6 mg/ml) in 1 % SDS  
 Lhcb1 Stammlösung (4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) in 6M GuHCl und 10 mM DTT  
 10 % OG  
 H<sub>2</sub>O dest. (Reinstwasser)  
 2fach Rekonstitutions- Puffer (10 mM DTT (erst direkt vor Messung dazugeben), 25 % Saccharose, 200 mM Lithiumboratpuffer (pH 9))

Ethanol p.A.  
 Eintrocknete Pigmente

Bei den Experimenten, beschrieben unter 3.2, kann die „Rapid-Mixing-Device“ nicht eingesetzt werden, da z.T. ungleiche Mischverhältnisse erforderlich sind.

In diesem Fall werden die Protein- und Detergens-Lösungen nach folgendem Pipetierschema vorbereitet (einzelne Lösungen vor Entnahme gut auf dem Tischrührgerät mischen).

**SDS denaturiertes Protein:**

<i>Detergens/Lipid- Lösung</i>			<i>Protein- Lösung</i>		
<i>Lösungen</i>	<i>Volumen</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Lösungen</i>	<i>Volumen</i>	<i>Konzentration</i>
OG- Lösung	300 $\mu\text{l}$	OG: 4%	Protein- SL	150 $\mu\text{l}$	0.72 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (28 $\mu\text{M}$ )
H <sub>2</sub> O	75 $\mu\text{l}$		H <sub>2</sub> O	225 $\mu\text{l}$	SDS: 0.2 %
2fach Reko- Puffer	375 $\mu\text{l}$	1 fach	2fach Reko- Puffer	375 $\mu\text{l}$	1 fach
$\Sigma$	750 $\mu\text{l}$		$\Sigma$	750 $\mu\text{l}$	

Die vorbereiteten Lösungen werden wie unter 2.2.7.1 behandelt, in 150 µl Aliquots aufgeteilt und bei 24 °C im Wasserbad temperiert. Die Pigment-Aliquots für einen Rekonstitutionsvorgang werden erst direkt vor dem Start der Messung in 15 µl Ethanol gelöst. Das 150 µl Aliquot der Detergens/Lipid-Lösung wird dann unter kräftigem Mischen dazugegeben.

### GuHCl denaturiertes Protein:

<i>Detergens/Lipid- Lösung</i>			<i>Protein- Lösung</i>		
<i>Lösungen</i>	<i>Volumen</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Lösungen</i>	<i>Volumen</i>	<i>Konzentration</i>
OG- Lösung	300 µl	OG: 2 %	Protein- SL	150 µl	4 µg/µl (157 µM)
H <sub>2</sub> O	450 µl				GuHCl: 6 M
2fach Reko- Puffer	750 µl	1 fach			DTT: 10 mM
Σ	1500 µl				

Die vorbereitete Detergenlösung wird wie unter 2.2.7.2 behandelt und in 300 µl Aliquots aufgeteilt und bei 24 °C im Wasserbad temperiert. Die Proteinlösung mit einer Konzentration von 4 µg/µl pLhcb1 in 6 M GuHCl wird nicht gekocht, da GuHCl in diesem Fall proteolytische Eigenschaften entwickeln könnte. Die gesamte Proteinlösung wird ebenfalls bei 24 °C temperiert. Die Pigment-Aliquots für einen Rekonstitutionsvorgang werden erst direkt vor dem Start der Messung in 15 µl Ethanol gelöst. Das 300 µl Aliquot der Detergens/Lipid-Lösung wird dann unter kräftigem Mischen dazugegeben.

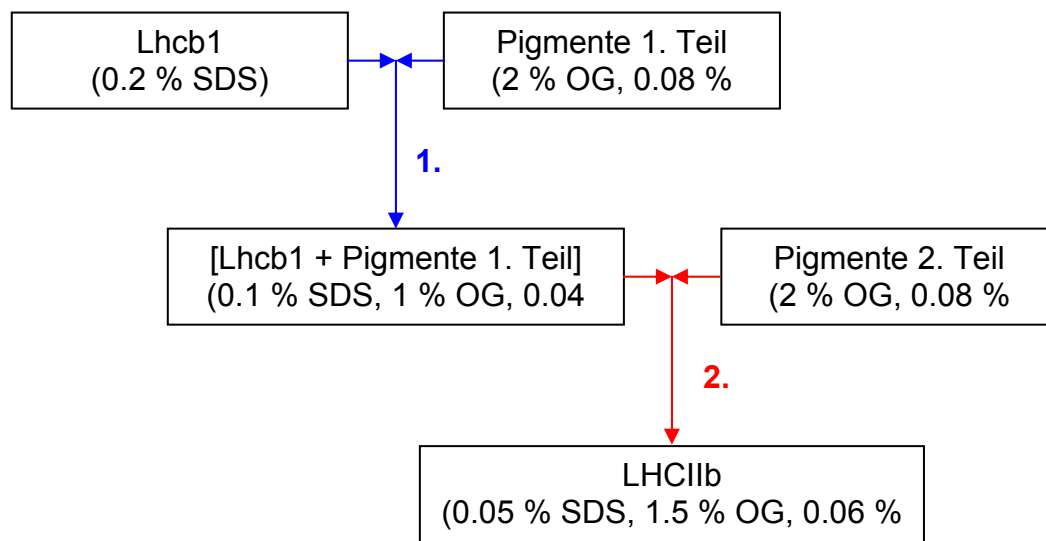
### Manuelles Mischen auf dem Tischrührgerät

In den Fällen, in denen die „Rapid-Mixing-Device“ nicht verwendet werden kann, erfolgt der Start der Rekonstitution durch kräftiges Mischen von Protein- und Pigmentlösung in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß auf dem Tischrührgerät für ca. 1-2 s. Die Lösung wird dann direkt in die Messküvette überführt und das jeweilige Messprogramm gestartet. Bei dieser Versuchsdurchführung ergibt sich natürlich eine größere Totzeit als bei der Verwendung der „Rapid- Mixing- Device“. Sie beträgt ≈ 10 s. Insgesamt können bis zu 5 Kinetiken gemessen werden.

Ausgehend von SDS-denaturiertem Protein werden jeweils 150 µl der Protein- und der Pigmentlösung gemischt (1:1). Ausgehend von GuHCl-denaturiertem Protein werden 30 µl der Proteinlösung und 300 µl der Pigmentlösung gemischt (1:10). Insgesamt können bis zu 5 Kinetiken gemessen werden.

### **2.2.7.3 Rekonstitution mit der Verdünnungsmethode ausgehend von SDS denaturiertem Lhcb1 mit Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten**

Durch Verteilung der Pigmentzugabe auf zwei aufeinander folgende Schritte soll die Möglichkeit geschaffen werden, gezielt Wechselwirkungen zwischen einzelnen Pigmentspezies und dem Protein beobachten zu können und dadurch einen genaueren Einblick in die Reihenfolge der Pigmentbindung zu bekommen. Die Durchführung der Induktion potentieller Wechselwirkungen zwischen Pigmenten und Protein erfolgt entsprechend der Verdünnungsmethode ausgehend von SDS denaturiertem Lhcb1. Die genaue Vorgehensweise wird im Folgenden schematisch erläutert.



**Abb. 2.2:** Schematische Darstellung der Rekonstitution des LHCIIb, bei der die Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten durchgeführt wird.

Material:

Lhcb1- Stammlösung (1 mg/ml) in 1 % SDS  
 PG/ OG- Lösung (0.4 % PG in 10 % OG)  
 H<sub>2</sub>O dest. (Reinstwasser)  
 2fach Rekonstitutions- Puffer (10 mM DTT (erst direkt vor Messung dazugeben), 25 % Saccharose, 200 mM Lithiumboratpuffer (pH 9))

Ethanol p.A.  
 Eingetrocknete Pigmente

Auch für diese Experimente (beschrieben unter 3.4) kann die „Rapid-Mixing-Device“ nicht verwendet werden, da ein Teil der Rekonstitutions-Lösung im 2. Mischschritt wieder verwendet wird.

Die Protein- und Detergens/Lipid-Lösungen werden nach folgendem Pipetierschema vorbereitet (einzelne Lösungen vor Entnahme gut auf dem Tischrührgerät mischen). Die Detergens/Lipid-Lösung wird zweimal angesetzt.

<i>Detergens/Lipid- Lösung (2x ansetzen)</i>			<i>Protein- Lösung</i>		
<i>Lösungen</i>	<i>Volumen</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Lösungen</i>	<i>Volumen</i>	<i>Konzentration</i>
PG/OG- Lösung	150 µl	OG: 2%	Protein- SL b	150 µl	0.2 µg/µl (7.9 µM)
H <sub>2</sub> O	225 µl		H <sub>2</sub> O	225 µl	SDS: 0.2 %
2fach Reko- Puffer	375 µl	1 fach	2fach Reko- Puffer	375 µl	1 fach
Σ	750 µl		Σ	750 µl	

Die Lösungen werden wie unter 2.2.7.2 behandelt, in 150 µl Aliquots aufgeteilt und bei 24 °C temperiert. Die Pigment-Aliquots für einen Mischschritt werden erst direkt vor dem Start der Messung in 15 µl Ethanol gelöst. Das 150 µl Aliquot der Detergens/Lipid-Lösung wird dann unter kräftigem Mischen dazugegeben. Für den Start der Rekonstitution werden im 1. Mischschritt die 150 µl der Pigment-Lösung mit 150 µl der Protein-Lösung µl in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß auf dem Tischrührgerät für ca. 1-2 s gemischt, die Lösung direkt in die

Messküvette überführt und das jeweilige Messprogramm gestartet. Für den 2. Mischschritt werden 150 µl der Lösung aus dem 1. Mischschritt aus der Messküvette wieder in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit den 150 µl Aliquot der restlichen Pigmente gemischt.

Als Kontrollexperiment werden unter den gleichen Bedingungen die Pigmente in einem einzigen Schritt zum Protein gegeben. Dafür werden folgende Protein- und Detergens/Lipid-Lösungen benötigt.

<i>Detergens/Lipid- Lösung</i>			<i>Protein- Lösung</i>		
<i>Lösungen</i>	<i>Volumen</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Lösungen</i>	<i>Volumen</i>	<i>Konzentration</i>
PG/OG- Lösung	150 µl	OG: 2%	Protein- SL b	75 µl	0.1 µg/µl (3.8 µM)
			PG/OG-Lösung	75 µl	OG: 1% PG: 0.04 %
H <sub>2</sub> O	225 µl		H <sub>2</sub> O	225 µl	SDS: 0.2 %
2fach Reko- Puffer	375 µl	1 fach	2fach Reko- Puffer	375 µl	1 fach
Σ	750 µl		Σ	750 µl	

Die vorbereitete Detergens-Lösung wird wie unter 2.2.7.2 behandelt, in 150 µl Aliquots aufgeteilt und bei 24 °C temperiert. Die Protein-Lösung wird für 2 min gekocht, wobei die PG/OG-Lösung erst nach dem Kochen dazu gegeben wird. Die Pigment-Aliquots für einen Rekonstitutionsvorgang werden erst direkt vor dem Start der Messung in 15 µl Ethanol gelöst. Das 150 µl Aliquot der Detergens/Lipid-Lösung wird dann unter kräftigem Mischen dazugegeben.

Für den Start der Rekonstitution werden die 150 µl der Pigment-Lösung mit 150 µl der Protein-Lösung µl in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß auf dem Tischrührgerät für ca. 1-2 s gemischt, die Lösung direkt in die Messküvette überführt und das jeweilige Messprogramm gestartet.

### **2.2.7.4 Rekonstitution nach der Detergenswechsel Methode mit nachfolgender Aufreinigung des LHCIlb**

#### Detergenswechsel- Rekonstitution

Bei der Rekonstitution nach der Detergenswechsel Methode wird die Faltung und Pigmentbindung des Proteins ebenfalls durch eine Veränderung der mizellären Umgebung in Anwesenheit der Pigmente induziert. Dabei wird das zur Lösung des Proteins benötigte LDS (Lithium-dodecyl-sulfat) jedoch, nachdem die Pigmente und das nichtionische Detergens Octylglycosid (OG) dazu gegeben wurden, durch eine Fällungsreaktion mit Kaliumchlorid zu einem großen Teil aus dem System entfernt. Proteine und Pigmente werden so aus LDS-Mizellen über LDS-OG-Mischmizellen in OG-Mizellen gezwungen und dadurch die Faltung und Pigmentbindung des Proteins induziert.

Material:

500 µg pLhcb1 Pellet  
 1 mg Totalpigmentextrakt (getrocknet unter N<sub>2</sub>-Strom)  
 H<sub>2</sub>O dest.  
 1 M DTT  
 Ethanol p.A.  
 10 % OG  
 2 M KCl

2x Solubilisierungspuffer (200 mM Tris/HCl [pH 9.0], 10 mM Aminocaprinsäure, 2 mM Benzamidin, 4 % LDS)

Zur Durchführung der Detergenswechsel- Rekonstitution wird zuerst das Proteinpellet in 500 µl 1x Solubilisierungspuffer (mit 1 mM DTT) aufgenommen und gelöst (5 min 100 °C). Die Pigmente werden in 50 µl Ethanol gelöst, zu der Proteinlösung dazugegeben und das ganze für 30 s auf dem Tischrührgerät gemischt (sofort mit dem Rühren anfangen). Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT werden 55 µl der 10 % OG-Lösung auf dem Tischrührgerät zur Protein-Pigmentlösung gemischt. Nach weiteren 10 min werden 55 µl der 2 M KCl-Lösung auf dem Tischrührgerät dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis wird die Probe für 4 min bei 12000 Upm und 4 °C zentrifugiert (Hettich Kühlzentrifuge). Der Überstand die gefalteten, pigmentierten Komplexe und wird zur weiteren Verwendung abgehoben. Des Weiteren befinden sich aber auch noch freie Pigmente und freies Protein in der Lösung.

### Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Die Verwendung der Komplexe für die Analyse der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie (vgl. 2.3.3) erfordert eine Abtrennung der Komplexe von freien Pigmenten und freiem Protein. Diese Aufreinigung erfolgt über eine Dichtegradienten-Ultrazentrifugation. Dabei wird der Überstand aus der Detergenswechsel-Rekonstitution mit freien Pigmenten, freiem Protein und LHCIIb oder auch nativer LHCIIb in 0.1 % LM auf einen Saccharose-Dichtegradienten (0 % bis 17 % Saccharose; 0.5 M Saccharose, 0.1 % LM, 5 mM NaP [pH 7.8]) aufgetragen und dieser über Nacht für 16 h mit 54000 Upm bei 4 °C zentrifugiert (Beckmann Ultrazentrifuge, SW6TI). Die einzelnen Komponenten werden entsprechend ihrer Masse und dadurch entsprechend ihrer unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten aufgetrennt. Nach einer erfolgreichen Trennung kann die Bande, die den nativen bzw. den rekombinanten LHCIIb enthält abgezogen und bis zur weiteren Verwendung aufgehoben werden.

### Gelfiltrations-Chromatographie

Da ein Saccharose-Molekül aufgrund seiner Asymmetrie ein starkes intrinsisches CD Signal im Bereich von 200 nm hat, muss nach der Abtrennung der Komplexe von freien Pigmenten und freiem Protein ein weiterer Aufreinigungsschritt, eine Gelfiltrations-Chromatographie erfolgen, bei dem die Saccharose entfernt wird. Diese Methode wird auch Ausschlusschromatographie genannt und trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe. Sie basiert auf der unterschiedlichen Permeation der einzelnen Komponenten in ein poröses Trägermaterial. Moleküle ab einer bestimmten Größe können nicht in die Poren eindringen und eluieren mit dem Lösungsmittel. Kleinere Moleküle dringen in die Poren ein und erfahren dadurch hinsichtlich ihrer Elution eine Verzögerung, so dass es zu einer zeitlichen Auftrennung der Komponenten kommt. Zur Durchführung wird 700 µl der abgezogenen Bande auf eine Gelfiltrations-Säule (HiTrap desalting column, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) aufgetragen und bei einem Fluss von 1 ml/ min mit einem Puffer mit 0.1 % LM und 5 mM NaP (pH 7.8) eluiert. Nach einer Vorfraktion von ca. 1 ml wird die grüne Hauptfraktion von 1 ml aufgefangen und das Volumen über Zentrifugation in Centricons stark eingengt. Für die CD-Spektroskopie werden die Komplexe in 160 bis 250 µl Puffer aufgenommen.

### 2.2.8 Durchführung einer Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE)

Bei der Polyacrylamid- Gelelektrophorese (PAGE) kann ein Gemisch von Proteinen oder Protein- Pigment Komplexen entsprechend ihrer Größe bzw. Ladung von einander getrennt werden. Dabei wird das Gemisch auf die Trennmatrix, das Polyacrylamidgel aufgetragen und ein elektrisches Feld angelegt. Bei Einsatz eines ionischen Detergens wie SDS sind alle

Komponenten des Gemisches negativ geladen und bewegen sich im elektrischen Feld in Richtung des Pluspols. Die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Komponenten wird durch ihre Größe bestimmt, kleinere Moleküle wandern schneller durch die vernetzten Strukturen des Gels, größere langsamer. Beim Einsatz von nichtionischen Detergentien wie z.B. Deriphat ist neben der Größe auch die Nettoladung der Proteine bzw. Komplexe ausschlaggebend für die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel.

### Gießen der Gele

Material:

H<sub>2</sub>O dest.

30 % Acrylamid/ 1 % Bisacrylamid

1M Tris- HCl (pH 8.8)

1 M Tris- HCl (pH 6.8)

80 % Glyzerin

10 % APS

TEMED

Zunächst wird mit den gereinigten Glasplatten, Aluminiumoxidplatten und Spacern die Gießapparatur zusammengebaut. Anschließend werden die Lösungen nach folgendem Pipettierschema hergestellt, wobei das Gesamtvolumen ausreichend ist für 5 Gele:

	<i>Trenngel (15 %)</i>	<i>Sammelgel (4.5 %)</i>
Acrylamid/Bisacrylamid	13.7 ml	3.0 ml
Tris- HCl (pH 8.8)	11.3 ml	----
Tris- HCl (pH 6.8)	----	2.6 ml
Glyzerin	1.7 ml	2.5 ml
Wasser	0.9 ml	11.8 ml
APS	200 µl	100 µl
TEMED	13 µl	10 µl

Vor der Zugabe von APS und TEMED werden die Lösungen entgast.

Nach Einfüllen des Trenngels in die Gießapparatur wird jedes Gel mit 200- 400 µl Wasser überschichtet, das nach abgeschlossener Polymerisation wieder abgezogen wird. Die Kämme werden sofort nach Einfüllen des Sammelgels eingesetzt. Ist auch das Sammelgel polymerisiert, können die einzelnen Gele aus der Apparatur genommen werden. Lagerung erfolgt im Kühlschrank, jedoch nicht länger als 2 Wochen.

### Durchführung einer (schwach) denaturierenden Gelelektrophorese

Material:

3-4fach Sparmix

15 %iges Glyzeringel

SDS- 7 Marker

LDS Laufpuffer (1 l): (3.03 g Tris, 14.42 g Glyzerin, 4.0 ml 25 % LDS, 1.0 ml 0.5 mM EDTA)

Deriphat Laufpuffer (1l): (1.5 g Deriphat, 3.6 g Glyzerin, 1.45 g Tris)

SDS Laufpuffer (1l):	(3.03 G Tris, 14.4 g Glycerin, 10 ml 10 % SDS, 1.0 ml 0.5 M EDTA
Färbelösung (100 ml):	(178 mg Serva- Blau, 50 ml Ethanol, 7 ml Eisessig, 43 ml Wasser,
1. Entfärber:	(10 % Ethanol, 7 % Eisessig)
2. Entfärber:	10 % Eisessig

Zur schonenden Trennung der rekonstituierten Monomere von nicht- rekonstituiertem Protein wird die Elektrophorese unter Abdunklung bei 4°C durchgeführt.

Nach Anschließen der Elektrophoresekammer an die Eiswasserkühlung wird das Gel eingespannt und der Puffer (LDS oder Deriphat) eingefüllt. Dabei sollten die Taschen des Gels luftblasenfrei sein. Bei einer Auftrennung von Komplexen, die mit der GuHCl Methode (vgl. 2.2.7.1) hergestellt wurden, muss Deriphat Puffer verwendet werden, da ansonsten Guanidinium-Dodecyl-Sulfat ausfällt und die Probe nicht mehr ins Gel einlaufen kann.

Von den Proben werden jeweils 20 µl in die Taschen pipettiert. Von dem Marker werden 2 µl verwendet.

Zu Beginn wird eine Spannung von 40 V angelegt, bis die Proben vollständig in das Sammelgel eingelaufen sind. Danach wird die Spannung auf 100 V erhöht. Wenn die freien Pigmente das untere Viertel des Gels erreicht haben, kann die Elektrophorese abgebrochen werden. Je nach Bedarf kann das Gel zunächst im „grünen“ Zustand gescannt werden. Für die Anfärbung der Proteine wird das Gel für 15 bis 30 min in der Färbelösung geschwenkt. Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgt in zwei Schritten: Behandlung mit dem 1. Entfärber, bis die Banden des Markers sichtbar werden; vollständige Entfärbung über Nacht durch den 2. Entfärber. Zur langfristigen Lagerung wird das Gel zwischen zwei Einmachfolien getrocknet.

Werden nur Proteine voneinander getrennt, muss die Elektrophorese nicht unter schonenden Bedingungen ablaufen. Denaturierung der Proteine erfolgt durch Einsatz von Sparmix im Verhältnis von 1:3 (Sparmix zu Probe) mit anschließendem Kochen der Probe. Als Puffer wird SDS Puffer verwendet und die Probe bei einer Spannung von 60 V in das Sammelgel einlaufen gelassen. Danach kann bis auf 200 V erhöht werden. Die Trennung erfolgt bei RT und wird abgebrochen wenn die Laufmittelfront das untere Ende des Gels erreicht hat. Zur weiteren Behandlung des Gels vgl. oben.

### **2.3 Methoden der Spektroskopie**

Optische spektroskopische Methoden machen sich die Eigenschaften von Molekülen und Molekülverbänden zu Nutze, mit Licht, das auf sie eingestrahlt wird, in Wechselwirkungen treten zu können. Die Veränderung gewisser Eigenschaften des Lichtes durch diese Wechselwirkungen kann dann detektiert werden und ermöglicht so eine Analyse des Moleküls, bzw. der Molekülverbände. Eine wichtige Form der Wechselwirkung ist die Absorption von Lichtenergie durch ein Molekül. Die Absorption von Licht im sichtbaren Spektralbereich ruft einen Farbeindruck hervor und zwar entsprechend dem Bereich des Lichtes, der nicht absorbiert wird. So sind z.B. die Chlorophylle grünlich und die Carotinoide orange- gelb gefärbt. Welche Wellenlängen, d.h. welche Energien dabei absorbiert werden können hängt ab von der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen innerhalb des Moleküls, je mehr Doppelbindungen, desto längerwelligeres also energieärmeres Licht kann absorbiert werden, wobei oftmals Licht verschiedener Wellenlängen von ein und demselben Molekül absorbiert werden kann. Physikalisch wird in einem Molekül bei der Absorption von Lichtenergie ein Elektron in ein höheres Orbital angehoben. Das Molekül geht von seinem elektronischen Grundzustand,  $S_0$  in einen angeregten Zustand  $S_1$  oder  $S_2$  über.

Licht wird als eine elektromagnetische Welle beschrieben, deren elektrische und magnetische Feldvektoren senkrecht aufeinander stehen. Eine natürliche Lichtquelle entsendet unpolarisiertes Licht, bei dem die beiden Feldvektoren isotrop (in alle Richtungen) im Raum verteilt sind. Bei linear polarisiertem Licht dagegen schwingt der elektrische Feldvektor nur in einer Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Seine Amplitude vergrößert und verkleinert sich periodisch.

Für die Absorption der Lichtenergie spielt die Polarisationsrichtung des Lichtstrahles eine große Rolle. Während des Übergangs vom Grundzustand in den angeregten Zustand entsteht eine Ladungsverschiebung mit einem entsprechenden Dipolmoment, dem so genannten Übergangsdipol. Dieser besitzt ebenfalls vektoriellen Charakter nimmt somit eine bestimmte räumliche Ausrichtung ein. Schwingt der elektrische Feldvektor des eingestrahnten Lichtes genau parallel zum Übergangsdipol des Moleküls, findet eine vollständige Absorption statt. Stehen beide Vektoren dagegen senkrecht aufeinander, bleibt das Molekül in seinem Grundzustand. In der Regel wird bei spektroskopischen Methoden die mit unpolarisiertem Licht bestrahlt. Ausnahmen sind z.B. Linear-Dichroismus- oder Circular-Dichroismus-Spektroskopie (vgl. 2.3.2).

Die Rückkehr in den Grundzustand kann auf mehreren Wegen erfolgen, die Abgabe von Photonen, d.h. Strahlung oder Wärme aber auch durch Energieübertragung (strahlungslos) auf ein benachbartes Molekül. Der Übergang vom höher angeregten Zustand  $S_2$  zu  $S_1$  findet dabei grundsätzlich strahlungslos statt.

#### **2.3.1 Fluoreszenzspektroskopie**

Die Emission von Energie (Photonen), die beim Rückgang vom angeregten Zustand  $S_1$  in den Grundzustand  $S_0$  abgegeben wird nennt sich Fluoreszenz. Sie ist in ihrem Maximum gegenüber der Absorption zu kleineren Energien, d.h. größeren Wellenlängen hin verschoben, da ein Teil der absorbierten Energie innerhalb der angeregten Zustände durch Relaxationsvorgänge verloren geht. Bei der Fluoreszenzspektroskopie wird das emittierte Licht in der Regel über einen Winkel von  $90^\circ$  gegenüber dem Anregungsstrahl detektiert, damit dieser nicht mit in den Photomultiplier gelangt. Ist in einer Probe das fluoreszierende Molekül relativ hoch konzentriert kommt es zu Reabsorptionsvorgängen, die das Fluoreszenzlicht schon innerhalb der Probe abschwächen (der so genannte Inner Filter Effekt), so dass das Signal verringert wird. Aus diesem Grund sollte die optische Dichte der Probe einen Wert von 0.1 bei der Anregungswellenlänge nicht überschreiten. Werden jedoch in manchen Fällen, wie auch in dieser Arbeit, experimentell hohe Konzentrationen der Fluorophore benötigt, kann der Effekt durch Verwendung einer so genannten „Front- Face-Apparatur“ vermieden werden. Dabei wird das Fluoreszenzlicht, das direkt von der ersten

Schicht an Molekülen in der Küvette senkrecht nach vorne ausgestrahlt wird, über 2 Spiegel in den Photomultiplier geleitet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben auf zwei Arten fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Zum einen wurden Fluoreszenzemissionsspektren gemessen, zum anderen Fluoreszenzkinetiken aufgenommen.

Zur Aufnahme eines Emissionsspektrums wird die Anregungswellenlänge (Excitationswellenlänge) gleich gehalten und die Emission von Fluoreszenzlicht für einen bestimmten Wellenlängenbereich detektiert. Dabei emittieren die Fluorophore in der Probe Strahlung, die entweder das Anregungslicht direkt absorbiert haben, oder auf die von einem anderen Molekül Anregungsenergie weitergeleitet wurde. So wird z.B. bei selektiver Anregung von im LHCIIb gebundenen Chl b bei 470 nm hauptsächlich Chl a Emission bei 680 nm detektiert, da die von Chl b absorbierte Energie innerhalb des Komplexes effizient auf Chl a übertragen werden kann.

Für eine kinetische Messung wird sowohl die Excitations- als auch die Emissionswellenlänge bei einem bestimmten Wert gehalten und die Veränderung der Fluoreszenzemission über einen bestimmten Zeitbereich hinweg aufgezeichnet. Dabei empfiehlt sich die Beobachtung an einer Stelle des Emissionsspektrums der Probe, wo die größte mögliche Änderung zwischen Anfang und Ende des eingestellten Zeitbereiches stattfindet, damit das Signal-zu-Rausch Verhältnis möglichst gut ist. In der vorliegenden Arbeit wird die Rekonstitution des LHCIIb anhand von zwei Fluoreszenzmonitoren beobachtet. Der erste ist die Fluoreszenz der Chlorophylle, die sich aufgrund der Etablierung des Energietransfers zwischen Chl b und Chl a während der Komplexbildung verändert. Der zweite ist die Fluoreszenz des proteingekoppelten Farbstoffes Bodipy (vgl. 2.2.6), dessen Emission aufgrund der Energieübertragung auf die Chlorophylle gelöscht wird.

### Messung mit der Apparatur FluoroMax-2

Für die Aufnahme der Spektren, bzw. der Kinetiken werden die folgenden Einstellungen gewählt:

#### Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken des Farbstoffes:

Experiment Typ:	Multigroup
Total time:	700 s
Excitation:	508 nm
Emission:	543 nm
Slit Exc./ Em.:	0.5 nm / 6 nm
Time increment:	0.5 s
Integration:	0.1 s
Signal:	S <sub>1</sub> /R <sub>1</sub>

#### Aufnahme der Spektren nach Anregung des Farbstoffes:

Experiment Typ:	Emission
Excitation:	508 nm
Scan Start:	515 nm
Scan End:	750 nm
Slit Exc./ Em.:	1 nm / 5 nm
Time increment:	0.5 nm
Integration:	0.2 s
Signal:	Sc (Blank, Mcorrect)

#### Aufnahme von Fluoreszenzkinetiken der Chlorophylle:

Vgl. Farbstoff-System bis auf	
Excitation:	470 nm
Emission:	660 und 680 nm

#### Aufnahme der Spektren nach Anregung der Chlorophylle:

Vgl. Farbstoff-System bis auf	
Excitation:	470 nm
Scan Start:	600 nm
Scan End:	750 nm

S/R bedeutet, dass das Fluoreszenzsignal durch ein Referenzsignal der Lampe dividiert wird, um mögliche Schwankungen der Lampenintensität über die Zeit auszugleichen. Das Emissionsspektrum wird durch zwei Faktoren korrigiert. (1) Subtraktion eines Blank-Spektrums und (2) Multiplikation mit einem Spektrum, das den reziproken Sensitivitäts-Unterschied des Detektors bei den verschiedenen Wellenlängen widerspiegelt.

Zur weiteren Bearbeitung der Spektren, bzw. Kinetiken werden die Dateien im ascii-Format exportiert.

### Messung mit der Apparatur SX.17MV mit integrierter Stopped-Flow Einheit

Durch die automatisierte Proben-Mischung mit anschließendem Start der Messung erlaubt die Verwendung des SX.17MV Fluorometers die Aufnahme von deutlich kürzeren Zeitintervallen im Bereich von 50 ms. Für die Aufnahme der Fluoreszenzkinetiken des Farbstoffes werden die folgenden Einstellungen gewählt:

Total time:	0.5 s/ 5 s/ 10 s/ 50 s
Excitation:	508 nm
Slit Exc.:	0.8 nm
Emission:	Selektiert durch Intefferenz-Bandpassfilter bei 546 nm (HWB 8±2 nm)
Pfad Exc.:	2 mm
Pfad Em.:	10 mm
Data Points:	1000

### 2.3.2 Circular-Dichroismus Spektroskopie

Die Circular-Dichroismus (CD) -Spektroskopie ist eine Form der Absorptionsspektroskopie und somit abhängig von der Anwesenheit von Chromophoren, d.h. von Molekülen, die die Fähigkeit zur Absorption von Strahlungsenergie haben, wobei es sich um den speziellen Fall der Absorption von circular polarisiertem Licht handelt. Bei circular polarisiertem Licht schwingt der elektrische Feldvektor nicht in einer Ebene, sondern beschreibt in Ausbreitungsrichtung mit gleich bleibender Amplitude eine Helix. Je nachdem ob der Feldvektor die Kreisbahn im Uhrzeigersinn (rechts) oder gegen den Uhrzeigersinn (links) umläuft, handelt es sich um linkscircular- bzw. rechtscircular- polarisiertes Licht. Die Blickrichtung ist dabei zur Lichtquelle hin gerichtet. Linear polarisiertes Licht lässt sich in zwei circular polarisierte Komponenten zerlegen. Durch Vektoraddition ergibt sich aus den jeweiligen Komponenten zu jeder Zeit wieder der Feldvektor des linear polarisierten Lichtstrahles.

Circular Dichroismus tritt auf, wenn Moleküle oder Molekülverbände einen unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten für links- bzw. rechts- polarisiertes Licht besitzen. In diesem Fall kann bei abwechselnder Bestrahlung einer Probe mit beiden Lichtarten ein Unterschied in den Absorptionen von  $\Delta A = A_L(\lambda) - A_R(\lambda)$  gemessen werden. Dabei fallen die CD- Signale einer Probe mit den normalen Absorptionsbanden zusammen. Für den Unterschied des Extinktionskoeffizienten gilt  $\Delta A = \Delta \epsilon(\lambda) c * l$  ( $l$  = Schichtdicke).  $\Delta \epsilon$  hat typischerweise kleine Werte im Bereich zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-6}$  [ $M^{-1} * cm^{-1}$ ]. Im Experiment muss demnach ein sehr geringer Unterschied zwischen zwei sehr großen Zahlen bestimmt werden. Die Einheit, in denen die CD- Signale gemessen werden, ist die sogenannte Elliptizität  $\theta$  (in Grad).

### Entstehung von CD-Signalen

Die Voraussetzung für das Auftreten von unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten für linkscircular- bzw. rechtscircular polarisiertes Licht ist eine Asymmetrie der Ladungsverschiebung. Diese Asymmetrie kann entweder intrinsisch, d.h. durch den Chromophor selbst bedingt sein, oder durch eine excitonische Kopplung (gegenseitige Beeinflussung der Übergangsdipole) von Chromophoren in molekularen Komplexen induziert werden.

Intrinsische Asymmetrie besteht, wenn an ein zentrales Kohlenstoffatom vier unterschiedliche Reste gebunden sind. Die Asymmetrie bewirkt bei der Absorption von Licht die Induktion einer Ladungsverschiebung, die auch eine helikale bzw. circulare Komponente hat, so daß die Fähigkeit zur Absorption von circular polarisiertem Licht gegeben ist. Das CD- Signal solcher Moleküle hat typischerweise dieselbe Bandenform wie bei der normalen

Absorption. Intrinsische Asymmetrie einzelner Chromophore kann ebenfalls erst durch sterische Änderungen des Moleküls oder durch Wechselwirkungen mit z.B. Aminosäure-Seitenketten induziert werden.

Excitonischen Interaktionen von zwei oder mehr Chromophoren innerhalb eines Komplexes führen zu einer Veränderung der Absorptionseigenschaften. Abhängig vom Abstand und der gegenseitigen Orientierung der Chromophore kommt es zur Aufspaltung der Absorptionsbande in zwei unterschiedliche Banden, deren elektronische Übergänge keine Symmetrieebene mehr besitzen. Diese Asymmetrie zeigt sich in einem CD- Spektrum durch ein entgegengesetztes Vorzeichen der beiden Banden mit einem Nulldurchgang an der Wellenlänge der ursprünglichen Absorption. Diese Bandenform nennt man konservativ, sie entsteht bei der Kopplung von gleichartigen Chromophoren oder von Chromophoren, deren Absorptionsbanden nur wenig voneinander entfernt liegen.

### CD-Signale von Proteinen

Der wichtigste Chromophor in Proteinen ist die Amid- Gruppe, die bei der Bildung einer Peptidbindung entsteht. Die Absorptionsmaxima der Amid- Gruppe liegen bei 195 nm und 220 nm. Absorption durch die meisten Seitenketten findet unterhalb von 200 nm statt, allerdings werden sie durch die starke Absorption bei 195 nm überlagert. Nur die aromatischen Seitenketten (Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin) haben ein Maximum bei 280 nm, das auch deutlich zu erkennen ist.

Excitonische Kopplung als Ursache für CD- Signale erfordert einen bestimmten Abstand und eine bestimmte Orientierung der Chromophore zueinander (vgl. oben). Dabei entstehen in Abhängigkeit von der Orientierung unterschiedliche CD- Signale. Die Orientierung der Amid-Gruppen zueinander ist abhängig von den verschiedenen Sekundärstrukturen ( $\alpha$ - Helix,  $\beta$ - Faltblatt und Zufallsknäuel), so daß sich die CD- Spektren der Sekundärstrukturen voneinander unterscheiden. Die Kopplung der Chromophore innerhalb einer  $\alpha$ - Helix führt zur Aufspaltung der 195 nm Bande in eine positive Bande bei 190 nm und eine negative bei 205 nm. Zusammen mit der negativen Absorptionsbande bei 220 nm ergibt sich ein charakteristisches Spektrum für eine  $\alpha$ - Helix. Auch für die anderen Sekundärstrukturen ergeben sich charakteristische Spektren. Entsprechend der Additivität des CD Signals kann ein Spektrum eines beliebigen Proteins als Summe der Spektren der Sekundärstrukturen angesehen werden. Durch Vergleiche mit Spektren von Proteinen mit bekannter Sekundärstruktur können somit die einzelnen Anteile an  $\alpha$ - Helix,  $\beta$ - Faltblatt und Zufallsknäuel ermittelt werden (vgl. 2.3.3).

### CD-Signale von Pigmenten und Pigment-Protein-Komplexen

Freie Chlorophylle in Lösung haben nur ein sehr schwaches intrinsisches CD- Signal, die Banden entsprechen denen der normalen Absorptionsbanden. In Pigment- Protein-Komplexen dagegen, in denen die Chlorophylle bestimmte Bindungsstellen einnehmen, kommt es zur Kopplung der Chromophore untereinander, aus der eine konservative Bandenform des Spektrums resultiert.

In der vorliegenden Arbeit wird die CD-Spektroskopie sowohl für die Analyse der Sekundärstruktur, als auch für die Analyse der Bindung der Pigmente verwendet. Dazu werden Spektren im UV- und im Sichtbaren-Bereich aufgenommen und zeitaufgelöste Messungen an bestimmten Wellenlängen durchgeführt.

Die folgenden Einstellungen werden dazu gewählt.

### Durchführung der CD-Spektroskopie im sichtbaren Bereich

#### Aufnahme von CD-Kinetiken:

Total Time: 350 s/ 700 s  
Data Pitch: 0.5 s  
Response: 0.5 s  
Sensitivity: Standard  
Band width: 0.8 nm/ 1 nm  
Monitor wavelength: 492 nm

#### Aufnahme von CD-Spektren:

Scan Start: 750 nm  
Scan End: 350 nm  
Data Pitch: 1 nm  
Response: 2 sec  
Band width: 4 nm  
Sensitivity: Standard  
Scanning Speed: 100 nm/min

### Durchführung der CD-Spektroskopie im UV-Bereich

#### Aufnahme von CD-Kinetiken:

Total Time: 600 s  
Data Pitch: 0.5 s  
Response: 0.5 s  
Sensitivity: Standard  
Band width: 4 nm  
Monitor wavelength: 195 nm/ 222 nm

#### Aufnahme von CD-Spektren:

Scan Start: 250 nm  
Scan End: 190 nm  
Data Pitch: 0.5 nm  
Response: 4 sec  
Band width: 4 nm  
Sensitivity: Standard  
Scanning Speed: 50 nm/min

Küvetten mit folgenden Pfadlängen werden verwendet:

Spektren bis 200 nm und Kinetiken bei 222 nm und 492 nm: 2 mm

Spektren bis 190 nm: 1mm

Kinetiken bei 195 nm: 0.2 nm (Durchflussküvette)

Zur weiteren Bearbeitung der Spektren, bzw. Kinetiken werden die Dateien im text-Format exportiert. Zur genaueren Analyse vgl. 2.3.3.

### **2.3.3 Computergestützte Analyse der spektroskopischen Daten**

#### Anpassung einer Funktion an die Signaländerung der kinetischen Experimente

Sowohl bei der Fluoreszenz-, als auch bei der CD- Spektroskopie wird die Rekonstitution des LHCII anhand der Änderung charakteristischer Signale über einen Zeitabschnitt von 100 s bis zu 700 s verfolgt. Bei Messungen am Fluoreszenzspektrometer werden Zu- bzw. Abnahme der Fluoreszenzemission der Chlorophylle bzw. eines proteingebundenen Farbstoffes dokumentiert. Am CD- Spektropolarimeter wird die Zunahme der Elliptizität bei verschiedenen Wellenlängen beobachtet.

Dabei werden jeweils die kontinuierlichen Signaländerungen vom Computer aufgezeichnet und als Punktwolke wiedergegeben. Die Analyse der zugrunde liegenden Kinetiken durch Anpassung verschiedener Funktionen an die Punktwolke erfolgt durch das Computerprogramm Tabel Curve (Version 2D 4.0, SPSS Inc, Chicago, USA). Die Güte einer Anpassung wird durch die „Residuals“, d.h. die Abweichungen der gemessenen Daten von der angepassten Funktion gezeigt.

An alle Punktwolken erfolgt die beste Anpassung mit einer Funktion, die der Summe mehrerer monoexponentieller Funktionen entspricht. Auf diese Weise wird die Signaländerung in mehrere unabhängige Schritte mit einfacher, d.h. 1. Reaktionsordnung unterteilt. In den meisten Fällen kann eine biexponentielle Funktion mit der folgenden Reaktionsgleichung verwendet werden.

Abnahme des Signals:

$$Y = A + B * \exp(-XC) + D * \exp(-XE)$$

Zunahme des Signals:

$$Y = A + B * (1 - \exp(-XC)) + D * (1 - \exp(-XE))$$

Charakterisiert werden die einzelnen Schritte durch die Reaktionskonstanten C und E, deren Kehrwert die Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  mit der Einheit [s] ergibt. Die dazugehörigen Amplituden B und D geben den jeweiligen Anteil des Schrittes an der gesamten Signaländerung an. Der so genannte Offset A entspricht bei einer Zunahme des Signals dem Y-Achsenabschnitt, bei einer Abnahme dem Endniveau der Punktewolke.

Grundsätzlich handelt es sich bei der Unterteilung der jeweiligen Signaländerungen in zwei unabhängige Schritte 1. Reaktionsordnung um ein reines Hilfsmittel, um die Vorgänge der Komplexbildung näher beschreiben zu können und um Vergleiche zwischen unterschiedlichen Reaktionsbedingungen anstellen zu können. Aus diesem Grund ist nur von „apparenten“ d.h. scheinbaren Schritten die Rede, die zugrunde liegenden molekularen Vorgänge sind noch nicht vollständig bekannt.

### Evaluation der Anteile der Sekundärstrukturen anhand der UV- CD Spektren

Anhand der CD-Spektren von Proteinen im UV-Bereich lassen sich die einzelnen Anteile von Sekundärstrukturen berechnen. Dazu müssen die Spektren, die in der Einheit Elliptizität [mdeg] aufgenommenen werden, zunächst in die Einheit „Mean Residue Ellipticity“ (MRE) [ $\text{deg cm}^{-2} \text{dmol}^{-1}$ ] konvertiert werden. Dies erfolgt im Programm-Bereich „Spectra Analysis“ und erfordert die Angabe der Anzahl der Aminosäuren des Proteins multipliziert mit der molaren Konzentration des Proteins in der Probe. Die Spektren werden so auf das mittlere Gewicht einer Aminosäure normiert, so dass sich Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen miteinander vergleichen lassen.

Für die Evaluation der Anteile an Sekundärstruktur wird das Computer Programm „Dicroprot“ verwendet, das aus dem Internet herunter geladen werden kann (Version 2.5 von Gilbert Deleage, <http://dicroprot-pbil.ibcp.fr/>). Die Berechnung der Anteile erfolgt nach der so genannten „Self-consistent“ Methode, die von Sreerama & Woody (1993) entwickelt wurde. Als Basis dienen die Daten löslicher Proteine, deren Kristallstrukturen von Kabsch & Sander (1983) analysiert wurden. Die Ergebnisse des Anpassungsvorgangs erfüllen die Kriterien, dass (1) die Summen der einzelnen Sekundärstrukturen zwischen 95 % und 105 % liegen und (2) der Wert des „Root-mean-squares“ (RMS) zwischen dem experimentellen und dem berechneten Spektrum  $\leq 0.25$  ist (Sreerama *et al.* 2000).

## 2.4 Methoden der Molekularbiologie

### Klonierung einer Mutante des Lhcb1

Zur Analyse der Pigmentbindung während der Assemblierung des LHCII wurde neben dem zur Rekonstitution fähigen Apoprotein, Lhcb1, auch eine Mutante desselben benötigt, die nicht mehr in der Lage ist, einen funktionstüchtigen Komplex zu bilden. Außerdem sollte sie ein singuläres Cystein zur Farbstoffmarkierung besitzen. Zur Herstellung der Mutante dienten schon bestehende Mutanten als Ausgangsmaterial. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 2.3 dargestellt. Sie sieht vor, dass zunächst die Ausgangsplasmide durch einen enzymatischen Verdau (Restriktion) in definierte Fragmente geschnitten werden (Vektor und Insert), die später neu kombiniert und wieder verbunden werden (Ligation). Dabei entspricht dem Vektor das DNA-Fragment, das hauptsächlich aus Plasmid-Anteilen besteht und charakteristische Stellen wie eine Multiple Cloning Site und Antibiotika-Resistenz, etc. besitzt. Das Insert dagegen besteht hauptsächlich aus Bereichen, die für das Protein codieren; es wird in der Ligationsreaktion in den Vektor eingefügt (insetiert).

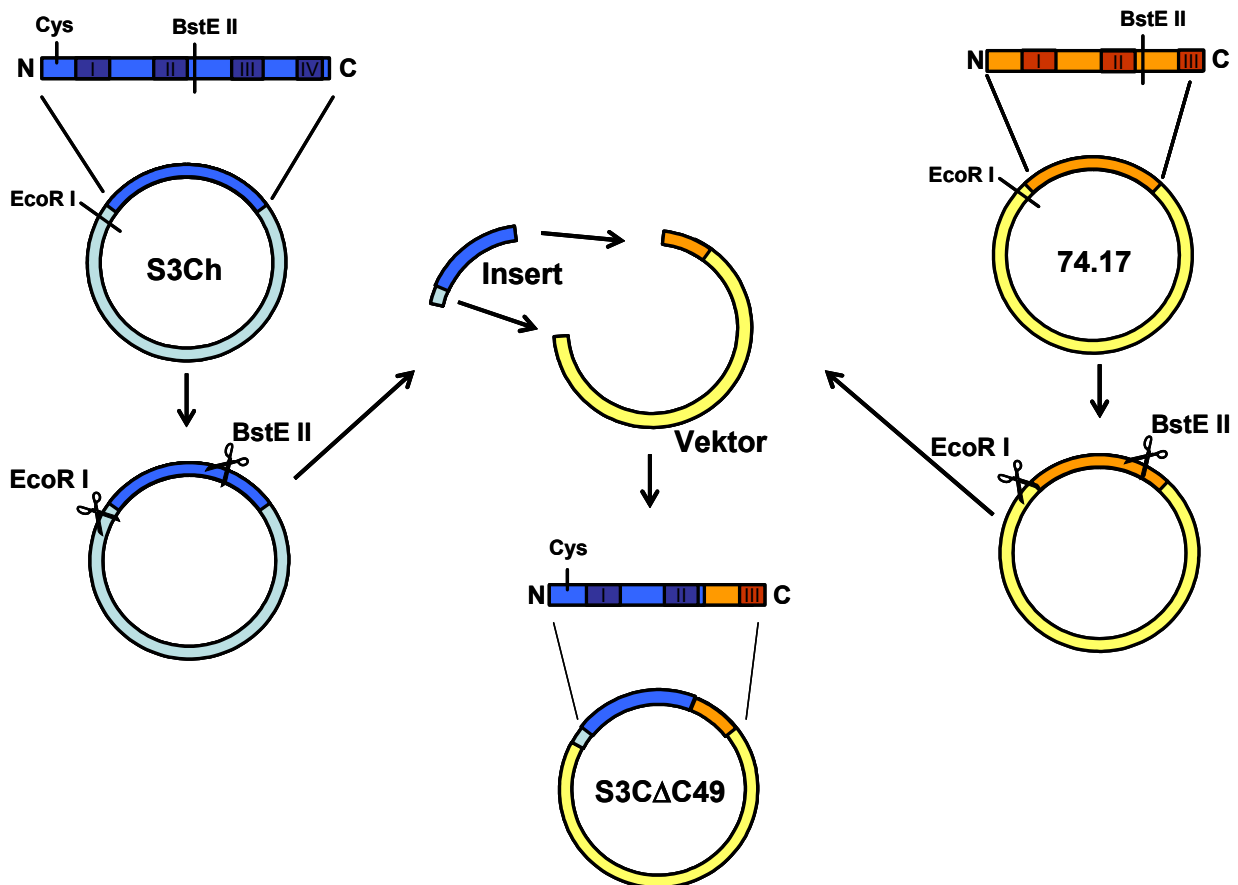


Abb. 2.3: Klonierungsstrategie der Mutante mit C-terminaler Deletion von 49 Aminosäuren und einem singulären Cystein an 3. Stelle, ausgehend vom N-Terminus (S3CΔC49). Die Ausgangsmutanten sind S3Ch mit einem singulären N-terminalen Cystein und C-terminalen His-tag und 74.17 mit einer C-terminalen Deletion. Die Ziffern I bis IV stehen für die vier helikalen Bereiche des LHCIIb; N und C für N-, bzw. C-Terminus; Cys für das singuläre Cystein. Bei EcoRI und BstE II handelt es sich um die verwendeten Restriktionsenzyme.

### **2.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen (Midi-Präp)**

Material:

50 (oder 100) ml Übernachtskultur (ÜK) von *E. coli*

Nucleobond AX-Kid der Firma Macherey-Nagel

Isopropanol

Ethanol 70% (-20°C)

H<sub>2</sub>O dest. steril

Zunächst wird die AX 100-Säule mit 2.5 ml Puffer N2 equilibriert. Zur Aufarbeitung der Zellsuspension wird die ÜK für 5 min bei 5000 Upm (Rotor JA 10.500, Beckmann Kühlzentrifuge) zentrifugiert und das Pellet in 4 ml Puffer S1 resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgt durch Zugabe von 4 ml Puffer S2 (6-8x vorsichtig schwenken) und 5 min Inkubation bei RT. Anschließend wird zur Neutralisierung der Lösung 4 ml Puffer S3 hinzugefügt (6-8x vorsichtig schwenken) und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 25 min bei 11000 Upm und 4°C wird der Überstand sofort vom weißen Präzipitat abgehoben und auf die Säule geladen. Nachdem der gesamte Überstand in die Säule eingelaufen ist, wird 2x mit jeweils 5 ml Puffer N3 gewaschen. Zur Elution der Plasmid-DNA wird 5 ml Puffer N5 auf die Säule gegeben und das Eluat in Corexröhrchen aufgefangen. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgt durch Überschichtung mit 3.6 ml Isopropanol, vorsichtigem Mischen (Röhrchen mit Parafilm verschließen) und anschließender Zentrifugation für 30 min bei 10000 Upm. Das DNA-Pellet (Überstand vorsichtig abgießen und darauf achten, wo das Pellet sitzt) wird mit 3.6 ml 70% Ethanol (-20°C) gewaschen. Nach einer letzten Zentrifugation von 10 min bei 10000 Upm wird der ethanolische Überstand vorsichtig abgehoben und das Pellet bei RT getrocknet. Zur Lagerung wird das DNA-Pellet mit H<sub>2</sub>O von der Glaswand gewaschen, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

Die Quantifizierung erfolgt spektroskopisch über die Absorption bei 260 nm. Dabei entspricht einer OD von 1 die DNA Menge von 50 µg/ml.

### **2.4.2 Enzymatischer Verdau von Plasmid-DNA**

Material:

DNA- Lsg. aus Midi-Präp

Restriktionsenzym

10x Puffer

H<sub>2</sub>O dest. steril

Restriktionsenzyme haben die Eigenschaft, DNA an Stellen mit spezifischer Nukleotidsequenz zu schneiden. Dies macht man sich zunutze, um bei einer Klonierung das Ausgangs-Plasmid in klar definierte Fragmente zu schneiden, die anschließend aufgetrennt und isoliert werden können. Je nach Restriktionsenzym können die Fragmente dabei einzelsträngige Überhänge („sticky ends“) haben oder nicht („blunt ends“).

Zur Berechnung des Überschusses an Restriktionsenzym über Plasmid-DNA geht man von der Definition aus die besagt, dass 1 Unit Enzym der Menge entspricht, die 1 µg λ-Phagen DNA bei 37°C komplett schneidet. Optimale Bedingungen hinsichtlich Puffer, Temperatur und Länge des Verdau können je nach Enzym unterschiedlich sein.

Folgende Restriktionsenzyme wurden in der Arbeit verwendet.

## 2. Material & Methoden

Enzym	Schnittstelle (5'Überhang)	Konzentration [U/μl]	Puffer	Temperatur [°C]	Hitzedeaktivierung
BstE II (NEB)	G <sup>▼</sup> GTNACC C CANTG <sup>▲</sup> G	10	NEB 3 (verwendet in NEB Puffer EcoRI)	60	keine
EcoR I (NEB)	G <sup>▼</sup> AATTC C TTAAG <sup>▲</sup>	2.5	NEB Puffer EcoRI	37	20 min bei 65°C
Hind III (Promega)	A <sup>▼</sup> AGCT TTCG <sup>▲</sup> A	10	Puffer E	37	20 min bei 65°C

Das Ansatzvolumen beträgt 30 μl mit DNA Mengen von 2-8 μg und entsprechenden Mengen an Enzym in einfacher Puffer-Konzentration.

### **2.4.3 Durchführung einer Agarose-Gel Elektrophorese zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA- Fragmenten**

Verschiedene DNA-Fragmente können durch Elektrophorese in einer Agarose-Matrix ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Der Nachweis der Banden erfolgt durch Ethidiumbromid im Laufpuffer, einem Molekül, das sich zwischen den Basen der Nukleotide einlagert und nach Anregung im UV Fluoreszenzlicht emittiert.

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente werden Gele mit Agarose-Konzentrationen von 0.5 – 2.0 % verwendet.

#### Gießen von Agarose-Gelen

Material:

0.5-2.0 g Agarose

5x TBE Puffer

(0.89 M Tris Base, 0.89 M Borsäure, 20 mM EDTA)

Zunächst wird die Gießapparatur mit gereinigten Glasplatten und Kämmen zusammengesetzt (für präp. Gele jeweils 2-3 Taschen zusammenkleben). Die abgewogene Agarose wird mit 1x TBE Puffer (Endvolumen 100 ml) in der Mikrowelle gelöst und jeweils 10 ml Flüssigkeit werden auf eine Glasplatte aufgetragen. Nach dem Trocknen erfolgt die Lagerung der Gele bei 4°C (feucht halten).

#### Durchführung einer analytischen Agarose-Gelelektrophorese

Material:

Agarose- Gele

Restriktionsverdau

10x Minigel- Auftragsmix:

(50 mM Tris- HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.025% Bromphenolblau, 0.025 % Xylenblau, 50 % Glycerol)

1kp DNA-Marker

100 bp DNA-Marker

Laufpuffer

(1x TBE, Ethidiumbromid (10mg/ml) 5 μl auf 100 ml TBE)

Nach einem Restriktionsverdau wird zunächst durch ein analytisches Gel die Größe der erhaltenen DNA- Fragmente kontrolliert. Dazu werden vom Verdau-Ansatz 10 μl mit 1μl Minigel-Auftragsmix gemischt und das gesamte Volumen dann auf das Agarose-Gel aufgetragen. Zum Größenvergleich dienen DNA-Marker mit Banden bekannter Fragmentgröße (vgl. Abb. 2.5); die Probe flankierend werden davon jeweils 2.5 μl

aufgetragen. Die Proben lässt man bei 140 V in das Gel einlaufen. Danach wird die Spannung auf 200 V erhöht.

Zur Auswertung wird das Gel in der Versa Doc (Bio-Rad, USA) mit UV-Licht bestrahlt und die resultierende Fluoreszenz der Banden mit einer Kamera aufgenommen. Bei Anwesenheit der gewünschten DNA-Fragmente kann eine zweite, diesmal präparative Gelelektrophorese durchgeführt werden.

### Durchführung einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese

Für die präparative Gelelektrophorese wird der Rest des Restriktionsverdau mit 3 µl Minigel-Auftragsmix gemischt und das gesamte Volumen auf das Gel aufgetragen (in eine große Tasche aus insgesamt 2-3 einzelnen Taschen). Auftrennung der Banden erfolgt analog zur analytischen Gelelektrophorese bei 140 und 200 V.

Anschließend wird das Gel unter der Hand-UV-Lampe betrachtet (312 nm, nur kurz!), so dass die Lage der zu isolierenden Fragment-Banden gekennzeichnet werden kann. Die Banden werden aus dem Gel ausgeschnitten und in Eppendorfgläsern gelagert (längere Lagerung bei -20°C).

### 2.4.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelstücken

Material:

Gelstücke

NucleoTrap-Kid der Firma Macherey-Nagel

5 mM Tris-HCl, pH 8.5

Das Prinzip der Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen sieht drei Schritte vor: 1. Bindung der DNA an eine Matrix bei großer Salzkonzentration und Abtrennung der restlichen Komponenten der Gelelektrophorese; 2. Waschen der gebundenen DNA; 3. Elution der DNA bei niedriger Salzkonzentration. Die Durchführung erfolgt gemäß der dem Kit beiliegenden Anleitung.

### 2.4.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese

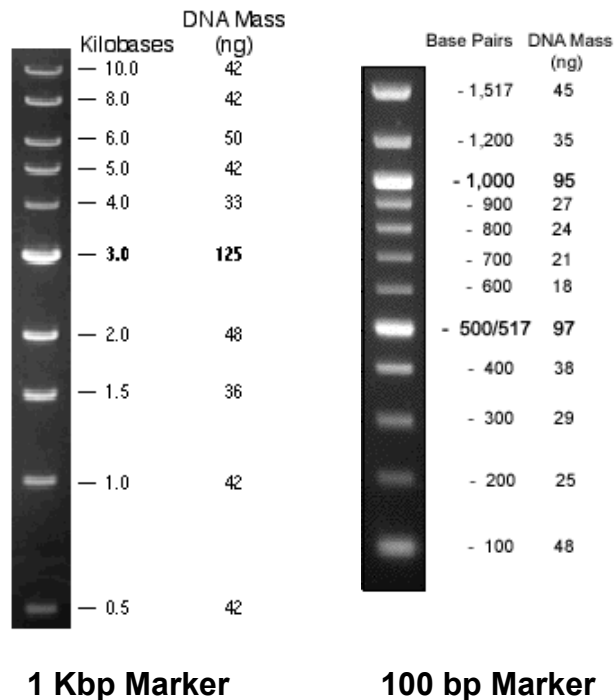
Für die weitere Verwendung muss sich nach der Aufreinigung der DNA-Fragmente eine Konzentrationsbestimmung anschließen. Dies geschieht durch densitometrische Auswertung der DNA-Bandenintensität nach Auftrennung der Fragmente durch eine Agarose-Gelelektrophorese. Als Referenz dienen die Intensitäten der Markerbanden, denen bei Auftrag eines bestimmten Volumens exakte DNA-Mengen zugeordnet werden können.

Damit einigermaßen sinnvolle Mengen der aufgereinigten DNA auf das Gel aufgetragen werden, empfiehlt sich zuvor eine grobe Abschätzung der Konzentration. Dazu berechnet man den Anteil, den das jeweilige Fragment an der Ausgangsmenge (Einsatz für den Restriktionsverdau) an DNA hat und nimmt einen 50 %igen Verlust durch die Aufreinigungsprozedur an.

Für die Gelelektrophorese wird ein Aliquot mit ca. 30 µg (theoretisch) mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Zur weiteren Durchführung vgl. 2.4.3.2.

Mit Hilfe der Versa Doc lassen sich nach Aufnahme des Fluoreszenzbildes die Intensitäten der DNA-Banden berechnen (Programm: Quantity One, Version 4.2, Bio-Rad). Zur Bestimmung der Konzentration an DNA in einer einzelnen Fragment-Bande wird eine auf gleicher Höhe liegende Marker-Bande mit bekannter DNA Menge als Referenz herangezogen.

Bei Auftrag von 5 µl Marker (New England Biolabs, NEB) ergeben sich die folgenden Mengen:



**Abb. 2.4:** Verwendete DNA-Marker (New England Biolabs) mit Angaben der DNA-Menge pro Bande. Auftrag von 5  $\mu$ l Marker mit einer Konzentration an 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l.

### 2.4.6 Dephosphorylierung des Vektor-DNA-Fragmentes

Um bei der nachfolgenden Ligation von Vektor und Insert eine Religation des Vektors zu vermeiden (zur Arbeitsweise der Ligase, vgl. 2.4.7), kann der Vektor zuvor dephosphoryliert werden.

Material:  
DNA-Lsg. Vektor  
Alkalische Phosphatase, AP (2U/ $\mu$ l)  
10x OPA  
H<sub>2</sub>O dest. steril

Für die Dephosphorylierungsreaktion wird 1 U AP für eine DNA-Menge von 1-20  $\mu$ g in 1x OPA Puffer angesetzt und die Lösung zunächst für 30 min bei 37°C, anschließend noch für 15 min bei 85°C inkubiert. Der Ansatz kann dann unaufgereinigt für die Ligrationsreaktion eingesetzt werden.

### 2.4.7 Ligation von Vektor- und Insert- DNA- Fragment

In der Ligrationsreaktion werden die zuvor isolierten Vektor- und Insert-DNA-Fragmente miteinander verbunden. Das Enzym, die Ligase, katalysiert dabei die Verbindung zweier DNA-Fragmente zwischen dem 5' Phosphat-Ende und dem 3'Hydroxyl-Ende zweier benachbarter Nukleotide (sowohl sticky- als auch blunt-ends).

Material:  
DNA- Lsg. des Vektors und des Inserts  
T4- Ligase (400 U/ $\mu$ l)  
10x T4- Ligase- Puffer

H<sub>2</sub>O dest. steril

Für einen Ligationsansatz werden DNA-Mengen von 50-200 ng (Vektor + Insert) verwendet, wobei das Gesamtvolumen des Ansatzes 10 µl nicht überschreiten sollte. Das Verhältnis von Vektor zu Insert beträgt dabei standardmäßig 1:2. Von der Ligase werden 200 U eingesetzt, die Pufferkonzentration ist einfach. Zur Kontrolle wird ein Ansatz nur mit Vektor-DNA und ein weiterer Ansatz ohne DNA (statt dessen H<sub>2</sub>O) angesetzt. Die Inkubationszeit beträgt 2- 4 h bei 16°C oder über Nacht bei 4°C. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt durch -20°C.

### **2.4.8 Transformation von kompetenten *E. coli*- Zellen mit Plasmid- DNA**

Nach erfolgter Ligation von Vektor und Insert wird das neue Plasmid in *E. coli*- Zellen eingeschleust, damit dort anschließend eine Überexpression zur Produktion des Proteins induziert werden kann. Die Bakterienzellen müssen dazu zur Aufnahme von Plasmid- DNA aus der Umgebung fähig, d.h. kompetent, sein. Die Selektion hinsichtlich der erfolgreichen Aufnahme eines Plasmides erfolgt durch die Anwesenheit eines Ampicillin-Resistenzgens auf dem Plasmid. Bei Anzucht auf LB- Platten, die das Antibiotikum enthalten, können nach Durchführung der Transformation nur die Zellen wachsen, die ein Plasmid aufgenommen haben. Dieser Schritt ermöglicht jedoch keine Unterscheidung zwischen der Aufnahme eines kompletten Plasmides (Vektor und Insert) und der Aufnahme nur eines religierten Vektors.

#### Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Material:

LB- MgCl <sub>2</sub> - Platten	1 % Bacto- Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,1 M NaCl, 0,01 M MgCl <sub>2</sub> , einstellen auf pH 7,5, 1,5 % Agar Agar)
TYM Broth- Medium	(2,0 % Bacto- Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,1 M NaCl, 0,01 M MgCl <sub>2</sub> , einstellen auf pH 7,5)
Tfb I	(30 mM KoAc, 100 mM KCl, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 15 % Glycerin, autoklavieren- danach + 50 mM MnCl <sub>2</sub> )
Tfb II	(75 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM Na-Mops (pH 7,0), 10 mM KCl, 15 % Glycerin autoklavieren)

Zur Herstellung kompetenter Zellen werden über Nacht Kolonien des Stammes JM101 (Dauerkultur bei -80°C) auf einer LB- MgCl<sub>2</sub>- Platte angezogen. Von der Platte wird dann eine Kolonie gepickt und 4-5 h in 100 ml TYM- Broth- Medium inkubiert (37°C, 210 Upm auf dem Kulturschüttler). Wenn die Zellsuspension ein OD<sub>550</sub> von 0,8-0,9 erreicht hat, werden die Zellen für 10 min bei 4°C und 3000 Upm pelletiert (Beckmann Kühlzentrifuge, Rotor JA20). Das Pellet wird vorsichtig in 30- 40 ml Tfb I- Lsg. resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 10 min bei 4°C und 3000 Upm werden die Zellen in 4 ml Tfb II- Lsg. resuspendiert. Anschließend werden jeweils 50 µl Aliquots in Eppendorf-Gefäße überführt und sofort (!) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgt bei -80°C.

#### Durchführung Transformation von kompetenten Zellen

Material:

Ligationsansätze  
50 µl Aliquots kompetenter Zellen  
LB- Medium ohne Ampicillin

LB- Platten mit Ampicillin

Für die Transformation werden die 50 µl Aliquots auf Eis für ca. 10 min aufgetaut. Nach einer Ligation werden jeweils ca. 10 ng der drei Parallel-Ansätze (Vektor+Insert, Kontrolle mit Vektor allein, Kontrolle mit nur H<sub>2</sub>O) eingesetzt. Das entsprechende Volumen wird zu den kompetenten Zellen zugegeben; Mischung erfolgt durch kurzes Anschneiden des Eppendorf-Gefäßes. Inkubation erfolgt auf Eis für 30 min und dann bei RT (Hitzeschock) für 5 min. Anschließend wird jeweils 225 µl vorgewärmtes LB- Medium (ohne Ampicillin) zu den Zellen zugegeben und diese für 1 h bei 37°C inkubiert. Zum Schluss werden 100- 200 µl der Zellsuspension auf LB- Platten mit Ampicillin (vorgewärmt) ausgestrichen und diese über Nacht bei 37°C inkubiert.

Ob die Ligation von Vektor und Insert erfolgreich war, zeigt sich anhand des Wachstums der (mit dem Ansatz Vektor+ Insert) transformierten Bakterienzellen auf dem ampicillinhaltigen Medium. Finden sich Kolonien, kann davon ausgegangen werden, dass eine Insertion stattgefunden hat. Findet sich kein Wachstum der Zellen, die mit „Vektor alleine“ transformiert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass keine Religation stattgefunden hat. Zur genaueren Überprüfung der Ligation von Vektor und Insert müssen sich aber noch weitere Schritte anfügen.

### **2.4.9 Überprüfung der Ligation von Vektor und Insert mittels PCR und „mini IB-Präparation“**

Material:

Ampicillin (100mg/ml)

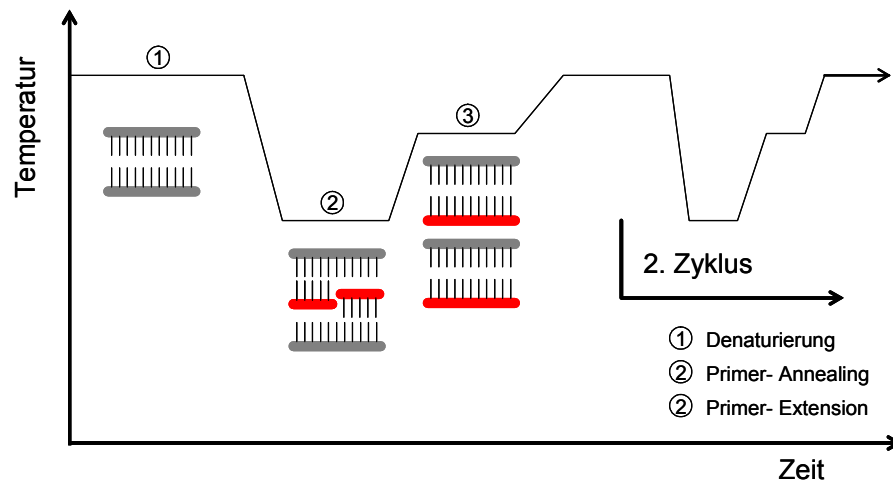
H<sub>2</sub>O dest. steril

LB- Medium: (1 % Trypton, 0.5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, einstellen auf pH 7.5)

Um zu überprüfen, dass die gewachsenen Kolonien des Transformationsansatzes „Vektor + Insert“ auf ihrem Plasmid das Insert auch wirklich enthalten und es sich nicht nur um eine Religation des Vektors handelt, wird zum Nachweis auf DNA Ebene eine PCR Reaktion (Polymerase Ketten Reaktion) und zum Nachweis auf Protein Ebene eine „mini IB-Präparation“ durchgeführt. Dazu werden eine Reihe von Kolonien von der Platte gepickt und jeweils in 500 µl LB- Amp Medium überführt und für 30 min bei 37°C im Drehrad inkubiert. Für die PCR werden anschließend 100 µl des Mediums abgenommen, die Zellen abzentrifugiert und wieder in H<sub>2</sub>O dest. aufgenommen. Für die mini IB Präparation werden ebenfalls 100 µl der Zellsuspension abgenommen und nach Zugabe von 400 µl frischem LB- Amp Medium für eine weitere Stunde bei 37°C im Drehrad inkubiert.

#### Prinzip einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können bestimmte Bereiche der Plasmid DNA in einem Ansatz vermehrt werden. Dazu werden sogenannte Primer, einzelsträngige DNA Stücke, ausgewählt, die am Rande des zu amplifizierenden Bereichs an den *sense*- und *antisense* Strang der DNA binden (Primer Annealing), die zuvor durch Erhöhung der Temperatur voneinander gelöst wurden (Denaturierung). Durch die Polymerase wird ausgehend von den Primern der dazwischen liegende Bereich amplifiziert (Primer Extension), so dass die Menge an DNA verdoppelt wird. Durch mehrmaliges Wiederholen des Zyklus wird der DNA Bereich exponentiell amplifiziert. Das folgende Schema zeigt ein Temperatur/ Zeit- Profil der PCR (nach F. Lottspeich in Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag).



**Abb. 2.5:** Schematische Darstellung des Temperatur/Zeit-Profiles einer Polymerase-Ketten-Reaktion, PCR (nach F. Lottspeich in Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag).

### Durchführung der PCR

Material:

Zellsuspension in H<sub>2</sub>O

H<sub>2</sub>O dest. steril

10 x Taq Polymerase Puffer

25 mM dNTPs

100 µM Primer + (DS23<sup>+</sup>)

100 µM Primer – (F37a.1<sup>+</sup> oder Lhcp 757<sup>+</sup>)

5U/ µl Taq Polymerase

### Durchführung der mini IB- Präparation

Material:

1M IPTG

3-4fach Sparmix

Polyacrylamidgel

Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wird die Expression des Proteins durch Zugabe von IPTG (1/1000) induziert und weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden dann abzentrifugiert und in 20 µl H<sub>2</sub>O und 10 µl Sparmix aufgenommen. Um die Zellen aufzubrechen und die Proteine in Lösung zu bekommen wird die Suspension gut gemischt und 2 min gekocht. Jeweils 15 µl der Lösung wird auf ein Polyacrylamid Gel aufgetragen und die Elektrophorese und nachfolgende Anfärbung der Proteinbanden entsprechend der Erläuterungen in 2.2.8 durchgeführt. Da vorher keine Aufreinigung stattgefunden hat, befinden sich neben dem potentiell überexprimierten Protein auch noch größere Mengen an bakteriellem Protein in der Lösung, so dass eine größere Anzahl an Proteinbanden zu erwarten ist. Eine erfolgreiche Ligation lässt sich dann direkt im Vorhandensein einer Bande von überexprimiertem Protein in der erwarteten Höhe nachweisen.

### Sequenzierung des mutierten DNA Bereiches

Um auszuschließen, dass während der Klonierungsprozedur kleine Veränderungen der DNA- Sequenz aufgetreten sind, die jedoch mittels PCR und mini IB- Präparation nicht sichtbar gemacht werden können, wird nach Isolierung der Plasmid DNA der erfolgreich transformierten Kolonie eine Sequenzierungsreaktion des DNA Bereiches mittels PCR

durchgeführt (vgl. dazu 2.4.9, 2. Absatz). Dabei wird der BigDye-Premix Version 3.1™ der Firma Genterprise verwendet, die schon alle benötigten Komponenten, bis auf die Primer, enthält. Die Primer werden wieder so gewählt, dass sie den zu analysierenden Bereich einschließen. Nach Ende der PCR wird die DNA Lösung ohne weitere Aufreinigung an die Firma Genterprise weitergegeben, wo die Sequenzanalyse stattfindet.

### 3 Ergebnisse zur zeitaufgelösten Messung der LHCIIb-Assemblierung

Der Hauptlichtsammelkomplex des Photosystems II der LHCIIb ist ein Membranprotein, bestehend aus 3 transmembranen und einer amphiphilen Helix, die der Membran aufliegt. Um seine Funktion als Lichtantenne ausüben zu können, sind weitere Kofaktoren, mindestens 12 Chlorophylle und 3 Carotinoide an das Proteingerüst gebunden, wobei die Bindung zumindest für einen Teil der Pigmente über Koordination bestimmter Aminosäureseitenketten mit dem zentralen Magnesium-Atom vermittelt wird. Durch die Mischung des Apoproteins Lhcb1 mit den Pigmenten *in vitro* kann die Bildung des Komplexes, d.h. die Ausbildung der Sekundärstruktur und die Bindung der Pigmente, induziert werden. Ein Charakteristikum des funktionellen Komplexes ist die Fähigkeit des Energietransfers zwischen den gebundenen Chlorophyllen.

Bevor nun die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dargestellt werden, soll kurz auf das Prinzip der bisher hauptsächlich verwendeten Methode zur zeitaufgelösten Messung der Assemblierung des LHCIIb eingegangen werden. Abb. 3.1 zeigt ein Fluoreszenz-Emissionsspektrum des LHCIIb nach selektiver Anregung von Chl b bei 470 nm.

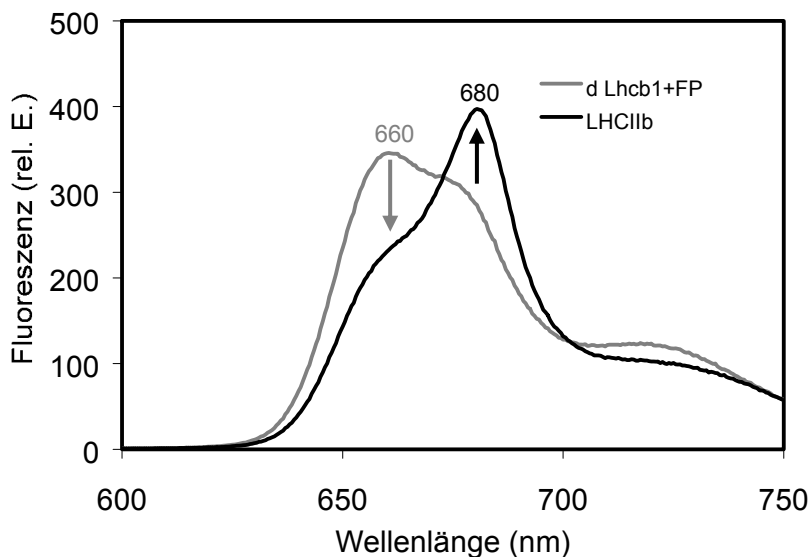


Abb. 3.1: Fluoreszenzemissionsspektren der Chlorophylle nach Chl b Anregung bei 470nm zu Beginn (simuliert durch Mischung der  $\Delta$ Lhcb1 Mutante, die zur Komplexbildung mit Pigmenten nicht fähig ist) und nach Abschluss eines kinetischen Experimentes zur Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb. Das Spektrum von freiem Protein und freien Pigmenten (FP) zeigt nach Anregung von Chl b bei 470 nm hauptsächlich Chl b Fluoreszenzemission bei 660 nm (graue Linie). Im funktionellen Komplex ist die Chl b Fluoreszenz aufgrund der Energieübertragung von Chl b auf Chl a gelöscht, das Spektrum (schwarze Linie) zeigt hauptsächlich einen Chl a Emissionspeak bei 680 nm.

Aufgrund des Energietransfers von Chl b auf Chl a im Komplex wird hauptsächlich die Chl a-Emission bei 680 nm detektiert, die Schulter bei 660 nm entsteht durch die Anwesenheit von freiem Chl b. Sind die Chlorophylle in der Lösung noch nicht an das Protein gebunden, d.h. liegen vor Beginn der Komplexbildung Protein, Chlorophylle und Carotinoide noch frei vor

(freie Pigmente, abgekürzt mit FP), ist dies im Spektrum durch die hauptsächliche Fluoreszenzemission von Chl b bei 660 nm zu erkennen. Da in der Praxis nach Mischen von Protein und Pigmenten die Pigmentbindung ohne Verzögerung einsetzt, wurde für die Aufnahme des Spektrums in Abb. 3.1 der Zustand vor Beginn der Komplexbildung durch eine Mischung der Pigmente mit einer C-terminalen Mutante des Lhcb1 ( $\Delta$ Lhcb1 oder dLhcb1, Sequenz vgl. 7.II) simuliert, die zur Bindung der Pigmente nicht mehr fähig ist. Anhand der Fluoreszenzspektren lässt sich demnach für die Bildung des LHCIIb deutlich ein „Vorher“ und ein „Nachher“ unterscheiden, wobei der Übergang zwischen den beiden Zuständen durch die Zunahme des Signals bei 680 nm bei gleichzeitiger Abnahme des Signals bei 660 nm charakterisiert wird. In Abb. 3.1 ist dies durch Pfeile angedeutet. Nach der Induktion der Komplexbildung durch Mischen von Protein- und Pigmentlösung (vgl. 2.2.7) können durch ausschließliche Detektion der Fluoreszenzemissionen bei 660 nm und 680 nm nach Anregung bei 470 nm, die Änderungen der Chlorophyll Fluoreszenzen, während des Zeitraums, der zwischen den beiden in Abb. 3.1 gezeigten Spektren liegt, verfolgt werden. Abb. 3.2 zeigt die Abnahme der Chl b Fluoreszenz bei 660 nm bei gleichzeitiger Zunahme der Chl a Fluoreszenz bei 680 nm, bedingt durch die Etablierung des Energietransfers zwischen Chl b und Chl a. Da die Energieweiterleitung ein Charakteristikum des funktionellen pigmentierten Komplexes ist, eignet sich die zeitaufgelöste Messung der Veränderung der Chlorophyll- Fluoreszenzen demnach als Monitor der Pigmentbindung an das Apoprotein im Verlauf der Komplexbildung.

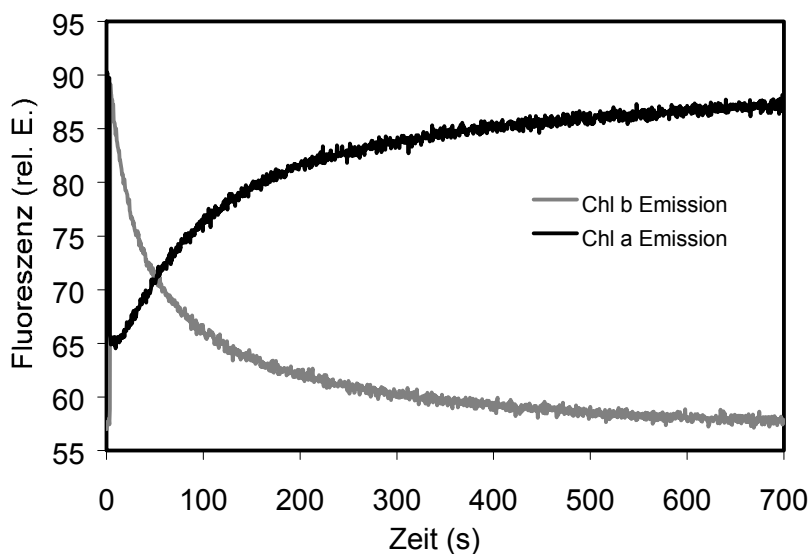


Abb. 3.2: Zeitaufgelöste Messung der Chl Fluoreszenz nach selektiver Anregung von Chl b (bei 470 nm) während der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb. Nach Mischen gleicher Volumina von Protein und Pigmentlösung in der „Rapid-Mixing“-Apparatur (vgl. 2.2.7.1) lässt sich anhand der Signaländerung der Chlorophyll- Fluoreszenzen die Komplexbildung beobachten. Aufgrund der Etablierung des Energietransfers von Chl b auf Chl a nimmt nach Anregung bei 470 nm die Chl b Emission bei 660 nm (schwarze Linie) im Verlauf der Komplexbildung ab, während die Chl a Emission bei 680 nm (graue Linie) zunimmt. (Proteinlösung: 7.8  $\mu$ M Lhcb1; Pigmentlösung: 94  $\mu$ M Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss bei Annahme von 3 Molekülen/ LHCIIb, 284  $\mu$ M Chl  $\rightarrow$  3fach Überschuss bei Annahme von 12 Molekülen/ LHCIIb)

Durch Anpassung einer biexponentiellen Funktion an die durch die Etablierung des Energietransfers hervorgerufenen Signaländerungen lässt sich der Vorgang der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb in zwei apparente Schritte, einen schnelleren und einen langsameren unterteilen, die durch die Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  mit den Amplituden  $A_1$  und  $A_2$

charakterisiert werden. Dieser Vorgang erlaubt den Vergleich zwischen verschiedenen Rekonstitutionsbedingungen, wie z.B. Pigmentüberschuss oder Lipidkonzentration, so dass der Faltungs- und Pigmentbindungsprozess hinsichtlich seiner Abhängigkeiten hin untersucht werden kann. Durch bisherige Messungen konnten Reaktionszeiten aufgelöst werden, die je nach Versuchsbedingungen zwischen 20 s und 70 s für  $\tau_1$  und zwischen 3 min und 8 min für  $\tau_2$  lagen (Reinsberg *et al.* 2000, 2001). Die Unterteilung in zwei Schritte ist dabei ein reines Hilfsmittel, weswegen auch nur von „apparenten“ d.h. scheinbaren Schritten die Rede ist, da die zugrunde liegenden molekularen Vorgänge noch nicht bekannt sind. Des Weiteren ist nicht geklärt, ob die zwei apparenten Schritte Vorgängen zugeordnet werden können, die an einem einzelnen Protein stattfinden, oder ob es sich um zwei verschiedene Ausgangspopulationen von Protein handelt, die sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit falten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Assemblierung des LHCIIb mit zwei spektroskopischen Methoden, der Fluoreszenz- und der CD-Spektroskopie untersucht. Neben der beschriebenen Methode der Messung der Chlorophyllfluoreszenzen, wurde die Bindung der Pigmente außerdem anhand der Fluoreszenz eines proteingebundenen Farbstoffes (3.3) und anhand der Ausbildung charakteristischer CD-Signale im sichtbaren Bereich (3.4) beobachtet. Der zweite wichtige Prozess der Komplexbildung, die Ausbildung der Sekundärstruktur wurde anhand der Ausbildung charakteristischer CD-Signale im UV-Bereich beobachtet (vgl. unten).

### **3.1 Ausbildung der $\alpha$ - helikalen Struktur während der Pigmentbindung des LHCIIb**

Wie oben bereits erwähnt wurde, konnten anhand der Chlorophyllfluoreszenzen für den Prozess der Pigmentbindung zwei apparente Schritte mit den dazugehörigen Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  aufgelöst werden. Interessant war nun die Frage, in welchen Zeitbereichen sich die Ausbildung der Sekundärstruktur abspielt und ob sie mit der Bindung der Pigmente gekoppelt abläuft. Ein Teil der im Folgenden beschriebenen Ergebnisse wurde schon im Rahmen meiner Diplomarbeit (2000) durchgeführt, der Vollständigkeit halber werden sie hier aber noch einmal aufgeführt. Die Bildung von Protein-Sekundärstrukturen lässt sich mit Hilfe der Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) beobachten (vgl. 2.3.2), da die verschiedenen Arten wie  $\alpha$ - Helix,  $\beta$ - Faltblatt und Zufallsknäuel im UV- Bereich deutlich unterschiedliche Spektren zeigen.

Für die Benennung der Spektren und Signaländerungen gilt für die folgenden Abbildungen das gleiche Muster. pLhcb1 steht für die Vorläuferform des Apoproteins des LHCIIb, die noch die Präsequenz von 36 Aminosäuren besitzt. Die einzelnen Spezies der Pigmentlösung werden mit Großbuchstaben abgekürzt: A für Chl a, B für Chl b, C für Carotinoide, Det steht für Detergens/Lipidlösung ohne Pigmente.

#### **3.1.1 Das Apoprotein pLhcb1 und der funktionelle Komplex pLHCIIb zeigen unterschiedliche CD Spektren**

Bei der CD-Spektroskopie handelt es sich um eine spezielle Art der Absorptionsspektroskopie, bei der das unterschiedliche Absorptionsverhalten bezüglich links, bzw. rechts zirkular polarisiertem Licht von Molekülen (bzw. Molekülverband) ausgenutzt wird. Dabei wird eine Probe abwechselnd mit den beiden Polarisierungsarten bestrahlt und das Spektrum als ein Differenzspektrum der absorbierten Anteile von rechts bzw. links zirkular polarisiertem Licht dargestellt, so dass negative und positive Maxima auftreten können. In Proteinen ist die Wechselwirkung der vielen Peptidbindungen, die je nach Sekundärstruktur eine räumlich andere Anordnung haben, verantwortlich für die unterschiedliche Absorption der beiden Lichtarten. Es entstehen so unterschiedliche Interaktionen der Peptidbindung, die sich in der CD-Spektroskopie im UV Bereich durch die charakteristischen Spektren der drei Sekundärstrukturen zeigen. Sind in einem Protein verschiedene Domänen mit unterschiedlicher Sekundärstruktur enthalten, entsprechen die aufgenommenen Spektren einer Addition der einzelnen Spektren, so dass mit Hilfe spezieller Computerprogramme (vgl. 2.3.3) die Anteile an der jeweiligen Art der Struktur herausgerechnet werden können. Das charakteristische Spektrum einer  $\alpha$ - helikalen Struktur zeigt negative Maxima bei 222 nm und um 205 nm und ein positives Maximum bei 195 nm, wobei das Verhältnis der Intensität von 195 nm/ 222 nm in etwa 2/3 zu 1/3 beträgt.

Ein Vergleich zwischen den Spektren von SDS denaturiertem pLhcb1 und pLHCIIb (Abb. 3.1.1) zeigt einen deutlichen Anstieg der Intensität bei 195 nm und 222 nm für den funktionellen Komplex gegenüber dem Apoprotein alleine, was das Vorhandensein der  $\alpha$ - helikalen Struktur des Komplexes, entsprechend den 4  $\alpha$ - Helices, reflektiert. Da jedoch auch

im Spektrum des SDS denaturiertem pLhcb1 leichte Maxima bei den charakteristischen Wellenlängen auftreten, ist erkennbar, dass auch im SDS-denaturierten Protein schon ein gewisser Anteil an  $\alpha$ -Helix vorhanden ist. Zur genaueren Analyse der Sekundärstruktur-Anteile siehe unten. Das Spektrum des nativen LHCIIb unterscheidet sich nicht von dem des rekombinanten Komplexes (nicht gezeigt).

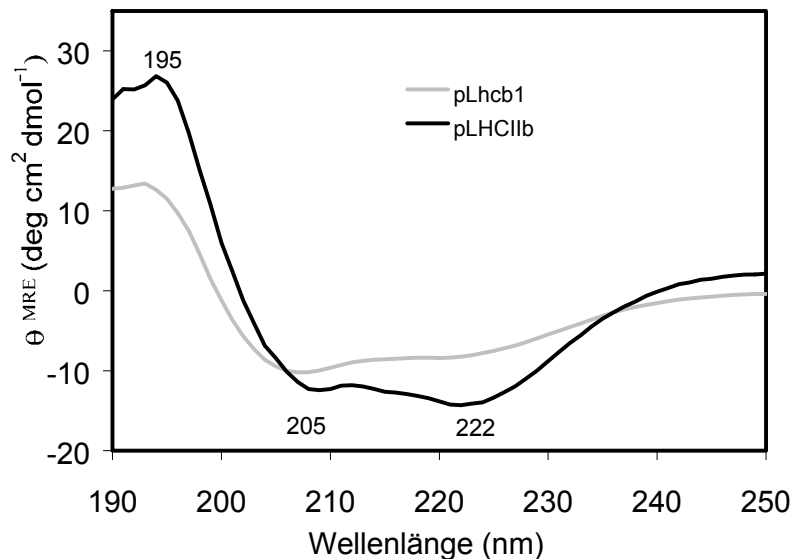


Abb. 3.1.1: UV- CD Spektren des aufgereinigten pLHCIIb in 0.1 % LM (schwarze Linie) und des in 0.2 % SDS denaturiertem pLhcb1 (graue Linie). Der funktionelle Komplex zeigt ein charakteristisches Spektrum für  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur mit Maxima bei 195 nm (positiv) und 205 nm und 222 nm (negativ). Rekonstitution des pLHCIIb erfolgte mit der Detergenswechsellmethode, die Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation und Gelfiltration (vgl. 2.2.7.4). Die Einheit MRE steht für „Mean Residue Ellipticity“, d.h. die Spektren sind auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure normiert, so dass Spektren von Proteinlösungen mit unterschiedlicher Konzentration verglichen werden können. (1.6  $\mu$ M pLHCIIb, 2.8  $\mu$ M pLhcb1)

Als Monitor für die Ausbildung der Sekundärstruktur im Verlauf einer kinetischen Messung bot sich die Zunahme an Intensität bei 222 nm an. Zwar konnte bei 195 nm ein größerer Signalanstieg erwartet werden, durch die verstärkte Hintergrundabsorption durch eine Reihe von Komponenten des Experimentes war aber auch eine Verschlechterung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses zu erwarten. Im Bereich um 222 nm zeigte sich dieser Effekt noch nicht so gravierend, für die spätere Analyse wurden jedoch zur Verringerung des Rauschabstands die Signale von 5 einzelnen Kinetiken akkumuliert.

### 3.1.2 Die Ausbildung der $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur des pLHCIIb lässt sich zeitaufgelöst anhand des CD Signal bei 222 nm beobachten

Nach Start des kinetischen Experimentes durch Mischen gleicher Volumina von Protein- und Pigmentlösung lässt sich die Bindung der Pigmente anhand der Änderungen der Chlorophyll-Fluoreszenzen beobachten, die durch die Etablierung des Energietransfers zwischen Chl b und Chl a bedingt ist. Abb. 3.1.2 zeigt, dass sich unter den gleichen experimentellen Bedingungen auch die Ausbildung der Sekundärstruktur beobachten lässt. Werden die beiden

Lösungen miteinander gemischt, findet ein deutlicher Anstieg des negativen Signals bei 222 nm statt, was die Zunahme der  $\alpha$ -helikalen Struktur des Apoproteins widerspiegelt. Dabei ist die Signaländerung an die Anwesenheit der Pigmente gekoppelt, bei Zugabe von Detergens/Lipidlösung alleine zum Protein zeigt sich bis auf einen leichten linearen Anstieg in positive Richtung keine Signaländerung. Das gleiche galt, wenn eine Mutante des Lhcb1, die durch eine Deletion von 32 Aminosäuren in der stromalen Schleife nicht mehr zur Komplexbildung fähig ist (Mutante 35b.1), mit Pigmenten gemischt wurde (nicht gezeigt).

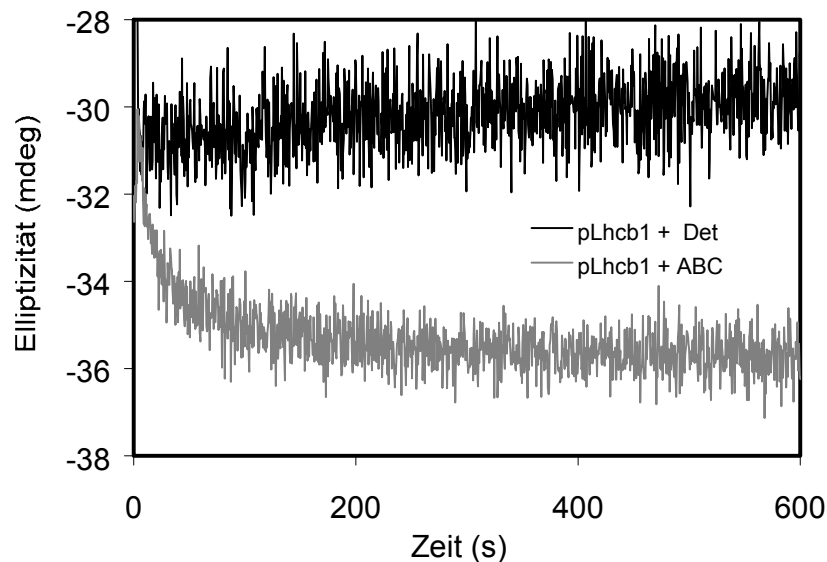


Abb. 3.1.2: Zeitaufgelöste CD Messung der Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Struktur während der Faltung des pLHCIIb, aufgenommen anhand der Zunahme an Elliptizität bei 222 nm (graue Linie). Start der Komplexbildung erfolgt durch Mischen gleicher Volumina von Protein- und Pigmentlösung in einer Rapid-Mixing-Apparatur. Wird das Protein nur mit einer Detergens/Lipidlösung ohne Pigmente gemischt, lässt sich keine Signaländerung beobachten. (Proteinlösung: 13.6  $\mu$ M pLhcb1; Pigmentlösung: 230  $\mu$ M Chl a+b  $\rightarrow$  1.4fach Überschuss bei Annahme von 12 Molekülen/ pLHCIIb, 138  $\mu$ M Carotinoide  $\rightarrow$  3.4fach Überschuss bei Annahme von 3 Molekülen/ pLHCIIb)

Als Ursache für die lineare Drift, die sich bei der Durchführung des Kontrollexperimentes zeigt, kommen Aggregationsprozesse des freien Proteins in Frage, da es im Gegensatz zu den Bedingungen von 0.2 % SDS vor dem Mischen unter den Bedingungen von 0.1 % SDS, 1% OG und 0.04 % PG nach dem Mischvorgang nicht mehr so gut löslich ist und aggregiert.

Die Auswertung der Signaländerung bei 222 nm erfolgte, wie auch bei aufgenommenen Fluoreszenzkinetiken zur Pigmentbindung (vgl. 3.1 und 2.3.3), durch Anpassung einer biexponentiellen Funktion. Dadurch wird der Vorgang der Faltung, genauer der Ausbildung der Anteile an  $\alpha$ -Helix im Protein in zwei apparente Schritte unterteilt, einen schnelleren und einen langsameren, die durch die Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  mit den Amplituden  $A_1$  und  $A_2$  charakterisiert werden. Auf diese Weise wird ein Vergleich zwischen den beiden wichtigen Vorgängen der Faltung und Pigmentbindung während der Komplexbildung möglich, was ein Ziel der beschriebenen Experimente ist. In Tabelle 3.1.1 sind die Werte der Reaktionszeiten und Amplituden für Kinetiken der Bildung der  $\alpha$ -helikalen Anteile aufgelistet. Die Daten stammen aus Messungen mit einem stöchiometrischen Pigmentüberschuss entsprechend den Standardbedingungen (vgl. Text Tabelle 3.1.1), bzw. mit auf 1/3 reduzierter Carotinoidkonzentration. Zum Vergleich mit dem Vorgang der Pigmentbindung sind außerdem die Daten von Fluoreszenzmessungen aufgeführt, die im Rahmen der Doktorarbeit von Dirk Reinsberg

(2000) unter den entsprechenden Standardbedingungen der CD-Messung durchgeführt wurden.

	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)	$A_1 / A_2$
CD Standard Pigmentüberschuss	$11 \pm 1$	$104 \pm 12$	$2.7 \pm 0.3$
CD 1/3 Carotinoide	$17 \pm 3$	$182 \pm 40$	$2.2 \pm 0.3$
Fluoreszenz (Chl b)*	$9 \pm 2$	$53 \pm 17$	$0.6 \pm 0.1$

Tab. 3.1.1: Parameter der Faltung und Komplexbildung des pLHCIIb ermittelt durch zeitaufgelöste Messungen des CD Signals bei 222 nm unter Standardbedingungen und reduzierter Carotinoidkonzentration. Daten ermittelt durch Anpassung einer biexponentiellen Funktion an die Signaländerung nach Mischung von Protein und Pigmenten. (Proteinlösung: 13.6  $\mu$ M pLhcb1, Pigmentlösung: 230  $\mu$ M Chl a+b  $\rightarrow$  1.4fach Überschuss, 138  $\mu$ M/ 46  $\mu$ M Carotinoide  $\rightarrow$  3.4/ 1.13fach Überschuss). \*Die Parameter der Pigmentbindung, ermittelt durch zeitaufgelöste Messung der Chl b Fluoreszenz stammen aus der Doktorarbeit von Dirk Reinsberg (2000). Die Konzentrationen entsprechen denen der CD Standardmessung.

Tabelle 3.1.1 zeigt, dass für die Reaktionszeit  $\tau_1$  des schnelleren Schrittes unter den gleichen Bedingungen sowohl für die Ausbildung der  $\alpha$ -helikalen Struktur, als auch für die Bindung der Pigmente an das Apoprotein, ein Wert um 10 s ermittelt werden kann. Die beobachteten Prozesse finden demnach im gleichen Zeitbereich statt. Für den langsameren Schritt lässt sich für die Bindung der Pigmente eine Reaktionszeit  $\tau_2$  ermitteln, die mit 53 s knapp halb so lang ist wie die Reaktionszeit, die für die Ausbildung der Sekundärstruktur aufgelöst wird. Ein deutlicher Unterschied zeigt sich in der Gewichtung der beiden apparenten Schritte. Für die Bildung der  $\alpha$ -helikalen Strukturen findet der größere Anteil an Signaländerung im schnelleren Schritt statt,  $A_1/A_2$  ist  $>1$ , während es für die Bindung der Pigmente genau umgekehrt ist,  $A_1/A_2$  ist  $<1$ . Die Gesamtänderung des Signals bei 222 nm, d.h. die Summe der ermittelten Amplituden, die im Rahmen dieser Messbedingungen aufgezeichnet werden kann, beträgt unter Standardbedingungen 6.7 mdeg und entspricht der Änderung, die sich anhand der Gleichgewichtsspektren für ungefaltetes pLhcb1 und gefalteten Komplex berechnen lässt (vgl. Abb. 3.1.3).

Wird die Carotinoidkonzentration um 1/3 reduziert, lässt sich eine Verlangsamung der Vorgänge der Ausbildung an  $\alpha$ -Helix um einen Faktor 2 beobachten, wobei die Amplitudenverhältnisse gleich bleiben. Abb. 3.1.3 zeigt die Spektren „vor und nach“ einem kinetischen Experiment zur Faltung und Pigmentbindung des pLHCIIb mit normaler Carotinoidkonzentration, wobei der Zustand vor dem Start der Rekonstitution durch das Apoprotein alleine in 0.1 % SDS, 1 % OG und 0.04 % PG, d.h. durch das Spektrum des Kontroll-experimentes ohne Pigmente simuliert wird.

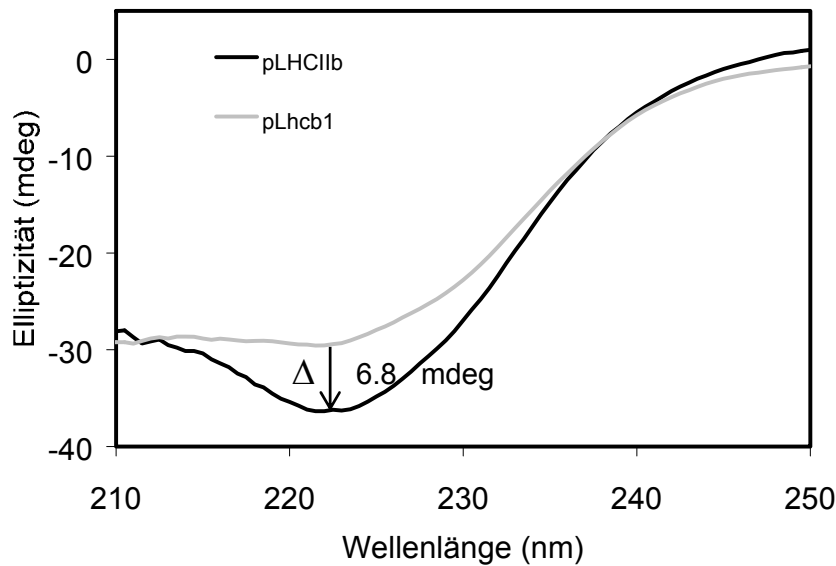


Abb. 3.1.3: UV- CD Spektren „vor und nach“ der Durchführung eines kinetischen Experimentes zur Faltung des pLHCIIb. Der Zustand vor der Rekonstitution wird durch das Spektrum des pLhcb1 in 0.1 % SDS, 1 % OG und 0.04 % PG dargestellt (graue Linie). Die schwarze Linie zeigt den Zustand am Ende des kinetischen Experimentes, wobei es sich um eine Mischung aus gefaltetem Komplex, ungefaltetem Protein und freien Pigmenten handelt. Der Pfeil markiert die Zunahme an Elliptizität bei 222 nm im Verlauf des kinetischen Experimentes. Der Unterschied an dieser Stelle zwischen dem Spektrum des freien Proteins und dem Spektrum der Mischung aus Komplex, freiem Protein und freien Chlorophyllen beträgt 6.8 mdeg. (6.8  $\mu$ M pLhcb1; 115  $\mu$ M Chl a+b  $\rightarrow$  1.4fach Überschuss, 69  $\mu$ M Carotinoide  $\rightarrow$  3.4fach Überschuss bzw. keine Pigmente)

Abb. 3.1.3 zeigt wie auch schon Abb. 3.1.1 deutlich den Unterschied der CD Spektren von ungefaltetem pLhcb1 und gefaltetem Komplex, d.h. zu Beginn und am Ende des kinetischen Experimentes zur Faltung des pLHCIIb. Die aufgenommene Signaländerung bei 222 nm von 6.7 mdeg, die die Zunahme an  $\alpha$ -helikaler Struktur während der Faltung reflektiert, lässt sich auch anhand der Spektren verfolgen. Der Unterschied bei 222 nm zwischen den beiden Spektren, gekennzeichnet durch den Pfeil in Abb. 3.1.3, beträgt 6.8 mdeg. Die Übereinstimmung der beiden Werte bedeutet, dass die gesamte Änderung des Signals im kinetischen Experiment aufgezeichnet werden konnte und dass kein Anteil in der Totzeit von 2 s verloren ging. Die Spektren der kinetischen Experimente können aufgrund der großen Hintergrundabsorption einiger Komponenten wie z.B. DTT und Saccharose nur bis 210 nm gezeigt werden, da bei darunter liegenden Wellenlängen das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu schlecht wird. Da unter den experimentellen Bedingungen keine Ausbeute an pLHCIIb von 100 % erreicht werden kann, ist das Spektrum am Ende des kinetischen Experiments eine Mischung des Spektrums von freiem Protein und gefaltetem Komplex. In bisherigen Experimenten konnten Ausbeuten um 50 % erreicht werden (Dirk Reinsberg 2000). Für dieses Experiment gibt ein theoretisches Spektrum einer 40% / 60 % Mischung von pLhcb1 und pLHCIIb den Verlauf des aufgenommenen Spektrums einigermaßen gut wieder. Für die Berechnung des theoretischen Spektrums, das in Abb. 3.1.4 dargestellt ist, wurden die in Abb. 3.1.1 gezeigten Spektren jeweils mit einem Faktor 0.4 und 0.6 multipliziert und anschließend addiert.

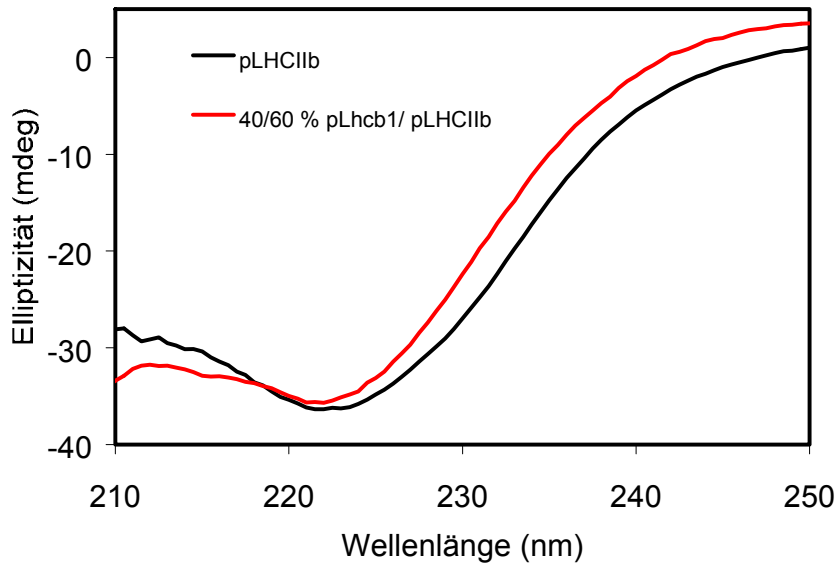


Abb. 3.1.4: UV- CD Spektrum „nach“ der Durchführung eines kinetischen Experimentes zur Faltung des pLHCIIb (schwarze Linie), wobei eine Mischung aus freiem Protein und gefaltetem Komplex vorliegt. Das theoretische Spektrum einer 40 % / 60 % Mischung von pLhcb1 und pLHCIIb (rote Linie) entspricht in etwa dem experimentellen Spektrum. Die Kalkulation des theoretischen Spektrums erfolgte durch Multiplikation der Spektren aus Abb. 3.1.1 mit einem Faktor von 0.4 bzw. 0.6 und anschließender Addition der Spektren.

### 3.1.3 Die Ausbildung der Sekundärstruktur lässt sich ebenfalls anhand der Signaländerung bei 195 nm beobachten

Im vorherigen Abschnitt wurde schon erwähnt, dass für die durchgeführten Experimente die Signal-zu-Rausch-Verhältnisse für Wellenlängen unterhalb von 210 nm schnell schlechter wurden, so dass die Signaländerung bei 222 nm als Monitor für die Ausbildung der Sekundärstruktur während der Komplexbildung verwendet wurde. Trotzdem war die Beobachtung der Veränderungen des CD Signals um 195 nm als ein weiteres Kontroll-experiment notwendig, um sicher zu gehen, dass die Signaländerung bei 222 nm die Ausbildung der  $\alpha$ -helikalen Struktur des Apoproteins widerspiegelt. Wie in Abb. 3.1.1 zu sehen, zeigt das Spektrum des aufgereinigten Komplexes neben dem negativen Maximum bei 222 nm auch ein deutliches positives Maximum bei 195 nm, wobei die Intensitäten der beiden Maxima in einem Verhältnis von 1/3 zu 2/3 stehen. Um die erwartete Signaländerung aufnehmen zu können, musste zur Reduktion der Absorption im Bereich von 200 nm von den experimentellen Standardbedingungen abgewichen werden, z.B. wurde eine Küvette mit einer Pfadlänge von 0.2 mm anstatt vorher 2 mm verwendet (vgl. 2.2.7.1 und 2.3.2). Durch die Verwendung der 0.2 mm Küvette konnte die Rapid-Mixing-Apparatur, die einen schnellen Mischvorgang ermöglicht, nicht mehr eingesetzt werden. Stattdessen wurden Protein- und Pigmentlösung auf dem Tischrührgerät in einem Reaktionsgefäß gemischt, die Lösung in die Küvette überführt und die Messung gestartet. Auf diese Weise ergab sich eine erhöhte Totzeit von  $\approx 10$  s. Abb. 3.1.4 (a) und (b) zeigt die Kinetiken bei 195 nm und 222 nm während der Faltung des pLHCIIb nach Mischen von Protein- und Pigmentlösung. Entsprechend der Veränderungen bei Zunahme an  $\alpha$ -helikaler Struktur, die anhand der Gleichgewichtsspektren

des ungefalteten Proteins und des gefalteten Komplexes in Abb. 3.1.1 nachvollzogen werden können, zeigt sich bei 195 nm eine Zunahme in positive Richtung, während das Signal bei 222 nm in negative Richtung zunimmt. Die Gesamtänderung des Signals fällt dabei aufgrund der um 1/10 geringeren Schichtdicke durch Verwendung der 0.2 mm Küvette deutlich kleiner aus als unter Standardbedingungen (vgl. Abb. 3.1.2).

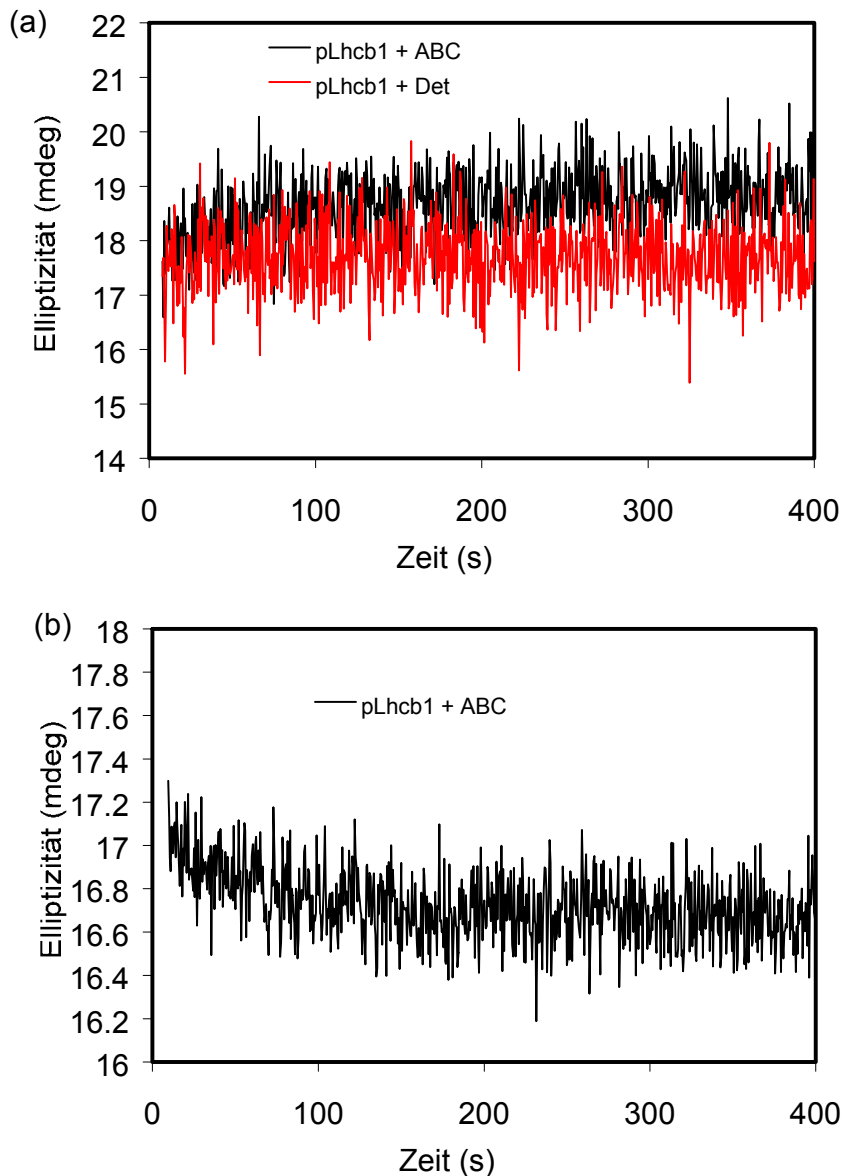


Abb. 3.1.5: Zeitaufgelöste CD Messung der Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Strukturen während der Faltung des pLHCII**b**. (a) Aufgenommen anhand der Zunahme an Elliptizität bei 195 nm (schwarze Linie). Durch Veränderung der experimentellen Bedingungen zur Reduktion der Hintergrundabsorption erfolgt der Start der Komplexbildung durch manuelles Mischen gleicher Volumina von Protein- und Pigmentlösung auf einem Tischrührgerät mit anschließendem Überführen der Lösung in die Küvette (Pfadlänge 0.2 mm) und Start der Messung. Die experimentelle Totzeit beträgt  $10 \pm 1$  s. Wird das Protein nur mit einer Detergens/Lipidlösung ohne Pigmente gemischt (rote Linie), lässt sich keine entsprechende Signaländerung beobachten. (b) Aufnahme der Zunahme an Elliptizität bei 222 nm unter den gleichen Bedingungen. (Proteinlösung:  $13.6 \mu\text{M}$  pLhcb1; Pigmentlösung:  $230 \mu\text{M}$  Chl a+b  $\rightarrow$  1.4fach Überschuss bei,  $138 \mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  3.4fach Überschuss)

Bei der Durchführung des Kontrollexperimentes, der Mischung von Proteinlösung mit Detergens/ Lipidlösung ohne Pigmente, zeigt sich keine Signaländerung, so dass auch für dieses Signal die Anwesenheit von Chlorophyll und Carotinoiden erforderlich ist.

Beide Kinetiken konnten mit der biexponentiellen Funktion mit den Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  von 11 s und 104 s angepasst werden, die anhand der Signaländerung bei 222 nm unter Standardbedingungen ermittelt wurde und auch die Summen der Amplituden  $A_1$  und  $A_2$  der Messung bei 195 nm und 222 nm standen im erwarteten Verhältnis von 2/3 zu 1/3 zueinander. So konnte davon ausgegangen werden, dass bei allen drei Experimenten der gleiche Vorgang und zwar die Ausbildung der  $\alpha$ -helikalen Struktur des LHCIIb beobachtet wurde.

### 3.1.4 Der $\alpha$ -helikale Anteil des Lhcb1 in 0.2 % SDS lässt sich nicht bestimmten Domänen im Protein zuordnen

Wie anhand des Spektrums in Abb. 3.1.1 beschrieben, besitzt das SDS denaturierte Apoprotein des LHCIIb schon einen gewissen Anteil an  $\alpha$ -helikaler Struktur, so dass die Pigmente zu Beginn des kinetischen Faltungsexperimentes nicht auf ein vollständig denaturiertes Protein treffen. Dabei war jedoch noch nicht bekannt, welcher Bereich des Proteins schon Sekundärstruktur aufweist, bzw. dadurch konnte auch die beobachtete Zunahme an  $\alpha$ -Helix keinem bestimmten Bereich zugeordnet werden. Um die Frage zu beantworten wurden verschiedene Deletionsmutanten des (p)Lhcb1, denen eine oder mehrere der 4  $\alpha$ -Helices fehlen und die alle nicht mehr fähig sind, einen funktionellen Komplex zu bilden, hinsichtlich ihres Anteils an Sekundärstruktur in 0.2 % SDS untersucht. Deutliche Unterschiede zwischen den Mutanten hätte dann die Zuordnung der schon im SDS denaturierten Protein vorhandenen  $\alpha$ -helikalen Struktur zu bestimmten Domänen des (p)Lhcb1 möglich gemacht. Abb. 3.1.6 zeigt ein Schema des pLhcb1 und der verwendeten Deletionsmutanten, die entsprechend der noch vorhandenen  $\alpha$ -Helices mit hI, hI,II, hI,III,IV und hII,III,IV benannt sind.

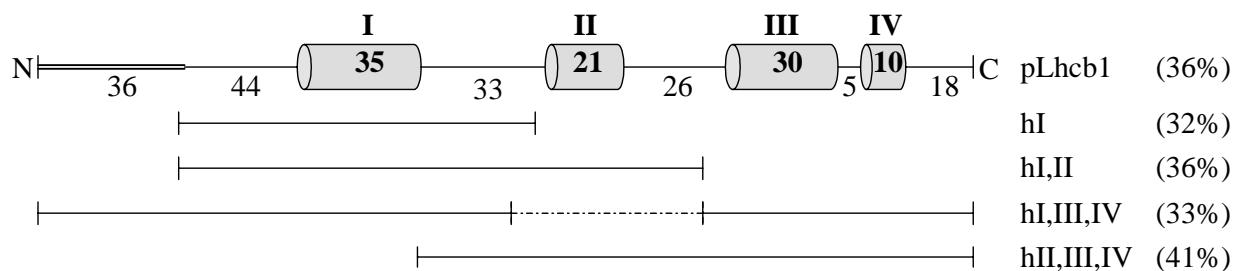


Abb. 3.1.6: Schema des pLhcb1 und von Deletionsmutanten, denen eine oder mehrere der 4 Helices fehlen. Die Zylinder I-IV stellen die transmembranen Bereiche und den Bereich der amphiphilen Helix ausgehend vom N-Terminus dar. Der Doppelstrich am linken Ende steht für die N-terminale Transitsequenz. Die Anzahl der Aminosäuren der helikalen und nicht-helikalen Bereiche stammt aus der Kristallstruktur, aufgelöst von Kühlbrandt *et al.* (1994). Die Prozentangaben geben für jedes Protein den theoretischen Anteil an  $\alpha$ -helikalen Aminosäuren im potentiell gefalteten Zustand an, wie er anhand der LHCIIb Kristallstruktur berechnet werden kann.

Die Anzahl der Aminosäuren der helikalen und nicht helikalen Bereiche stammt aus der Kristallstruktur des LHCIIb, die 1994 von Kühlbrandt *et al.* aufgelöst wurde. Der theoretische

Anteil an  $\alpha$ -helikalen Aminosäuren der jeweiligen Mutanten im potentiell komplett gefalteten Zustand (die Deletionsmutanten sind alle nicht fähig zur Komplexbildung) wurde ebenfalls anhand der Kristallstruktur des LHCIIb berechnet. Der komplett gefaltete funktionelle pLHCIIb besitzt somit theoretisch einen  $\alpha$ -helikalen Anteil von 36 % während z.B. die Deletionsmutante mit nur noch der ersten transmembranen Helix bei kompletter Faltung zu 32 %  $\alpha$ -helikale Struktur aufweisen würde. Um die tatsächlichen Anteile an  $\alpha$ -helikaler Struktur zu ermitteln wurden CD Spektren der Deletionsmutanten und des Volllängenproteins in 0.2 % SDS von 190 nm bis 250 nm aufgenommen (Abb. 3.1.7). Auf den ersten Blick zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Spektren. Für die genauere Untersuchung, d.h. eine Evaluation der Anteile an Sekundärstruktur mussten die Spektren auf das mittlere Gewicht einer Aminosäure normiert werden, was den Vergleich von Spektren verschiedener Proteinlösungen mit unterschiedlicher Konzentration erlaubt. Die resultierende Einheit nennt sich „Mean Residue Ellipticity“ (MRE).

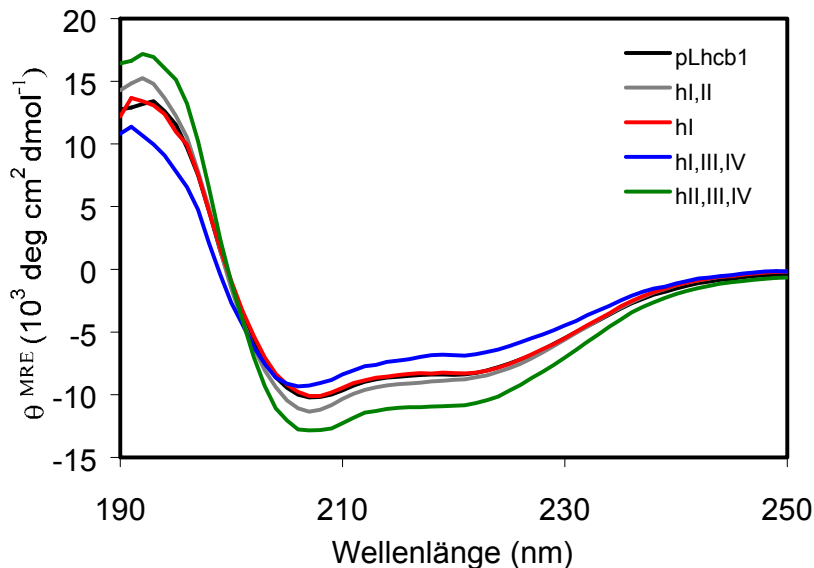


Abb. 3.1.7: CD Spektren des pLhcb1 und der Deletionsmutanten, denen eine oder mehrere der 4  $\alpha$ -Helices fehlen, in 0.2 % SDS. Die Benennung der Mutanten erfolgt entsprechend der noch vorhandenen Helices mit der Nummerierung ausgehend vom N-Terminus. Siehe dazu auch Abb. 3.1.6. Die Einheit MRE steht für „Mean Residue Ellipticity“, d.h. die Spektren sind auf den Durchschnitt des Gewichts einer Aminosäure normiert, so Spektren von Proteinlösungen mit unterschiedlicher Konzentration verglichen werden können. (pLhcb1: 2.8  $\mu\text{M}$ , hl,II: 5.0  $\mu\text{M}$ , hl: 5.9  $\mu\text{M}$ , hl,III,IV: 2.4  $\mu\text{M}$ , hlII,III,IV: 3.3  $\mu\text{M}$ )

Die Berechnung der Anteile an Sekundärstruktur erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Dicroprot (V2.5 von Gilbert Deleage, <http://dicroprot-pbil.ibcp.fr/>), das für die Evaluationsprozedur CD Spektren von Proteinen mit bekannten Anteilen an Sekundärstruktur zugrunde legt (vgl. 2.3.3). Die ermittelten Werte sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Protein	$\alpha$ - Helix (%)	$\beta$ - Faltblatt (%)	$\beta$ - Turn + Zufallsknäuel (%)	$\Sigma$	theoretisch $\alpha$ - Helix (%)
rekombinanter pLHCI <b>II</b> b	41	7	53	101	36
nativer LHCI <b>II</b> b	42	8	50	100	41
pLhcb1 in 0.2 % SDS	27	18	56	101	36
hI in 0.2 % SDS	27	17	54	98	32
hI,II in 0.2 % SDS	28	16	54	98	36
hI,III,IV in 0.2 % SDS	20	24	52	96	33
hII,III,IV in 0.2 % SDS	32	13	57	102	41

Tabelle 3.1.2: Prozentuale Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturen, ermittelt anhand der CD Spektren des aufgereinigten rekombinanten oder nativen (p)LHCI**II**b und SDS denaturierten (p)Lhcb1 Deletionsmutanten. Die CD Spektren gezeigt in Abb. 3.1.1 und 3.1.7 wurden mit Hilfe des Computerprogramms Dicroprot hinsichtlich der Anteile an Sekundärstrukturen analysiert. Der theoretische Wert für den Anteil an  $\alpha$ -Helix ergibt sich aus der Kristallstruktur des LHCI**II**b, aufgelöst von Kühlbrandt *et al.* (1994).

Zum Vergleich wurden auch die Spektren von aufgereinigtem rekombinantem (Abb. 3.1.1) und nativem (p)LHCI**II**b einer Analyse der Anteile an Sekundärstruktur unterzogen. Die ermittelten Werte sind ebenfalls in Tab. 3.1.2 dargestellt. Mit 41 % bzw. 42 %  $\alpha$ -helikalem Anteil kommen sie den Werten von 36 % bzw. 41 %, die sich anhand der Kristallstruktur nach Kühlbrandt berechnen lassen, sehr nahe. Das Apoprotein besitzt in 0.2 % SDS etwa  $\frac{3}{4}$  des helikalen Anteils, den es im gefalteten und pigmentierten Zustand haben wird. Auch die verschiedenen Deletionsmutanten zeigen  $\alpha$ -helikale Struktur, der Anteil entspricht wie beim Vollängenprotein rund  $\frac{3}{4}$  des im Fall der Mutanten jedoch theoretischen Wertes für den gefalteten und pigmentierten Zustand. Bei einer tatsächlichen Beschränkung des Anteils an  $\alpha$ -helikaler Sekundärstruktur, bereits vorhanden im SDS denaturierten pLhcb1, auf bestimmte Bereiche des Proteins, wären Unterschieden für die Werte der verschiedenen Deletionsmutanten zu erwarten gewesen. Die Ergebnisse zeigen dies nicht, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sich die  $\alpha$ -helikale Struktur auf mehrere Domänen des Proteins verteilt, wahrscheinlich solche, die im nativen LHCI**II**b helikal sind. Darüber, in wie weit Anteile der Struktur des  $\beta$ -Faltblattes (Tab. 3.1.2) tatsächlich im SDS denaturierten pLhcb1 sowie auch im funktionellen Komplex vorhanden sind, oder ob es sich hier um ein theoretisches Problem der Computergestützten Analyse handelt, kann im Rahmen dieser Arbeit keine Aussage gemacht werden. Anhand der Kristallstruktur konnten keine Bereich mit  $\beta$ -Faltblatt identifiziert werden.

### **3.2 Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb ausgehend von vollständig ungefaltetem Apoprotein**

Wie in Abschnitt 3.1 gezeigt wurde, besitzt der Lhcb1 im SDS denaturierten Zustand schon in etwa  $\frac{3}{4}$  des Anteils der  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur des gefalteten und pigmentierten Komplexes LHCIIb. Zu Beginn der kinetischen Experimente zur *in vitro* Faltung und Pigmentbindung des Komplexes treffen die Pigmente somit nicht auf ein vollständig ungefaltetes Protein, so dass angenommen werden könnte, dass der vorhandene  $\alpha$ -helikale Anteil gerade eine Voraussetzung für die erfolgreiche Komplexbildung ist, indem z.B. Pigmentbindungsstellen erst durch die  $\alpha$ -helikale Struktur zugänglich werden. Um diese Frage zu klären, wurden kinetische Experimente ausgehend von Guanidinium Hydrochlorid (GuHCl) und SDS denaturiertem Lhcb1 durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Die Lösung des Lhcb1 in 6 M GuHCl führte zu einer vollständigen Denaturierung des Proteins, es ließ sich schon im Vorfeld kein Anteil an Sekundärstruktur mehr beobachten (Yang *et al.* 2003). Als Monitor für die Vorgänge während der Komplexbildung wurden die Veränderungen in den Chlorophyll-Fluoreszenzen gewählt, die durch die Etablierung des Energietransfers zwischen Chl b und Chl a während der Pigmentbindung zustande kommen (vgl. 3).

#### **3.2.1 Die Komplexbildung ausgehend von SDS- oder GuHCl denaturiertem Lhcb1 resultiert in ähnlichen Fluoreszenz-Kinetiken**

Für die Durchführung der kinetischen Experimente, ausgehend von GuHCl denaturiertem Lhcb1 mussten die Bedingungen von denen der Standardrekonstitution etwas abgewandelt werden. So wurden die Protein- und Pigmentlösungen in einem Verhältnis von 1:10 und nicht mehr 1:1 miteinander gemischt; der Start der Komplexbildung wurde nicht mehr mit Hilfe der Rapid-Mixing-Apparatur durchgeführt, sondern musste manuell erfolgen. Dementsprechend erhöhte sich die experimentelle Totzeit auf  $10 \pm 1$  s. Auch mussten deutlich höhere Reaktantenkonzentrationen (3.6fach) gewählt werden, damit eine ausreichende Signaländerung zu beobachten war (vgl. 2.2.7.2). Die kinetischen Experimente, ausgehend von SDS-denaturiertem Lhcb1 wurden weiterhin mit einer 1:1 Mischung gestartet, die Konzentration von Protein, Pigment und Detergens waren jedoch so gewählt, dass ihre Endkonzentrationen mit denen der GuHCl Experimente übereinstimmten. Die Benennung der in den folgenden Graphen dargestellten Kinetiken erfolgt nach einem einheitlichen Muster. Die Signaländerungen in den Fluoreszenzemissionen sind je nach Ursprung mit Chl a oder Chl b benannt. Sind die Kinetiken während eines Kontrollexperimentes ohne Protein aufgenommen worden, ist dies weiterhin mit FP für „freies Pigment“ gekennzeichnet. Abb. 3.2.1a/b zeigt die Änderung der Chlorophyllfluoreszenzen während des kinetischen Experimentes zur Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb, ausgehend von GuHCl- und SDS denaturiertem Protein. Anhand der Abnahme der Chl b Fluoreszenz bei gleichzeitiger Zunahme der Chl a-Fluoreszenz aufgrund der Ausbildung des Energietransfers zeigt sich, dass auch bei vollständiger Denaturierung des Proteins die Bildung eines funktionellen Komplexes möglich ist (Abb. 3.2.1a) und somit die Anwesenheit eines Teils der  $\alpha$ -helikalen Struktur somit keine

Voraussetzung zu sein scheint. Auf den ersten Blick unterscheiden sich die Kinetiken auch nicht von denen, die für die Komplexbildung, ausgehend von SDS denaturiertem Lhcb1 beobachtet wurden (Abb. 3.2.1b).

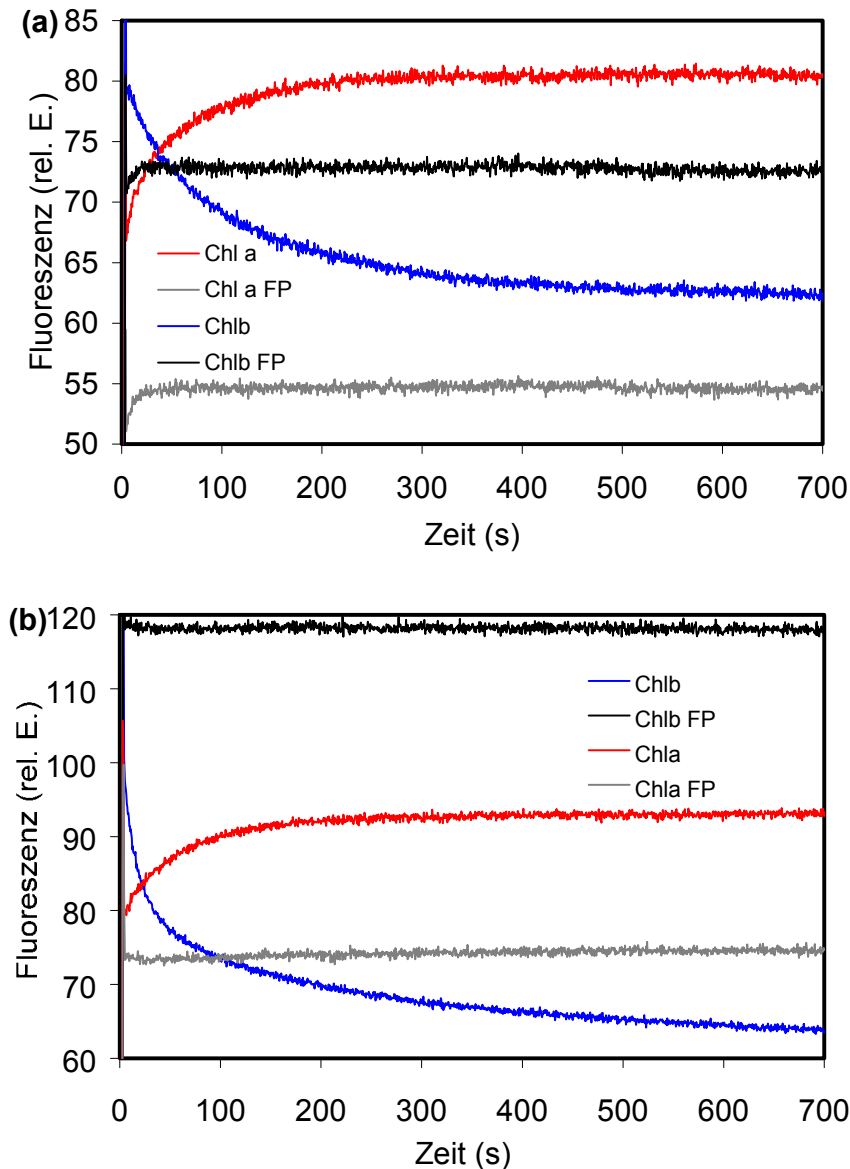


Abb. 3.2.1: Zeitaufgelöste Messung der Chl-Fluoreszenz nach Anregung von Chl b (bei 470 nm) während der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb ausgehend von GuHCl- oder SDS-denaturiertem Lhcb1. Aufgrund der Etablierung des Energietransfers von Chl b auf Chl a nimmt nach Anregung bei 470 nm die Chl b Emission bei 660 nm (blaue Linie) im Verlauf der Komplexbildung ab, während die Chl a Emission bei 680 nm (rote Linie) zunimmt. (a) GuHCl: Manuelles Mischen von Protein und Pigmentlösung erfolgte im Verhältnis von 1:10. Werden nur die Pigmente (FP, freies Pigment) mit der 6 M GuHCl Lösung gemischt, lässt sich für Chl a und für Chl b ein Anstieg der Fluoreszenzen beobachten (schwarze und graue Linie). (Proteinlösung: 157  $\mu\text{M}$  Lhcb1 in 6M GuHCl; Pigmentlösung: 171  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss bei Annahme von 3 Molekülen/ LHCIIb, 244  $\mu\text{M}$  Chl  $\rightarrow$  1.3fach Überschuss bei Annahme von 12 Molekülen/ LHCIIb). (b) SDS: Manuelles Mischen von Protein und Pigmentlösung im Verhältnis von 1:1. In Abwesenheit des Proteins zeigt sich keine Änderung der Chlorophyllfluoreszenzen (schwarze und graue Linie). (Proteinlösung: 28  $\mu\text{M}$  Lhcb1 in 0.2 % SDS und 1fach Reko-Puffer; Pigmentlösung: 336  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss, 437  $\mu\text{M}$  Chl  $\rightarrow$  1.3fach Überschuss)

Für das Kontrollexperiment, bei dem die Chlorophyllfluoreszenzen in Abwesenheit des Proteins beobachtet wurden, zeigt sich ein Anstieg beider Chlorophyllsignale nach der Mischung mit 6 M GuHCl (Abb. 3.2.1a), der nach der Mischung der Pigmente mit der SDS-Lösung jedoch nicht auftritt (Abb. 3.2.1b). Als Grund für diese Signaländerungen erscheint eine Zunahme der Fluoreszenzquantenausbeute der Chlorophylle, hervorgerufen durch Umgebungsänderungen während des Mischvorgangs, als möglich. Dass diese Änderungen relativ langsam ablaufen, könnte durch die erhöhte Viskosität der GuHCl Lösung bedingt sein. Ein weiterer Grund für den Anstieg der Chlorophyllfluoreszenzen könnte auch die Auflösung von bestehenden Pigmentaggregaten sein. Dagegen spricht jedoch die zeitliche Begrenzung der Signaländerung, zu erwarten wäre ein stetiger und linearer Anstieg des Signals. Bei dem kinetischen Experiment, ausgehend von SDS-denaturiertem Lhcb1 zeigt sich das Chl b-Fluoreszenzsignal beeinflusst von einer linearen Drift (Abb. 3.2.1b), deren Ursprung in diesem Fall wahrscheinlich die Aggregation von freien Pigmenten im Verlauf der Messung ist. Aufgrund des deutlichen Anstiegs der Chlorophyllfluoreszenz in Abwesenheit des Proteins erschien eine Korrektur der Kinetiken des GuHCl-Experimentes als notwendig. Dazu wurden von den Kinetiken der Messung mit Protein und Pigmenten die Kinetiken der Messung ohne Protein abgezogen. Da bei einer entsprechenden Kontrolle des SDS-Experimentes für die Chlorophylle alleine kein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet wurde, konnten die Kinetiken unkorrigiert verwendet werden. Abb. 3.2.2 zeigt noch einmal die Kinetiken der beiden Experimente im Vergleich.

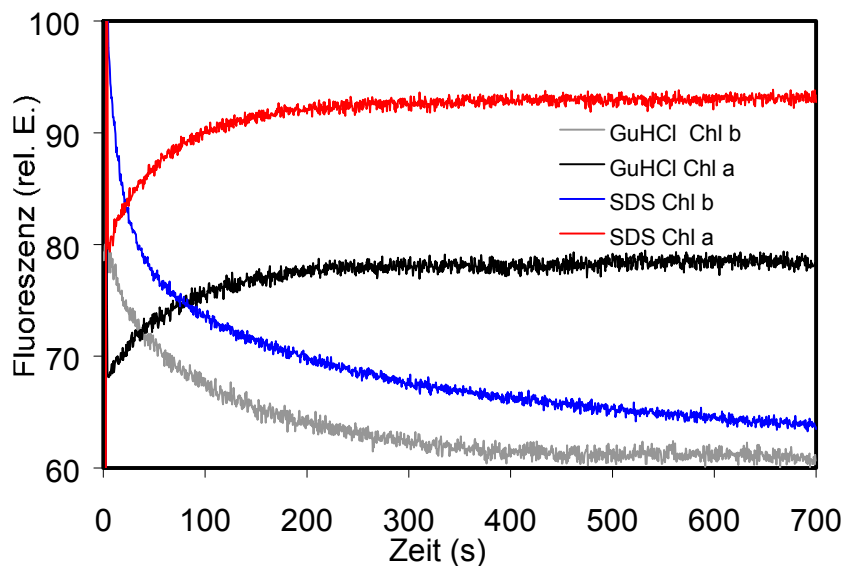


Abb. 3.2.2: Zeitaufgelöste Messung der Chl-Fluoreszenz nach Anregung von Chl b (bei 470 nm) während der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb. Denaturierung des Lhcb1 mittels GuHCl bzw. SDS. Die Kinetiken der Komplexbildung, ausgehend von GuHCl-denaturiertem Lhcb1 wurden durch Subtraktion der Kinetiken des Kontrollexperimentes ohne Protein korrigiert (Chl a-, bzw. Chl b-Emission, schwarze bzw. graue Linie). Die Kinetiken der Komplexbildung, ausgehend von SDS denaturiertem Lhcb1 werden unkorrigiert gezeigt (Chl a-, bzw. Chl b-Emission, rote und blaue Linie).

Auch nach der Korrektur lassen sich abgesehen von der linearen Drift, keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Methoden feststellen. Eine genauere Analyse erfolgte durch Anpassung einer biexponentiellen Funktion an die jeweiligen Signaländerungen, die, entsprechend der schon in den vorherigen Ergebnisteilen beschriebenen Vorgehensweise, dadurch in zwei apparente Schritte unterteilt werden konnte. Auf diese Weise wurde die

Komplexbildung, ausgehend von den unterschiedlichen Denaturierungszuständen des Proteins, durch die Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  mit den dazugehörigen Amplituden  $A_1$  und  $A_2$  charakterisiert und so beide Methoden direkt vergleichbar gemacht. Die ermittelten Werte für die Halbwertszeiten und Amplituden sind in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 3.2.1).

Gelöst in	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)	$A_1 / A_2$
GuHCl	21 ± 4 (24 ± 8)	135 ± 17 (105 ± 25)	0.4 ± 0.1 (0.4 ± 0.2)
SDS	17 ± 2 (29 ± 6)	241 ± 19 (123 ± 56)	1.7 ± 0.2 (0.7 ± 0.3)

Tab. 3.2.1: Parameter der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb ermittelt durch zeitaufgelöste Messungen der Chlorophyllfluoreszenzen während kinetischer Experimente, ausgehend von GuHCl- oder SDS- denaturiertem Lhcb1. Daten ermittelt durch Anpassung einer biexponentiellen Funktion an die Signaländerung von Chl b (Chl a in Klammern) nach Mischung von Protein- und Pigmentlösung. Die Kinetiken des GuHCl-Experimentes wurden zuvor durch Subtraktion der Kinetiken des Kontrollexperimentes ohne Protein korrigiert. Diese zeigten einen Anstieg der Chlorophyllfluoreszenzen. (GuHCl-Proteinlösung: 157  $\mu$ M Lhcb1 in 6M GuHCl; Pigmentlösung: 171  $\mu$ M Carotinoide, 244  $\mu$ M Chl) (SDS-Proteinlösung: 28  $\mu$ M Lhcb1 in 0.2 % SDS und 1fach Reko-Puffer; Pigmentlösung: 336  $\mu$ M Carotinoide, 437  $\mu$ M Chl)

Wird die Bildung des LHCIIb durch die Mischung der Pigmente mit vollständig denaturiertem Lhcb1 induziert, lassen sich anhand der Fluoreszenzänderung von Chl b und Chl a (in Klammern gesetzt) für die Pigmentbindung die zwei apparenten Schritte mit den Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  um 20 s und 2 min auflösen. Dabei findet der größere Anteil der Signaländerung im langsameren Schritt statt,  $A_1/A_2$  ist  $<1$ . Ein Vergleich mit den Werten des SDS-Experimentes zeigt, dass das Vorhandensein von  $\alpha$ -helikalen Strukturen keine Veränderung der Geschwindigkeit der Pigmentbindung bewirkt. Die Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  liegen zum größten Teil in gleichen Zeitbereichen wie die des GuHCl-Experimentes. Eine Ausnahme macht  $\tau_2$ , ermittelt anhand der Chl b-Fluoreszenz, das mit einem Wert von 4 min doppelt so lang ist wie wenn die Chl a-Fluoreszenz betrachtet wird, bzw. wenn das Protein in GuHCl gelöst wird. Diese Abweichung könnte durch den Einfluss der linearen Drift entstehen, die für die Chl b-Signaländerung des SDS-Experimentes beobachtet werden kann (Abb. 3.2.1b). Die Ergebnisse zeigen, dass die Kinetiken der Bildung des LHCIIb unabhängig davon sind, ob das Protein zu Beginn schon einen Anteil an  $\alpha$ -helikaler Struktur besitzt oder nicht.

### 3.2.2 Die Ausbildung der Sekundärstruktur ausgehend von vollständig ungefaltetem Lhcb1 lässt sich nicht anhand der Änderung des CD Signals bei 222 nm beobachten

Unter Standardbedingungen ließ sich die Ausbildung der  $\alpha$ -helikalen Struktur während der Bildung des LHCIIb, ausgehend von SDS denaturiertem Protein, anhand der Änderung des CD Signals bei 222 nm beobachten (vgl. 3.1). Dabei konnte gezeigt werden, dass sich der im Vergleich zum gefalteten Komplex noch fehlende Anteil an Sekundärstruktur (in etwa  $\frac{1}{4}$ ) in einem Zeitrahmen ausbildet, in dem auch schon Pigmente gebunden werden. Eine interessante Frage war nun, ob sich auch die Ausbildung der Sekundärstruktur im gesamten, d.h. ausgehend vom vollständig ungefalteten Protein beobachten lässt und wenn ja, welche

Zeitbereiche sich auflösen lassen. Um dies näher zu untersuchen wurden die kinetischen Experimente mit SDS- bzw. GuHCl-denaturiertem Lhcb1 im CD Spektropolarimeter durchgeführt. Da GuHCl im UV Bereich sehr stark absorbiert und auch die Konzentration der anderen Komponenten relativ hoch war, wurde zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses eine Küvette mit einer Pfadlänge von 0.2 mm gewählt. In Abb. 3.2.2a/b sind die Signaländerungen bei 222 nm gezeigt, die sich nach der Mischung des GuHCl denaturierten bzw. SDS denaturierten Proteins mit den Pigmenten beobachten lassen.

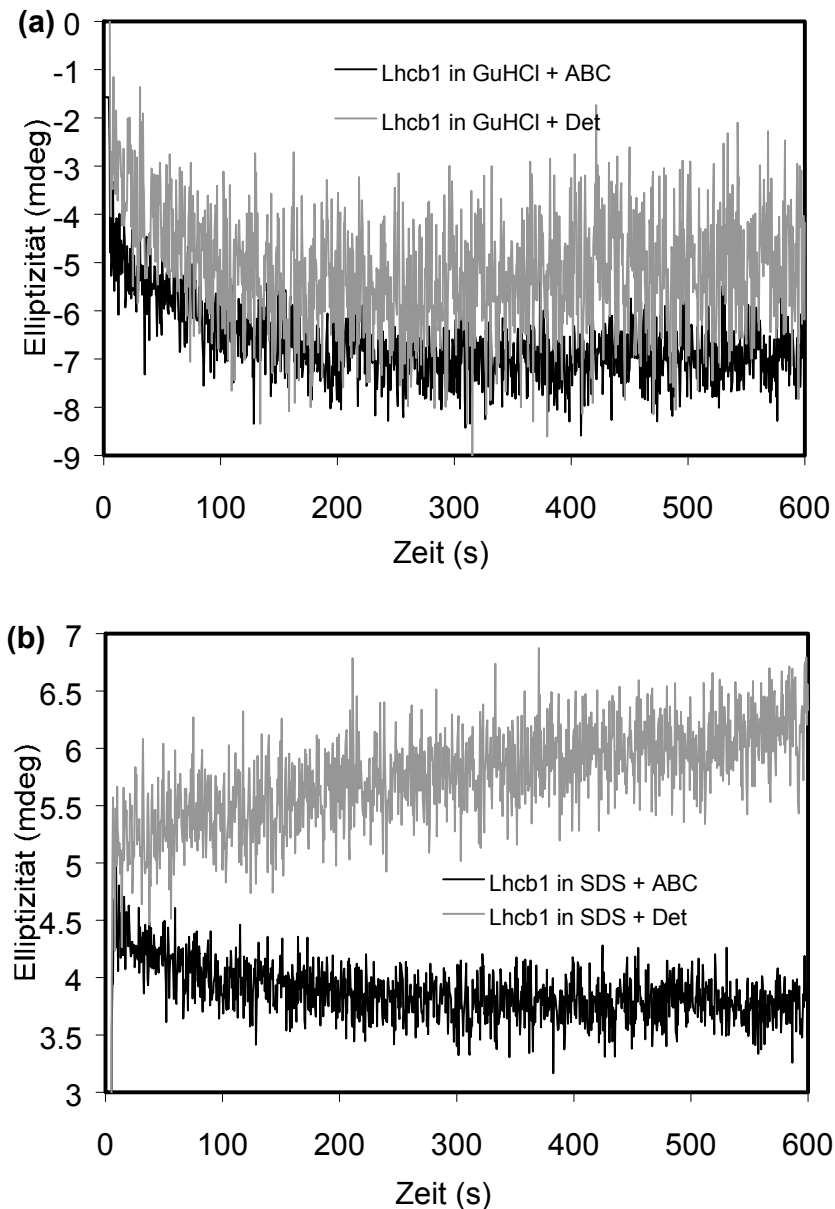


Abb. 3.2.3: Zeitaufgelöste CD Messung der Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Struktur während der Faltung des LHCIIb, ausgehend von SDS- bzw. GuHCl-denaturiertem Lhcb1, aufgenommen anhand der Zunahme an Elliptizität bei 222 nm. (a) GuHCl: Sowohl mit (schwarze Linie), als auch ohne Pigmente (graue Linie) lässt sich eine Zunahme des Signals bei 222 nm beobachten. (b) SDS: Eine Zunahme des Signals lässt sich nur in Anwesenheit von Pigmenten beobachten (schwarze Linie). Sie reflektiert die Bildung der  $\alpha$ -helikalen Struktur während Faltung des LHCIIb. (GuHCl-Proteinlösung: 157  $\mu$ M Lhcb1 in 6M GuHCl; Pigmentlösung: 171  $\mu$ M Carotinoide, 244  $\mu$ M Chl) (SDS-Proteinlösung: 28  $\mu$ M Lhcb1 in 0.2 % SDS und 1fach Reko-Puffer; Pigmentlösung: 336  $\mu$ M Carotinoide, 437  $\mu$ M Chl)

In beiden Fällen zeigt sich eine Zunahme des negativen Signals bei 222 nm, die allerdings auch bei einem GuHCl-Kontrollexperiment ohne Pigmente zu sehen ist. Für das SDS-Kontrollexperiment zeigt sich dagegen eine Zunahme des Signals in positiver Richtung. Es kann demnach nicht davon ausgegangen werden, dass die im Fall des GuHCl-denaturierten Proteins beobachtete Signaländerung die Ausbildung an  $\alpha$ -helikaler Struktur während der Komplexbildung reflektiert. Die durchgeführten Versuche eigneten sich somit nicht zur Beantwortung der Frage, in welchem Zeitbereich die Ausbildung der gesamten Sekundärstruktur des LHCIIb stattfindet.

### **3.3 Erste Schritte der Pigmentbindung im Verlauf der Assemblierung des LHCIIb**

#### **3.3.1 Ein proteingebundener Fluoreszenzfarbstoff kann als Monitor der Pigmentbindung dienen**

Im ersten Abschnitt des Ergebnisteils wurde dargestellt, wie sich die Bindung der Pigmente anhand der Änderungen der Chlorophyllfluoreszenzen aufgrund der Etablierung des Energietransfers zwischen Chl b und Chl a beobachten lässt. Damit der Energietransfer zwischen den Chlorophyllen als Monitor für die Komplexbildung dienen kann, ist die Anwesenheit von mindestens einem Chl b und einem Chl a Molekül die Voraussetzung. Die bisherigen Messungen ermöglichten demnach nur einen beschränkten Blick auf die Vorgängen während der Komplexbildung. Um diesen Ausschnitt zu erweitern, sollte ein Fluoreszenzfarbstoff als Energie-Donor in das System gebracht werden, der auf beide Chlorophyllspezies gleich gut überträgt, so dass theoretisch die Möglichkeit bestehen sollte, auch die Bindung von nur einem Molekül anhand Veränderungen in der Donor-Fluoreszenz beobachten zu können. Als künstlicher Energie-Donor wurde in dieser Arbeit der Fluoreszenzfarbstoff Bodipy 507/545 IA verwendet (BP, Struktur vgl. 2.2.6), dessen Absorptions- und Emissionsmaxima bei 508 nm bzw. 543 nm liegen. Anhand des Überlappungsintegrals der Donorfluoreszenz mit der Extinktionskoeffizientenkurve des Akzeptors, konnte ein  $R_0$  von 77 Å für den Energietransfer zwischen dem Farbstoff und den Chlorophyllen bestimmt werden.  $R_0$  ist der Abstand von Donor und Akzeptor, bei dem halbmaximaler Energietransfer stattfindet. Die Berechnung von  $R_0$  erfolgte nach Latt *et al.* (1965). Für die Versuchsdurchführung wurde der Farbstoff über eine kovalente Verknüpfung der SH- Gruppe eines Cysteins mit der Acetamido- Gruppe des Farbstoffes an den Lhcb1 gebunden (vgl. 2.2.6) und das farbstoffmarkierte Protein (im folgenden Lhcb1BP) für eine standardmäßige Rekonstitution eingesetzt (vgl. 2.2.7.1). Der Farbstoff eignet sich als guter Energie-Donor für die Chlorophylle, was anhand der Spektren Abb. 3.3.1 zu sehen ist.

Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Intensität der Farbstofffluoreszenz zwischen freiem Lhcb1BP und dem markierten Komplex LHCIIbBP. Nach Anregung des Farbstoffes bei 508 nm ist für das freie markierte Protein hauptsächlich Emission bei 543 nm zu beobachten, dem Maximum des Farbstoffes. Im markierten Komplex wird jedoch die absorbierte Energie auf die Chlorophylle übertragen und somit die Farbstofffluoreszenz gelöscht. Das Spektrum zeigt hauptsächlich das Emissionsmaximum von Chl a bei 680 nm. In Anwesenheit der Pigmente, d.h. direkt zu Beginn eines kinetischen Experimentes, hier simuliert durch die Mischung von freiem Farbstoff (BP) mit freien Pigmenten (FP), ist die Fluoreszenz des Farbstoffes durch Reabsorptionsvorgänge durch die anwesenden Pigmente (Inner Filter Effekt) schon zu einem gewissen Grad gelöscht. Die vollständige Löschung erfolgt aber erst durch Bindung der Pigmente an das Protein. Bezogen auf das Spektrum des freien Farbstoffes und der freien Pigmente werden im markierten Komplex etwa 65 % der Ausgangsfluoreszenz gelöscht. Wie durch die Pfeile in Abb. 3.3.1 angedeutet wird, kann durch ausschließliche Detektion der Fluoreszenzemission bei 543 nm die Signaländerung des Farbstoffes im Verlauf der Komplexbildung verfolgt werden.

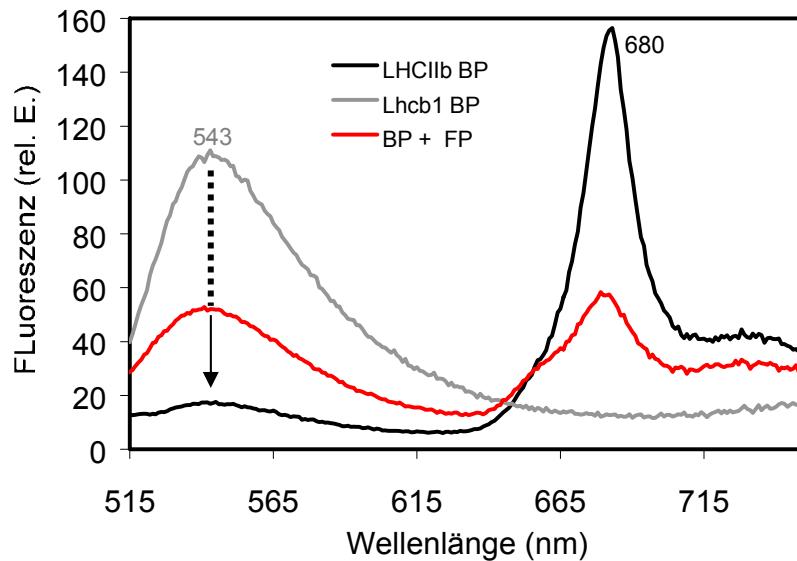


Abb. 3.3.1: Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung des farbstoff-markierten Lhcb1 (N-Terminus) bei 508 nm zu Beginn und nach Abschluss eines kinetischen Experimentes zur Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb. In Abwesenheit von Pigmenten zeigt das Spektrum deutlich das Emissionsmaximum des Farbstoffes (BP, graue Linie) bei 543 nm. Im funktionellen LHCIIb ist die Fluoreszenzemission des Farbstoffes aufgrund von Energieübertragungsvorgängen zwischen Farbstoff und gebundenen Chl gelöscht (um etwa 65 % der Ausgangsfluoreszenz bezogen auf das Spektrum von freiem BP und freien Pigmenten). In diesem Fall zeigt das Spektrum das Emissionsmaximum von Chl a (schwarze Linie). Das rote Spektrum zeigt die Fluoreszenzverhältnisse von freiem Farbstoff und freien Pigmenten (FP) entsprechend den im Experiment eingesetzten Konzentrationen und simuliert so die Verhältnisse direkt zu Beginn eines kinetischen Experimentes. Die Farbstofffluoreszenz ist durch Reabsorptionsvorgänge durch die Anwesenheit der Chl schon im Vergleich zum freien markierten Protein reduziert (gestrichelte Linie). (3.9  $\mu\text{M}$  Lhcb1 BP bzw. nur BP; 47  $\mu\text{M}$  Carotinoide, 142  $\mu\text{M}$  Chl bzw. keine Pigmente)

Wurde das markierte Protein für ein kinetisches Experiment eingesetzt, konnte die Abnahme der Farbstofffluoreszenz nach der Mischung gleicher Volumina von Protein und Pigmentlösung beobachtet werden (Abb. 3.3.2). Für die Benennung der Signaländerungen gilt für die folgenden Abbildungen das gleiche Muster. Lhcb1BP bzw.  $\Delta\text{Lhcb1}$  (im Text  $\Delta\text{Lhcb1}$ ) steht für das farbstoffmarkierte Apoprotein bzw. die C-terminale Deletionsmutante. Die einzelnen Pigmente, enthalten in der Detergens/ Lipidlösung werden mit Großbuchstaben abgekürzt: A für Chl a, dA für Chlorophyllid a (ohne Phytolschwanz), B für Chl b, C für Carotinoide, Det steht für die Detergens/ Lipidlösung ohne Pigmente. Außerdem gilt für die folgenden Abbildungen, dass die Kinetiken auf den gleichen Startpunkt normiert sind.

Der Verlauf der Farbstofffluoreszenz, wie er in Abb. 3.3.2 gezeigt ist, gleicht im ersten Eindruck der der Chl b-Fluoreszenz (Abb. 3.2). Auch hier ermöglicht die Anpassung einer biexponentiellen Funktion die Unterteilung des Gesamtvorganges in zwei apparente Schritte, charakterisiert durch  $\tau_1$  und  $\tau_2$  mit  $A_1$  und  $A_2$ . Für beide Methoden lassen sich Werte für  $\tau_1$  und  $\tau_2$  um 25 s bzw. 200 s ermitteln. Dabei ist die Änderung des Farbstoffsignals nur in Anwesenheit des Proteins zu beobachten, das Mischen von Farbstoff alleine mit Pigmenten bewirkt keine Signaländerung.

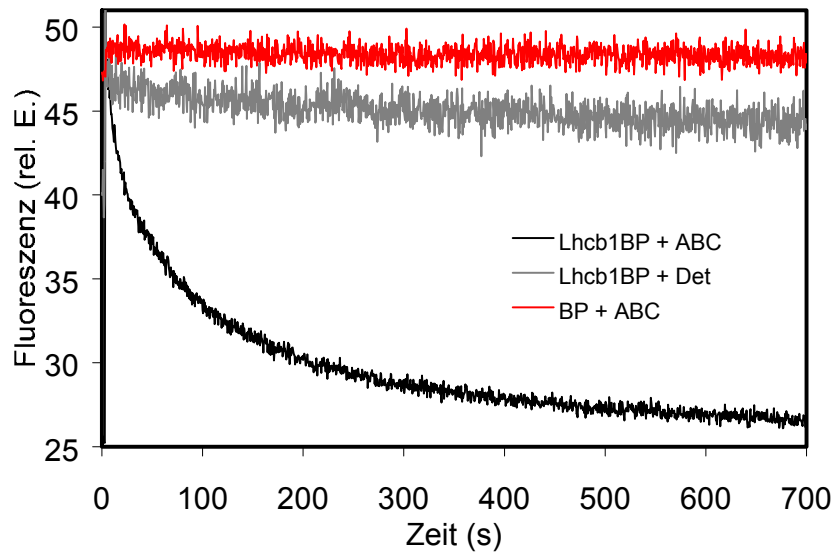


Abb. 3.3.2: Zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz des an Lhcb1 gebundenen Farbstoffs (N-Terminus) bei 543 nm während der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb. Start der Rekonstitution erfolgt durch Mischen gleicher Volumina von Protein- und Pigmentlösung in einer Rapid-Mixing-Apparatur. Aufgrund des Energietransfers zwischen dem an das Protein gebundenen Farbstoff und den Chlorophyllen nimmt nach Anregung bei 508 nm die Emission des Farbstoffes bei 543 nm (schwarze Linie) im Verlauf der Komplexbildung ab. Dies ist nicht der Fall unter Bedingungen ohne Protein (rote Linie), während in Abwesenheit von Pigmenten (graue Linie) nur eine kleine Abnahme in der Emission des proteingebundenen Farbstoffes festzustellen ist. Normierung der Kinetiken auf den gleichen Wert bei 4 s. (Proteinlösung: 7.8  $\mu$ M Lhcb1 BP; Pigmentlösung: 94  $\mu$ M Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss, 284  $\mu$ M Chl  $\rightarrow$  3fach Überschuss)

Wird nur das markierte Protein mit der Detergens/Lipidlösung ohne Pigmente gemischt, zeigt sich ein kleiner Rückgang der Farbstofffluoreszenz, dessen Ursprung nicht experimentell geklärt wurde, für den aber Wechselwirkungen des Farbstoffes mit seiner Umgebung, der Detergens/Lipidmizelle oder dem Protein selbst, verantwortlich sein könnten. Ein weiterer leicht linearer Abfall der Farbstofffluoreszenz kann auch durch Aggregation des freien Proteins bedingt sein. Dass die lineare Drift nicht durch eine Zerstörung des Farbstoffes entsteht zeigt das schon erwähnte Experiment, bei dem Pigmente und Farbstoff alleine gemischt wurden und über das beobachtete Zeitintervall keine Signaländerung zu beobachten war. Anhand der Kinetik in Abb. 3.3.2 lässt sich eine Gesamtänderung der Farbstofffluoreszenz während der Komplexbildung von etwa 47 % der Ausgangsfluoreszenz berechnen, was unter dem Wert von 65 % liegt, der anhand des Unterschieds zwischen den Spektren von freiem Farbstoff mit freien Pigmenten und markiertem Komplex liegt (Abb. 3.3.1). Ein Teil der Signaländerung war demnach der experimentellen Totzeit von  $\approx 2$  s (vgl. 2.2.7.1) zum Opfer gefallen. Der fehlende Anteil konnte durch Verwendung eines Fluoreszenzspektrometers mit integrierter Stopped-Flow Einheit mit einer Totzeit von  $\approx 1.4$  ms aufgelöst werden. Die kinetischen Experimente mit der verbesserten Totzeit und Aufnahme von deutlich mehr Datenpunkten pro Zeiteinheit (alle 1.0 ms, vorher nur alle 0.5 s) wurden im Labor von Paula J. Booth an der Universität von Bristol durchgeführt. In Abb. 3.3.3 sind die Signaländerungen des Farbstoffes im Verlauf der ersten Sekunde nach der Mischung von Protein und Pigmentlösung gezeigt.

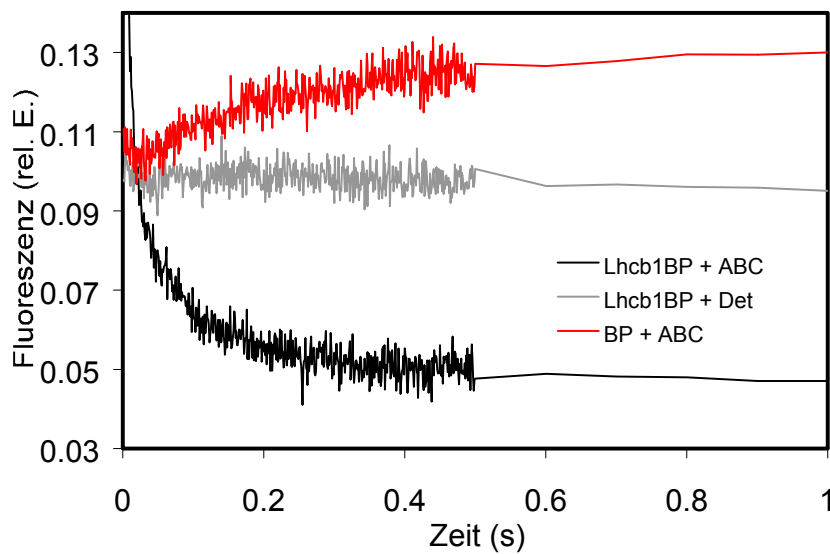


Abb. 3.3.3: Zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz des an den Lhcb1 gebundenen Farbstoffs (N-Terminus) bei 543 nm während der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb. Die Mischung von Protein und Pigmentlösung erfolgte in einer Stopped-Flow Apparatur mit einer Totzeit von  $\approx 1.4$  ms. Schon innerhalb des sehr kurzen Zeitintervalls von 0.5 s nach Mischung von markiertem Protein mit den Pigmenten kann eine Löschung der Farbstofffluoreszenz beobachtet werden (schwarze Linie). In Abwesenheit des Proteins zeigt sich ein leichter Anstieg des Signals (rote Linie), während in Abwesenheit der Pigmente keine Signaländerung innerhalb der ersten Sekunde stattfindet. Normierung der Kinetiken auf den gleichen Wert bei 1.8 ms. Innerhalb der ersten 0.5 s erfolgte die Datenaufnahme alle 0.001 s, danach nur noch alle 0.1 s. (Proteinlösung:  $7.8 \mu\text{M}$  Lhcb1 BP; Pigmentlösung:  $94 \mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss,  $284 \mu\text{M}$  Chl  $\rightarrow$  3fach Überschuss)

Abb. 3.3.3 zeigt, dass bei der Mischung von markiertem Protein mit den Pigmenten schon innerhalb des sehr kurzen Zeitintervalls von 0.5 s eine Löschung der Farbstofffluoreszenz eintritt. In Abwesenheit der Pigmente kann keine Änderung beobachtet werden, während bei der Mischung von freiem Farbstoff mit freien Pigmenten das Signal sogar noch etwas ansteigt. Für die Abnahme der Farbstofffluoreszenz kann ein apparenter Schritt mit einer Reaktionszeit von 10 ms aufgelöst werden. Die Amplitude des beobachteten Schrittes ist in etwa halb so groß wie die Änderung des Signals, die bei der Messung über ein Zeitintervall von 700 s aufgezeichnet wird (Abb. 3.3.2). Insgesamt geht daher bei diesen Messungen in etwa 1/3 der gesamten Änderung des Signals in der Totzeit von  $\approx 2$  s verloren. So lässt sich die Diskrepanz zwischen den beiden Werten für die Gesamtänderung des Signals, zum einen berechnet anhand der Gleichgewichtsspektren (Abb. 3.3.1), zum anderen berechnet anhand der Kinetiken der Messung über das Intervall von 700 s (Abb. 3.3.2), erklären.

Um ausschließen zu können, dass für die beobachtete Löschung der Farbstofffluoreszenz über ein Zeitintervall größer als 50 s unspezifische Wechselwirkungen verantwortlich sind, wurden kinetische Experimente mit einer Mutante des Lhcb1 durchgeführt, die eine C-terminale Deletion von 49 Aminosäuren bis einschließlich Glycin an Position 184 besitzt ( $\Delta\text{Lhcb1}/\text{dLhcb1}$ ) und die zur Pigmentbindung und Komplexbildung nicht mehr fähig ist. Die noch vorhandenen Proteinbereiche sollten genug Raum für unspezifische Wechselwirkungen bieten. Die Kinetiken sind in Abb. 3.3.4 dargestellt.

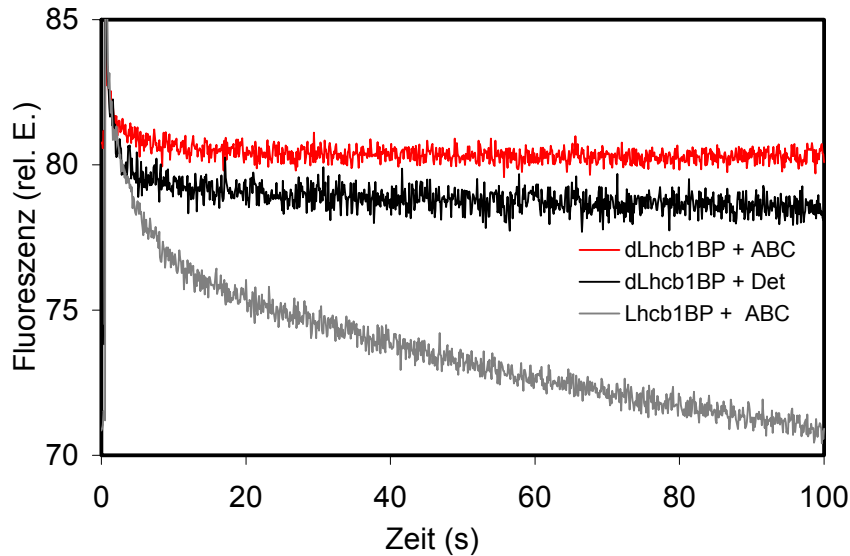


Abb. 3.3.4: Zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz des Farbstoffes bei 543 nm, gebunden an das N-terminale Ende des Lhcb1 bzw. einer C-terminalen Deletionsmutante  $\Delta$ Lhcb1 (dLhcb1). Während für das Volllängenprotein (graue Linie) nach Mischen mit Chl und Carotinoiden eine Signaländerung zu beobachten ist (Etablierung des Energietransfers zwischen Farbstoff und Chl im Verlauf der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb), zeigt die Deletionsmutante keine Änderung in der Fluoreszenzemission (rote Linie). In Abwesenheit von Pigmenten zeigt sich eine entsprechende geringe Signaländerung wie auch für ein markiertes Volllängenprotein. (Proteinlösung: 7.8  $\mu$ M Lhcb1 BP; Pigmentlösung: 94  $\mu$ M Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss bei Annahme von 3 Molekülen/ LHCIIb, 284  $\mu$ M Chl  $\rightarrow$  3fach Überschuss bei Annahme von 12 Molekülen/ LHCIIb)

Während für das Volllängenprotein nach der Mischung von markiertem Protein mit der Pigmentlösung die deutliche Abnahme der Farbstofffluoreszenz zu beobachten ist, zeigt die Deletionsmutante unabhängig von der Anwesenheit der Pigmente nur zu Beginn eine geringe Abnahme der Fluoreszenz. Diese Änderung kann auch für das Volllängenprotein in Abwesenheit der Pigmente beobachtet werden (Abb. 3.3.2). Der Grund für die Signaländerung des Farbstoffes sind demnach spezifische Wechselwirkungen zwischen den Pigmenten und dem Protein. D.h. die Abnahme der Fluoreszenz reflektiert, wie auch die Änderung der Chlorophyllfluoreszenzen (Abb. 3.2), die Bindung der Pigmente an das Protein. Die Fluoreszenz des Farbstoffes dient somit als Monitor für die Vorgänge der Komplexbildung. Leider kann keine Aussage gemacht werden, ob für den apparenten Schritt mit der Reaktionszeit von 10 ms auch schon spezifische Wechselwirkungen verantwortlich sind, da eine kinetische Messung mit einer Totzeit von 1.4 ms mit der Deletionsmutante nicht durchgeführt wurde.

### 3.3.2 Wird der Farbstoff an verschiedenen Stellen im Protein gebunden, können leicht unterschiedlichen Signaländerungen während der Pigmentbindung beobachtet werden

Die Bindung des Farbstoffes an das Protein erfolgte über eine kovalente Verknüpfung der SH-Gruppe eines Cysteins mit der Acetamido-Gruppe des Farbstoffes. In dieser Arbeit wurden insgesamt vier Mutanten des Lhcb1 verwendet, die ein singuläres Cystein an verschiedenen Stellen im Protein besitzen: an den beiden Termini, der stromalen und der luminalen Schleife.

Das folgende Schema zeigt, wo sich die verschiedenen Markierungsorte innerhalb des gefalteten Komplexes befinden.

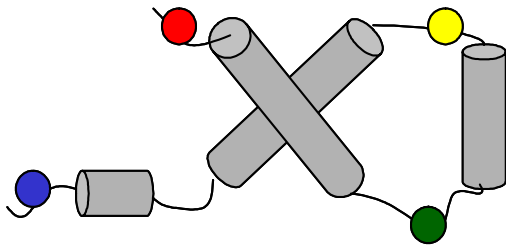


Abb. 3.3.5: Schema des LHCIIb mit einer farbigen Kennzeichnung der Orte, an denen sich in den jeweiligen Mutanten des Lhcb1 singuläre Cysteine befinden, an die der Farbstoff kovalent gebunden werden kann. Durch die Zylinder werden die helikalen Bereiche des funktionellen Komplexes dargestellt, durch Striche die sie verbindenden Schleifenregionen. Rot: nahe N-Terminus; gelb: stromale Schleife; grün: luminale Schleife; blau: nahe C-Terminus.

Durch die Markierung an unterschiedlichen Stellen im Protein sollte die Möglichkeit getestet werden, ob während der Komplexbildung gezielt einzelne Domänen im Protein beobachtet werden können, ob der Farbstoff also als lokaler Monitor der Pigmentbindung einzusetzen ist.

Abb 3.3.6 zeigt die Signaländerung des Farbstoffes nach Mischen gleicher Volumina von Pigment- und Proteinlösung bei Bindung an die vier verschiedenen Stellen im Protein.

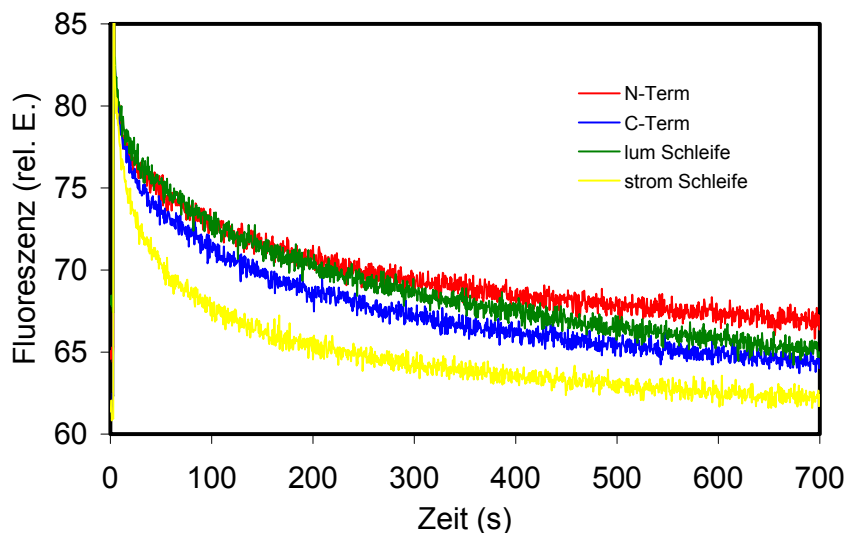


Abb. 3.3.6: Zeitaufgelöste Messung der Farbstofffluoreszenz bei 543 nm während der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb je nach Ort der Bindung an das Protein. Bei Bindung des Farbstoffes in der stromalen Schleife lässt sich die größte Signaländerung beobachten. (Proteinlösung: 7.8  $\mu\text{M}$  Lhcb1BP; Pigmentlösung: 94  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss bei Annahme von 3 Molekülen/ LHCIIb, 284  $\mu\text{M}$  Chl  $\rightarrow$  3fach Überschuss bei Annahme von 12 Molekülen/ LHCIIb)

Für die Markierungsorte in der luminalen Schleife und nahe der beiden Termini lassen sich ähnliche Kinetiken beobachten, während sich die Kinetik bei Bindung in der stromalen Schleife auf den ersten Blick dadurch von den anderen unterscheidet, dass eine größere Gesamtsignaländerung aufgenommen wird. Die Anpassung einer biexponentiellen Funktion an

die Signaländerungen liefert die Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  mit den dazugehörigen Amplituden  $A_1$  und  $A_2$  und ermöglicht einen genaueren Vergleich zwischen den vier Markierungsorten. Die Werte sind in Tabelle 3.3.1 dargestellt.

Markierungsort	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)	$A_1 / A_2$
N-terminal	$15 \pm 1$	$243 \pm 24$	$0.8 \pm 0.1$
C-terminal	$15 \pm 2$	$272 \pm 23$	$0.6 \pm 0.2$
stromale Schleife	$22 \pm 3$	$229 \pm 14$	$1.2 \pm 0.2$
luminale Schleife	$16 \pm 5$	$275 \pm 32$	$0.6 \pm 0.1$

Tab. 3.3.1: Parameter der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb ermittelt durch zeitaufgelöste Messungen der Farbstofffluoreszenz bei unterschiedlichen Bindungsorten des Farbstoffes an den Lhcb1. Daten ermittelt durch Anpassung einer biexponentiellen Funktion an die Signaländerung nach Mischung von farbstoffmarkiertem Protein und Pigmenten. (Proteinlösung: 7.8  $\mu\text{M}$  Lhcb1BP; Pigmentlösung: 94  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss, 284  $\mu\text{M}$  Chl  $\rightarrow$  3fach Überschuss)

Die Parameter der Faltung und Pigmentbindung bei Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes als Monitor zeigen für die Bindungsorte nahe der beiden Termini und in der luminalen Schleife nur vernachlässigbare Unterschiede. Die Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  liegen für den Bindungsort an der stromalen Schleife im gleichen Rahmen wie die der drei anderen. Unabhängig vom Markierungsort lässt sich somit mit dem Farbstoff als Monitor die Komplexbildung in zwei apparente Schritte unterteilen, mit Reaktionszeiten  $\tau_1$  um 20 s und  $\tau_2$  um 4 min. Die Verteilung der gesamten Signaländerung auf die beiden Amplituden ist jedoch unterschiedlich. Ist der Farbstoff in der stromalen Schleife gebunden, erfolgt der größere Anteil der Signaländerung in dem schnelleren Schritt, erkennbar durch einen Amplitudenquotient  $A_1/A_2 > 1$ . Bei den anderen drei Bindungsorten überwiegt der Anteil des langsameren Schrittes, der Wert des Quotienten ist  $< 1$ . Möglicherweise sind die Kinetiken durch eine lineare Drift überlagert, die besonders bei Bindung an die beiden Termini und die luminale Schleife aufgrund der geringeren Signaländerung einen Einfluss hat. Durch eine Überschätzung der zweiten Amplitude während des Anpassungsvorgangs würden sich dann die beobachteten Verhältnisse ergeben. Als Grund für die lineare Drift kommen Aggregationsprozesse der Chlorophylle in Frage, wobei sich gebildete Aggregate im Verlauf des kinetischen Experimentes auflösen, so stetig für eine Verstärkung der Reabsorptionsvorgänge (Inner Filter Effekt) sorgen und auf diese Weise indirekt eine weitere Löschung der Farbstofffluoreszenz bewirken. Ein Grund für eine direkte Löschung der Farbstofffluoreszenz wäre außerdem die Aggregation des freien Proteins.

Die Ursache für die unterschiedliche Beeinflussbarkeit des Farbstoffes in Abhängigkeit des Markierungsortes ist jedoch zurzeit noch unbekannt.

Abgesehen von der größeren Signaländerung, die für die Bindung des Farbstoffes in der stromalen Schleife aufgenommen werden kann, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Markierungsorten. So kann davon ausgegangen werden, dass sich mit dem gewählten Farbstoff die Pigmentbindung nicht gezielt innerhalb kleinerer Bereiche des Proteins gesondert betrachten lässt. Dass keine Unterschiede festgestellt

werden konnten, kann dann positiv so interpretiert werden, dass der Farbstoff keinen störenden Einfluss auf die Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb hat. Die im Vergleich große Signaländerung und geringere Beeinflussbarkeit der Kinetik durch eine lineare Drift bei Bindung des Farbstoffes in der stromalen Schleife wurde als besonders günstig für die kinetischen Messungen gewertet, so dass ein großer Teil der im Folgenden beschriebenen Experimente mit dieser Mutante durchgeführt wurden.

### 3.3.3 Die Kinetiken der Chl b-Fluoreszenzen und der des proteingebundenen Farbstoffes, aufgenommen im Verlauf der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb, unterscheiden sich

Da von dem Einsatz des Farbstoffes als Monitor erwartet wurde, dass im Gegensatz zur Verwendung der Chlorophyllfluoreszenzen als Monitor ein erweiterter Ausschnitt der Komplexbildung zu beobachten ist, wurden die Kinetiken der beiden Methoden bei verschiedenen stöchiometrischen Chlorophyll Überschüssen miteinander verglichen. Auf den ersten Blick scheinen sich die Kinetiken der Chl b- und der Farbstofffluoreszenzen nach Mischen von Protein- und Pigmentlösung nicht zu unterscheiden (vgl. Abb. 3.2 und 3.3.2). Nach Auswertung durch Anpassung einer biexponentiellen Funktion bestätigt sich dies auch noch für relative hohe stöchiometrische Überschüsse, d.h. wenn mehr als 24 Chlorophyll Moleküle pro Molekül Lhcb1 anwesend sind. Die Veränderung der Chlorophyllkonzentration bei gleich bleibender Carotinoidkonzentration ergab jedoch eine unterschiedliche Entwicklung der Kinetiken je nachdem, ob die Chl b-Fluoreszenz oder die Farbstofffluoreszenz als Monitor gewählt wurde. In Abb. 3.3.7 sind die Werte der Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  und des Amplitudenquotienten  $A_1/A_2$  in Abhängigkeit des Chlorophyll zu Lhcb1 Verhältnisses aufgetragen. Die Werte der beiden verschiedenen Fluoreszenz Monitore für die Vorgänge der Faltung und Pigmentbindung befinden sich zum Vergleich innerhalb eines Graphen. Für die Darstellung des Chlorophyll zu Lhcb1 Verhältnisses geht man davon aus, dass einem 1.0 fachen stöchiometrischen Überschuss die Anwesenheit von 12 Chlorophyll Molekülen pro Lhcb1 Molekül entspricht.

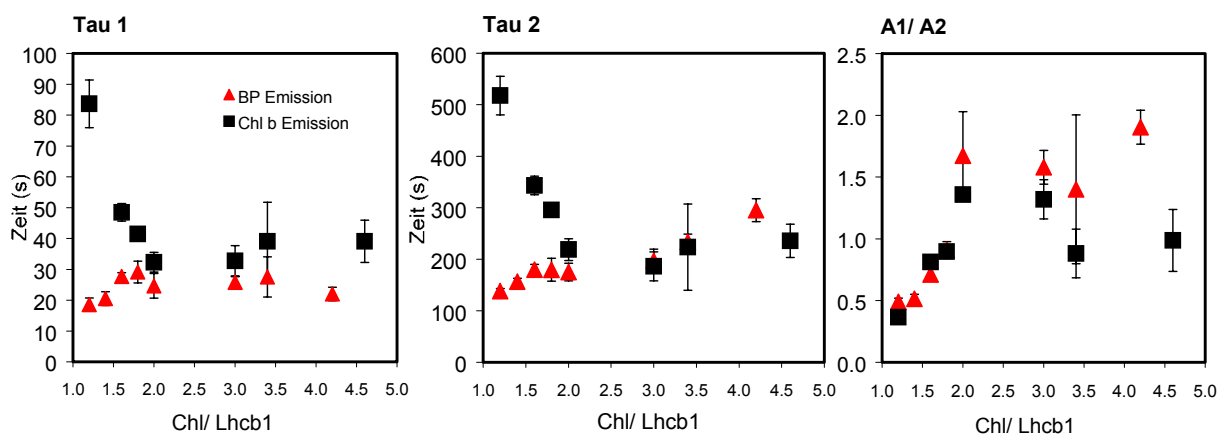


Abb. 3.3.7: Parameter der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb in Abhängigkeit unterschiedlicher Chlorophyll Konzentrationen, ermittelt durch zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenz von Chl b (■), bzw. des Farbstoffes bei Bindung in der stromalen Schleife (▲). Daten ermittelt durch Anpassung einer biexponentiellen Funktion an die jeweiligen Signaländerungen. (Proteinlösung: 7.8  $\mu$ M Lhcb1(BP); Pigmentlösung: 94  $\mu$ M Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss, 113  $\mu$ M bis 434  $\mu$ M Chl  $\rightarrow$  1.2 bis 4.6fach Überschuss, bei Annahme von 12 Chlorophyll Molekülen/ LHCIIb Molekül)

Die Unterschiede in den Geschwindigkeiten, d.h. den ermittelten Reaktionszeiten, je nachdem, ob die Chl b-Fluoreszenz oder die Farbstofffluoreszenz als Monitor für die Vorgänge während der Faltung und Pigmentbindung verwendet wird, werden bei der Bindung des Farbstoffes in der stromalen Schleife besonders deutlich (Abb. 3.3.7).

Für den Prozess der Faltung und Pigmentbindung, beobachtet anhand der Etablierung des Energietransfers zwischen Chl b und Chl a, lässt sich für die zwei aufgelösten apparenten Schritte eine deutliche Verkürzung der beiden Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , d.h. eine Beschleunigung der Prozesse mit zunehmender Chlorophyllkonzentration beobachten (schwarze Quadrate). Bis zu einem 3fachen stöchiometrischen Überschuss von Chlorophyll zu Protein werden  $\tau_1$  und  $\tau_2$  jeweils um einen Faktor 2.5 verkürzt, von 84 s auf 33 s, bzw. von 520 s auf 190 s. Bei einer weiteren Zunahme der Chlorophyllkonzentration verändern sie sich nicht weiter. Bei Verwendung der Fluoreszenz des in der stromalen Schleife gebundenen Farbstoffes als Monitor für die Prozesse der Faltung und Pigmentbindung, zeigt sich eine entgegengesetzte Entwicklung. Für die Reaktionszeiten der beiden apparenten Schritte ergibt sich eine Verlängerung von  $\tau_1$  und  $\tau_2$  um einen Faktor 1.3, von 19 s auf 25 s bzw. von 140 s auf 180 s. Insgesamt werden bis zu einem 2 fachen Chlorophyllüberschuss deutlich kürzere Vorgänge beobachtet, wenn die Farbstofffluoreszenz als Monitor verwendet wird. Ab einem 2 fachen Überschuss liegen die Werte der Reaktionszeiten, ermittelt anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzmessungen, in ähnliche Bereichen zwischen 20 s und 30 s für  $\tau_1$  und zwischen 3 min und 4 min für  $\tau_2$ . Unter Bedingungen mit erhöhter Chlorophyllkonzentration scheinen demnach beide Monitore die gleichen Vorgänge zu beobachten. Der Amplitudenquotient  $A_1/A_2$  verändert sich für die Verwendung der beiden unterschiedlichen Monitore auf die gleiche Weise, bei Erhöhung des Chlorophyllüberschusses steigt er von Werten  $< 1$  auf Werte  $> 1$ . D.h. für niedrige Chlorophyllüberschüsse liegt der Hauptteil der gesamten Signaländerung im langsameren Schritt,  $A_1 < A_2$ , während bei Anstieg der Chlorophyllkonzentration die Amplitude des schnelleren Schrittes zunimmt und schließlich überwiegt,  $A_1 > A_2$ .

Abb. 3.3.8 zeigt, dass sich bei Bindung des Farbstoffes an die beiden Termini, bzw. die luminalen Schleife besonders für den langsameren Schritt etwas andere Tendenzen beobachten lassen. Anders als bei der Bindung des Farbstoffes in der stromalen Schleife lässt sich bei den anderen drei Bindungsstellen keine Verkürzung der Reaktionszeit  $\tau_2$  beobachten, sowohl bei einem 1.2 fachen als auch bei einem 3.0 fachen Chlorophyll Überschuss liegen die Werte für  $\tau_2$  im Bereich um 250 s. Bei einer Bindung des Farbstoffes nahe der beiden Termini kann sogar eher eine leichte Verlängerung der Reaktionszeiten bei Verringerung des Chlorophyll Überschusses beobachtet werden. Ein weiterer Unterschied bei Bindung des Farbstoffes nahe der beiden Termini und in der luminalen Schleife ist, dass bei einem 3.0 fachen Chlorophyll Überschuss die Reaktionszeiten, ermittelt anhand der Farbstoff- bzw. der Chl b Fluoreszenz als Monitor, nicht auf ähnlichen Werten angelangt sind, wie das bei Bindung an der stromalen Schleife der Fall ist, sondern dass sich für die Chl b Fluoreszenz als Monitor eine etwas kürzere Reaktionszeit  $\tau_2$  ergibt. Es scheinen demnach auch unter Bedingungen mit erhöhter Chlorophyll Konzentration die beiden Monitore nicht die gleichen Vorgänge zu beobachten. Das Amplitudenverhältnis  $A_1/A_2$  zeigt, dass bei niedrigen Chlorophyllüberschüssen bei der Bindung des Farbstoffes nahe der beiden Termini und in der luminalen Schleife ebenfalls ein größerer Anteil der Signaländerung für den langsameren Schritt detektiert wird,  $A_1 < A_2$ .

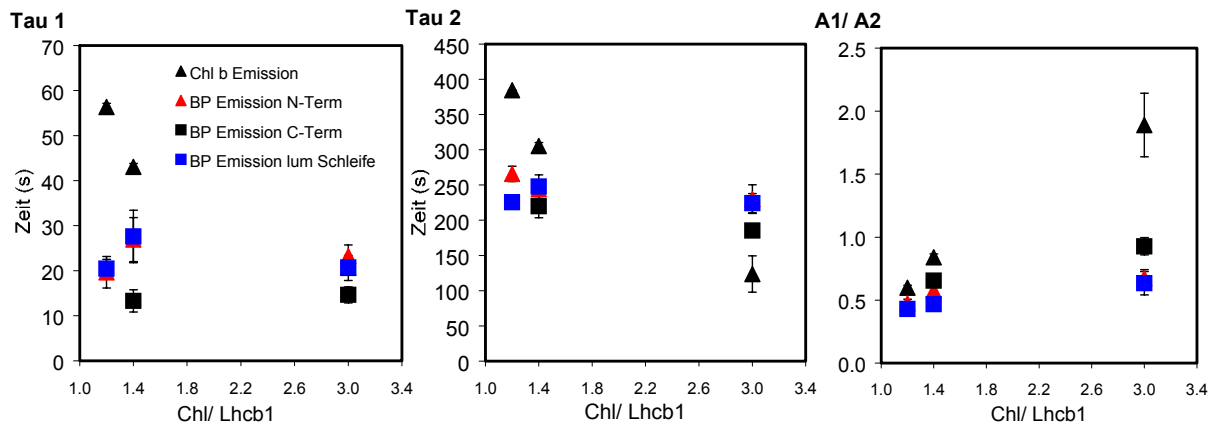


Abb. 3.3.8: Parameter der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb in Abhängigkeit unterschiedlicher Chl-Konzentrationen, ermittelt durch zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenz von Chl b (▲), bzw. des Farbstoffes bei Bindung an der luminalen Schleife (■), bzw. den beiden Termini (▲ N-Terminus; ■ C-Terminus). Daten ermittelt durch Anpassung einer biexponentiellen Funktion an die Signaländerung von Chl b, bzw. des proteingebundenen Farbstoffes. (Proteinlösung: 7.8  $\mu\text{M}$  Lhcb1(BP); Pigmentlösung: 94  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss, 113  $\mu\text{M}$  bis 284  $\mu\text{M}$  Chl  $\rightarrow$  1.2 bis 3.0fach Überschuss bei Annahme von 12 Chlorophyll Molekülen/ LHCIIb Molekül)

Bei einem Anstieg der Chlorophyllkonzentration nimmt die Amplitude des schnelleren Schrittes zu, der Quotient wird größer, jedoch überwiegt auch bei einem 3fachen Überschuss immer die Amplitude des langsameren apparenten Schrittes,  $A_1/A_2 < 1$ . Als Grund für die Unterschiede zwischen den Werten des langsameren Schrittes bei Bindung des Farbstoffes an die verschiedenen Stellen im Protein kommt zunächst auch wieder ein unterschiedlich starker Einfluss einer linearen Drift, bedingt durch Auflösung von Pigmentaggregaten oder Bildung von Proteinaggregaten in Frage. Dabei würde ein stärkerer Einfluss auf das Farbstoffsignal bei Bindung nahe der beiden Termini und in der luminalen Schleife wie schon beschrieben zu einer Überschätzung der zweiten Amplitude führen und gleichzeitig eine Verlängerung der dazugehörigen Reaktionszeit bewirken. Was ebenfalls zumindest am Rande beachtet werden sollte ist, dass zwischen den einzelnen Proteinlösungen kleine Schwankungen in der Konzentration an farbstoffmarkiertem Protein nicht ausgeschlossen werden können, so dass nicht von exakt dem gleichen Pigmentüberschuss ausgegangen werden kann. Neben den beschriebenen Umgebungseffekten kann natürlich auch die Störung der Faltung und Pigmentbindung durch den Farbstoff ein Grund für die längeren Reaktionszeiten  $\tau_2$ , ermittelt für die Kinetik bei Bindung nahe der beiden Termini und in der luminalen Schleife sein. Allerdings sind die beschriebenen Unterschiede eher gering, so dass diese Möglichkeit im Weiteren als nicht relevant betrachtet wurde.

### 3.3.4 Der Farbstoff als Monitor detektiert die Bindung von Pigmenten unter Bedingungen, unter denen noch kein Energietransfer zwischen Chl b und Chl a beobachtet werden kann.

Die Durchführung von kinetischen Experimenten zur Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb anhand der Chlorophyllfluoreszenzen erfordert die Anwesenheit von Chl a und Chl b, damit überhaupt eine Signaländerung aufgenommen werden kann. Diese Limitierung besteht nicht, wenn der proteingebundenen Farbstoff als Monitor verwendet wird, da für beide Chlorophyllspezies ähnliche Werte für  $R_0$  (Abstand von Donor und Akzeptor, bei dem die Energie mit 50%

Effizienz übertragen wird) ermittelt werden und so die Anwesenheit von nur Chl a oder nur Chl b bei einer potentiellen Bindung an das Protein für eine Löschung der Farbstofffluoreszenz sorgen kann. Die Unterschiede der Kinetiken bei niedrigen Chlorophyllüberschüssen für die Farbstofffluoreszenz bzw. die Chl b-Fluoreszenz (siehe oben) zeigen schon, dass frühe Bindungsschritte detektiert werden können, die noch keinen Energietransfer zwischen den Chlorophyllen erlauben. Welche Pigmente in dieser frühen Phase schon an das Protein binden, d.h. ob z.B. durch die ausschließliche Bindung einer Chlorophyll Spezies noch gar kein Energietransfer möglich ist, sollte durch kinetische Experimente mit verschiedenen Pigmentvariationen untersucht werden. Abb. 3.3.9 zeigt die Veränderung der Farbstofffluoreszenz nach Mischen des in der stromalen Schleife markierten Proteins mit unvollständigen Pigmentsätzen.

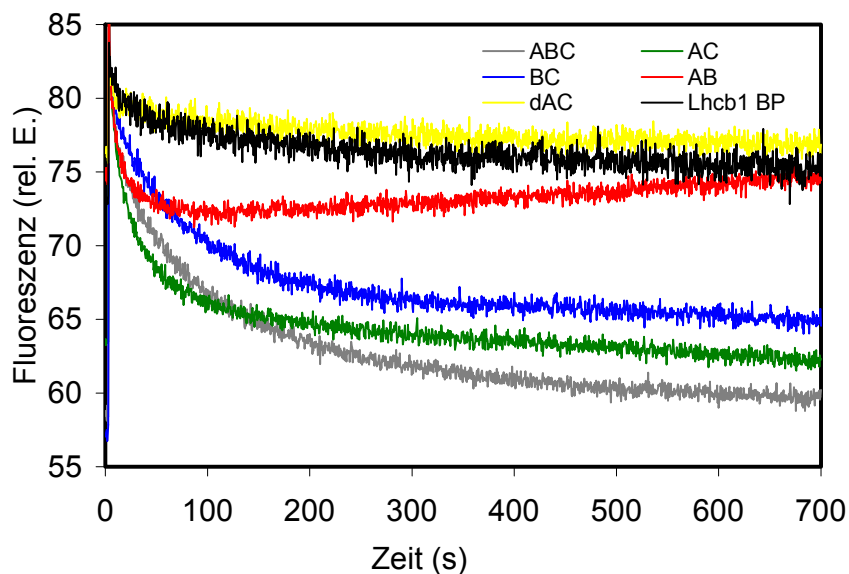


Abb. 3.3.9: Zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz des Lhcb1 gebundenen Farbstoffes (stromale Schleife) bei 543 nm nach Mischen des Proteins mit unvollständigen Pigmentsätzen. Vollständiger Satz mit Chl a+b und Carotinoiden (ABC), nur Chl a und Carotinoide (AC), nur Chl b und Carotinoide (BC), nur Chl a und b (AB), Chlorophyllid a (Chlid a) und Carotinoide (dAC). (Proteinlösung; 7.8  $\mu$ M Lhcb1 BP; Pigmentlösung: 94  $\mu$ M Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss, 142  $\mu$ M Chl a+b oder nur Chl(ide) a oder nur Chl b  $\rightarrow$  1.5fach Überschuss)

Deutlich wird, dass schon unter Bedingungen, die nicht zur Bildung eines funktionellen Komplexes führen, eine Abnahme der Farbstofffluoreszenz und somit eine Bindung von Pigmenten an das Protein beobachtet werden kann. Die Anwesenheit der Carotinoide scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen. Zugabe von Chl a + b alleine zum Protein bewirkt nur eine vorübergehende Löschung der Farbstofffluoreszenz, die Pigmente werden nur transient gebunden. Bei Zugabe von Chl a oder Chl b alleine mit Carotinoiden wird ebenfalls eine Löschung der Fluoreszenz beobachtet, die jedoch über die Zeit nicht wieder zunimmt, d.h. es handelt sich um eine unter den herrschenden Bedingungen stabile Pigment- Protein Interaktion. Ein Komplex, der mit biochemischen Methoden zu isolieren ist, kann nur mit Chl b alleine in der Anwesenheit der Carotinoide gebildet werden. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff als Monitor können somit bzgl. der Isolation instabile aber spezifische Interaktionen zwischen Chl a und dem Protein direkt detektiert werden. Der Nachweis der Interaktion der Carotinoide mit dem Protein erfolgt nur indirekt, da ihre Anwesenheit eine Voraussetzung für die beobachtete

Signaländerung ist, sie selber aber nicht zur Löschung der Farbstofffluoreszenz beitragen, da sie im Bereich von 543 nm nicht angeregt werden können. Chlide a, die Vorstufe von Chl a ohne Phytolschwanz, ist nicht in der Lage, in Anwesenheit der Carotinoide an das Protein zu binden. Die Parameter der einzelnen Kinetiken, ermittelt durch die Anpassung einer biexponentiellen Funktion an die beobachteten Signaländerungen sind in Tabelle 3.3.2 zusammengestellt. Stellvertretend für die restlichen Markierungsorte wurden die Daten, ermittelt bei Bindung des Farbstoffes an den N-Terminus mit in die Tabelle aufgenommen.

Pigmentangebot	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)	$A_1 / A_2$	$A_1 + A_2$ (%)
ABC	$24 \pm 3$	$182 \pm 12$	$0.8 \pm 0.1$	$100 \pm 3$
AC	$24 \pm 3$	$372 \pm 57$	$2.3 \pm 0.5$	$95 \pm 11$
AC N- Terminus	$19 \pm 3$	$239 \pm 52$	$3.5 \pm 0.6$	$60 \pm 7$
BC	$49 \pm 15$	$280 \pm 123$	$1.8 \pm 1.1$	$72 \pm 10$
AB	$16 \pm 1$	zweite Amplitude ist negativ		

Tab. 3.3.2: Parameter der Interaktionen von Pigmenten und Lhcb1BP ermittelt durch zeitaufgelöste Messungen der Farbstofffluoreszenz (Bindung in der stromale Schleife und am N-Terminus) nach Zugabe von unvollständigen Pigmentsätzen. Daten ermittelt durch Anpassung einer biexponentiellen Funktion an die Signaländerung proteingebundenen Farbstoffes. Die Summe der Amplituden ist in Prozent angegeben, wobei der Wert für die Kinetik nach Zugabe von Chl a+b und Carotinoiden als 100 % genommen wurde. (Proteinlösung: 7.8  $\mu$ M Lhcb1BP; Pigmentlösung: 94  $\mu$ M Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss, 142  $\mu$ M Chl a+b oder nur Chl a oder Chl b  $\rightarrow$  1.5fach Überschuss)

Die Daten in Tabelle 3.3.2 machen deutlich, dass sich bei einer Veränderung des Pigmentangebotes Unterschiede in den Reaktionszeiten und Amplituden der beiden apparenten Schritte ergeben. Der schnellere apparente Schritt zeigt für die Bindung von Chl a alleine in Anwesenheit der Carotinoide die gleiche Reaktionszeit  $\tau_1$  wie für die Bindung beider Chlorophylle während er für die Bindung von Chl b deutlich verlangsamt ist. Eine frühe Phase der Pigmentbindung könnte demnach die Bindung von Chl a alleine sein (näheres siehe Diskussion). Für den langsameren apparenten Schritt lässt sich bei Chl a als alleinigem Chlorophyll eine Reaktionszeit  $\tau_2$  ermitteln, die etwa doppelt so lang ist wie wenn Chl a und Chl b anwesend sind. Ohne Chl b findet der deutlich größere Anteil der Signaländerung während des Schrittes mit der kürzeren Reaktionszeit  $\tau_1$  statt, der Amplitudenquotient  $A_1/A_2$  ist  $>1$ . Mit Chl a und Chl b hat die Amplitude des langsameren Schrittes den größeren Anteil,  $A_1/A_2$  ist  $<1$ . Durch die schlechte Übereinstimmung der Kinetiken einer Messung bei der Mischung des Proteins mit Chl b und Carotinoiden, ergaben sich für die Werte der Reaktionszeit  $\tau_2$  und der dazugehörigen Amplitude  $A_2$  recht hohe Standardabweichungen, so dass nur ein ungefährender Vergleich mit den Daten der anderen Kinetiken erfolgen kann. Die Reaktionszeit  $\tau_2$  des langsameren Schrittes liegt in etwa zwischen den Zeiten, die für die Bindung beider Chlorophylle bzw. für die Bindung von Chl a alleine ermittelt wurden. Entsprechendes gilt für den Amplitudenquotienten. Ein Grund für die schlechtere Übereinstimmung mehrerer Kinetiken könnte eine weniger zielgerichtete Besetzung von Bindungsstellen durch Chl b sein, die bei Standard Pigmentstöchiometrien von Chl a

Molekülen besetzt sind, so dass bei verschiedenen Experimenten unterschiedliche Bindungsvorgänge detektiert werden (vgl. 4.4.6). Ist der Farbstoff an den N-Terminus gebunden ergeben sich keine signifikanten Unterschiede für die Bindung von Chl a alleine. Allerdings ist der Schwerpunkt der Amplituden noch deutlicher zum schnelleren Schritt hin verschoben. In Abwesenheit der Carotinoide wird für die transiente Bindung von Chl a und Chl b eine etwas kürzere Reaktionszeit  $\tau_1$  ermittelt. Insgesamt ist die Signaländerung bei der Bildung eines funktionellen Komplexes, d.h. bei der Bindung von Chl a, Chl b und Carotinoiden an den Lhcb1 kaum größer, als wenn nur Chl a und Carotinoide mit dem Protein interagieren.

Ein Vergleich aller vier möglichen Bindungsorte des Farbstoffes wurde nur für die Bindung von Chl a alleine in Anwesenheit der Carotinoide durchgeführt. Die Kinetiken der Messung, die mit einem 3 fachen stöchiometrischen Chlorophyllüberschuss und über ein Zeitintervall von 100 s erfolgte, sind in Abb. 3.3.10 (a-d) gezeigt.

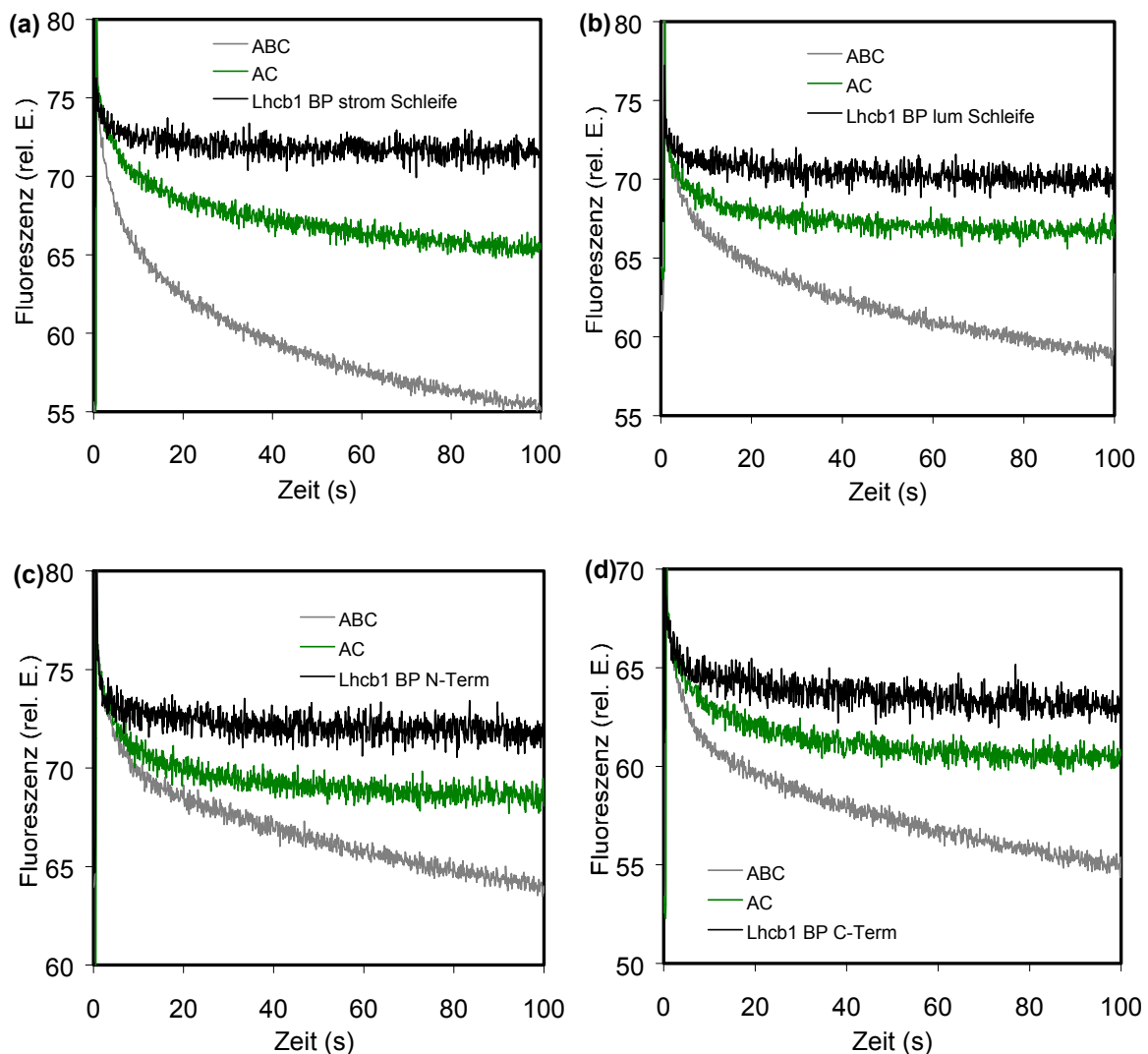


Abb. 3.3.10: Zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz des Lhcb1 gebundenen Farbstoffes bei 543 nm nach Mischen des Proteins mit unvollständigen Pigmentsätzen. Vollständiger Satz mit Chl a+b und Carotinoiden (ABC), nur Chl a und Carotinoide (AC), nur Chl b und Carotinoide (BC), nur Chl a und b (AB). Bindung des Farbstoffes in der (a) stromale Schleife, (b) luminale Scheife, nahe des (c) N-Terminus, (d) C-Terminus. (Proteinlösung: 7.8  $\mu\text{M}$  Lhcb1 BP, 94  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss, 284  $\mu\text{M}$  Chl a+b oder nur Chl a  $\rightarrow$  3fach Überschuss).

Bei allen Markierungsorten kann eine spezifische Interaktion zwischen Pigment und Protein in Abwesenheit von Chl b (AC) detektiert werden.

Es fällt auf, dass im Gegensatz zu Messungen mit einem 1.5 fachen Chlorophyllüberschuss (Kinetiken Abb. 3.3.9) die Gesamtsignaländerung bei allen vier Markierungsorten nach Zugabe von Chl a und Carotinoiden geringer ist. Eine Ursache dafür kann eine verstärkte Aggregation der Pigmente sein, wenn Chl a alleine in einem 3.0 fachen Überschuss vorliegt, im Gegensatz dazu, wenn Chl a und Chl b zusammen in einem 3.0 fachen Überschuss vorliegen. Verantwortlich für diesen Effekt ist vermutlich die höhere Hydrophobizität von Chl a gegenüber Chl b. Chl a besitzt an Ring b des Porphyringringsystems eine Methylgruppe, während sich bei Chl b an dieser Stelle eine Formylgruppe befindet. Durch die verstärkte Aggregation stehen im Endeffekt weniger Pigmente zur Verfügung, so dass zum einen die Ausbeute und dadurch die Gesamtsignaländerung reduziert werden. Eine Quantifizierung der Pigmentmenge, die dem Protein unter diesen Bedingungen tatsächlich noch zur Verfügung stand, wurde nicht durchgeführt. Es muss sich aber um Überschüsse deutlicher unterhalb von 1.5 gehandelt haben, da für diese Konzentrationen gerade eine sehr große Signaländerung zu beobachten war. Für die Messungen direkt konnte die Aggregation, z.B. anhand einer Trübung der Pigmentlösung nicht beobachtet werden, da sie durch den Experimentaufbau in der Rapid-Mixing Apparatur nicht einzusehen war. Bei späteren Experimenten außerhalb der Rapid-Mixing Apparatur konnte eine Trübung jedoch beobachtet werden.

Die Auswertung der in Abb. 3.3.10 gezeigten Kinetiken über ein Zeitintervall von 100 s konnte nicht mehr durch die Anpassung einer Funktion mit nur zwei Exponentiellen erfolgen. Durch die Aufnahme von mehr Messpunkten pro Zeiteinheit ließen sich im Gegensatz zur Messung über ein Zeitintervall von 700 s insgesamt drei apparente Schritte auflösen, wobei der schnellste unabhängig vom Markierungsort und Pigmentangebot eine Reaktionszeit von  $\approx 4$  s besitzt. Eine Signaländerung des Farbstoffes in diesem Zeitbereich lässt sich auch in Abwesenheit der Pigmente beobachten (Abb. 3.3.10), bzw. wenn die C-terminale Deletionsmutante  $\Delta$ Lhcb1 mit einem kompletten Pigmentangebot gemischt wird (Abb. 3.3.4). So kann ausgeschlossen werden, dass dieser schnelle Schritt einen Prozess der Pigmentbindung widerspiegelt. Mögliche Gründe für diese Signaländerung wären, wie schon in Abschnitt 3.3.1 erwähnt, Wechselwirkungen des Farbstoffes mit seiner Umgebung, der Detergens/Lipidmizelle oder auch dem Protein selbst, bzw. eine Aggregation von freiem Protein.

Der zweitschnellste apparente Schritt lässt sich für alle Markierungsorte mit den gleichen Parametern beschreiben, die für die jeweiligen Kinetiken (ABC oder AC) bei der Messung über ein Zeitintervall von 700 s (Bindung des Farbstoffes in der stromalen Schleife) ermittelt wurden (Tab. 3.3.2). D.h. unabhängig davon, an welcher Stelle im Protein der Farbstoff gebunden ist, zeigt sich sowohl für die Bindung von Chl a+b als auch für die Bindung von Chl a alleine ein apparenter Schritt mit einer Zeit  $\tau_1$  um 24 s. Der langsamste apparente Schritt kann auch noch aufgelöst werden. Da jedoch die beobachteten Prozesse innerhalb des gemessenen Zeitintervalls von 100 s noch nicht abgeschlossen sind, also keine konkreten Daten mehr für die Anpassung der Funktion vorliegen, lassen sich die dazugehörigen Reaktionszeiten und Amplituden nur mit einem größeren Fehler ermitteln, so dass sie hier nicht näher betrachtet werden sollen.

### **3.4 Kinetische Experimente zur Pigmentbindung des LHCIIb, durchgeführt in zwei aufeinander folgenden Schritten**

Wie in Ergebnisteil 3.3 beschrieben, ließen sich mit Hilfe eines an den Lhcb1 gebundenen Farbstoff frühe Vorgänge der Pigmentbindung beobachten, die noch keinen Energietransfer zwischen Chl b und Chl a zur Folge haben und dadurch bisher durch Messung der Chl Fluoreszenzen noch nicht aufgelöst werden konnten. Außerdem konnte durch kinetische Experimente mit unvollständigen Pigmentangeboten eine (unter den gegebenen Bedingungen) stabile und spezifische Wechselwirkung von Chl a mit dem Protein nachgewiesen werden, für die die Anwesenheit der Carotinoide eine Voraussetzung ist, ein indirekter Beweis, dass auch die Carotinoide mit dem Protein interagieren müssen. Um den Charakter und die Bedeutung dieser Wechselwirkungen für den gesamten Ablauf der Faltung und Pigmentbindung des LHCII näher zu untersuchen, wurde in weiterführenden kinetischen Experimenten versucht, die Zugabe der Pigmente auf zwei aufeinander folgende Schritte aufzuteilen. Ergebnisse sollten dann mit denen kinetischer Experimente verglichen werden, in denen die Faltung und Pigmentbindung des LHCII durch Mischen des Proteins mit einem kompletten Angebot an Pigmenten auf einmal, d.h. mit einem einzigen Schritt der Pigmentzugabe gestartet wird. Dazu wurde zunächst geprüft, ob die Wechselwirkungen zwischen Chl a und Lhcb1 in Anwesenheit der Carotinoide auch während eines zweiten Mischvorganges bestehen bleiben.

#### **3.4.1 Wechselwirkungen zwischen Chl a und Lhcb1 bleiben auch während eines zweiten Mischvorgangs bestehen**

Nach Mischung von Chl a und Carotinoiden mit farbstoffmarkiertem (stromale Schleife) Lhcb1 konnte nach Anregung bei 508 nm eine stabile Abnahme in der Fluoreszenz Emission des Farbstoffes bei 543 nm beobachtet werden, die auf die Ausbildung des Energietransfers zwischen Farbstoff und den mit dem Protein wechselwirkenden Pigmenten zurückzuführen war. Abb. 3.3.1 zeigt neben der Kinetik der Interaktion von Chl a und Carotinoiden mit dem Protein die Signaländerung, die nach einem weiteren 2. Mischschritt für die Farbstofffluoreszenz zu beobachten ist. Nach Mischung von Lhcb1 mit Chl a und Carotinoiden und Aufnahme der Kinetik wurde ein Teil der Lösung aufgenommen, mit einer zweiten Pigmentlösung gemischt und ein zweites Mal die Signaländerung des Farbstoffes aufgenommen. Für die Darstellung sind die Startpunkte der zeitlich hintereinander stattfindenden Kinetiken auf denselben Anfangspunkt normiert. Die Benennung der jeweiligen Signaländerung erfolgt nach einem einheitlichen Muster. Die Pigmentspezies werden mit einzelnen Buchstaben abgekürzt: A für Chl a, B für Chl b, C für den Gesamtcarotinoideextrakt mit Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin im Verhältnis von 3:1:1. Bei Verwendung der einzelnen Carotinoidepezies steht Lut für Lutein, Nx für Neoxanthin und Vx für Violaxanthin. Lhcb1BP steht für das farbstoffmarkierte Protein und Det für Zugabe von Detergens/Lipidlösung ohne Pigmente. Schreibweise in Großbuchstaben bedeutet, dass diese Pigmente im dargestellten Mischschritt dazugegeben wurden. Schreibweise in Kleinbuchstaben stellt dar, welche Pigmente im vorausgehenden Mischschritt zugegeben wurden. Abb. 3.4.1 zeigt,

dass sich nach einem zweiten Mischschritt mit einer Lösung mit Chl a und Carotinoiden, das Signal des Farbstoffes nicht weiter ändert, die Wechselwirkungen der Pigmente mit dem Protein demnach weiter bestehen bleiben. Die Konzentrationen von Chl a und Carotinoide sind in beiden Lösungen, die im 2. Schritt gemischt werden die gleichen.

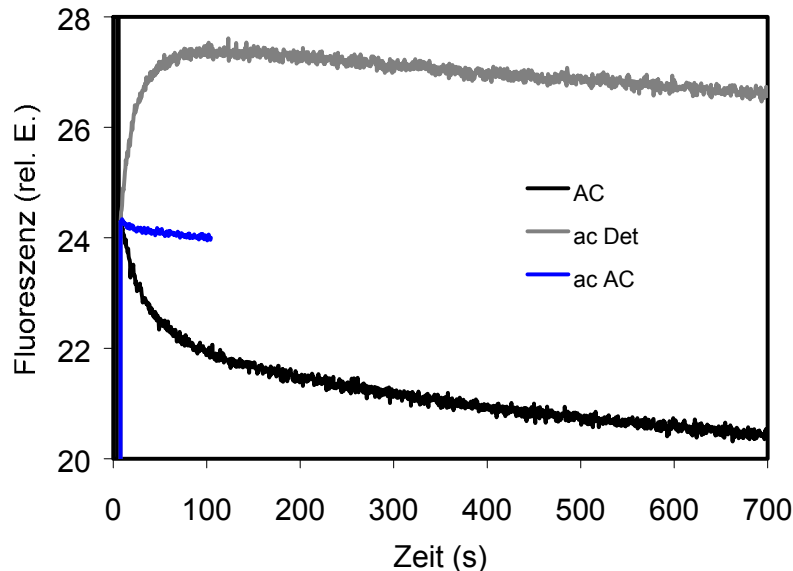


Abb. 3.4.1: Zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz des an den Lhcb1 gebundenen Farbstoffes bei 543 nm bei kinetischen Experimenten zur Pigmentbindung des LHCIIB in zwei aufeinander folgenden Mischschritten. Normierung der hintereinander ablaufenden Kinetiken auf den gleichen Startpunkt.

1. Schritt: 1:1 Mischung einer Lösung mit farbstoffmarkiertem Protein (Bindung an stromaler Schleife) mit einer Lösung mit Chl a und Carotinoiden (schwarze Linie). Abnahme der Farbstoffemission aufgrund der Etablierung des Energietransfers zwischen dem Farbstoff und Chl a Molekülen, die mit dem Protein wechselwirken. 2. Schritt: 1:1 der Lösung mit farbstoffmarkiertem Protein, Chl a und Carotinoiden (aus 1. Schritt) mit einer Lösung mit Chl a und Carotinoiden in den gleichen Konzentrationen (blaue Linie) bzw. ohne Pigmente (graue Linie). Keine Veränderung der Farbstoffemission zeigt ein weiteres Bestehen der Wechselwirkungen an, während die Zunahme des Signals die Ablösung der Pigmente vom Lhcb1 bedeutet. Dabei steigt das Signal um etwa 2/3 der vorherigen Abnahme wieder an. (1. Schritt Proteinlösung: 7.8  $\mu\text{M}$  Lhcb1BP; Pigmentlösung; 94  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss bei Annahme von 3 Molekülen/ LHCIIB, 142  $\mu\text{M}$  Chl a  $\rightarrow$  1.5fach Überschuss bei Annahme von 12 Molekülen/ LHCIIB. 2. Schritt: Pigmentlösung: 47  $\mu\text{M}$  Carotinoide; 71  $\mu\text{M}$  Chl a)

Werden in einem zweiten Schritt jedoch keine weiteren Pigmente, sondern nur Detergenzlösung dazu gemischt, steigt die Farbstofffluoreszenz an; um ca. 2/3 der vorherigen Abnahme bei Zugabe von Chl a und Carotinoiden. Die Wechselwirkungen zwischen Chl a und den Carotinoiden mit dem Protein werden demnach wieder gelöst. Bei dem anschließend an den Anstieg der Farbstofffluoreszenz zu beobachtende Abfall des Signals handelt es sich vermutlich um eine lineare Drift, die durch Aggregationsprozesse des freien Proteins und der freien Pigmente hervorgerufen wird und die auch die Signaländerung nach Zugabe von Chl a und Carotinoiden zu beeinflussen scheint. Genauere Erläuterungen dazu siehe weiter unten. An beide Signaländerungen lässt sich eine biexponentielle Funktion anpassen, wobei im Falle der Dissoziationskinetik die zweite Reaktionszeit nur den Anteil der linearen Drift beschreibt, so dass sie hier nicht weiter beachtet wird. Für die erste Reaktionszeit  $\tau_1$  ergibt sich ein Wert von  $17 \pm 2$  s. Die Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  für die Bindung der Pigmente liegen bei  $28 \pm 2$  s und  $693 \pm 228$  s, wobei das Vorhandensein der linearen Drift sicherlich zu einer Verlängerung der zweiten Reaktionszeit führt. Zu beachten ist, dass im Falle der Dissoziationskinetik die

gesamte positive Signaländerung mit einer Reaktionszeit stattfindet, während bei der Bindung der Pigmente die Änderung auf zwei Reaktionszeiten aufgeteilt ist.

Nachdem angenommen werden konnte, dass die Wechselwirkungen zwischen Chl a und Protein in Anwesenheit der Carotinoide bei der Zugabe von Pigmenten in einem 2. Schritt weiter bestehen bleiben, sollte in einem 2. Schritt durch Zugabe von Chl b die „vollständige“ Bildung des LHCIIb ausgelöst werden.

Als Monitor zur zeitaufgelösten Beobachtung der Vorgänge der Faltung und Pigmentbindung bei Zugabe der Pigmente in einem Schritt, bzw. in zwei aufeinander folgenden Schritten kommen generell mehrere spektroskopische Methoden in Frage. Zum einen die Messung von Fluoreszenzen der Chlorophylle bzw. des proteingebundenen Farbstoffes, wie in Ergebnisteil 3.3 beschrieben. Eine weitere Möglichkeit ist die Circular Dichroismus (CD) Spektroskopie, die ebenfalls spezifische Wechselwirkungen von Pigmenten detektiert, so dass Unterschiede zwischen freien und gebundenen Pigmenten gut aufgelöst werden können.

### 3.4.2 Farbstofffluoreszenz als Monitor der Vorgänge bei Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten.

Abbildung 3.4.2 zeigt die Veränderung der Fluoreszenz des proteingebundenen Farbstoffes nach einem 2. Mischschritt, dem ein 1. Schritt der 1:1 Mischung von Protein- und Pigmentlösung (Chl a und Carotinoide) vorausgeht.

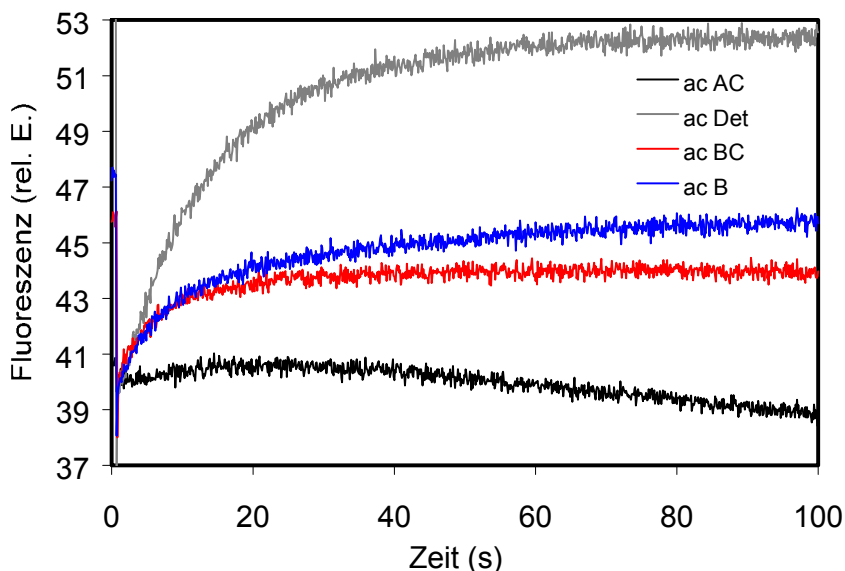


Abb. 3.4.2: Zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz des an den Lhcb1 gebundenen Farbstoffes bei 543 nm bei kinetischen Experimenten zur Pigmentbindung des LHCIIb in zwei aufeinander folgenden Mischschritten. Nur die Signaländerungen nach dem 2. Mischschritt sind gezeigt. 1. Schritt: 1:1 Mischung von Lhcb1 mit Chl a und Carotinoiden (nicht gezeigt, siehe aber Abb. 3.4.1); 2. Schritt: Zugabe (1:1 Mischung) von Detergens alleine (graue Linie), Chl a und Carotinoide (schwarze Linie), Chl b und Carotinoide (rote Linie), nur Chl b (blaue Linie). (1. Schritt Proteinlösung: 15.6  $\mu\text{M}$  Lhcb1BP; Pigmentlösung; 188  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss, 284  $\mu\text{M}$  Chl a  $\rightarrow$  1.5fach Überschuss. 2. Schritt: Pigmentlösung: 94  $\mu\text{M}$  Carotinoide; 142  $\mu\text{M}$  Chl a bzw. Chl b)

Wie schon in Abb. 3.4.1 zu sehen, bewirkt die Zugabe (1:1) einer Pigmentlösung mit Chl a und Carotinoiden zur Lösung von Protein, Chl a und Carotinoiden (aus 1. Schritt) keine weitere Signaländerung, während eine Zugabe von Detergenslösung alleine einen Anstieg der Farbstofffluoreszenz nach sich zieht. Als Grund für den Anstieg der Farbstofffluoreszenz wurde angenommen, dass die Pigmente vom Protein abdissoziieren, die Wechselwirkungen zwischen Pigmenten und Protein einen Verdünnungsschritt der Pigmente demnach nicht überstehen. Wird im 2. Schritt Chl b und Carotinoide oder nur Chl b dazu gegeben, lässt sich ebenfalls ein Anstieg der Farbstofffluoreszenz beobachten, der jedoch in der Amplitude deutlich geringer ist.

Entsprechend den vorherigen Überlegungen zur Stabilität der Wechselwirkungen zwischen Protein und Chl a in Anwesenheit der Carotinoide wurde der Anstieg der Farbstofffluoreszenz nach der Zugabe von Chl b und Carotinoiden einem Vorgang zugeordnet, bei dem die Pigmente wieder vom Protein abgelöst werden. Die Aufnahme von Emissionsspektren am Ende des kinetischen Experimentes zeigten jedoch deutlichen Energietransfer zwischen Chl b und Chl a (nicht gezeigt), so dass eine erfolgreiche Komplexbildung stattgefunden haben muss. In dieser Art des kinetischen Experimentes kam es somit zu Überlagerung von Signaländerungen unterschiedlichen Ursprungs, wobei die Dissoziation von Protein und Pigment die vorherrschende zu sein schien, so dass eine erfolgreiche Auswertung der Kinetiken bezüglich des Vergleiches der Zugabe der Pigmente in einem Schritt bzw. in zwei aufeinander folgenden Schritten unwahrscheinlich erschien. Um den Grad der Verdünnung herabzusetzen und so möglichen Dissoziationsprozessen der Pigmente vorzubeugen, wurden als Variation in einem zweiten Experiment die Mischverhältnisse des 2. Schrittes von 1:1 zu 10:1 (Verhältnis der Lösung des Proteins mit Chl a und Carotinoiden aus dem 1. Schritt zur 2. Pigmentlösung) verändert. Abb. 3.4.3 zeigt die aufgenommenen Signaländerungen des proteingebundenen Farbstoffes nach dem 2. Mischschritt.

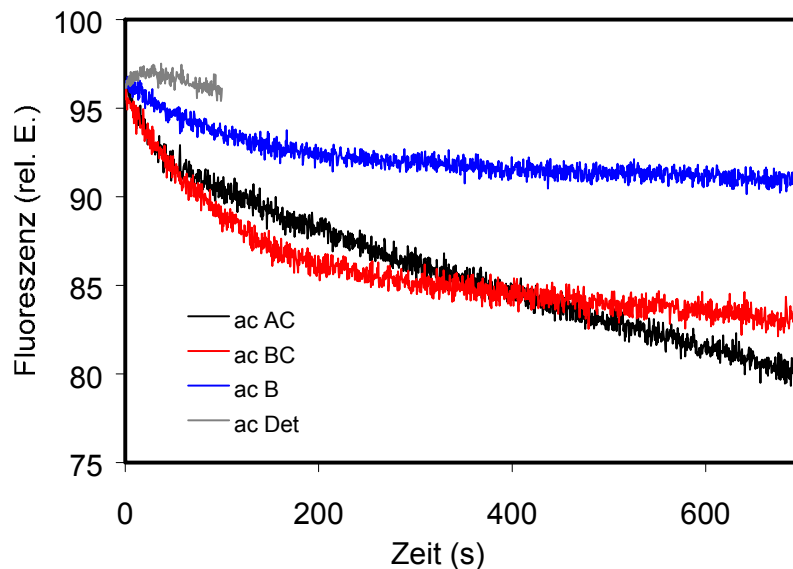


Abb. 3.4.3: Zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz des an den Lhcb1 gebundenen Farbstoffes bei 543 nm bei kinetischen Experimenten zur Pigmentbindung des LHCIIB in zwei aufeinander folgenden Mischschritten. Nur die Signaländerungen nach dem 2. Mischschritt sind gezeigt. 1. Schritt: 1:1 Mischung von Lhcb1 mit Chl a und Carotinoiden (nicht gezeigt); 2. Schritt: Zugabe (1/10 Volumen) von Chl a und Carotinoiden (schwarze Linie), Chl b und Carotinoide (rote Linie), nur Chl b (blaue Linie), nur Detergens (graue Linie). (1. Schritt Proteinlösung: 7.8  $\mu\text{M}$  Lhcb1BP; Pigmentlösung; 94  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach, 142  $\mu\text{M}$  Chl a  $\rightarrow$  1.5fach Überschuss. 2. Schritt: Pigmentlösung: 94  $\mu\text{M}$  Carotinoide; 142  $\mu\text{M}$  Chl a bzw. Chl b)

Die Zugabe von Detergens alleine im 2. Mischschritt bewirkt keine starke Signaländerung mehr, so dass die Veränderung des Mischverhältnisses tatsächlich die Dissoziation der Pigmente verhindern kann.

Bei den Mischverhältnissen von 1:10 im 2. Schritt lässt sich sowohl nach der Zugabe von Chl a und Carotinoiden als auch nach der Zugabe von Chl b und Carotinoiden, bzw. Chl b alleine eine weitere Abnahme der Farbstofffluoreszenz beobachten, die jedoch unterschiedliche große Amplituden besitzt. Zugabe von Chl b und Carotinoiden bewirkt eine größere Abnahme der Fluoreszenz als Zugabe von Chl b alleine. Die Signalabnahme nach Zugabe von Chl a und Carotinoiden, bei denen in den vorherigen Experimenten keine weitere Emissionsabnahme beobachtet wurde, hat eher den Charakter einer linearen Drift und dürfte weniger durch aktive Vorgänge zwischen Pigmenten und Chlorophyllen entstehen. Generell kommen als Ursprung für die fortschreitende Löschung der Farbstofffluoreszenz Aggregationsprozesse der Chlorophylle in Frage. Dabei lösen sich bestehende Pigmentaggregate während der Messung auf, da sich durch die Bindung der Pigmente an das Protein das Gleichgewicht zu Ungunsten der Aggregation verschiebt. Der Anstieg der Konzentration an gelösten Chlorophyllen führt zu einer Verstärkung der Reabsorptionsvorgänge (Inner Filter Effect) und bewirkt auf diese Weise indirekt eine weitere Löschung der Farbstofffluoreszenz. Ein Grund für eine direkte Löschung der Farbstofffluoreszenz ist außerdem die Aggregation des freien Proteins. Da auch für dieses Experiment nicht genau geklärt werden konnte, wie verschieden stark sich spezifische und unspezifische Wechselwirkungen auf die Änderung der Signalintensität auswirken, erschien die erfolgreiche Auswertung der aufgenommenen Kinetiken ein weiteres Mal zweifelhaft. Aus diesem Grund wurde von einer weiteren Verwendung des Farbstoffes als Monitor abgesehen und stattdessen im Folgenden versucht, anhand der Veränderungen in den Chlorophyll Fluoreszenzen Aufschluss über die Vorgänge bei einer Pigmentzugabe in zwei aufeinander folgenden Schritten zu erhalten. Verwendet wurde dabei nur unmarkiertes Protein.

### 3.4.3 Chlorophyll Fluoreszenz als Monitor der Vorgänge bei Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten.

Um zeitaufgelöste Messungen der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb mit den Chlorophyll Fluoreszenzen als Monitor durchzuführen, ist die Etablierung des Energietransfers zwischen Chl b und Chl a, d.h. die Anwesenheit beider Pigmentspezies und ihre Bindung an das Protein eine Voraussetzung. Aus diesem Grund konnte der 1. Schritt der Pigmentzugabe, bei dem nur Chl a und Carotinoide mit der Proteinlösung gemischt werden, mit dieser Methode des kinetischen Experimentes nicht mehr dokumentiert werden. Er fand stattdessen nur im Reaktionsgefäß statt und erst nach Zugabe von Chl b im 2. Mischschritt (1:1 Mischung) wurde im Fluoreszenzspektrometer die Änderungen der Chlorophyll Fluoreszenzen aufgenommen. Durch die Voraussetzung der spezifischen Bindung von Chl a und Chl b an das Protein für den Energietransfer war die Annahme, dass es mit dieser Methode zu weniger Problemen mit Überlagerungen von unspezifischen Signalen kommt. Zum Vergleich der Vorgänge nach Zugabe des kompletten Pigmentangebotes mit den Vorgängen nach dem 2. Schritt der Pigmentzugabe mußten die Detergensbedingungen der Proteinlösung verändert werden. Unter Standardbedingungen wurde bei Faltungsexperimenten mit komplettem Pigmentangebot das Protein in 0.2 % SDS gelöst. Diese wurden verändert zu 0.1 % SDS und 1% OG, den

Bedingungen, in denen sich das Protein nach dem 1. Schritt der Pigmentzugabe befindet, so dass für den Vergleich die Ausgangskonzentrationen an Detergens die gleichen sind (vgl. 2.2.7.3). Abb. 3.4.4 zeigt die Veränderung der Chlorophyll-Fluoreszenzen nach Zugabe des gesamten Pigmenten in einem einzelnen Schritt bzw. nach Zugabe von Chl b im 2. Schritt.

Beide Mischvorgänge führen zu einer Abnahme der Chl b Fluoreszenz bei gleichzeitiger Zunahme der Chl a Fluoreszenz, das heißt zu einer Etablierung des Energietransfers aufgrund der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb. Auf den ersten Blick zeigt sich schon ein Unterschied zwischen den Kinetiken der beiden Experimente, jedoch sind die Signaländerungen stark von einem linearen Anstieg der Chlorophyll Fluoreszenzen überlagert, was eine Auswertung durch Anpassung einer biexponentiellen Funktion sehr fehlerbehaftet werden ließ. Eine Erhöhung der Reaktantenkonzentration um den Faktor 1.5 führte zu einer noch stärkeren Überlagerung durch die lineare Drift, so dass die Chl b Fluoreszenz besonders im kinetischen Experiment mit Zugabe des kompletten Pigmentangebotes zum Teil gegen Ende wieder anstieg.

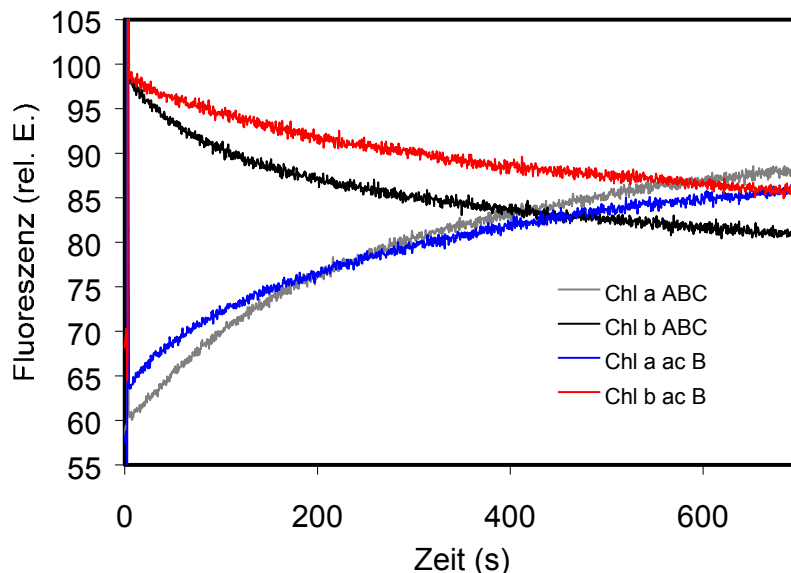


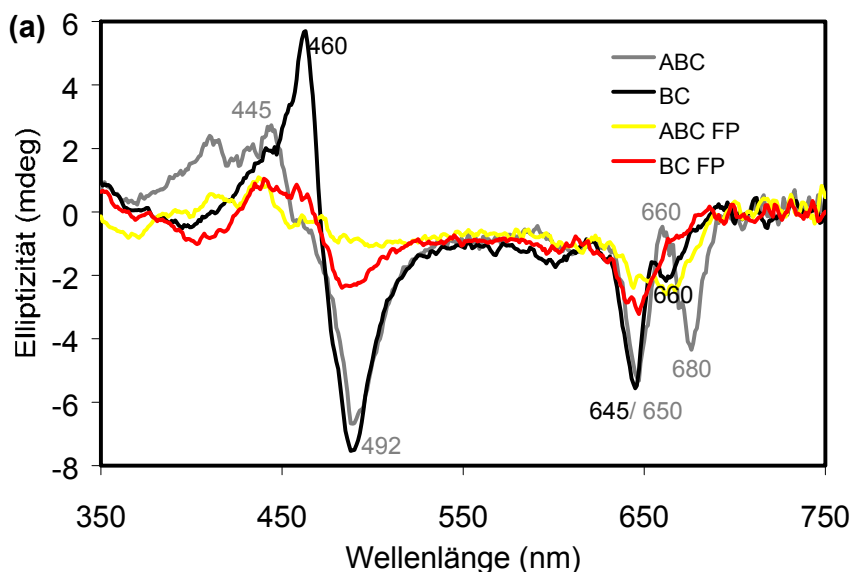
Abb. 3.4.4: Zeitaufgelöste Messung der Chlorophyll Fluoreszenzen bei kinetischen Experimenten zur Pigmentbindung des LHCIIb mit Zugabe der Pigmente in einem Schritt (schwarze und graue Linie, Änderung der Chl b- bzw. der Chl a- Fluoreszenz) bzw. in zwei aufeinander folgenden Schritten (2. Schritt rote und blaue Linie, Änderung der Chl b- bzw. der Chl a- Fluoreszenz). Gezeigt ist jeweils die Änderung der Chl b Fluoreszenzen bei 660 nm und der Chl a Fluoreszenz bei 680 nm nach Anregung bei 470 nm. 1. Schritt: 1:1 Mischung von Lhcb1 mit Chl a und Carotinoiden (nicht gezeigt); 2. Schritt: Zugabe (1:1 Mischung) von Chl b. (1. Schritt: Proteinlösung: 7.8  $\mu\text{M}$  Lhcb1 in 0.2 % SDS; Pigmentlösung: 94  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss, 142  $\mu\text{M}$  Chl a  $\rightarrow$  1.5fach Überschuss in 2% OG und 0.08 % PG. 2. Schritt: Pigmentlösung: 71  $\mu\text{M}$  Chl b in 2 % OG und 0.08 % PG. Ein Schritt: Proteinlösung: 3.9  $\mu\text{M}$  Lhcb1 in 0.1 % SDS und 1 % OG; Pigmentlösung: 142  $\mu\text{M}$  Chl a+b  $\rightarrow$  3fach Überschuss, 47  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss)

Auch hier kommen generell als Ursache für einen linearen Anstieg der Fluoreszenzen Aggregationsprozesse der freien Chlorophylle in Frage. Dabei führt der Anstieg der Konzentration an gelösten Chlorophyllen zu einer Verstärkung der Hintergrund Fluoreszenz, ein Signal, das im Falle von Chl a in Richtung der Signaländerung, im Falle von Chl b entgegen der Signaländerung, bedingt durch die Etablierung des Energietransfers, läuft. Dieser Vorgang wurde im beschriebenen Experiment anscheinend durch vorausgehendes

Lösen des Proteins in 0.1 % SDS und 1 % OG, 0.04 % PG begünstigt. Die zuvor getroffene Annahme der geringeren Überlagerung des Signals durch unspezifische Vorgänge traf somit nicht zu. Da auch die Verwendung von verschiedenen Detergentien diesen Aggregat Effekt nicht verhindern konnte, wurde im Folgenden die Methode der CD Spektroskopie zur Untersuchung der unterschiedlichen kinetischen Experimente angewendet, bei der ein Beitrag von freien, bzw. aggregierten Pigmenten zum Hintergrundsignal als geringer eingestuft wurde, als bei der Methode der Fluoreszenzspektroskopie.

#### 3.4.4 Die Ausbildung charakteristischer CD Signale eignet sich als Monitor der Vorgänge bei Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten

Bei Circular Dichroismus Spektroskopie handelt es sich um eine spezielle Art der Absorptionsspektroskopie, bei der das unterschiedliche Absorptionsverhalten bezüglich links, bzw. rechts zirkular polarisiertem Licht von Molekülen (bzw. Molekülverband) ausgenutzt wird. Dabei wird eine Probe abwechselnd mit den beiden Polarisierungsarten bestrahlt und das Spektrum als ein Differenzspektrum der absorbierten Anteile von rechts bzw. links zirkular polarisiertem Licht dargestellt, so dass negative und positive Maxima auftreten können. Freie Chlorophylle und Carotinoide zeigen nur geringe Unterschiede in der Absorption der unterschiedlichen Polarisierungsrichtungen (sie zeigen nur ein geringes intrinsisches CD Signal), bei Bindung im Komplex jedoch treten excitonische Wechselwirkungen zwischen den Pigmenten auf, die zu unterschiedlicher Absorption der beiden zirkular polarisierten Komponenten führen. Das CD Spektrum des LHCIIb (Abb. 3.4.5) zeigt durch bestimmte Anordnung der Pigmente im Komplex und Wechselwirkungen der Pigmente untereinander charakteristische positive und negative Maxima, die sich bei Veränderung der Pigmentzusammensetzung im Komplex ebenfalls verändern. Abb. 3.4.5 zeigt CD Spektren des LHCIIb am Ende eines kinetischen Experimentes mit Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Schritt, wobei in einem Fall nur mit Chl b und Carotinoiden rekonstituiert wurde. Für die Kontrollexperimente, deren Spektren ebenfalls in Abb. 3.4.5 zu sehen sind, wurden nur die jeweiligen Pigmente unter Standardbedingungen gemischt.



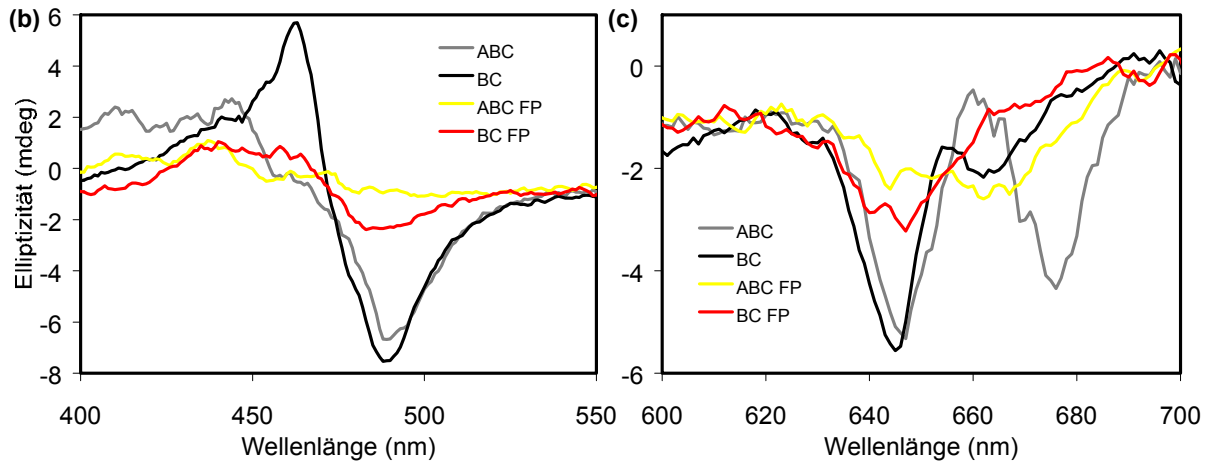


Abb. 3.4.5: CD-Spektren des LHCIIb am Ende eines kinetischen Experimentes zur Faltung und Pigmentbindung mit Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Schritt. Zugabe von Chl a+b und Carotinoiden (graue Linie) und nur Chl b mit Carotinoiden (schwarze Linie). Kontrollexperimente wurden entsprechend den Standardbedingungen aber ohne Protein durchgeführt, Chl a+b und Carotinoide (gelbe Linie), Chl b und Carotinoide (rote Linie). (a) Spektren gezeigt über den gesamten gemessenen Wellenlängenbereich, (b) und (c) Vergrößerungen der Bereiche, in denen die wichtigsten Unterschiede zwischen den Spektren der Komplexe und der freien Pigmente (FP) auftreten. (1.9  $\mu\text{M}$  Lhcb1, 71  $\mu\text{M}$  Chl a+b, bzw. Chl b  $\rightarrow$  3fach Überschuss, 23.5  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss)

Sind neben den Carotinoiden Chl a und Chl b im Komplex gebunden, zeigen sich (unter den gegebenen Bedingungen, in denen der Komplex völlig unaufgereinigt zusammen mit freien Chlorophyllen und freiem Protein vorliegt) charakteristische negative Maxima um 492 nm, 650 nm und 680 nm. Positive Maxima liegen um 445 nm und 660 nm. Neben den deutlichen Maxima treten weitere negative Schultern um 460 nm und 473 nm auf, deren Ausprägung jedoch zwischen verschiedenen Experimenten leicht variiert. In Abwesenheit des Proteins sind keine der genannten Maxima zu beobachten, nur im Bereich zwischen 630 nm und 680 nm zeigt sich ein schwaches Signal mit einem sehr breiten negativen Maximum und einem Mittelpunkt um 670 nm. Ist im Komplex kein Chl a vorhanden zeigen sich deutliche negative Maxima um 492 nm und 645 nm und ein kleineres negatives Maximum um 660 nm. Positive Maxima liegen bei 460 nm und 655 nm. Die Maxima um 492 nm und 660 nm lassen sich auch in Abwesenheit des Proteins beobachten, allerdings mit einer sehr viel geringeren Intensität.

### 3.4.5 Ein Unterschied in den Detergensbedingungen der Proteinlösung hat keinen Einfluss auf die CD- Signale.

Um die Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb zeitaufgelöst anhand der Ausbildung charakteristischer CD Signale beobachten zu können, wurde das negative Maximum bei 492 nm ausgewählt, da bei dieser Wellenlänge die größtmögliche Änderung des Signals zu erwarten war. Nachdem sich die Detergensbedingungen für das kinetische Experiment zur Pigmentzugabe in einem einzelnen Schritt für die Fluoreszenzspektroskopie aufgrund der Auflösungseffekte der Pigmentaggregate und dadurch bedingten linearen Anstieg der Hintergrund Fluoreszenz als ungünstig erwiesen hatten, wurde zunächst überprüft, dass sich die Kinetiken bei 492 nm und die CD Spektren des LHCIIb nach Rekonstitution unter Standardbedingungen nicht von denen mit variierten Detergensbedingungen unterscheiden.

Abb. 3.4.6 zeigt CD Spektren nach der Komplexbildung unter den beiden verschiedenen Detergensbedingungen. Es kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

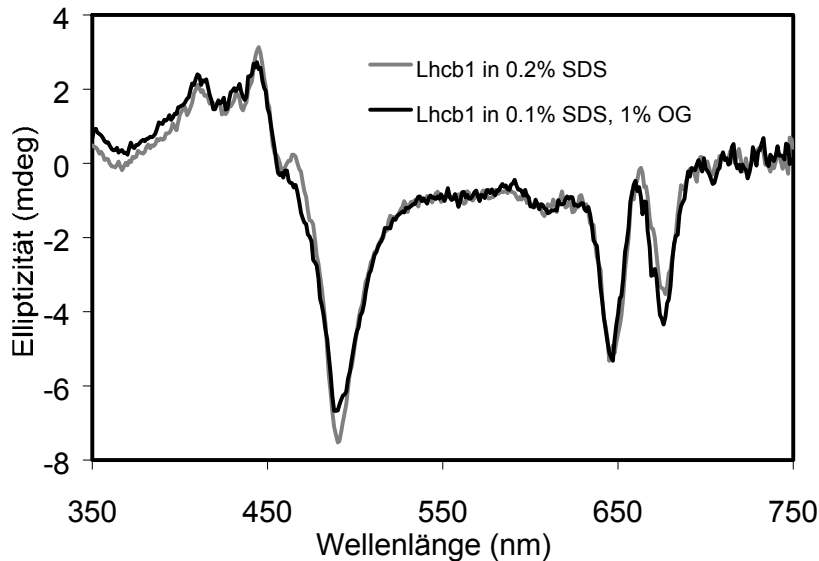


Abb. 3.4.6: CD Spektren des LHCIIb nach kinetischen Experimenten zur Faltung und Pigmentbindung bei Zugabe der Pigmente in einem Schritt. Die Detergensbedingungen der Proteinlösung sind 0.2 % SDS (Standard, graue Linie) und 0.1 % SDS mit 1 % OG, 0.04 % PG (Variation für Vergleich mit Zugabe in zwei aufeinander folgenden Schritten, schwarze Linie). (1.9  $\mu\text{M}$  Lhcb1, 71  $\mu\text{M}$  Chl a+b  $\rightarrow$  3fach Überschuss, 23.5  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss)

Wie in Abb. 3.4.7 zu sehen, können auf den ersten Blick auch zwischen den Kinetiken, aufgenommen bei 492 nm nach Mischen gleicher Volumina von Protein- und Pigmentlösung, keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

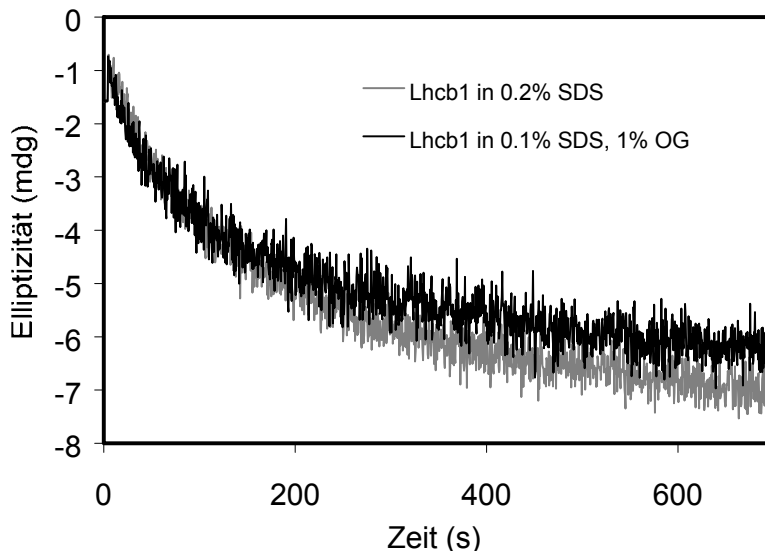


Abb. 3.4.7: Zeitaufgelöste CD Messung der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb bei Zugabe der Pigmente in einem Schritt. Die Assemblierung des funktionellen Komplexes wird anhand der Zunahme an Elliptizität bei 492 nm beobachtet. Start der Rekonstitution erfolgt durch schnelles Mischen gleicher Volumina von Protein- und Pigmentlösung. Die Detergensbedingungen der Proteinlösung sind 0.2 % SDS (Standard, graue Linie) und 0.1 % SDS mit 1 % OG (Variation für Vergleich mit Zugabe in zwei aufeinander folgenden Schritten, schwarze Linie). (Proteinlösung: 3.9  $\mu\text{M}$  Lhcb1; Pigmentlösung: 142  $\mu\text{M}$  Chl a+b  $\rightarrow$  3fach Überschuss, 47  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss).

Es zeigt sich nur ein kleiner Rückgang in der Gesamtänderung des Signals unter den Bedingungen, bei denen das Protein in 0.1 % SDS und 1 % OG, 0.04 % PG gelöst wird. Durch Anpassung einer biexponentiellen Funktion an die Signaländerung lässt sich der Vorgang der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb, beobachtet anhand der Änderung des charakteristischen CD Signals bei 492 nm, in einen schnelleren und einen langsameren apparenten Schritt unterteilen, die durch die Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  mit den Amplituden  $A_1$  und  $A_2$  charakterisiert werden. Diese Unterteilung ist dabei ein reines Hilfsmittel, weswegen auch nur von „apparenten Schritten“ die Rede ist, da die zugrunde liegenden molekularen Vorgänge noch nicht bekannt sind. Die Reaktionszeiten liegen bei beiden Detergensbedingungen im Bereich von 1 min für  $\tau_1$  und von 5 min für  $\tau_2$  und die Amplitude des langsameren Schrittes überwiegt. Es zeigt sich demnach auch bei genauerer Betrachtung kein Unterschied je nachdem, ob das Protein in 0.2 % SDS oder 0.1 % SDS und 1 % OG gelöst ist. Der Einfluss der Pigmentaggregate, der die Messung der Chlorophyll Fluoreszenzen stark negativ beeinflusst hat, ist demnach für die Methode der CD Spektroskopie nicht relevant, so dass ein Vergleich zwischen den kinetischen Experimenten mit Zugabe der Pigmente in einem bzw. zwei aufeinander folgenden Schritten möglich ist. Die im Folgenden gezeigten Kinetiken nach Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Schritt gehen demzufolge immer von einer Proteinlösung mit 0.1 % SDS und 1 % OG aus.

#### 3.4.6 Die Vorgänge der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb nach Pigmentzugabe in einem Schritt unterscheiden sich von denen nach Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten

Nachdem die variierten Detergensbedingungen keinen negativen Einfluss auf die Ausbildung des CD Signals bei 492 nm im Verlauf der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb nach Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Schritt zeigten, wurden die Änderungen des Signals bei 492 nm nach Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten aufgenommen. Die drei Kinetiken sind zum Vergleich in Abb. 3.4.8 gezeigt.

Bei der Darstellung ist zu beachten, dass nach dem Ende der 1. Kinetik die Probe für kurze Zeit zur Durchführung des 2. Mischschrittes aus dem CD Spektropolarimeter herausgenommen und anschließend eine neue Messung gestartet wurde und nicht, wie anhand der Graphik angenommen werden könnte, die Zugabe der 2. Pigmentlösung direkt im Gerät stattfand. Die Kinetik nach Zugabe der gesamten Pigmente in einem einzelnen Schritt beginnt nur in der Darstellung für den besseren Vergleich mit der Kinetik nach dem 2. Mischschritt beim Zeitpunkt von 350 s, experimentell war kein weiterer Schritt vorgeschoben. Beides gilt auch für die folgenden Abbildungen.

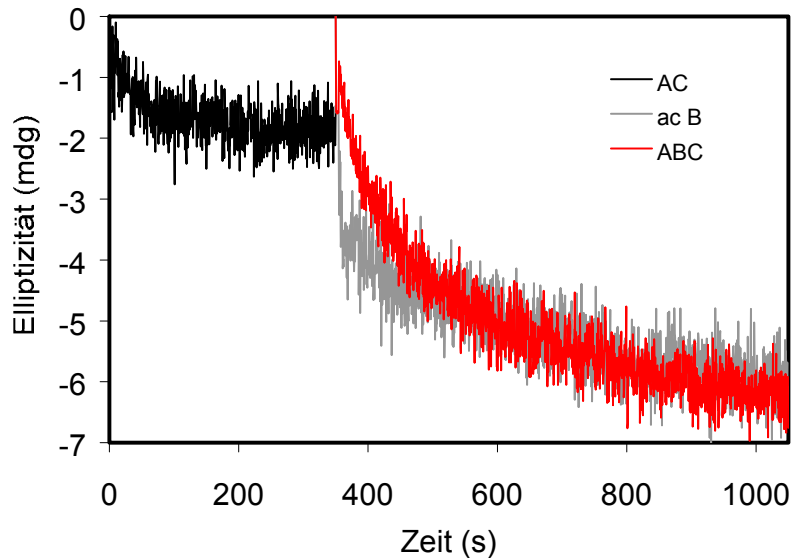


Abb. 3.4.8: Zeitaufgelöste CD Messung der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb bei Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Mischschritt (rote Linie) oder zwei aufeinander folgenden Schritten (1. Schritt Zugabe von Chl a und Carotinoiden, schwarze Linie, 2. Schritt Zugabe von Chl b, graue Linie). Beobachtung der Assemblierung des LHCIIb in beiden Fällen anhand der Zunahme an Elliptizität bei 492 nm. Der Beginn der Kinetik nach Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Mischschritt ist zum besseren Vergleich auf den Anfangspunkt des 2. Mischschrittes verschoben. Experimentell ist kein Schritt vorgeschoben. (1. Schritt: Proteinlösung: 7.8  $\mu\text{M}$  Lhcb1; Pigmentlösung: 94  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss, 142  $\mu\text{M}$  Chl a  $\rightarrow$  1.5fach Überschuss. 2. Schritt: Pigmentlösung: 71  $\mu\text{M}$  Chl b. Einzelner Schritt: Proteinlösung: 3.9  $\mu\text{M}$  Lhcb1; Pigmentlösung: 142  $\mu\text{M}$  Chl a+b  $\rightarrow$  3fach Überschuss, 47  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss)

Schon nach Mischen von Protein mit Chl a und Carotinoiden im 1. Schritt lässt sich eine Zunahme des negativen Signals bei 492 nm beobachten. Anhand der kinetischen Experimente mit dem Fluoreszenzfarbstoff als Monitor konnten schon spezifische Wechselwirkungen zwischen Chl a und Lhcb1 in Anwesenheit der Carotinoide nachgewiesen werden, da nach Mischen von Protein- und Pigmentlösung eine stabile Löschung der Farbstofffluoreszenz zu beobachten war (vgl. Abb. 3.3.9). Die Ergebnisse der CD Messungen zeigen nun, dass in dieser Phase auch schon die Pigmente Wechselwirkungen eingehen und excitonische Kopplung stattfinden kann. Dass eine Voraussetzung für diese Wechselwirkungen die Interaktion/ Bindung der Pigmente an das Protein ist, zeigt ein Kontrollexperiment, in dem nur die Pigmente (FP freies Pigment) ohne Protein gemischt werden (Abb. 3.4.9), wobei keine Signaländerung zu beobachten ist. Wird im 2. Mischschritt Chl b zur Lösung mit Chl a, Carotinoiden und Lhcb1 aus dem 1. Mischschritt dazugegeben, beginnt das Signal deutlich unterhalb des Endpunktes der Kinetik aus dem 1. Mischschritt und nur noch ein kleinerer Teil an weiterer Verstärkung des CD Signals bei 492 nm wird detektiert. Da jedoch die Reaktantenkonzentration im 1. Schritt doppelt so hoch ist wie im 2., können die beiden einzelnen Amplituden absolut nicht addiert werden. Der Startpunkt der Kinetik nach Zugabe von Chl b liegt ebenfalls deutlich unterhalb des Startpunkts der Kinetik, die bei Zugabe des kompletten Pigmentsatzes in einem einzelnen Schritt aufgenommen wird. Dass dies kein Effekt der Zugabe von freiem Chl b alleine in der Lösung ist, kann ebenfalls durch das Kontrollexperiment gezeigt werden. Bei Zugabe von Chl b zur Lösung mit Chl a und Carotinoiden ohne Lhcb1 ergibt sich keine Verstärkung des Signals bei 492 nm (Abb. 3.4.9).

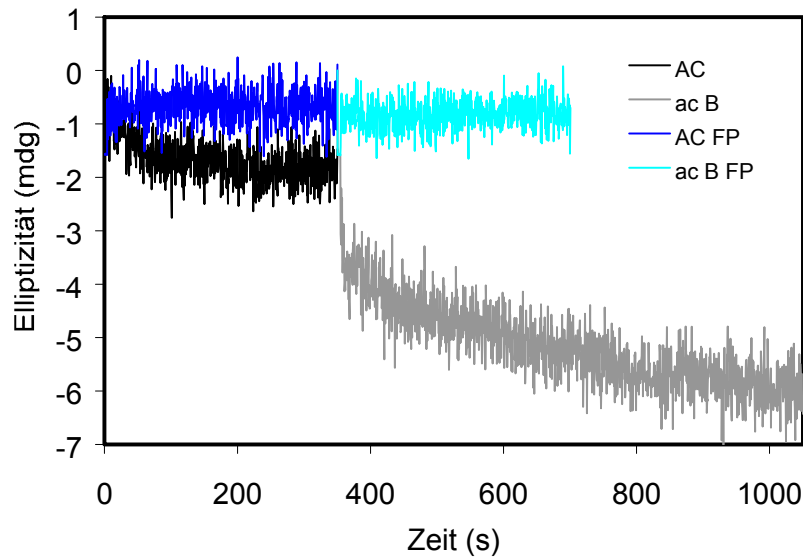


Abb. 3.4.9: Zeitaufgelöste CD Messung der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb bei Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten. Werden die Pigmente in den entsprechenden Konzentrationen alleine für das kinetische Experiment eingesetzt lässt sich keine Signaländerung beobachten (dunkelblaue und hellblaue Linie, FP: freies Pigment). Das gleiche gilt, wenn die C-terminale Deletionsmutante des Lhcb1, S3CΔC49, verwendet wird (nicht gezeigt).

An die aufgenommenen Signaländerungen nach Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten lässt sich am besten eine monoexponentielle Funktion anpassen, so dass für die Vorgänge nach Zugabe von Chl a und Carotinoiden bzw. von Chl b jeweils ein apparenter Schritt mit einer Reaktionszeit und einer Amplitude aufgelöst wird. Die Parameter sind in Tabelle 3.4.1 dargestellt. Zum Vergleich sind die Parameter angegeben, die nach Anpassung einer biexponentiellen Funktion an die Signaländerung nach Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Schritt ermittelt werden können. Dabei ist die Benennung der Reaktionszeiten ermittelt für die Signaländerung nach dem 1. und 2. Mischschritt mit  $\tau_1$  und  $\tau_2$  zunächst rein aufzählend zu verstehen. Die Übereinstimmung der Reaktionszeiten suggeriert zwar, dass den einzelnen aufgelösten Schritten die gleichen Vorgänge auf molekularer Ebene zugrunde liegen, wie den apparenten Schritten mit Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , die für die Vorgänge nach Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Schritt aufgelöst werden, zu beweisen ist dies jedoch an dieser Stelle nicht.

	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)	$A_1$ (mdeg)	$A_2$ (mdeg)	$A_{\text{total}}$ (mdeg)
ABC	$45 \pm 6$	$313 \pm 29$	$2.3 \pm 0.2$	$3.5 \pm 0.1$	$5.8 \pm 0.8$
2. ac B		$345 \pm 12$		$2.7 \pm 0.1$	
1. AC	$57 \pm 6$		$1.1 \pm 0.1$		

Tab. 3.4.1: Parameter der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb ermittelt durch zeitaufgelöste Messung des CD Signals bei 492 nm während kinetischer Experimente mit Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Mischschritt bzw. in zwei aufeinander folgenden Mischschritten. Die Daten wurden ermittelt durch Anpassung einer biexponentiellen Funktion an die Signaländerung nach Zugabe des kompletten Pigmentangebots in einem Schritt (ABC) und Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die Signaländerungen nach dem 1. (1. AC) und dem 2. Mischschritt (2. ac B).

Für die Signaländerung bei 492 nm nach Zugabe von Chl b im 2. Mischschritt lässt sich ein apparenter Schritt mit einer Reaktionszeit um 5 min auflösen. Eine ähnliche Reaktionszeit  $\tau_2$  wird für den langsameren Schritt ermittelt, der sich für die Signaländerung nach Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Schritt auflösen lässt, allerdings mit einer etwa 1.3fach größeren Amplitude. Für die Vorgänge nach Mischung von Chl a und Carotinoiden mit Lhcb1 lässt sich ein apparenter Schritt auflösen, der mit knapp 1 min deutlich schneller ist als die Vorgänge nach Zugabe von Chl b. Ein direkter Vergleich mit dem schnelleren Schritt des kinetischen Experimentes mit einem einzelnen Mischschritt kann nicht erfolgen, da aufgrund der Versuchsbedingungen die Konzentration an Lhcb1 im 1. Mischschritt um den Faktor 2 höher ist als im einzelnen Mischschritt bei Zugabe des kompletten Pigmentangebotes. Diese doppelte Reaktantenkonzentration ist erforderlich, damit nach den zwei 1:1 Mischschritten die gleiche Endkonzentration an Pigment und Protein herrscht, wie nach einem einzelnen Mischschritt. Aus diesem Grund können auch die beiden Amplituden aus den aufeinander folgenden Kinetiken nicht zu einer Gesamtamplitude addiert werden. Jedoch wird auch nur bei Vergleich der beiden langsamen Schritte deutlich, dass ein Teil der Signaländerung, die nach Zugabe von Chl b zu erwarten wäre, in der experimentellen Totzeit von  $\approx 10$  Sekunden verloren geht. Bei Verbesserung der Totzeit, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, sollte ein apparenter Schritt mit einer recht kurzen Reaktionszeit aufzulösen sein, der bei Experimenten zur Faltung und Pigmentbindung nach Zugabe des kompletten Pigmentangebotes in einem einzelnen Schritt bisher nicht zu beobachten war. Vorherige Bindung/ Interaktion von Chl a und Carotinoiden an den Lhcb1 scheint demnach eine Beschleunigung der Vorgänge von Faltung und Pigmentbindung, beobachtet anhand der Ausbildung des CD Signals bei 492 nm, zu bewirken, die nach Zugabe von Chl b bis zur Fertigstellung des Komplexes stattfinden.

Die Spektren (Abb. 3.4.10) des LHCIIb am Ende der kinetischen Experimente unterscheiden sich nicht voneinander je nachdem ob die Pigmente in einem einzelnen oder in zwei aufeinander folgenden Mischschritten zugegeben wurden, so dass sich die am Ende der beiden Experimentarten vorliegenden Komplexe strukturell gleichen sollten.

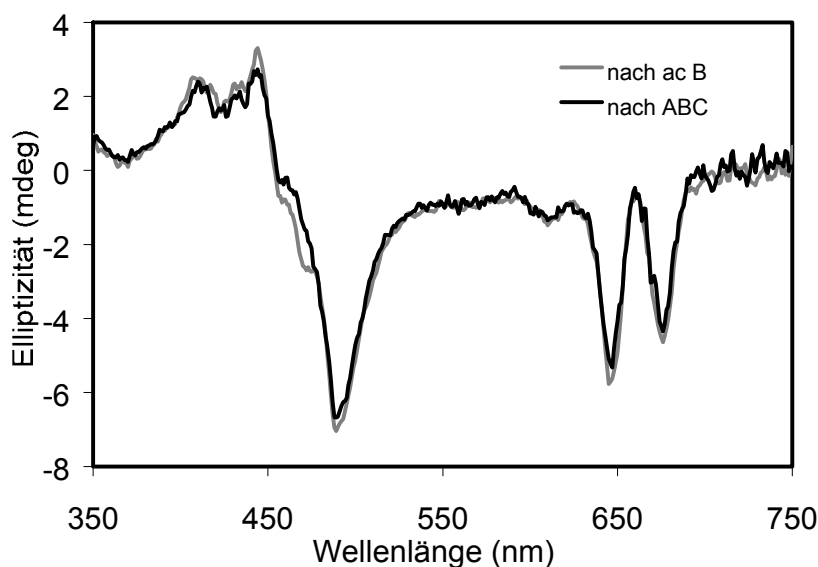


Abb. 3.4.10: CD Spektren des LHCIIb nach kinetischen Experimenten zur Faltung und Pigmentbindung bei Zugabe der Pigmente in einem Schritt (schwarze Linie) bzw. zwei aufeinander folgenden Schritten (nach 2. Schritt graue Linie). (1.9  $\mu$ M Lhcb1, 71  $\mu$ M Chl a+b  $\rightarrow$  3fach Überschuss, 23.5  $\mu$ M Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss)

Kleinere Unterschiede werden als nicht signifikant eingestuft, da unter den gegebenen Bedingungen keine aufgereinigten Komplexe vorliegen. Genauer wäre nach Aufreinigung durch z.B. Ultrazentrifugation und Pigmentanalyse mittels HPLC zu sagen, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt wurde.

Das Spektrum der Lösung mit Lhcb1, Chl a und Carotinoiden nach dem 1. Mischschritt (Abb. 3.4.11 a-c) zeigt, dass neben einem Maximum bei 492 nm, dessen Ausbildung in der Kinetik beobachtet wird, noch weitere Maxima vorhanden sind, die auf excitonische Kopplung der mit dem Protein interagierenden Chl a und Carotinoid Moleküle zurückzuführen sein müssen, da sie im Spektrum des Kontrollexperimentes mit freien Pigmenten (FP) ohne Protein nicht auftreten.

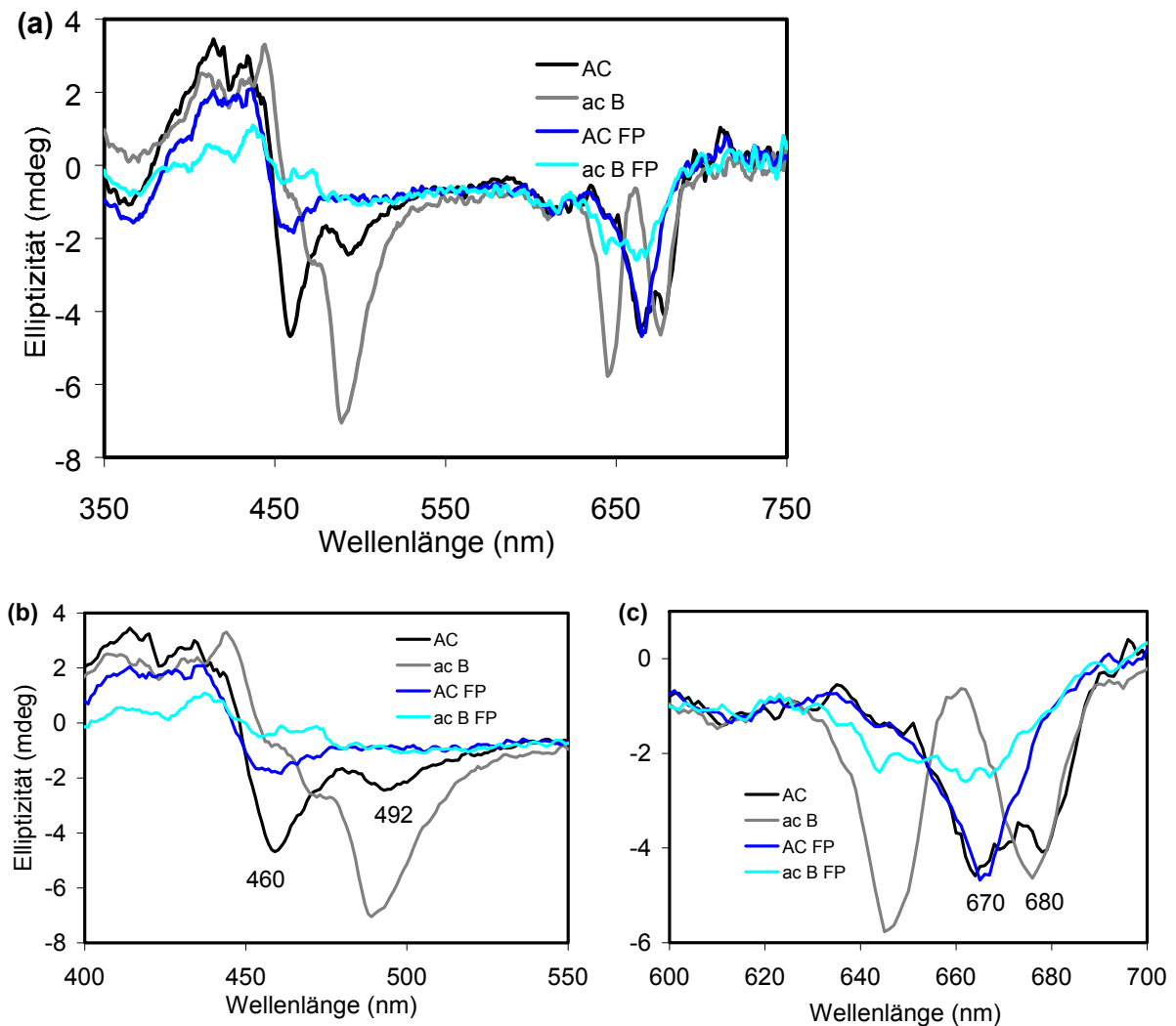


Abb. 3.4.11: CD Spektren des LHCIIb nach kinetischen Experimenten zur Faltung und Pigmentbindung bei Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten. (a) Spektren gezeigt über den gesamten gemessenen Wellenlängenbereich, (b) und (c) Vergrößerungen der Bereiche, in denen die wichtigsten Unterschiede zwischen den Mischschritten und zu den Kontrollexperimenten zu sehen sind. Nach Mischen von Lhcb1 mit Chl a und Carotinoiden im 1. Schritt (schwarze Linie) ergeben sich Wechselwirkungen, die sich deutlich von den intrinsischen Signalen der freien Chl a und Carotinoide (AC FP) unterscheiden lassen. Nach der Zugabe von Chl b im 2. Schritt lässt sich ein charakteristisches CD- Spektrum des LHCIIb beobachten. Die freien Pigmente (ac B FP) zeigen wiederum nur ein schwaches intrinsisches Signal. (nach 1. Mischschritt: 3.9  $\mu$ M Lhcb1, 47  $\mu$ M Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss, 71  $\mu$ M Chl a  $\rightarrow$  1.5 fach Überschuss; nach 2. Mischschritt: 1.9  $\mu$ M Lhcb1, 23.5  $\mu$ M Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss, 71  $\mu$ M Chl a+b  $\rightarrow$  3fach Überschuss)

So entstehen nach Mischen von Lhcb1 mit Chl a und Carotinoiden weitere negative Maxima bei 680 nm (kann je nach Erfolg auch nur eine Schulter sein) und um 460 nm. Ein negatives Maximum um 460 nm lässt sich auch für Chl a und Carotinoide alleine beobachten, jedoch nicht in der Intensität, wie bei der gleichzeitigen Anwesenheit von Lhcb1 (Abb. 3.4.11b). Das negative Maximum um 670 nm allerdings dürfte allein durch freie Chlorophylle in der Lösung entstehen, da es in Abwesenheit des Proteins ebenfalls auftritt (Abb. 3.4.11c). Eine sichere Erkennung positiver Maxima unterhalb 450 nm ist durch ein erhöhtes Rauschen und kleine Unterschiede zwischen einzelnen Messungen in diesem Bereich etwas erschwert, erkennbar sind aber Maxima bzw. Schultern um 444 nm und um 434 nm, letzteres ist aber auch bei Chl a und Carotinoiden alleine zu beobachten.

### 3.4.7 Lutein als alleiniges Carotinoid reicht aus, um nach Mischung mit Chl a und Lhcb1 die Ausbildung charakteristischer CD Signale zu beobachten.

Wird im 1. Mischschritt neben Chl a nur Lutein als einziges Carotinoid eingesetzt, lässt sich auf den ersten Blick der gleiche Verlauf der Kinetiken beobachten, wie wenn Gesamtcarotinoid verwendet wird. Abb. 3.4.12 zeigt, dass nach Mischen von Chl a und Lutein mit Lhcb1 eine Zunahme der Signalintensität bei 492 nm, bedingt durch excitonische Kopplung zwischen den Pigmenten, eintritt.

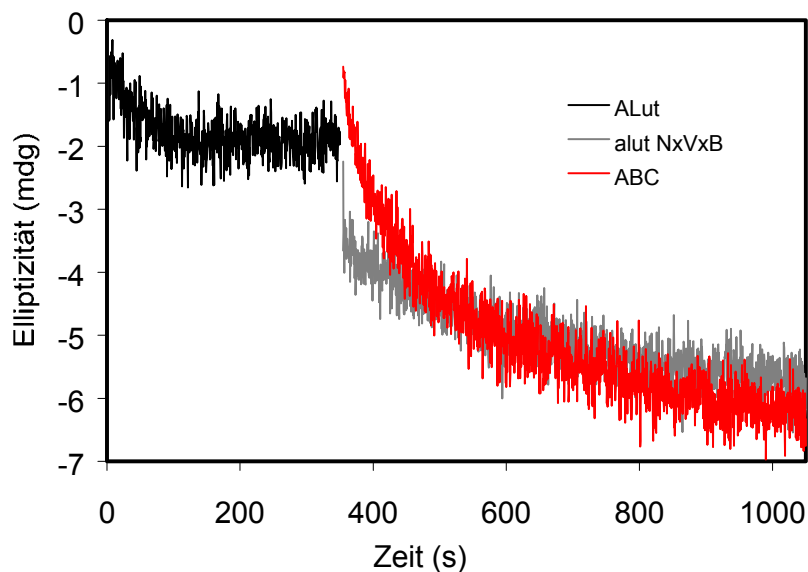


Abb. 3.4.12: Zeitaufgelöste CD Messung der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb bei Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Mischschritt (rote Linie) oder zwei aufeinander folgenden Schritten (1. Chla und Lutein, schwarze Linie, 2. Chl b, Nx und Vx, graue Linie) Der Beginn der Kinetik nach Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Mischschritt ist zum besseren Vergleich auf den Anfangspunkt des 2. Mischschrittes verschoben. Experimentell ist kein Schritt vorgeschoben. (1. Schritt: Proteinlösung: 7.8  $\mu\text{M}$  Lhcb1; Pigmentlösung: 57  $\mu\text{M}$  Lutein, 142  $\mu\text{M}$  Chl a  $\rightarrow$  1.5fach Überschuss. 2. Schritt: Pigmentlösung: 18  $\mu\text{M}$  Nx+Vx, 71  $\mu\text{M}$  Chl b. Einzelner Schritt: Proteinlösung: 3.9  $\mu\text{M}$  Lhcb1; Pigmentlösung: 142  $\mu\text{M}$  Chl a+b  $\rightarrow$  3fach Überschuss, 47  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss)

Wird im 2. Mischschritt Chl b, Neoxanthin und Violaxanthin (1:1:3 Endverhältnis der Carotinoide Nx: Vx: Lut wie in der Pflanze) dazugegeben, beginnt die Kinetik wieder deutlich

unterhalb des Endpunktes der Kinetik des 1. Mischschrittes und auch unterhalb des Startpunktes der Kinetik nach Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Mischschritt, so dass auch hier ein Teil der Amplitude in der experimentellen Totzeit verloren geht. Der genauere Vergleich zwischen den kinetischen Experimenten kann nach Anpassung einer monoexponentiellen Funktion erfolgen.

	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)	$A_1$ (mdeg)	$A_2$ (mdeg)	$A_{\text{total}}$ (mdeg)
ABC	$45 \pm 6$	$313 \pm 29$	$2.3 \pm 0.2$	$3.5 \pm 0.1$	$5.8 \pm 0.8$
2. alut BNxVx		$280 \pm 123$		$2.5 \pm 0.1$	
1. ALut	$36 \pm 3$		$1.2 \pm 0.2$		

Tab. 3.4.2: Parameter der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb ermittelt durch zeitaufgelöste Messung des CD Signals bei 492 nm während kinetischer Experimente mit Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Mischschritt bzw. in zwei aufeinander folgenden Mischschritten. Daten ermittelt durch Anpassung einer biexponentiellen Funktion an die Signaländerung nach Zugabe des kompletten Pigmentangebots in einem Schritt (ABC) und Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die Signaländerungen nach dem 1. (1. ALut) und dem 2. Mischschritt (2. alut BNxVx).

Aus Tabelle 3.4.2 lässt sich ersehen, dass für die jeweiligen Reaktionszeiten und Amplituden ähnliche Werte ermittelt werden, wie wenn im 1. Mischschritt Gesamtcarotinoid (vgl. Tab. 3.4.1) eingesetzt wird.

Wie in Abb. 3.4.13 zu sehen ist, zeigt auch das Spektrum von Lhcb1 mit Chl a und Lutein als einzigem Carotinoid keine Unterschiede gegenüber dem Spektrum mit zusätzlich Violaxanthin und Neoxanthin in der Lösung, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese beiden Carotinoid Spezies in dieser Phase keinen Beitrag zu den beobachteten CD Signalen leisten.

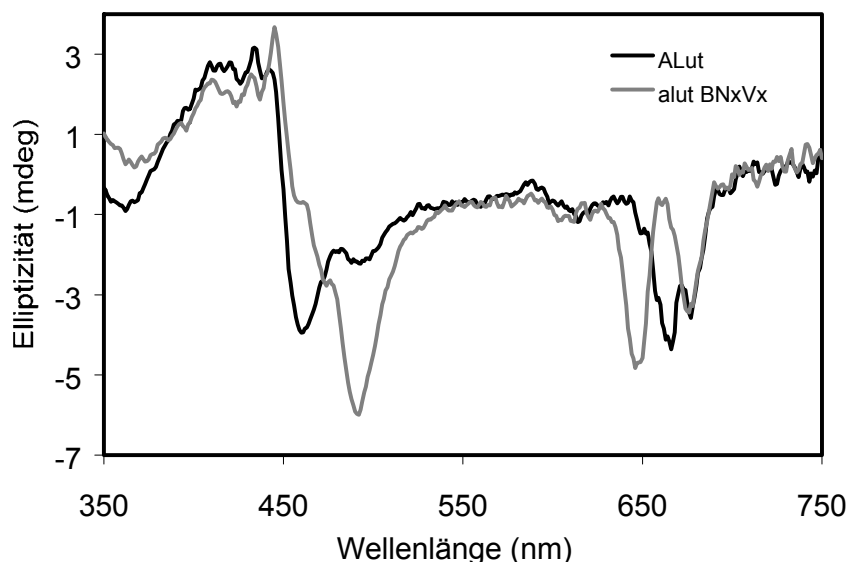


Abb. 3.4.13: CD Spektren des LHCIIb nach kinetischen Experimenten zur Faltung und Pigmentbindung bei Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten. 1. Mischschritt: Lhcb1 mit Chl a und Lutein (ALut). 2. Mischschritt: Zugabe von Chl b, Nx und Vx (alut BNxVx) (nach 1. Mischschritt:  $3.9 \mu\text{M}$  Lhcb1  $28.5 \mu\text{M}$  Lutein,  $71 \mu\text{M}$  Chl a  $\rightarrow$  1.5fach Überschuss. Nach 2. Mischschritt:  $1.8 \mu\text{M}$  Lhcb1,  $23.5 \mu\text{M}$  Lut+Nx+Vx,  $71 \mu\text{M}$  Chl a+b)

Chl a und Lutein alleine sind demnach erstens in der Lage mit dem Protein zu interagieren und zweitens aufgrund dieser Interaktion in der Lage durch excitonische Kopplung charakteristische, von intrinsischen Signalen der freien Pigmente unterschiedliche, CD Signale auszubilden. Des Weiteren scheinen diese Interaktionen zu einer Beschleunigung der Vorgänge von Faltung und Pigmentbindung zu führen, die anhand der Ausbildung des CD Signals bei 492 nm beobachtet werden und nach der Zugabe von Chl b bis zur Fertigstellung des Komplexes stattfinden, wobei sich diese Annahme auf die Beobachtung stützt, dass ein Teil der Signaländerung in der Totzeit verloren geht und dadurch eine Reaktionszeit besitzen muss, die bei Zugabe der Pigmente in einem einzelnen Schritt bisher nicht aufgelöst wurde.

Wird im 1. Mischschritt Chl a mit Neoxanthin bzw. Violaxanthin als alleinigem Carotinoid angeboten, ergeben sich keine von freien Pigmenten unterschiedlichen CD Signale, bis auf geringe Unterschiede in der Intensität bei 460 nm. In Anwesenheit von Violaxanthin zeigt sich eine höhere Intensität, in Anwesenheit von Neoxanthin eine niedrigere Intensität gegenüber dem Spektrum von freiem Chl a und freien Carotinoiden ohne Protein (Abb. 3.4.14).

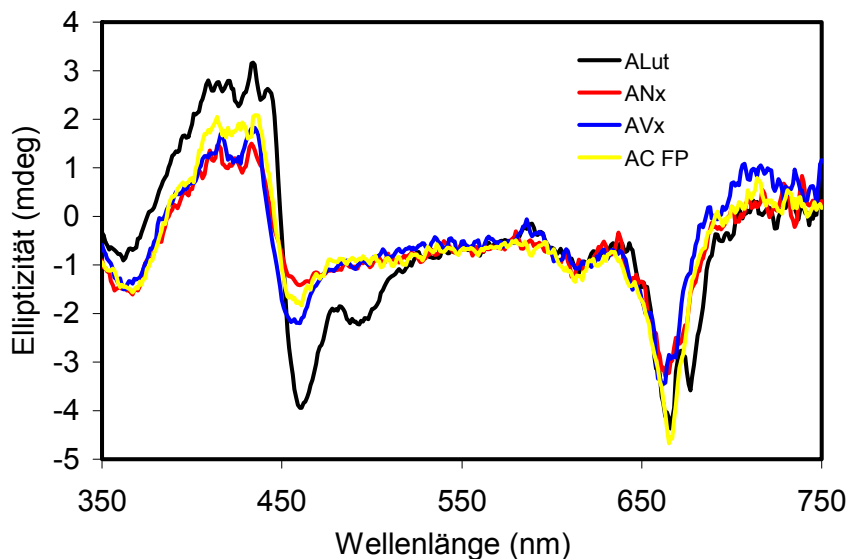


Abb. 3.4.14: CD Spektren nach Zugabe von Chl a und einzelnen Carotinoidspezies zum Apoprotein Lhcb1 des LHCIIb. Zugabe von Chl a und Lutein (schwarze Linie), Chl a und Neoxanthin (rote Linie), Chl a und Violaxanthin (blaue Linie), Chl a und Carotinoide in Abwesenheit von Lhcb1 (gelbe Linie, FP freies Pigment). (3.9  $\mu\text{M}$  Lhcb1, 28.5  $\mu\text{M}$  Lutein oder 9.5  $\mu\text{M}$  Neoxanthin oder Violaxanthin, 71  $\mu\text{M}$  Chl a  $\rightarrow$  1.5fach Überschuss)

Die Kinetik nach Zugabe der restlichen Pigmente im 2. Mischschritt entspricht der Signaländerung, die nach Zugabe des kompletten Pigmentangebotes in einem Mischschritt beobachtet wird. Dabei wurden Nx und Vx jeweils entsprechend ihrem Verhältnis im Gesamtextrakt eingesetzt (jeweils 1/3 der Menge an Lutein), so dass auch die Möglichkeit besteht, dass die Konzentration in der Pigmentlösung zu gering war. Ob sich bei einer Erhöhung der Konzentration ein Effekt einstellt, konnte jedoch im Rahmen der Arbeit nicht mehr nachgeprüft werden. Das Gleiche gilt, wenn im 1. Mischschritt Chl b alleine mit Nx oder Vx angeboten wird. Auch Carotinoide alleine ohne Chl zeigen keinen Effekt. Nicht auszuwerten ist die Zugabe von Chl a und Chl b ohne Carotinoide im 1. Mischschritt, da in der eingesetzten Konzentration die freien Chl alleine schon ein recht großes Signal um 492 nm

zeigen, so dass zu erwartende Signaländerungen nach Zugabe der Carotinoide im 2. Mischschritt vor diesem Hintergrund verloren gehen.

### 3.4.8 Die Anwesenheit von Neoxanthin (und Violaxanthin) im Komplex hat einen Anteil am Signal bei 492 nm.

Wird nach Zugabe von Chl a und Lutein im 1. Mischschritt nur Chl b im 2. Mischschritt dazugegeben, zeigt sich eine deutliche Verringerung des gesamten Signals bei 492 nm (Abb. 3.4.15). Der Startpunkt der Kinetik nach Zugabe von Chl b alleine ist weiter nach oben verschoben und beginnt nur noch knapp unterhalb des Endpunktes der Kinetik nach dem 1. Mischschritt. Jedoch ist er nicht bis auf die Höhe des Startpunktes der Kinetik nach Zugabe des kompletten Pigmentangebotes verschoben. Der Verlauf der Signaländerung unterscheidet sich nicht vom Verlauf der Signaländerung, die nach Zugabe von Chl b mit Nx und Vx beobachtet wird, so dass angenommen werden kann, dass die Vorgänge, die durch die langsamere Reaktionszeit um 5 min charakterisiert werden, unabhängig von Neoxanthin und Violaxanthin ablaufen.

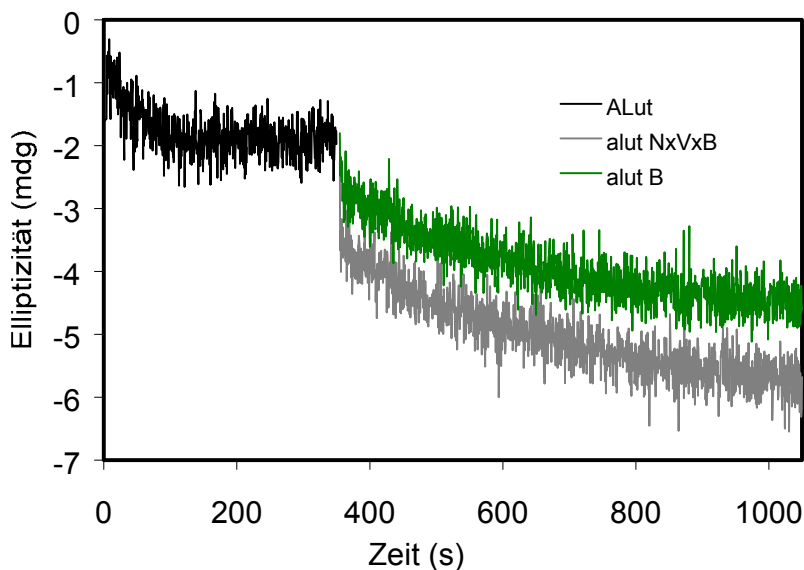


Abb. 3.4.15: Zeitaufgelöste CD Messung der Faltung und Pigmentbindung des LHCIIb bei Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten, wobei nach Zugabe von Chl a und Lutein im 1. Mischschritt (schwarze Linie) im 2. Mischschritt Chl b mit Nx und Vx (graue Linie) bzw. nur Chl b dazugegeben wird (grüne Linie). (1. Schritt: Proteinlösung: 7.8  $\mu\text{M}$  Lhcb1; Pigmentlösung: 57  $\mu\text{M}$  Lutein, 142  $\mu\text{M}$  Chl a  $\rightarrow$  1.5fach Überschuss. 2. Schritt: Pigmentlösung: 18  $\mu\text{M}$  Nx+Vx, 71  $\mu\text{M}$  Chl b oder nur Chl b)

Dass die Anwesenheit von Neoxanthin und Violaxanthin nicht nur einen Einfluss auf das CD Signal bei 492 nm haben, zeigen die Spektren in Abb. 3.4.16. Ist nur Lutein im Komplex gebunden, ist das Maximum bei 492 nm zu einer Flanke reduziert während sich die Schulter im Bereich von 474 nm zu einem Maximum ausgebildet hat. Ebenfalls eine Reduktion in der Signalintensität kann für das negative Maximum bei 650 nm beobachtet werden.

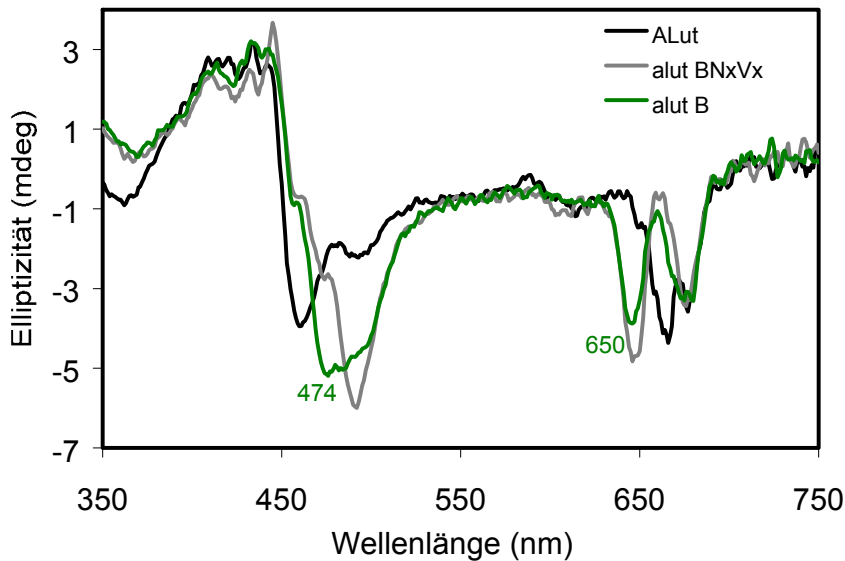


Abb. 3.4.16: CD Spektren des LHCIIb nach kinetischen Experimenten zur Faltung und Pigmentbindung bei Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Schritten (1. Chl a und Lutein schwarze Linie, 2. Chl b, Nx und Vx). Die blaue Linie zeigt das Spektrum nach dem 2. Mischschritt, wenn nur Chl b dazugegeben wird. (1. 3.9  $\mu\text{M}$  Lhcb1 28.5  $\mu\text{M}$  Lutein, 71  $\mu\text{M}$  Chl a  $\rightarrow$  1.5fach Überschuss. 2. 1.8  $\mu\text{M}$  Lhcb1, 23.5  $\mu\text{M}$  Lut+Nx+Vx bzw. 14  $\mu\text{M}$  Lutein alleine, 71  $\mu\text{M}$  Chl a+b)

#### 3.4.9 Nach Mischung von Chl a, Carotinoiden und Lhcb1 scheint sich schon ein Teil $\alpha$ -helikaler Struktur des Proteins auszubilden

Neben der Bindung der Pigmente ist der zweite wichtige Prozess der Komplexassemblierung die Ausbildung der Sekundärstruktur. Wie in Ergebnisteil 3.1 gezeigt, muss sich, ausgehend vom SDS- gelösten Protein, im Verlauf der Rekonstitution noch etwa 40 % der  $\alpha$ - helikalen Struktur des funktionellen Komplexes bilden, wobei dieser Prozess eng an die Bindung der Pigmente gekoppelt ist. Die Ausbildung der Sekundärstruktur lässt sich mit der Methode der CD Spektroskopie beobachten, mit der im UV Bereich für die drei Arten von Sekundärstruktur unterschiedliche charakteristische Spektren aufgenommen werden können. Das Spektrum eines  $\alpha$ - helikale Proteins, wie es der LHCIIb ist, zeigt negative Maxima bei 222 nm und 205 nm und ein positives Maximum bei 195 nm mit einem Verhältnis der Intensitäten von 195 nm zu 222 nm von 2/3 zu 1/3 (vgl. Abb. 3.1.1). Zeitaufgelöste Messung der Ausbildung der Sekundärstruktur erfolgt anhand der Zunahme des Signals bei 222 nm. Nachdem sich mittels Fluoreszenz- und CD Spektroskopie im sichtbaren Bereich die Interaktion von Chl a und Lutein mit Lhcb1 und die dadurch ermöglichte excitonische Kopplung der Pigmente untereinander nachweisen ließ, war eine weitere interessante Frage, in wie weit auch schon weitere Anteile der  $\alpha$ - Helices in dieser Phase ausgebildet werden. Dabei wurden im Rahmen der Arbeit keine ausführlichen Experimente mehr zu dieser Fragestellung durchgeführt, erste Ergebnisse zeigen aber, dass zumindest ein kleiner Teil an  $\alpha$ - Helix in der Phase ausgebildet wird, in der Chl a und Lutein mit dem Protein interagieren. Abb. 3.4.17 zeigt die Signaländerungen bei 222 nm nach Zugabe von Chl a und Carotinoiden, Chl a und Lutein und Chl a+b und Carotinoide jeweils mit einem 1.5fachen stöchiometrischen Chlorophyll Überschuss.

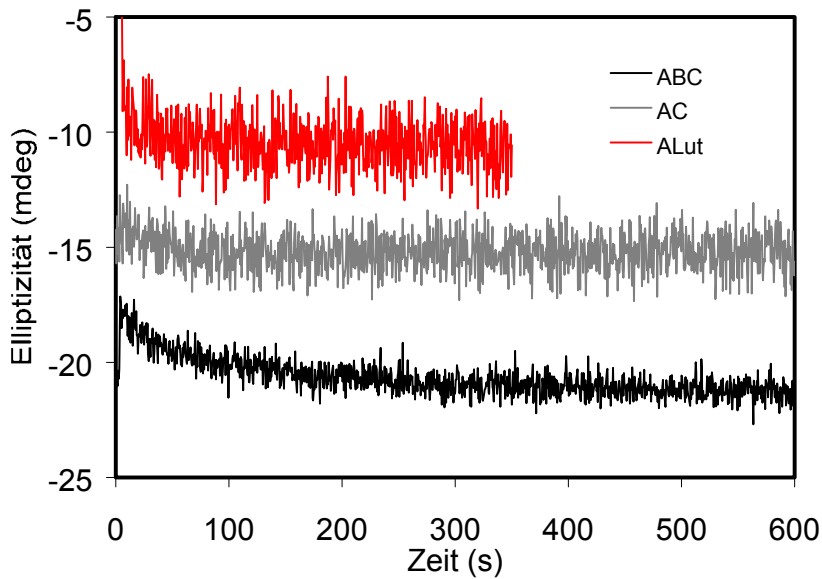


Abb. 3.4.17: Zeitaufgelöste UV-CD Messung der Ausbildung  $\alpha$ -helicaler Strukturen des Lhcb1 anhand der Zunahme an Elliptizität bei 222 nm bei Zugabe von Chl a+b und Carotinoiden (schwarze Linie), Chl a und Carotinoide (graue Linie) und Chl a und nur Lutein (rote Linie). (Proteinlösung: 7.8  $\mu\text{M}$  Lhcb1; Pigmentlösung: 71  $\mu\text{M}$  Chl a+b oder nur Chl a  $\rightarrow$  1.5fach Überschuss, 47  $\mu\text{M}$  Carotinoide  $\rightarrow$  4fach Überschuss oder 28.5  $\mu\text{M}$  Lutein)

Die Startpunkte entsprechen dabei nicht den tatsächlich gemessenen Werten, sondern wurden für den besseren Vergleich nachträglich so gewählt. Die unterschiedlichen Signal- zu- Rausch-Verhältnisse kommen daher, dass die gezeigte Kinetik der Messung nach Zugabe des gesamten Pigmentangebotes insgesamt einen Durchschnitt von 8 unabhängigen Experimenten entspricht, die Kinetik der Messung nach Zugabe von Chl a und Carotinoiden einem Durchschnitt von 5 unabhängigen Experimenten und die Messung nach Zugabe von Chl a und Lutein nur mit einer Signaländerung eines einzelnen Experimentes dargestellt ist. Nach Zugabe von Chl a+b und Carotinoiden kann deutlich die größte Signaländerung beobachtet werden, die die Ausbildung des restlichen Anteils an  $\alpha$ - Helix auf dem Weg zu einem funktionellen LHCIIB widerspiegelt. Die Anpassung einer biexponentiellen Funktion liefert die Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  von 21 s und 165 s für die beiden apparenten Schritte, wobei der Schwerpunkt in der Amplitude des langsameren Schrittes liegt,  $A_1/A_2 = 0.7$ . Auch bei Zugabe von nur Chl a und Carotinoiden bzw. Lutein zeigt sich eine Zunahme des Signals bei 222 nm, so dass angenommen werden kann, dass sich in der Phase, in der Chl a und Lutein mit dem Protein in Abwesenheit von Chl b interagieren tatsächlich auch schon weitere Teile der Sekundärstruktur ausbilden. Die Signaländerungen lassen sich mit einer monoexponentiellen Funktion anpassen, so dass nur jeweils eine Reaktionszeit ermittelt wird, die bei 26 s bzw. 22 s liegt. Dabei ist zu beachten, dass aufgrund des niedrigen Signal- zu- Rausch- Verhältnisses die Anpassung sehr schlecht ist und darum die Werte für die Reaktionszeiten hier nur als erste Näherung betrachtet werden sollten. Um wie viel Prozent der gesamten Struktur es sich hier handelt und in wie weit sich nach Zugabe von Chl b im 2. Mischschritt die Signaländerung entwickelt wurde im Rahmen der Arbeit nicht mehr untersucht. Da des weiteren auch keine Kontrollexperimente durchgeführt wurden und wie erwähnt auch das Signal zu Rausch Verhältnis sehr schlecht ist, können die gezeigten Ergebnisse zunächst nur als Hinweis gelten, dass in einer Phase der Komplexbildung ohne

Chl b neben der Interaktion von Chl a und Lutein mit dem Protein und excitonischer Kopplung der Pigmente untereinander auch Veränderungen im Bereich des Proteins selbst, der Sekundärstruktur stattfinden.

## 4. Diskussion

### **4.1 Die Verwendung verschiedener Monitore ermöglicht die Beobachtung verschiedener Faltungseignisse während der Assemblierung des LHCIIb**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Assemblierung des LHCIIb durch zeitaufgelöste Messungen mittels spektroskopischer Methoden untersucht. Dabei wurden die Messungen an einer gesamten Population von Proteinen, d.h. im Ensemble und nicht am einzelnen Molekül durchgeführt. Durch die Verwendung der Methoden der CD- und der Fluoreszenzspektroskopie konnte die Komplexbildung zum einen auf der Ebene der Proteinstruktur und zum anderen auf der Ebene der Pigmentbindung betrachtet werden. Da in Abhängigkeit der verwendeten Methode, d.h. des verwendeten Monitors, unterschiedliche Interaktionen für eine Signaländerung verantwortlich sind, konnten mit mehreren Monitoren unterschiedliche Faltungseignisse beobachtet werden.

#### **4.1.1 CD-Signale im UV-Bereich: ein direkter Blick auf die Ausbildung der Sekundärstruktur**

Verantwortlich für die Entstehung von CD-Signalen im UV-Bereich ist die excitonische Kopplung der Übergangsdipole der Peptidbindungen, die in Abhängigkeit von der Sekundärstruktur verschiedene Anordnungen einnehmen. So ergeben sich charakteristische Spektren im UV-Bereich, die eine Unterscheidung der drei Haupttypen,  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Zufallsknäuel erlauben (vgl. 2.3.2).

Durch die Strukturaufklärung des LHCIIb durch Kühlbrandt *et al.* (1994) konnte dem Komplex eine, für Membranproteine typische,  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur zugeordnet werden, so dass das CD-Spektrum die charakteristischen Maxima bei 195 nm, 205 nm und 222 nm zeigt (vgl. 3.1.1). Im Spektrum des SDS-denaturierten Lhcb1 dagegen haben besonders die Signale bei 195 nm und 222 nm eine deutlich geringere Intensität. Eine Zunahme der Signale spiegelt demnach direkt eine Zunahme an  $\alpha$ -helikaler Struktur wieder. Die Wahl der Signaländerung bei 195 nm oder 222 nm als Monitor erlaubt so einen direkten Blick auf die Ausbildung der Sekundärstruktur während der Komplexbildung.

#### **4.1.2 Fluoreszenzsignale: ein indirekter Blick auf die Bindung der Chlorophylle**

Die zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenz-Signale, des Donor-Farbstoffs bzw. der Chlorophylle, ermöglicht nur eine indirekte Beobachtung der Komplexbildung, genauer der Pigmentbindung. In beiden Fällen kann ein „Faltungseignis“ nur detektiert werden, d.h. findet eine Signaländerung nur dann statt, wenn Energietransfer zwischen mindestens zwei Partnermolekülen stattfindet. Der Fokus liegt dabei auf dem gesamten Komplex, es kann nicht zwischen Vorgängen an verschiedenen Bereichen des Proteins unterschieden werden. Aufgrund der unterschiedlichen Voraussetzungen für eine Signaländerung ist der

Chlorophyllmonitor gegenüber dem Farbstoffmonitor jedoch schon eingeschränkter in seinen Detektions-Möglichkeiten. Werden die Chlorophyllfluoreszenzen als Monitor für die Komplexbildung verwendet, kann ein „Faltungseignis“ erst beobachtet werden, wenn mindestens ein Chl b- und ein Chl a-Molekül gebunden sind und der Energietransfer zwischen den beiden Molekülen auch möglich ist. In Anwesenheit des Farbstoffes sollte dagegen schon die Bindung von einem Chlorophyllmolekül ausreichend sein, damit Energietransfer stattfinden kann. Bindungseignisse der Carotinoide dagegen können mit beiden Monitoren nicht beobachtet werden.

### 4.1.3 CD-Signale im sichtbaren Bereich: ein indirekter Blick auf die Bindung von Chlorophyllen und Carotinoiden

Die zeitaufgelöste Messung von CD-Signalen im sichtbaren Bereich ermöglicht ebenso wie die Messung der Fluoreszenzsignale nur eine indirekte Beobachtung der Pigmentbindung. Auch mit dieser Methode kann ein „Faltungseignis“ nur detektiert werden, wenn eine Interaktion zwischen mindestens zwei Partnermolekülen stattfindet. Dabei können jedoch abhängig vom Wellenlängenbereich die charakteristischen Maxima durch die Wechselwirkung von mindestens zwei Pigmenten in fast jeder Kombination entstehen. Ebenso können Interaktionen zwischen einzelnen Pigmenten und dem Protein für CD-Signale verantwortlich sein. Je nach der Wahl der Wellenlänge ist demnach der Monitor sehr speziell auf nur wenige Bereiche des Komplexes und auch Vorgänge der Pigmentbindung gerichtet. Im Gegensatz zu den Fluoreszenzmonitoren können Bindungseignisse von Chlorophyllen und Carotinoiden beobachtet werden.

### 4.1.4 Die Faltungseignisse gliedern sich in einen schnelleren und einen langsameren Schritt

Grundsätzlich ließen sich die aufgenommenen Signaländerungen aller Monitore mit einer biexponentiellen Funktion anpassen, so dass die Assemblierung des LHCIIb anhand der verschiedenen Faltungseignisse in einen schnelleren und einen langsameren apparenten Schritt unterteilt werden kann.

Charakterisiert werden diese Schritte durch ihre Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  und den dazugehörigen Amplitude  $A_1$  und  $A_2$  (vgl. 2.3.3). In den folgenden Abschnitten der Diskussion sollen durch den Vergleich der Reaktionszeiten und Amplituden der verschiedenen Monitore die verschiedenen Faltungseignisse miteinander verknüpfen werden, um auf diese Weise die Komplexbildung aus verschiedenen Blickwinkeln gleichzeitig betrachten zu können.

Um einen besseren Überblick über die verschiedenen Messungen zu geben, befindet sich im Anhang unter 7.III eine Tabelle, in der die verschiedenen Reaktionszeiten zusammengefasst sind.

### **4.2 Die Assemblierung des LHCIIb auf der Ebene der Proteinstruktur: UV-CD-spektroskopische Untersuchungen**

Anhand des CD-Monitors bei 222 nm konnte die Assemblierung des LHCIIb auf der Ebene der Proteinstruktur untersucht werden. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Ausbildung der  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur und die Bindung der Pigmente innerhalb eines ähnlichen Zeitbereiches stattfinden. Ausgehend vom SDS-denaturierten Zustand wird jedoch nur noch ein Teil der Helices ausgebildet.

#### **4.2.1 Der Lhcb1 weist im SDS-denaturierten Zustand eine $\alpha$ -helikale Struktur auf**

Ein Vergleich der CD-Spektren des LHCIIb und des SDS-denaturierten Lhcb1 zeigt deutliche Unterschiede in den Intensitäten der Signale bei 195 nm und 222 nm, die charakteristisch für eine  $\alpha$ -helikale Struktur sind. Durch die Analyse der Anteile an Sekundärstruktur nach der Methode von Sreerama und Woody (1993, vgl. 2.3.3) ergibt sich eine Helikalität von 41 % für den funktionellen Komplex und eine von 27 % für das Apoprotein. Im SDS-denaturierten Zustand des Lhcb1 sind demnach schon 60 % der Sekundärstruktur des LHCIIb vorhanden. Dass das Protein im SDS-denaturierten Zustand nicht vollständig entfaltet vorliegt, wurde schon von Paulsen *et al.* (1993) anhand von CD-Spektren im UV-Bereich beobachtet.

Der stabilisierende Effekt von SDS auf  $\alpha$ -helikale Strukturen ist ebenfalls von weiteren Membranproteinen bekannt. So besitzt Bakteriorhodopsin (bR), ein Membranprotein mit 7 Helices, im SDS-denaturierten Zustand schon etwas mehr als die Hälfte der helikalen Struktur des nativen Zustandes, ein Equivalent von etwa 4 transmembranen Helices (Riley *et al.* 1997). Im Enzym Diacylglycerol Kinase aus *E. coli* (DGK) sind im SDS-denaturierten Zustand sogar noch ungefähr 85 % der helikalen Struktur vorhanden (Lau & Bowie, 1997). Alle drei Membranproteine können ebenso wie der Lhcb1, aus diesem unvollständig entfalteten Zustand in den der nativen Struktur entsprechenden Zustand gebracht werden.

#### **4.2.2 Die $\alpha$ -helikale Struktur des SDS-denaturierten Lhcb1 ist gleichmäßig über das Protein verteilt**

Mit der Aufnahme von CD-Spektren im UV-Bereich lassen sich Proteine hinsichtlich ihrer Sekundärstrukturen analysieren, eine Zuordnung der einzelnen Strukturen zu bestimmten Domänen ist jedoch nicht möglich. So kann anhand des Spektrums des SDS-denaturierten Lhcb1 keine Aussage darüber gemacht werden, wie sich die 27 % an Helikalität über das gesamte Protein verteilen und ob es möglicherweise zu einer lokalen Konzentration der helikalen Struktur kommt.

Die Analyse der Sekundärstruktur der verschiedenen ebenfalls SDS-denaturierten Deletionsmutanten des Lhcb1 zeigt, dass alle in etwa  $\frac{3}{4}$  des Anteils an  $\alpha$ -helikaler Struktur des theoretisch vollständig gefalteten Proteins besitzen (vgl. Tab. 3.1.2). Bei einer tatsächlichen Beschränkung des Anteils an  $\alpha$ -helikaler Sekundärstruktur, bereits vorhanden im SDS denaturierten pLhcb1, auf bestimmte Bereiche des Proteins, wären Unterschieden für die

Werte der verschiedenen Fragmente zu erwarten gewesen. Die  $\alpha$ -helikale Struktur ist demnach nicht auf bestimmte Abschnitte des Lhcb1 konzentriert, sondern eher gleichmäßig wahrscheinlich auf die im LHCIIb helikalen Bereiche verteilt.

### 4.2.3 Die Pigmentbindung ist eine Voraussetzung für die Ausbildung der $\alpha$ -helikalen Struktur

Nach dem Start der Komplexbildung durch die Mischung des SDS-denaturierten Proteins mit den Pigmenten lässt sich die Ausbildung der noch fehlenden 40 % an Helikalität des funktionellen LHCIIb anhand des CD-Monitors bei 222 nm beobachten. Dass die Zunahme an Elliptizität tatsächlich die Bildung an  $\alpha$ -helikaler Struktur reflektiert, zeigt die entsprechende Zunahme des Signals bei 195 nm mit den gleichen Reaktionszeiten und einer um das doppelte größeren Gesamtamplitude.

Ein Zusammenhang der Pigmentbindung mit der Ausbildung der Sekundärstruktur konnte schon durch Untersuchungen am fertigen Komplex nachgewiesen werden, bei denen sich zeigte, dass eine dauerhafte und damit stabile Ausbildung der Sekundärstruktur an die Bindung der Pigmente gekoppelt ist (Paulsen *et al.* 1993). Eine Aussage über den zeitlichen Ablauf beider Prozesse ist jedoch erst durch die zeitaufgelösten Messungen der vorliegenden Arbeit möglich. Diese zeigen, dass in Abwesenheit der Pigmente kein Anstieg des Signals bei 222 nm stattfindet, der Anteil an Sekundärstruktur demnach nicht weiter zunimmt. Die Bindung der Pigmente dient somit nicht erst nachträglich der Stabilisierung einer ausgebildeten Struktur, sondern ist eine Voraussetzung für den Start des Prozesses.

### 4.2.4 Die Ausbildung der Sekundärstruktur ist auch im weiteren Verlauf mit der Pigmentbindung gekoppelt

Die Zunahme an  $\alpha$ -helikaler Struktur, ausgehend vom SDS-denaturierten Lhcb1, findet vollständig innerhalb der zeitlichen Auflösung des Experimentes statt und lässt sich in zwei apparente Schritte mit den Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  von 11 s und 104 s unterteilen. Diese Reaktionszeiten zeigen eine gute Übereinstimmung mit den Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , die unter den gleichen Bedingungen für die beiden Schritte der Pigmentbindung anhand des Chl b-Monitors aufgelöst werden (Reinsberg 2000, vgl. Tab. 7.III). Beide Prozesse finden demnach im gleichen Zeitfenster statt, wobei der langsamere Schritt der Ausbildung der Sekundärstruktur erst etwas nach der Pigmentbindung abgeschlossen zu sein scheint. Der Unterschied der Amplituden zeigt, dass beide Prozesse unterschiedlich gewichtet sind. Der Hauptteil der Chlorophylle, die am Energietransfer beteiligt sind, bindet während des langsameren Schrittes, während sich der größere Teil an Sekundärstruktur im schnelleren Schritt ausbildet.

Dass sich die beiden Vorgänge in ihren Geschwindigkeiten durch den gleichen Faktor limitieren lassen zeigt, dass sie während des weiteren Ablaufs der Komplexbildung miteinander gekoppelt sind. In der vorliegenden Arbeit konnten die Reaktionszeiten der beiden apparenten Schritte, die für die Ausbildung der Sekundärstruktur aufgelöst werden, durch eine Reduktion der Carotinoidkonzentration um etwa das Doppelte verlängert werden. Die

Pigmentbindung wird nach Reinsberg *et al.* (2001) durch eine entsprechend geringere Carotinoid-Menge um den gleichen Faktor verlangsamt.

### 4.2.5 Die Faltung des LHCIIb entspricht nicht dem „Two-Stage-Modell“ der Faltung von Membranproteinen

Für die Faltung von Membranproteinen wurde nach dem Vorbild der Faltung von bR das so genannte „Two-Stage-Modell“ aufgestellt (vgl. 1.7.2). Dieses sieht vor, dass sich die helikalen Transmembranbereiche in einem ersten Schritt zunächst unabhängig voneinander ausbilden können und auch stabil sind, in einem zweiten Schritt miteinander interagieren und daraufhin die Ausbildung der Tertiärstruktur induziert wird. Die Bindung von möglichen Kofaktoren findet nach dem Modell erst gegen Ende der Faltungsvorgänge statt (Popot & Engelmann 1990). So findet bei der Faltung von bR die Bindung des Kofaktors Retinal erst an ein Intermediat I<sub>2</sub> statt, das schon einen dem nativen Zustand entsprechenden Anteil an  $\alpha$ -helikaler Struktur besitzt. Die Ausbildung der Sekundärstruktur ist demnach unabhängig von der Bindung des Kofaktors. Der Faltungsprozess des LHCIIb läuft nach den vorliegenden Ergebnissen nicht getrennt in Bildung der Sekundärstruktur und Bindung der Kofaktoren, d.h. der Pigmente ab. Wie in den vorausgehenden Abschnitten erläutert wurde, finden die einzelnen Schritte vielmehr parallel und miteinander gekoppelt statt. Auch zeigen die Bereiche der einzelnen Helices keine vollständige stabile Sekundärstruktur in Abwesenheit der Pigmente.

Ein nachvollziehbarer Grund für die unterschiedlichen Verhaltensweisen der beiden Membranproteine bR und LHCIIb liegt in der unterschiedlichen Anzahl der gebundenen Kofaktoren. Im LHCIIb müssen mindestens 12 Chlorophylle und 3 Carotinoide auf spezifische Weise in die Struktur eingepasst werden und spielen dort eine wichtige Rolle für die Stabilität des Komplexes, was in einer Reihe von Mutationsanalysen und Pigmentbindungsstudien beobachtet werden konnte (Yang *et al.* 1999, Remelli *et al.* 1999, Croce *et al.* 1999b, Formaggio *et al.* 2001). Während der Ausbildung der Sekundärstruktur erscheint für die Bindung der Pigmente an verschiedenen Stellen eine limitierende Rolle möglich zu sein. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann jedoch nur vermutet werden, welches diese Stellen sein könnten.

Im Folgenden sollen zwei Möglichkeiten der Limitierung durch die Chlorophylle und die Carotinoide vorgestellt werden.

#### (1) Mögliche Rolle der Chlorophylle während der Faltung:

Für die Bindung der Chlorophylle befindet sich eine Reihe von polaren und pH-abhängig auch geladenen Aminosäuren innerhalb der transmembranen Bereiche. Es sind dies Histidin, Glutamat, Asparagin und Glutamin (Kühlbrandt *et al.* 1994). Grundsätzlich besteht die Triebkraft für die Ausbildung einer  $\alpha$ -helikalen Struktur von Transmembranbereichen darin, dass der Aufenthalt des Proteinrückgrates innerhalb der hydrophoben Umgebung energetisch wesentlich günstiger ist, wenn die Peptidbindungen untereinander Wasserstoff-Brücken ausbilden (White & Wimley 1999). Anhand der Primärstruktur lassen sich solche Bereiche oft durch eine Ansammlung von hydrophoben Aminosäuren charakterisiert. Das Vorkommen von polaren Aminosäuren ist jedoch nicht selten, wobei die Polarität aber z.B. durch die Ausbildung von Salz-Brücken verringert wird und somit diese Aminosäuren leichter in die hydrophobe

Umgebung eingepasst werden können (Popot & Engelman 2000). Im LHCIIb findet dies für die Aminosäuren Glutamat und Arginin statt (Kühlbrandt *et al.* 1994).

Für die Aminosäuren, die im LHCIIb als Chlorophyll-Liganden dienen, könnte die Bindung der Chlorophylle für eine Verringerung der Polarität sorgen. In Abwesenheit der Chlorophylle sollte es für diese polaren Abschnitte energetisch noch günstiger sein, sich mit einer eher ungeordneten Struktur in der hydrophileren Puffer-Umgebung aufzuhalten. Die helikale Struktur des unpigmentierten SDS-denaturierten Lhcb1 wäre dann auf die Bereiche der hydrophoben Aminosäuren beschränkt. Erst durch die Bindung der Chlorophylle würde die Polarität der Aminosäuren gesenkt und so der Aufenthalt für einen deutlich längeren Bereich des Proteins innerhalb einer hydrophoben Mizellen-Umgebung mit einer helikalen Struktur günstiger.

Um genauere Hinweise auf die gegenseitige Beeinflussung der Pigmentbindung und der Ausbildung der Sekundärstruktur im weiteren Verlauf der Komplexbildung zu erhalten, müssten z.B. CD-Kinetiken bei unterschiedlichen Chlorophyll-Überschüssen aufgenommen werden.

### (2) Mögliche Rolle der Carotinoide während der Faltung:

Bei bR ist die Interaktion von fünf schon gefalteten Helices wahrscheinlich die Voraussetzung dafür, dass sich auch in den verbleibenden zwei transmembranen Bereichen eine helikale Struktur ausbildet (vgl. 4.1.3). Falls die engere Packung der Proteinstruktur ebenfalls ein limitierender Schritt für die Faltung des LHCIIb ist, wäre anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung der Carotinoide an diesem Vorgang zu vermuten. Da Lutein als hauptverantwortlich für die Beeinflussung der Faltungsgeschwindigkeit angesehen wird und die zwei Moleküle im Zentrum des Komplexes für Stabilität sorgen (Reinsberg *et al.* 2001, Kühlbrandt *et al.* 1994), wäre es vorstellbar, dass eine engere Packung der Helices I und III durch die Bindung des Pigments unterstützt wird.

In dem Zusammenhang erscheint auch die Ausbildung der beiden Salz-Brücken zwischen den Helices I und III als ein wichtiger Faktor, da sie ebenfalls für eine Stabilität des Komplexes sorgen (Remelli *et al.* 1999). Ob in Abwesenheit der Salz-Brücke überhaupt Komplexe gebildet werden scheint abhängig von den ausgetauschten Aminosäuren zu sein (Heinemann & Paulsen 1999, Remelli *et al.* 1999, Rogel & Kühlbrandt 1999). Welchen Einfluss die Ausbildung der Salz-Brücke auf die Ausbildung der Sekundärstruktur hat, sollte anhand von zeitaufgelösten Messungen mit Mutanten des Lhcb1 beobachtet werden können, denen die verantwortlichen Aminosäuren fehlen.

### 4.2.6 Der LHCIIb faltet sich ähnlich schnell wie andere Membranproteine

Die Geschwindigkeit der Faltung des LHCIIb, mit den Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  der beiden apparenten Schritte von 11 s und 104 s, ist vergleichbar mit der Geschwindigkeit anderer Membranproteine. So werden bei der Faltung von bR in Detergens/Lipidvesikeln in einem limitierenden Schritt in der Bildung des Intermediats I<sub>2</sub>, 40 % des verbleibenden helikalen Anteils mit einer Reaktionszeit um 2 min ausgebildet; 60 % der Reaktion erfolgen in der experimentellen Totzeit von 20 s (Riley *et al.* 1997). Für das „Outer Membrane Protein A“ (OmpA) von *E. coli*, dessen Sekundärstruktur aus einem so genannten „ $\beta$ -barrel“ besteht, d.h.

einer Art Faserstruktur aus  $\beta$ -Faltblättern, wird der Übergang von einer teilweise gefalteten Struktur in Wasser zur nativen Sekundärstruktur mit einer Reaktionszeit von 5 min aufgelöst (Surrey & Jähnig 1995).

### 4.2.7 Lösliche Proteine falten sich deutlich schneller als Membranproteine

Im Vergleich zu Membranproteinen erreichen löslichen Proteinen ihren gefalteten Zustand meistens mit deutlich kürzeren Reaktionszeiten im Bereich von wenigen Millisekunden. Unter experimentellen Bedingungen von 5°C erfolgt z.B. für das „Acyl-Coenzyme A Binding Protein“ (ACBP), einem 4-Helix-Bündel Protein, die Ausbildung der Sekundärstruktur in einem Schritt von 25 ms (Kragelund *et al.* 1995). Mit einer Reaktionszeit unter 5 ms faltet sich das „cold-shock Protein“ (CspB) des *Bacillus subtilis*, ein kleines aus 5 Strängen bestehendes  $\beta$ -barrel Protein (Schindler *et al.* 1995). Beide löslichen Proteine zeigen keine Akkumulation von Intermediaten und falten sich dementsprechend nach dem „Two-state-Modell“ (vgl. 1.7.1). Vertreter der löslichen Proteine, die auf ihrem Faltungsweg Intermediate ausbilden sind z.B. Myoglobin, ein 8-Helix-Protein, und Cytochrom c, ein 3-Helix-Protein. Cyanometmyoglobin, eine Variante von Myoglobin, bei der das Eisenatom des Häms zunächst am 5. und 6. Liganden durch ein Cyanid-Molekül besetzt ist, zeigt im nativen Zustand 80 % an Helikalität. Ausgehend von Harnstoff-denaturiertem Protein wird dieser Anteil an Sekundärstruktur in drei Schritten ausgebildet. Die Reaktionszeiten liegen bei > 10 ms, 100 ms und 500 s. Dabei ist schon nach den ersten beiden schnellen Schritten die Sekundärstruktur zu 95 % vorhanden und auch eine dem nativen Zustand ähnliche Tertiärstruktur ausgebildet (Chiba *et al.* 1994). Trotz der mehr als doppelten Anzahl an Helices ist die Faltungsgeschwindigkeit noch deutlich höher als die von LHCIIb. Für Cytochrom c wird ein Faltungsmodell postuliert, bei dem der endgültige Anteil an  $\alpha$ -helikaler Struktur in insgesamt drei Schritten ausgebildet wird, wobei unter Bedingungen mit niedrigem pH der native Zustand nach 10 ms erreicht wird (Akiyama *et al.* 2000).

Die Gründe für die deutlich unterschiedlichen Faltungsgeschwindigkeiten von löslichen Proteinen und Membranproteinen sollten in der Struktur und der spezifischen Umgebung der beiden Klassen zu finden sein. Möglicherweise müssen im Verlauf der Faltung durch die Interaktion der Seitenketten mit Detergens- oder Lipidmolekülen höhere Energiebarrieren überwunden werden, als durch die Interaktion mit Wassermolekülen. Eine weitere Einschränkung der Membranproteine könnte dadurch bedingt sein, dass ihre Bereiche an geordneter Sekundärstruktur deutlich länger sind, als die von löslichen Proteinen. So sind die  $\alpha$ -Helices von Membranproteinen in der Regel länger als 20 AS (White & Wimley 1999). Bei einer Neigung der Helices innerhalb der Membran sind sogar noch mehr AS beteiligt. Die Helix I des LHCIIb z.B. umfasst 35 AS (Kühlbrandt *et al.* 1994). Die helikalen Bereiche der löslichen Proteine ACBP und Cytochrom c, die im vorherigen Absatz vorgestellt wurden, sind dagegen nur 10 bis 15 AS lang (Kragelund *et al.* 1995, Qi *et al.* 1994).

### **4.3 Die Assemblierung ausgehend von vollständig ungefaltetem Lhcb1: fluoreszenzspektroskopische und UV-CD-spektroskopische Untersuchung**

Wird die Rekonstitution des LHCIIb durch die Mischung von SDS-denaturiertem Lhcb1 mit detergens-gelösten Pigmenten induziert, treffen diese nicht auf ein vollständig entfaltetes Protein. Wie in den Abschnitten 3.1 und 4.2 erläutert wurde, sind schon  $\approx 60\%$  des helikalen Anteils des funktionellen Komplexes vorhanden, wobei die strukturierten Bereiche über das Protein verteilt liegen.

Die Lösung des Lhcb1 in Guanidinium-Hydrochlorid (GuHCl) dagegen verhindert die Ausbildung von helikalen Strukturen, erkennbar anhand von CD-Spektren im UV-Bereich, denen das Signal um 222 nm fehlt (Yang *et al.* 2003). Auch aus diesem vollständig entfalteten Zustand kann nach der Mischung des Proteins mit den Pigmenten ein funktioneller Komplex gebildet werden, der sich in seinen biochemischen und spektroskopischen Eigenschaften nicht von dem Produkt der SDS-Rekonstitution unterscheidet (Yang *et al.* 2003). Das Vorhandensein eines Anteils an helikaler Struktur ist somit keine Voraussetzung für eine erfolgreiche Komplexbildung. Inwieweit die vollständige Ausbildung der Sekundärstruktur die Geschwindigkeit der Komplexbildung limitiert, wurde anhand des Vergleichs der GuHCl-Kinetiken mit den SDS-Kinetiken untersucht. Als Monitor der Pigmentbindung diente die Ausbildung des Energietransfers zwischen Chl b und Chl a, die Ausbildung der Sekundärstruktur sollte anhand des CD-Monitors bei 222 nm beobachtet werden.

#### **4.3.1 Die Ausbildung eines Anteils an $\alpha$ -helikaler Struktur ist nicht limitierend für die Geschwindigkeit der Pigmentbindung**

Wird der durch GuHCl vollständig denaturierte Lhcb1 mit den detergens-gelösten Pigmenten gemischt und auf diese Weise die Komplexbildung induziert, lässt sich anhand des Chl b-Monitors der Vorgang der Pigmentbindung ebenfalls in zwei apparente Schritte unterteilen. Ein Vergleich mit den Reaktionszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , die sich anhand der Kinetiken der SDS-Rekonstitution auflösen lassen zeigt, dass die Geschwindigkeit der Pigmentbindung unabhängig vom Grad der Denaturierung des Proteins die gleiche ist (vgl. Tab. 3.2.1, 7.III).

Die Ausbildung des gesamten Anteils an Sekundärstruktur beinhaltet demnach keine, die Pigmentbindung limitierenden Schritte.

Ausgehend vom SDS-denaturierten Protein ist die Bindung der Pigmente eine Voraussetzung für die Ausbildung des restlichen Anteils an  $\alpha$ -helikaler Struktur (vgl. 4.2.3). Ob die Pigmente auch schon zu Beginn, d.h. am vollständig ungefalteten Lhcb1 die Ausbildung der Sekundärstruktur induzieren, sollte anhand des CD-Monitors bei 222 nm untersucht werden.

### 4.3.2 Inwieweit die Ausbildung der Sekundärstruktur ausgehend von vollständig ungefalteten Lhcb1 durch die Pigmentbindung induziert wird bleibt unklar

Ein Vergleich von Kinetiken des CD-Monitors bei 222 nm mit den Kinetiken des Chl b-Monitors sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit, ausgehend vom vollständig ungefalteten Lhcb1, die Ausbildung der Sekundärstruktur durch die Pigmentbindung induziert wird.

Dabei ließ sich anhand des CD-Monitors bei 222 nm unabhängig von der An- oder Abwesenheit der Pigmente eine Signaländerung mit nahezu der gleichen Amplitude beobachten (vgl. Abb. 3.2.3). Die Mischung des GuHCl-denaturierten Proteins mit 2 % OG induziert demnach auch ohne eine Bindung von Pigmenten die Ausbildung von  $\alpha$ -helikalen Strukturen.

Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass der unpigmentierte Lhcb1 in 2% OG nicht löslich ist und aggregiert (Yang *et al.* 2003), so dass als Ursprung der Signaländerung die Induktion der helikalen Struktur durch eine fortschreitende Aggregation vermutet werden kann. Ebenso möglich wäre, dass zumindest ein Teil des Proteins in der Detergens-Umgebung in Lösung bleibt und OG ebenso wie SDS in der Lage ist,  $\alpha$ -helikale Strukturen zu stabilisieren. Da die angewandte Methode der Rekonstitution keine 100 %ige Ausbeute an gefalteten Komplexen ermöglicht (Yang *et al.* 2003), ist es wahrscheinlich, dass sich in Anwesenheit der Pigmente die Signaländerung des freien Proteins mit der Signaländerung der Komplexbildung überlagert.

Anhand des CD-Monitors bei 222 nm kann demnach nicht geklärt werden, in welchem Zeitrahmen die Ausbildung der Sekundärstruktur ausgehend von vollständig ungefaltetem Lhcb1 stattfindet.

Aufgrund der Zunahme des Signals bei 222 nm in Abwesenheit der Pigmente kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Detergens-Umgebung zunächst pigment-unabhängig die Bildung eines Teils der  $\alpha$ -helikalen Struktur induziert und erst die Ausbildung des restlichen Anteils eine Bindung der Pigmente voraussetzt.

#### **4.4 Die Assemblierung des LHCIIb auf der Ebene der Pigmentbindung: fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen**

Durch die Verwendung der beiden Fluoreszenzmonitore, Donor-Farbstoff- und Chl b-Monitor, konnten während der Assemblierung des LHCIIb unterschiedliche Pigmentbindungs-ereignisse beobachtet werden.

Anhand des Farbstoffmonitors ließen sich außerdem zwei weitere schnellere Schritte auflösen, deren Ursprung im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht ausreichend aufgeklärt werden konnte.

##### **4.4.1 Spezifische Wechselwirkungen zwischen den Pigmenten und dem Lhcb1 im Millisekunden-Bereich sind möglich**

Der schnellste Schritt mit der Reaktionszeit von 10 ms konnte durch die Messungen mit einer deutlich erhöhten zeitlichen Auflösung und einer Totzeit von  $\approx 1.4$  ms beobachtet werden. Bei früheren Messungen der Komplexbildung, bei denen die Chlorophyll- und die Proteinfluoreszenz als Monitor verwendet wurde, konnte ebenfalls ein Schritt mit dieser Reaktionszeit aufgelöst werden (Booth & Paulsen 1996). Dabei war jedoch auch für die Chlorophyll- bzw. das Protein alleine eine Abnahme der jeweiligen Fluoreszenz zu beobachten. Aus diesem Grund wurde als Ursache für den schnellen Schritt die Interaktion mit der sich formierenden mizellären Umgebung angesehen. In dieser Arbeit kann ein direkter Einfluss der Umgebungsänderung auf die Emission des Farbstoffes ausgeschlossen werden, da der schnelle Schritt nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von markiertem Protein und Pigmenten zu beobachten ist. Der Einfluss entsteht eher indirekt durch die Bildung der OG/PG/SDS-Mischmizellen, wobei Protein und Pigmente miteinander in Kontakt gebracht werden. Im Rahmen der Arbeit konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die aufgenommene Signaländerung schon eine spezifische Bindung der Pigmente widerspiegelt, oder ob eher unspezifische, wie z.B. hydrophobe Wechselwirkungen ausreichen, um eine Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes zu bewirken.

##### **4.4.2 Auch ein pigment-unabhängiger Schritt wird durch den Farbstoffmonitor detektiert**

Der zweitschnellste Schritt mit einer Reaktionszeit von 5 s ist deutlich unabhängig von der Anwesenheit bzw. der Bindung der Pigmente, so dass Interaktionen mit der direkten Umgebung für die Abnahme der Farbstofffluoreszenz verantwortlich sein müssen. Es kann nicht unterschieden werden, ob für die beobachtete Signalabnahme nur der Teil des Proteins verantwortlich ist, der keine Pigmente bindet (die Ausbeute an LHCIIb ist  $\approx 60$  %, vgl. Abb. 3.1.4), oder ob dieser Schritt in der gesamten Population stattfindet. Nach Auskunft der technischen Abteilung des Herstellers (Molecular Probes, Inc.: <http://www.probes.com/>) werden Farbstoffe der Bodipy-Serie in ungebundener Form für das Aufspüren von hydrophoben Bindungstaschen in Proteinen verwendet, wobei sie in der Proteinumgebung eine erhöhte Fluoreszenz aufweisen. Als Ursache für eine Erniedrigung der Fluoreszenz käme

demnach ein Wechsel des Farbstoffes aus einer unpolaren in eine polare Umgebung in Frage. Ebenso möglich erscheint eine Erniedrigung der Fluoreszenzquantenausbeute z.B. durch Interaktionen mit anderen  $\pi$ -Elektronen-Systemen, hervorgerufen durch eine Aggregation eines Teils des Proteins. Die genaue Ursache des Schrittes ist nach derzeitigem Kenntnisstand jedoch noch ungeklärt.

### 4.4.3 Der Farbstoffmonitor detektiert frühere Ereignisse der Pigmentbindung als der Chlorophyllmonitor

Wie unter 4.1.2 erwähnt wurde, sollten mit den beiden Fluoreszenzmonitoren unterschiedliche Faltungereignisse beobachtet werden können. Für den proteingebundenen Donor-Farbstoff ist theoretisch die Bindung von einem Chlorophyllmolekül ausreichend, damit Energietransfer stattfinden kann, während für den Energietransfer zwischen den Chlorophyllen mindestens ein Chl b- und ein Chl a-Molekül gebunden sein sollte. Dass der Farbstoffmonitor auf diese Weise in der Lage ist, frühere Ereignisse der Pigmentbindung zu detektieren als der Chlorophyllmonitor, wird besonders bei niedrigen Chlorophyllüberschüssen deutlich, bei denen anhand der Farbstofffluoreszenz kürzere Reaktionszeiten aufgelöst werden, als anhand der Chl b-Fluoreszenz (vgl. 3.3.3). Ob der aufgelöste schnelle Schritt auch das allererste Bindungsereignis reflektiert, kann allerdings erst entschieden werden, wenn die Vorgänge während der 10 ms Zeit aufgeklärt sind.

Bei einer Zunahme der Chlorophyllkonzentration zeigt sich eine Beschleunigung der Vorgänge, die anhand des Chlorophyllmonitors beobachtet werden, während für den Farbstoffmonitor eher eine leichte Verlangsamung der aufgelösten Schritte stattfindet. Mindestens eine der Bindungsstellen muss demnach eine hohe Affinität für die Bindung seines Chlorophyllmoleküls haben, so dass schon bei einer geringen Konzentration der Chlorophylle der Sättigungsbereich, bzw. die maximale Bindungsgeschwindigkeit erreicht ist. Eine höhere Konzentration scheint den Vorgang eher zu stören, vergleichbar mit einer kompetitiven Hemmung der Bindung, evtl. zwischen Chl a und Chl b.

Die Bindestelle(n), deren Besetzung einen Energietransfer zwischen Chl b und Chl a ermöglicht, ist (sind) weniger affin für das (die) bindende (n) Chlorophyllmolekül(e). Der Sättigungsbereich, bzw. die maximale Geschwindigkeit des Bindungsereignisses ist erst ab einem stöchiometrischen Überschuss von 2.5 erreicht. Ab dieser Chlorophyll-Konzentration werden mit beiden Monitoren gleich schnelle Schritte aufgelöst, d.h. es müssen gleichzeitig Chl a- und Chl b-Moleküle gebunden werden, bzw. die beiden Bindungsereignisse müssen gleichzeitig stattfinden.

Die unterschiedliche Affinität der Bindestellen könnte durch sterische Einflüsse der Umgebung vermittelt werden, so dass durch eine leichtere Zugänglichkeit schon bei niedrigeren Chlorophyll-Konzentrationen eine höhere „Trefferquote“ zwischen Chlorophyll-Molekül und Ligand erreicht wird. In der direkten Nachbarschaft könnten sperrige Aminosäure-Seitenketten die Zugänglichkeit erschweren. Entlang der Sequenz weiter entfernt liegende Aminosäure-Seitenketten könnten spezifische Bindungstaschen ausbilden, in die das Chlorophyll-Molekül eingefügt werden muss.

Ein Einfluss einer solchen Bindungstasche setzt voraus, dass die Proteinumgebung zu den jeweiligen Zeitpunkten schon ausreichend ausgebildet ist. Auf der Ebene der Sekundärstruktur

ist dies durchaus möglich, da ungefähr 60 % der gesamten  $\alpha$ -helikalen Struktur schon vor der Pigmentbindung (in SDS) vorhanden sind, und der restliche Anteil zusammen mit der Bindung der Pigmente ausgebildet wird (vgl. 3.4.9). In welchem Zeitrahmen der Komplex seine dreidimensionale Struktur ausbildet, kann aus den Ergebnissen nicht direkt geschlossen werden.

### 4.4.4 Ohne Carotinoide findet keine stabile Pigmentbindung statt

In Abwesenheit der Carotinoide kommt es nur zu einer transienten Bindung der Chlorophylle an den Lhcb1, da mit dem Farbstoffmonitor keine dauerhafte Fluoreszenzlösung zu beobachten ist (vgl. Abb. 3.2.11). So sind die Carotinoide zwar keine Voraussetzung für eine erste Interaktion der Chlorophylle mit dem Protein, im weiteren Verlauf der Komplexbildung aber unerlässlich für eine stabile Pigmentbindung. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der zeitaufgelösten Messungen von Booth & Paulsen (1996) und Reinsberg *et al.* (2001), nach denen ohne Carotinoide keine Pigmentbindung stattfindet und besonders Lutein limitierend für die Bindung der Chlorophylle ist. Im funktionellen Komplex wird die Besetzung der beiden zentralen Lutein-Bindestellen als stabilisierend für die Interaktion der beiden Helices I und III angesehen (Kühlbrandt *et al.* 1994), so dass der limitierende Schritt eben diese Stabilisierung durch die Carotinoide sein könnte. Wie unter 4.2.5 diskutiert wurde, scheint die Beeinflussung der Carotinoid-Bindung auf die Chlorophyll-Bindung gekoppelt mit der Ausbildung der Sekundärstruktur abzulaufen, da auch diese sich in ihrer Geschwindigkeit abhängig von der Carotinoid-Konzentration zeigt.

### 4.4.5 In der schnelleren Phase ( $\tau_1$ ) bindet Chl a vor Chl b

Anhand der Farbstofffluoreszenz zeigt sich, dass für die *in vitro* aufgelöste schnellere Phase ( $\tau_1$ ) Chl a alleine schneller an das Protein binden kann als Chl b (vgl. 3.3.4 oder 7.III). In Anwesenheit beider Chlorophylle wird für den schnellen Schritt eine ebenso kurze Reaktionszeit  $\tau_1$  aufgelöst, wie für Chl a alleine. Das bedeutet, dass die Bindung von Chl a (mit einer hohen Affinität) vor der Bindung von Chl b stattfindet und das Fehlen eines Energietransfers von Chl b auf Chl a zu einem frühen Zeitpunkt (bei niedrigen Chlorophyll-Konzentrationen) durch eine spätere Bindung von Chl b zu erklären ist. Demzufolge ist die Bindung von Chl b ein limitierender Schritt für die Ausbildung des Energietransfers.

Für die Verkürzung der Reaktionszeiten, die anhand des Chl b-Monitors aufgelöst werden, wäre dann hauptsächlich die Erhöhung der Chl b-Konzentration verantwortlich. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse von Reinsberg *et al.* (2001), die eine deutliche Verlängerung der Reaktionszeiten bei Chl a/Chl b-Verhältnissen  $< 1.0$  zeigten. Ebenfalls möglich erscheint die Situation, in der der erste schnelle Schritt wirklich nur die Bindung von sehr wenigen oder nur einem Chl a-Molekül reflektiert, die weiteren Chl a-Moleküle aber nur mit deutlich geringerer Affinität binden können. Die Besetzung dieser Chl a-Bindestellen könnte dann, wie von Reinsberg *et al.* (2001) vermutet, ein limitierender Schritt für die darauf folgende Bindung von Chl b sein. Wenn jedoch die Bindung des/der ersten Chl a ausreichend ist für eine

vollständige Löschung der Farbstofffluoreszenz, würden diese Ereignisse nicht mehr aufgelöst werden. Auch Chl b ist in der Lage, die Bindestellen zu besetzen, die limitierend für die weiteren Bindungsereignisse sind, die Reaktion läuft jedoch mit einer geringeren Geschwindigkeit ab. Ein Grund für die unterschiedlichen Geschwindigkeiten wäre eine geringere Aktivierungsenergie des limitierenden Schrittes bei der Bindung von Chl a als bei der Bindung von Chl b.

Nach den Ergebnissen von Hobe *et al.* (2003) lässt sich im funktionellen Komplex keiner Bindestelle eine ausschließliche Chl a-Bindung, aber 5 Bindestellen, vermutlich b1, b2, b6, a6 und a7, eine ausschließliche Chl b-Bindung zuordnen. Für den frühen Chl a-Bindungsschritt, der anhand des Farbstoffmonitors beobachtet wird, sollte demnach eine Besetzung dieser 5 Bindestellen ausgeschlossen werden können. Eine weitere Eingrenzung der möglichen Bindestellen könnte anhand von kinetischen Messungen mit Mutanten erfolgen, denen einzelne Bindestellen fehlen.

### 4.4.6 Die Bindungsereignisse in der langsamen Phase ( $\tau_2$ ) benötigen die Anwesenheit von Chl b

Wird die Bindung der Pigmente mit dem Farbstoffmonitor beobachtet, ist für die Kinetik der Chl a-Bindung in Abwesenheit von Chl b die Geschwindigkeit des langsamen Schrittes ( $\tau_2$ ) deutlich langsamer und auch der Anteil des Schrittes an der Gesamtänderung des Signals deutlich geringer, als wenn Chl a und Chl b zusammen anwesend sind. Ohne Chl b werden die Bindungsereignisse in der langsamen Phase demnach deutlich reduziert und außerdem verlangsamt. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass der geringe Anteil der Amplitude in Abwesenheit von Chl b keine Pigmentbindung reflektiert, sondern z.B. die Aggregation des ungefalteten Proteins dafür verantwortlich ist. In diesem Fall wäre ohne Chl b gar keine langsame Bindung mehr zu beobachten. So kann angenommen werden, dass in dem langsamen Schritt entweder hauptsächlich Chl b bindet, oder dass eine Chl b-Bindung zumindest eine Voraussetzung für einen großen Teil der langsameren Bindungsereignisse ist.

Ein vollständiger Ausfall der „normalerweise“ langsameren Bindungsereignisse findet jedoch nicht statt, da die Gesamtsignaländerung des Farbstoffmonitors in Abwesenheit von Chl b nicht deutlich geringer ist, als wenn beide Chlorophylle anwesend sind, statt dessen finden sie mit einer kurzen Reaktionszeit statt. Eine Verschiebung des Amplitudenquotienten in Richtung des schnelleren Schrittes bei einer Erhöhung des Chl a/b-Verhältnisses lässt sich ebenfalls anhand von Messungen mit dem Chl b-Monitor beobachten (Reinsberg *et al.* 2001). Insgesamt wird demnach die Pigmentbindung durch die Anwesenheit von Chl b verlangsamt. Auch hier wäre ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Geschwindigkeiten eine geringere Aktivierungsenergie der Prozess bei einer Bindung von Chl a.

In Abwesenheit von Chl a scheint die Bindung von Chl b weniger zielgerichtet oder kooperativ zu sein, so dass es zu größeren Variationen in den Geschwindigkeiten des langsameren Schrittes zwischen den einzelnen Messungen kommt. Die Bindung von Chl a ist zwar keine Notwendigkeit für die Stabilität des Komplexes, scheint aber in der Assemblierung eine Rolle

für das Stattfinden eines gleich bleibenden Faltungs- bzw. Bindungsmodus zu spielen oder für eine Einschränkung der Anzahl an möglichen Faltungs- bzw. Bindungsmodi verantwortlich zu sein. Besonders der langsamere Schritt scheint davon betroffen zu sein.

### 4.4.7 Das System aus [Lhcb1-Chla-Lutein], freien Pigmenten und freiem Protein befindet sich im dynamischen Gleichgewicht

Die Mischung des Lhcb1 mit Chl a und Carotinoiden resultiert in einer dauerhaften Löschung der Farbstofffluoreszenz und somit in einer unter den gegebenen Bedingungen andauernden Interaktion der Pigmente mit dem Protein. Da sich jedoch auf biochemischem Weg bisher kein pigmentiertes Protein isolieren ließ, soll hier nicht von „Intermediat“ die Rede sein. Um dennoch das Vorhandensein einer definierten Anordnung von Protein und Pigmenten anzudeuten, wird im Folgenden die Schreibweise [Lhcb1-Chla-Lutein] verwendet. Dabei ist Lutein als alleiniges Carotinoid ausreichend für die Ausbildung von [Lhcb1-Chla-Lutein] (vgl. 4.5.2).

Das System aus [Lhcb1-Chla-Lutein], freien Pigmenten und freiem Protein befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht, da bei einer Verdünnung der Lösung eine Zunahme der Farbstofffluoreszenz zu beobachten ist (vgl. Abb. 3.4.1). Zur Wiederherstellung des Gleichgewichtes muss ein Teil des [Lhcb1-Chla-Lutein] in freies Protein und freie Pigmente zerfallen. Der LHCIIb dagegen befindet sich entweder nicht in einem dynamischen Gleichgewicht mit den freien Pigmenten und dem freien Protein der Lösung, oder das Gleichgewicht liegt sehr weit auf der Seite des Komplexes. Bei einer Verdünnung steigt die Farbstofffluoreszenz nicht wieder an. Im Gegensatz zum [Lhcb1-Chla-Lutein] ist der LHCIIb in einem stabilen Zustand.

### **4.5 Die Assemblierung des LHCIIb auf der Ebene der Pigmentbindung: Vis-CD-spektroskopische Untersuchungen**

Ausgehend von der Fähigkeit des Lhcb1, nur mit Chl a und Carotinoiden eine nachweisbare Interaktion eingehen zu können, ergab sich die Möglichkeit, die Vorgänge der Pigmentbindung auf zwei zeitaufgelöste Experimente verteilt untersuchen zu können. Dies sollte einen genaueren Einblick in die molekularen Ereignisse geben, die den zwei apparenten Schritten zugrunde liegen. Dazu wurde zunächst der Lhcb1 nur mit Chl a und Carotinoiden gemischt und erst nach der Aufnahme der Kinetiken in einem zweiten Mischschritt Chl b dazugegeben. Die Komplexbildung wurde demnach experimentell in einen ersten Schritt in Abwesenheit von Chl b und einen zweiten Schritt in Anwesenheit von Chl b unterteilt.

Zur Aufnahme der Kinetiken erwies sich die CD-Spektroskopie im sichtbaren Bereich als am besten geeignet. Dabei ermöglicht die zeitaufgelöste Messung von CD-Signale im sichtbaren Bereich ebenso wie die Messung der Fluoreszenzsignale nur eine indirekte Beobachtung der Pigmentbindung, da eine Signaländerung die Interaktion zweier Partnermoleküle erfordert. Je nach der Wahl der Wellenlänge ist der CD-Monitor im Gegensatz zu den Fluoreszenzmonitoren jedoch sehr speziell auf nur wenige Bereiche des Komplexes und auch Vorgänge der Pigmentbindung gerichtet (vgl. 4.1.2).

#### **4.5.1 Der CD-Monitor bei 492 nm ermöglicht die Beobachtung der Bindung von Neoxanthin, Chl b und Lutein**

Um zu wissen, welches Bindungsereignis anhand von Änderungen der verschiedenen CD-Signale beobachtet werden kann, d.h. welcher spezieller Bereich der Komplexbildung gewählt wird, müssen die Maxima einzelnen Pigmentinteraktionen zugeordnet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Signaländerung bei 492 nm als Monitor der Pigmentbindung gewählt, da es sich um das stärkste Signal im CD-Spektrum des LHCIIb handelt, und so die größte Signaländerung erwartet werden konnte (vgl. 3.4.5).

Die Zuordnung von Pigmentinteraktionen zu den einzelnen Banden des CD-Spektrums beschränkt sich in den meisten Arbeiten zu diesem Thema bisher auf die Rolle der Chlorophylle. Nach Ide *et al.* (1987) sind Wechselwirkungen zwischen Chl b-Molekülen verantwortlich für die positiven und negativen Maxima bei 445 nm und 495 nm. Die Analyse von rekombinantem LHCIIb mit unterschiedlicher Pigmentausstattung zeigte eine Unabhängigkeit des Maximums bei 492 nm von der Anwesenheit von Chl a im Komplex, da auch im Spektrum eines Chl a-losen LHCIIb dieses Signal zu beobachten ist. Die Bindung von Lutein als alleinigem Carotinoid führte zu einer Reduktion des Maximums bei 492 nm auf eine Schulter, bei gleichzeitiger Ausbildung eines neuen negativen Maximums bei 474 nm (Hobe 1995). Beide Beobachtungen konnten auch im Rahmen dieser Arbeit gemacht werden (vgl. Abb. 3.4.5 und 3.4.16). Croce *et al.* (1999b) schlossen aus ihren Carotinoidbindungsstudien, dass die Amplitude des Signals bei 492 nm durch die Bindung von Neoxanthin im Komplex verstärkt wird.

Anhand der bisherigen Untersuchungen kann demnach davon ausgegangen werden, dass der vorherrschende Beitrag zum CD-Signal bei 492 nm im LHCIIb durch Chl b- sowie Neoxanthin-Moleküle geleistet wird. Eine Beteiligung von Lutein wurde nicht direkt nachgewiesen, ist aber

wahrscheinlich, da im Absorptionsspektrum des LHCIIb Banden um 495 nm und 489 nm Lutein zugeordnet werden können (Croce *et al.* 2000, Das & Frank 2002).

Die Entstehung eines CD-Signals ist dabei nicht auf eine Interaktion der Pigmente untereinander angewiesen. Ebenfalls möglich ist (1) das Vorhandensein eines intrinsischen CD-Signals aufgrund einer Asymmetrie des Moleküls, die durch die Bindung an das Protein induziert wird. Für Lutein wäre das die spiralförmige Anordnung an der „Superhelix“ des LHCII aus den Helices I und III (vgl. Abb. 1.3). Oder durch (2) Interaktionen mit den Seitenketten der umgebenden Aminosäuren. Beide Möglichkeiten kommen z.B. für die Carotinoid-Bindung an das Reaktionszentrum von *Rhodobacter sphaeroides* in Frage (Frank & Violette 1989).

Dass der Beitrag von Neoxanthin zum Signal bei 492 nm auf eine Interaktion mit Chl b zurückzuführen ist, ist wenig wahrscheinlich, da für eine solche Wechselwirkung in spektroskopischen Untersuchungen von Olszówka *et al.* (2003) keine Hinweise gefunden werden konnten. Vollkommen ausschließen lässt sie sich jedoch nicht.

### 4.5.2 Der Bindung von Lutein kann anhand des CD-Monitors bei 492 nm nur ein Zeitrahmen zugeordnet werden

Nach der Mischung von Chl a und Carotinoiden mit dem Lhcb1 zeigt das CD-Spektrum im sichtbaren Bereich deutliche Signale um 460 nm, 492 nm und 680 nm. Das gleiche Spektrum zeigt sich ebenfalls in Anwesenheit von Lutein als alleinigem Carotinoid (vgl. Abb. 3.4.11/13), so dass für die frühe Bindung von Chl a nur Lutein erforderlich zu sein scheint. Da Chl b und Neoxanthin, die im LHCIIb nachweislich zum Signal bei 492 nm beitragen, zu diesem Zeitpunkt nicht anwesend sind, muss Lutein für die Entstehung des CD-Signals bei 492 nm im Spektrum des [Lhcb1-Chl a-Lutein] verantwortlich sein. Inwieweit auch Chl a-Moleküle alleine einen Beitrag leisten, oder ob Interaktionen von Lutein mit Chl a eine Voraussetzung des Signals sind, ist noch ungeklärt. Gegen den ersten Punkt spricht jedoch, dass die Absorptionsmaxima von Chl a im Soret-Bereich bei deutlich höheren Energien liegen. Im LHCIIb konnten Chl a nach Croce *et al.* (2000) Absorptions-Banden bei 432 nm und 439 nm zugeordnet werden.

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand lässt demnach die Detektion eines Bindungsereignisses anhand des CD-Monitors bei 492 nm nach der Mischung von Chl a, Lutein und Lhcb1 zwei Möglichkeiten zu. (A) Lutein bindet oder (B) Chl a bindet und interagiert mit schon gebundenem Lutein, dessen Bindung erst dadurch nachweisbar wird.

Aus diesem Grund kann bzgl. Lutein anhand des CD-Monitors bei 492 nm keine Aussage über die tatsächliche Bindungsgeschwindigkeit gemacht werden, sondern nur, dass die Bindung nach einem bestimmten Zeitabschnitt praktisch abgeschlossen ist.

### 4.5.3 In der schnelleren ( $\tau_1$ ) Phase bindet Lutein mindestens so schnell wie Chl b

Nach der Mischung von Chl a und Lutein mit dem Lhcb1 lässt sich anhand des CD-Monitors bei 492 nm eine Reaktionszeit auflösen, die mit 57 s deutlich länger ist als die Reaktionszeit  $\tau_1$

von 24 s, die unter den gleichen Reaktionsbedingungen für die Bindung von Chl a anhand des Farbstoffmonitors aufgelöst wird (vgl. Tab. 7.III). Mit dem CD-Monitor bei 492 nm wird demnach ein Bindungsereignis detektiert, das erst nach der frühen Chl a-Bindung stattfinden, d.h. Lutein wird maximal erst nach der frühen Chl a-Bindung mit einer Reaktionszeit von 50 s gebunden. Für die komplette Bildung des LHCIIb in Anwesenheit von Chl a+b, Lutein, Neoxanthin und Violaxanthin wird eine Reaktionszeit  $\tau_1$  des schnelleren Schrittes aufgelöst, die in etwa so lang ist, wie wenn Chl a und Lutein alleine anwesend sind (vgl. Tab. 6.IV). Es kann also davon ausgegangen werden, dass auch im kompletten Verlauf der Komplexbildung vor der Bindung von Lutein und Chl a keine weiteren Bindungsereignisse stattfinden, die anhand des CD-Monitors beobachtet werden können.

Die Amplitude der Signaländerung bei 492 nm ist bei der Bindung von Lutein und Chl a alleine deutlich geringer, als die Amplitude des gleichen Signals im schnelleren Schritt der kompletten Komplexbildung. Dies könnte bedeuten, dass bei einem vollständigen Pigmentangebot nach dem gleichen Zeitabschnitt eine größere Ausbeute an pigmentiertem Protein vorhanden ist. Dagegen spricht, dass nach dem zweiten Mischschritt das gleiche Endniveau erreicht wird wie nach einem einzigen Mischschritt, d.h. die gleiche Ausbeute an LHCIIb vorliegt, aber anhand der Kinetik keine Reaktionszeit im Bereich von 1 min aufgelöst wird. Letzteres sollte dann der Fall sein, wenn freies Protein erst im zweiten Mischschritt komplett pigmentiert wird. Wahrscheinlicher ist, dass bei einem vollständigen Pigmentangebot im schnelleren Schritt neben Chl a und Lutein außerdem auch Chl b und/ oder Neoxanthin binden.

Dass eine Bindung von Chl b auch in der schnelleren Phase stattfindet, zeigen die Farbstoffkinetiken, anhand derer sich für die Bindung von Chl b allein (in Anwesenheit der Carotinoide) eine Reaktionszeit  $\tau_1$  von 50 s auflösen lässt (vgl. Tab. 7.III). Allerdings ist es möglich, dass Chl b in diesem Fall zunächst Chl a-spezifische Bindestellen besetzt (Hobe *et al.* 2003). Da die Bindung von Lutein zu diesem Zeitpunkt garantiert abgeschlossen ist, kann für die komplette Komplexbildung in der schnelleren Phase angenommen werden, dass Lutein mindestens so schnell bindet wie Chl b.

Über die Anzahl und den Ort der gebundenen Pigmente im [Lhcb1-Chla-Lutein] können anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine direkten Schlüsse gezogen werden. Die Ergebnisse bisheriger Veröffentlichungen erlauben jedoch zumindest Vermutungen. So erscheint eine Besetzung von L1 durch ein Lutein-Molekül vor dem Hintergrund sinnvoll zu sein, nach dem nach Croce *et al.* (1999b) die Besetzung dieser Bindestelle als hauptverantwortlich für die Stabilität des LHCIIb angesehen wird. Dafür spricht ebenfalls, dass der CP29, einer der minoren Antennenkomplexe des PSII, der ein Chl a/b-Verhältnis von 3.0 hat und nur ein Lutein-Molekül in L1 bindet, ähnliche negative CD-Maxima zeigt, wie der [Lhcb1-Chla-Lutein] (Giuffra *et al.* 1997, Bassi *et al.* 1999).

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, welche und wie viele Chl a-Bindestellen besetzt sein könnten, sollten die weiteren CD-Signale im Spektrum des [Lhcb1-Chla-Lutein] hinsichtlich einer Beteiligung von Chl a analysiert werden. So zeigt sich z.B. ein weiteres negatives Maximum bei 680 nm. Im LHCIIb wird das Maximum an dieser Stelle Chl a- Chl-b oder nur Chl a-a Interaktionen zugeordnet (Ide *et al.* 1987, Hemelrijk *et al.* 1992). Mutationsanalysen deuten darauf hin, dass die beteiligten Chlorophylle an die Liganden a2, a4 und b2 gebunden sind (Remelli *et al.* 1999). Gute Kandidaten für eine Bindung von Chl a im [Lhcb1-Chla-Lutein] wären demnach die Liganden a2 und a4.

### 4.5.4 Chl a und Lutein sind ausreichend für die Ausbildung eines Teils der Sekundärstruktur in einer schnelleren Phase

Die CD-Messungen im UV-Bereich zeigen, dass auch in Abwesenheit von Chl b ein Teil der  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur ausgebildet wird, die Bindung von Chl b demnach für diesen schnelleren Vorgang keine Voraussetzung sein kann. Die Reaktionszeit, die anhand der Signaländerung bei 222 nm aufgelöst wird liegt mit 22 s in dem Bereich, der anhand des Farbstoffmonitors für die Bindung von Chl a im schnelleren Schritt beobachtet werden konnte. Die Bindung von Lutein, beobachtet anhand des CD-Monitors bei 492 nm, dagegen erfolgt mit einer deutlich längeren Reaktionszeit (vgl. Tab. 7.III).

Generell konnte schon gezeigt werden, dass ohne eine Pigmentbindung keine vollständige Sekundärstruktur ausgebildet werden kann (Horn & Paulsen 2002). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich die Kopplung der beiden Vorgänge noch etwas genauer betrachten. So scheint die Bindung mindestens eines Chl a-Moleküls eine Voraussetzung für die Ausbildung eines Teils der Sekundärstruktur in der schnelleren Phase zu sein. Wie viel der endgültigen Sekundärstruktur des LHCIIb schon ausgebildet ist, kann nur vermutet werden. In Zusammenhang mit der Diskussion zur Ausbildung der Sekundärstruktur in 4.2.5 und mit der vermuteten Bindung von Lutein in L1 erscheint es sinnvoll, dass mindestens die Helix III vollständig helikal ist, damit die Proteinbereiche in der stromalen und der luminalen Schleife, die die Bindestelle L1 ausmachen (Kühlbrandt *et al.* 1994), den richtigen Abstand für die Bindung des Lutein-Moleküls haben.

Hinweise auf das Vorhandensein einer dreidimensionalen Struktur könnte eine Messung der Abstände zwischen einzelnen Bereichen des Proteins bringen. Dafür geeignet ist die Methode der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie). Nach persönlicher Mitteilung von PD Dr. Anja Liskay (Biochemie der Pflanzen, Universität Freiburg) wäre sogar eine zeitaufgelöste Messung mit dieser Methode im Prinzip durchführbar.

Darüber, inwieweit auch nach dem zweiten Mischschritt noch Sekundärstruktur ausgebildet wird, kann zurzeit noch keine Aussage gemacht werden.

### 4.5.5 In der langsameren Phase bindet Chl b aber nicht Neoxanthin

Wie in Abschnitt 4.4.2 schon erwähnt wurde, ist für eine Bindung von Chl a im schnelleren Schritt in Abwesenheit von Chl b nur Lutein erforderlich. Dies zeigt sich durch die Unabhängigkeit des CD-Spektrums und der Kinetik bei 492 nm von der Anwesenheit von Neoxanthin (und Violaxanthin) in der Pigmentlösung (vgl. Abb. 3.4.11 und 13). Eine Bindung von Neoxanthin in dieser Phase in Abwesenheit von Chl b kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da außer dem Wissen, dass hauptsächlich Chl b und Neoxanthin für das Signal bei 492 nm verantwortlich sind, die genaue Zusammensetzung des Signals bei 492 nm noch nicht bekannt ist (vgl. 4.5.1). So könnte für den Beitrag von Neoxanthin eine Interaktion mit Chl b die Voraussetzung sein. In diesem Fall wäre eine Bindung von Neoxanthin an ein pigmentiertes Protein ohne Chl b anhand des CD-Monitors bei 492 nm nicht zu detektieren.

In jedem Fall lässt sich eine deutliche Verstärkung des Signals bei 492 nm erst dann beobachten, wenn Chl b und Neoxanthin gleichzeitig anwesend sind, d.h. wenn im zweiten Mischschritt entweder Chl b (bei vorheriger Zugabe von Chl a, Lutein, Neoxanthin und Violaxanthin) oder Chl b, Neoxanthin und Violaxanthin (bei vorheriger Zugabe von Chl a und Lutein) dazugegeben werden. Anhand der Kinetik lässt sich eine Reaktionszeit auflösen, die genauso lang ist wie die Reaktionszeit  $\tau_2$  des langsameren Schrittes, der für die komplette Komplexbildung aufgelöst wird. Ein Teil der Signaländerung geht jedoch innerhalb der experimentellen Totzeit von  $\approx 10$  s verloren. Dies ist daran zu erkennen, dass der Startpunkt der Kinetik des 2. Mischschrittes deutlich unterhalb des Endpunkts der Kinetik des 1. Mischschrittes liegt (vgl. 3.4.8 und 12). Für den Großteil dieser sehr schnellen Phase  $<10$  s ist die Anwesenheit von Neoxanthin erforderlich, da ohne das Pigment der Startpunkt der Kinetik des 2. Mischschrittes deutlich höher liegt (vgl. 3.4.15). Daraus kann geschlossen werden, dass bei der Zugabe von Neoxanthin erst im 2. Mischschritt, dieses in der Lage ist, mit einer Reaktionszeit von  $<10$  s zu binden. Die Amplitude des langsameren Schrittes ist unbeeinflusst durch eine An- oder Abwesenheit von Neoxanthin, so dass in dieser Phase anhand des CD-Monitors bei 492 nm nur die Bindung von Chl b reflektiert wird (vgl. 3.4.14). Neoxanthin bindet demnach nicht in der langsameren Phase.

Inwieweit Lutein noch in der langsameren Phase bindet, ist aus den Kinetiken nicht ersichtlich.

### 4.5.6 Die Bindung von Chl b in der schnelleren Phase wird durch Chl a und Lutein limitiert

Zumindest ein Teil der Chl b-Bindung nach dem 2. Mischschritt muss aber auch innerhalb der sehr schnellen Phase stattfinden, da davon ausgegangen werden kann, dass eine Bindung von Chl b entweder direkt oder indirekt am Neoxanthin-Beitrag zum Signal bei 492 nm beteiligt ist. Dies ergibt sich trotz der Unsicherheit über die genaue Zusammensetzung des Signals bei 492 nm aus folgenden Überlegungen.

Möglichkeit (A): Neoxanthin alleine ist in der Lage zum Signal bei 492 nm beizutragen. In diesem Fall ist die Bindung von Chl b eine Voraussetzung für die Bindung von Neoxanthin, da das komplette Signal erst nach der Zugabe von Chl b im 2. Mischschritt beobachtet werden kann. Wird im ersten Mischschritt neben Chl a und Lutein auch Neoxanthin zum Lhcb1 gegeben, zeigt sich dass gleiche CD-Spektrum, wie wenn Neoxanthin nicht anwesend ist (vgl. Abb. 3.4.11 und 13). Die sehr schnelle Bindung von Neoxanthin erfordert dann auch eine sehr schnelle Bindung von Chl b.

Möglichkeit (B): Neoxanthin kann erst durch eine Interaktion mit Chl b einen Beitrag zum Signal bei 492 nm leisten. In diesem Fall muss Chl b keine Voraussetzung für die Bindung von Neoxanthin sein, ebenso könnte Neoxanthin die Bindung von Chl b in dieser schnellen Phase limitieren. Die direkte Beteiligung am Signal erfordert aber ebenfalls eine sehr schnelle Bindung von Chl b.

Werden im 2. Mischschritt Chl b und Neoxanthin (und Violaxanthin) zum [Lhcb1-Chla-Lutein] gegeben, sind demnach beide Pigmente in der Lage, mit einer Reaktionszeit von  $<10$  s zu binden, während in der langsameren Phase nur noch Chl b, aber nicht Neoxanthin bindet.

Für die komplette Komplexbildung, d.h. bei der Zugabe des vollständigen Pigmentangebotes in einem Mischschritt, scheint keine Phase mit einer Reaktionszeit kürzer als 10 s, d.h.

innerhalb der Totzeit stattzufinden, da die Kinetik auf gleicher Höhe mit dem Kontrollexperiment beginnt, bei dem kein Protein vorhanden ist (vgl. 3.4.8 und 9). Aufgrund der Unsicherheit über die genaue Zusammensetzung des Signals bei 492 nm kann daraus nur geschlossen werden, dass bei gleichzeitiger Anwesenheit aller Pigmente keine gleichzeitige sehr schnelle Bindung von Chl b und Neoxanthin stattfindet. D.h. entweder binden beide Pigmente im „normalen“ schnelleren Schritt mit einer Reaktionszeit  $\tau_1$  von 50 s, oder aber Neoxanthin bindet zwar sehr schnell, die Bindung kann aber erst nach der „normalen“ schnelleren Bindung von Chl b ebenfalls nachgewiesen werden. Dass eine Bindung von Chl b in der „normalen“ schnelleren Phase stattfindet zeigen die Kinetiken des Farbstoffmonitors in Abwesenheit von Chl a, anhand derer sich beide Schritte auflösen lassen (vgl. 3.3.4 und Tab. 7.III).

Eine stark beschleunigte Bindung von Chl b ist demnach nur möglich, wenn eine Struktur existiert, in der Chl a und Lutein schon gebunden sind. Anhand des Farbstoffmonitors und des CD-Monitors bei 492 nm wird die Bindung von Chl a und Lutein im schnelleren Schritt beobachtet (vgl. 3.3.4 und 3.4.7). Bei gleichzeitiger Anwesenheit aller Pigmente müssen diese Bindungsereignisse des schnelleren Schrittes demnach limitierend sein für die Bindung von Chl b. Wird erst im zweiten Mischschritt Chl b und Neoxanthin zum [Lhcb1-Chla-Lutein] gegeben, ist der limitierende Schritt schon abgeschlossen und die nachfolgende Bindung von Chl b kann ohne Verzögerung, d.h. mit einer sehr schnellen Geschwindigkeit ablaufen. Die genaue Rolle von Neoxanthin für die Bindungsereignisse in der schnelleren Phase bleibt noch ungeklärt, da nach derzeitigem Kenntnisstand der CD-Monitor bei 492 nm keinen direkten Nachweis der Neoxanthin-Bindung erlaubt. So sind weitere Fragen inwieweit (1) auch die Bindung von Neoxanthin an einer Limitierung der Bindung von Chl b in der schnelleren Phase beteiligt ist und ob (2) die Bindung von Neoxanthin selbst durch Chl a und Lutein limitiert wird. Bisherige Ergebnisse bzgl. der Neoxanthin-Bindung im funktionellen LHCIIB lassen jedoch eher eine Limitierung der Neoxanthin-Bindung durch Chl b vermuten. Dabei wird davon ausgegangen, dass Neoxanthin durch Interaktionen mit Chl b-Molekülen im Komplex nahe der Helix C gehalten wird (Croce *et al.* 1999 a/b).

### 4.5.7 Anhand des CD-Monitors bei 492 nm kann nicht die Bindung aller Pigmente beobachtet werden

Wie im Abschnitt 4.4.1 erläutert wurde, kann anhand des CD-Monitors bei 492 nm hauptsächlich die Bindung von Chl b, Neoxanthin und Lutein beobachtet werden. Inwieweit die Bindung von Chl a innerhalb des langsameren Schrittes erfolgt, konnte demnach nicht näher untersucht werden. Des weiteren muss beachtet werden, dass nicht alle gebundenen Pigmente auch an den Signalen des CD-Spektrums beteiligt sein müssen, wie z.B. die Ergebnisse der Diplomarbeit von Arne Charlet (1998) zeigen. Dabei konnte trotz eines Verlusts von Chlorophyllmolekülen durch Hitzestress, keine deutliche Veränderung des Monomer-Spektrums beobachtet werden. Mit der Methode der CD-Spektroskopie bleibt demnach ein Teil der Vorgänge während der Komplexbildung des LHCIIB unbeobachtet.

### **4.6 Der Faltungsmechanismus des LHCIIb**

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Verwendung der Methoden der CD- und der Fluoreszenzspektroskopie die Assemblierung des LHCIIb zum einen auf der Ebene der Proteinstruktur und zum anderen auf der Ebene der Pigmentbindung betrachtet werden. Die komplexe Struktur des LHCIIb, bestehend aus vier  $\alpha$ -helikalen Bereichen und mindestens 15 gebundenen Pigmente (vgl. 1.2) macht deutlich, dass der Ablauf der Assemblierung eine Kette von mehreren Ereignissen umfassen muss. Dabei wurde durch die Wahl des Monitors bestimmt, welches der Ereignisse in der jeweiligen zeitaufgelösten Messung betrachtet werden konnte. Das Ziel der zeitaufgelösten Messungen war und ist es, ein Faltungs-Modell des LHCIIb aufstellen zu können, in dem die einzeln zu betrachtenden Ereignisse zusammengefasst werden können. Dabei konnten auch bei der Betrachtung verschiedener Ereignisse diese immer in einen schnelleren und einen langsameren Schritt unterteilt werden.

#### **4.6.1 Die Ereignisse der schnelleren und der langsameren Phase**

Im Folgenden soll zunächst zusammengefasst werden, was nach dem derzeitigen Kenntnisstand in den beiden unterschiedlich schnellen Schritten stattfindet.

##### **Ausbildung der Sekundärstruktur:**

Die  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur wird in beiden Phasen ausgebildet, wobei die Bildung der restlichen 40 % an Helikalität, ausgehend vom SDS-denaturierten Lhcb1, erst durch die Bindung der Pigmente induziert wird. Beide Prozesse finden in einem ähnlichen Zeitrahmen statt und sind miteinander gekoppelt, wobei als gemeinsamer limitierender Schritt bisher die Bindung der Carotinoide identifiziert werden konnte. In der schnelleren Phase ist die Bindung von Chl a und Lutein ausreichend für die Zunahme an  $\alpha$ -helikaler Struktur.

##### **Pigmentbindung:**

Die Geschwindigkeit der Pigmentbindung wird nicht davon beeinflusst, wenn der gesamte Anteil der Sekundärstruktur, ausgehend von GuHCl-denaturiertem Lhcb1 ausgebildet werden muss. Eine stabile Pigmentbindung ohne Carotinoide ist nicht möglich.

In beiden Phasen findet die Bindung der Chlorophylle mit unterschiedlichen Affinitäten statt, wobei der Energietransfer zwischen Chl b und Chl a erst nach der Besetzung der weniger affinen Bindestellen etabliert wird.

Bei einem hohen Chl a-Überschuss finden vermehrt Bindungsereignisse in der schnelleren Phase statt, während ein hoher Chl b-Überschuss deutlich langsamere Bindungsereignisse begünstigt. Die Bindung von Chl b ist die Voraussetzung für einen thermodynamisch stabilen Zustand des Komplexes. Über die Bindung von Violaxanthin kann generell keine Aussage gemacht werden.

### Pigmentbindung in der schnelleren Phase:

In der schnellen Phase bindet Chl a mit einer höheren Affinität vor Chl b, so dass die Bindung von Chl b limitierend ist für die Ausbildung des Energietransfers. Lutein bindet in dieser Phase mindestens so schnell wie Chl b. Inwieweit Neoxanthin in der schnelleren Phase oder sogar mit einer noch kürzeren Reaktionszeit bindet, ist zurzeit noch ungeklärt. Die Bindung von Chl b in der schnelleren Phase wird durch die Bindung von Chl a und Lutein limitiert. Die gegenseitige Limitierung von Chl b und Neoxanthin in dieser Phase ist ebenfalls noch ungeklärt.

### Pigmentbindung in der langsameren Phase:

Für die Ereignisse der langsameren Phase ist die Bindung von Chl b eine Voraussetzung. Ob außer Chl b auch Chl a und Lutein in dieser Phase binden ist noch ungeklärt. Eine Bindung von Neoxanthin findet jedoch nicht statt.

### 4.6.2 Zwei grundsätzliche Modelle beschreiben die Unterteilung in zwei Phasen

Dass sich auch bei der Betrachtung verschiedener Ereignisse diese immer in einen schnelleren und einen langsameren Schritt unterteilen ließen, lässt zwei grundsätzlich unterschiedliche Modelle zu.

- (A) Es existieren zwei Proteinpopulationen, von denen sich eine schnell, die andere langsam faltet.
- (B) Es existieren zwei unterschiedliche schnelle Gruppen von Faltungsereignissen, die an einem Protein stattfinden.

Eine eindeutige Zuordnung eines der beiden Modelle zu dem Faltungsmechanismus eines Proteins ist auf verschiedenen Wegen möglich. Ein eindeutiger Nachweis dafür, dass die beiden Gruppen von Faltungsereignissen an einem Protein stattfinden wäre die Existenz eines Intermediats, das experimentell als obligates Zwischenprodukt zwischen den einzelnen Schritten identifiziert werden kann.

Dies ist z.B. für die Faltung von bR möglich, wo vor der Bindung des Kofaktors Retinal und der endgültigen Faltung in einem limitierenden Schritt zunächst ein Intermediat  $I_2$  ausgebildet werden muss. Für den gesamten Prozess in Anwesenheit von Retinal können anhand der Veränderung der Proteinfluoreszenz als Monitor mehrere kinetische Phasen aufgelöst werden ( $\tau_3$  bis  $\tau_6$ ). In Abwesenheit von Retinal kommt es zu einer Akkumulation von  $I_2$ , wobei nur  $\tau_3$  beobachtet wird. Damit auch die Phasen  $\tau_4$  bis  $\tau_6$  beobachtet werden können, muss Retinal zu einer Lösung gemischt werden, die das Intermediat schon enthält;  $\tau_3$  dagegen kann dann nicht mehr beobachtet werden (Allen *et al.* 2001). Die einzelnen Phasen können somit eindeutig nur Teilschritten an einem Protein zugeordnet werden.

Für die Assemblierung des LHCIIb konnte in Abwesenheit von Chl b nach Ablauf einer schnelleren Phase der Chl a und Lutein-Bindung mit der Struktur von [Lhcb1-Chla-Lutein] eine Art Intermediat akkumuliert werden. Es konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass auch bei gleichzeitiger Anwesenheit aller Pigmente in einem ersten Schritt nur Chl a und Lutein

binden und Chl b und die restlichen Carotinoide ausschließlich in einem zweiten langsameren Schritt gebunden werden. Vielmehr bindet Chl b auch und Neoxanthin nur im schnelleren Schritt. Die Existenz eines Intermediates ließ somit nicht zeigen, so dass ein Nachweis für eine Faltung nach Modell (B) auf diesem Weg nicht möglich ist.

Das Nichtauffinden eines Intermediates spricht jedoch nicht automatisch dagegen, dass die Bindungsereignisse an einem Protein stattfinden. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass entlang des Faltungsweges keine der Strukturen eine ausreichende Stabilität hat, um akkumuliert zu werden und die einzelnen Bindungsereignisse mit einer hohen Kooperativität hintereinander ablaufen.

Um in solchen Fällen zwischen den beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, eignet sich ein Vergleich der Amplitudenquotienten von Kinetiken verschiedener Monitore. Der Amplitudenquotient gibt an, wie der beobachtete Prozess auf die beiden Phasen verteilt ist. Ein Quotient von 1.0 heißt für eine Faltung nach Modell (A), dass sich 50 % der Proteine in einem schnellen Schritt vollständig falten während sich die restlichen 50 % in einem langsameren Schritt falten. Für eine Faltung nach Modell (B) heißt es, dass das Protein nach dem schnellen Schritt nur zur Hälfte gefaltet vorliegt und eine vollständige Faltung erst nach dem langsameren Schritt erreicht ist.

Anhand des CD-Monitors bei 222 nm ergibt sich für die Ausbildung der  $\alpha$ -helikalen Struktur ein Amplitudenquotient von 2.7. D.h. ein Großteil der Ausbildung der Sekundärstruktur findet in der schnelleren Phase statt. Unter den gleichen Bedingungen ergibt sich für die Pigmentbindung anhand des Chl b-Monitors ein Quotient von 0.6 und somit der umgekehrte Fall (vgl. Tab. 3.1.1). Der Großteil der Pigmentbindung findet demnach in der langsameren Phase statt. Bei einer Faltung nach Modell (A) hätten beide Prozesse gleich auf die beiden Schritte verteilt sein müssen, da zu einer vollständigen Faltung sowohl die Ausbildung der gesamten Sekundärstruktur als auch die Bindung der gesamten Pigmente gehört. Der Unterschied der Amplitudenquotienten gibt somit einen Hinweis darauf, dass der Faltungsmechanismus des LHCIIb dem Modell (B), d.h. sequentieller Faltung, entspricht. Um eine endgültige Entscheidung treffen zu können, müssen jedoch die beiden Prozesse noch eingehender unter verschiedenen Rekonstitutionsbedingungen vergleichend betrachtet werden.

Mit dem CD-Monitor bei 492 nm werden von den Vorgängen der Komplexbildung nur sehr spezielle Ereignisse beobachtet, die Bindung von Chl b, Neoxanthin und Lutein. Dies ermöglicht eine Zuordnung einzelner Pigmentbindungsereignisse zu den beiden Schritten. Wird dabei ein obligates Bindungsereignis beobachtet, erfordert eine Faltung nach Modell (A), dass es in beiden Schritten detektiert werden kann, da in beiden Schritten eine vollständige Faltung stattfindet. Von den Bindungsereignissen, die anhand des CD-Monitors bei 492 nm beobachtet werden, ist jedoch nur die Bindung von Chl b und Lutein obligat. Eine Bindung von Chl b kann für beide Schritte detektiert werden, ob Lutein auch in beiden Schritten bindet, ist noch ungeklärt. Unter den Bedingungen, dass Chl b, Neoxanthin und Violaxanthin erst in einem zweiten Mischschritt zu [Lhcb1-Chla-Lutein] gegeben werden, konnte die Bindung von Neoxanthin nur in einer sehr schnellen Phase, aber nicht in der langsameren Phase beobachtet werden (vgl. 4.5.5). Wäre die Bindung von Neoxanthin obligat für die Komplexbildung, würde dies für eine Faltung des LHCIIb nach Modell (B) sprechen. Da eine Komplexbildung aber auch ohne Neoxanthin stattfindet (vgl. Abb. 3.4.16), kann Modell (A)

nicht ganz ausgeschlossen werden. Dass bei einer Zugabe der Pigmente in zwei aufeinander folgenden Mischschritten keine Bindung von Neoxanthin in der langsameren Phase mehr detektiert wird, könnte ebenso daran liegen, dass der potentiell langsamer faltenden Population unter diesen speziellen Bedingungen kein Neoxanthin mehr zur Verfügung steht. Z.B. weil es direkt durch die schneller faltende Population weg gefangen wird. Da Neoxanthin aber in einem 2.3 fach stöchiometrischen Überschuss eingesetzt wurde, sollte dies eher unwahrscheinlich sein. Ansonsten konnte anhand der verschiedenen Monitore bisher kein weiteres Pigmentbindungsereignis nur einer der beiden unterschiedlich schnellen Phasen zugeordnet werden.

Insgesamt kann nach derzeitigem Kenntnisstand für die Faltung des LHCIIb ein Mechanismus favorisiert werden, bei dem zwei unterschiedlich schnelle Gruppen von Faltungsereignissen existieren, die an einem Protein stattfinden. Um einen Mechanismus nach Modell (A) vollständig auszuschließen, sind jedoch noch weitere Experimente erforderlich. Die Möglichkeit, die Faltung auch an einzelnen Komplexen zu untersuchen sollte dabei einen großen Vorteil gegenüber der in der vorliegenden Arbeit angewendeten Ensemble-Messung bieten. In diesem Fall wäre die Existenz zweier Bindungsereignisse an einem Protein direkt nachweisbar.

#### **4.7 Schlussfolgerungen für die LHCII-Assemblierung *in vivo***

Der Mechanismus der Assemblierung des LHCIIb *in vivo*, d.h. der Insertion des Proteins in die Thylakoidmembran in Zusammenhang mit der Pigmentbindung, ist noch zu großen Teilen unaufgeklärt. Aktuell existieren zwei Modelle für den Weg des Lhcb ausgehend von der Biosynthese im Cytoplasma, deren Unterschied besonders darin liegt, welcher Ort für die endgültige Assemblierung des Komplexes vorgesehen ist. Dies ist in einem der Modelle die Thylakoidmembran, in dem zweiten Modell die innere Hüllmembran der Chloroplasten (vgl. 1.4).

Für die Insertion in die Thylakoidmembran konnte direkt gezeigt werden, dass sie nur in Anwesenheit der Chlorophylle stattfindet und besonders die Chl b-Synthese eine Voraussetzung für die Akkumulation des LHCII ist (Kuttkat *et al.* 1997, Espineda *et al.* 1999). Chl b wird ausgehend von Chl a oder auch schon Chlid a (Vorstufe/ Abbauprodukt von Chl a ohne Phytolrest) durch das Enzym Chlorophyll(id) a Oxygenase (CAO) synthetisiert (Tanaka *et al.* 1998, Oster *et al.* 2000). Da die Umsetzung eine hydrophobe Umgebung erfordert wird vermutet, dass die Reaktion *in situ*, d.h. an protein-gebundenen Pigmenten stattfindet (Porra *et al.* 1994, Plumley & Schmidt 1995).

Die gleichen Voraussetzungen werden auch für das Modell der Assemblierung innerhalb der Chloroplasten-Hüllmembran gefordert (Hooper & Eggink 1999, vgl. 1.4). Dass der LHCII nicht in der Thylakoidmembran sondern schon in der Chloroplasten-Hüllmembran assembliert wird, wird dabei durch Beobachtungen begründet, nach denen ein dauerhafter Aufenthalt des Lhcb innerhalb des Chloroplasten unbedingt die Synthese von Chlorophyll erfordert. In Abwesenheit der Chlorophylle konnte das Vorläuferprotein erst gar nicht in den Chloroplasten importiert werden (White *et al.* 1996, Park & Hooper 1997). Die Synthese der Carotinoide, besonders der

von Lutein zeigte sich ebenfalls als notwendig für eine Akkumulation des LHCII in den Thylakoiden (Heinze *et al.* 1997).

Eine erste Stabilisierung des Proteins in der Hüllmembran soll nach dem Modell durch die Bindung von Chlorophyllen an die so genannten Retentions-Motive der Helix I und III stattfinden, wobei zunächst das Motiv der Helix I und erst in einem zweiten Schritt die Bindestellen des Motivs der Helix III besetzt werden sollen. Als Unterstützung dieser These gelten *in vitro* Untersuchungen, bei denen von Eggink & Hooper (2000) beobachtet werden konnte, dass Chlorophylle an kurze Peptide bindet, die nur die Sequenz des Retentions-Motivs der Helix I enthalten.

Für die Assemblierung *in vitro* wird nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die Ausbildung der restlichen 40% der Sekundärstruktur erst durch die Bindung der Pigmente induziert. Innerhalb einer Lipiddoppelschicht ist ein Aufenthalt von Proteinbereichen nur mit einer ausgebildeten Sekundärstruktur energetisch günstig, in der die Peptidbindungen untereinander Wasserstoff-Brücken ausbilden (White & Wimley 1999). Dies könnte erklären, warum *in vivo* nach dem Modell von Hooper & Eggink (1999) für einen Verbleib des Proteins in der Membran die Bindung der Pigmente erforderlich ist.

Bei einer Assemblierung des LHCII ausgehend von einem löslichen Übergangskomplex aus Lhcb und cpSRP (vgl. 1.4) im Chloroplasten-Stroma würde die Pigmentbindung dann eine aktive Rolle bei der Insertion des Proteins spielen und nicht erst durch nachträgliche Bindung für eine Stabilisierung sorgen.

Dass in Abwesenheit der Carotinoide *in vitro* erst gar keine Bindung der Chlorophylle statt findet deutet darauf hin, dass auch die Bindung der Carotinoide *in vivo* schon zu Beginn für die Assemblierung des LHCII in der Membran eine wichtige Rolle spielt und aus diesem Grund ohne Lutein *in vivo* kein LHCII akkumuliert wird.

Eine frühe Bindung der Carotinoide würde außerdem garantieren, dass von Anfang an für einen Schutz der Chlorophylle vor Photooxidation gesorgt ist.

Dass speziell die Bindung von Chl b notwendig ist für eine stabile Insertion des Komplexes *in vivo*, lässt sich durch die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen bestätigen. Diese zeigten, dass eine dissoziations-stabile Pigmentbindung nur durch die Bindung von Chl b erreicht wird. Der vermutete Reaktionsmechanismus der Chl b-Synthese, nach der die Umwandlung zu Chl b *in vivo* ausgehend von protein-gebundenem Chl a stattfindet, würde erfordern, dass Chl a auch in Abwesenheit von Chl b binden und das teilweise pigmentierte Protein in die hydrophobe Umgebung der Membran integriert werden kann. Nach den Ergebnissen der *in vitro* Assemblierung erscheint ein solcher Ablauf als möglich. Diese zeigten, dass Chl a vor Chl b bindet und dass auch in Abwesenheit von Chl b eine helikale Sekundärstruktur ausgebildet wird, die eine Voraussetzung für einen Aufenthalt in der Lipiddoppelschicht der Membran sein sollte.

Die hohe Affinität der Chl a-Bindung *in vitro* könnte in diesem Fall so interpretiert werden, dass ein schneller Umsatz von Chl a zu Chl b auch bei geringeren Chl a-Konzentrationen garantiert ist, z.B. wenn mit anderen ausschließlich Chl a bindenden Komplexen des Photosyntheseapparates konkurriert werden muss.

Die Vorstellung, nach der Chl b *in vivo* ausgehend von protein-gebundenem Chl a synthetisiert wird, kann dagegen nicht bestätigt werden. Nach der Mischung von Lhcb1 mit

Chlid a und Carotinoiden ließ sich keine Abnahme der Farbstofffluoreszenz beobachten (vgl. Abb. 3.3.9).

Ein Bindungs-Ablauf, wie er für die Assemblierung in der inneren Hüllmembran vorgeschlagen wird, bei dem erst das Retentions-Motiv der Helix I und dann das der Helix III pigmentiert wird, konnte für die Pigmentbindung *in vitro* nicht nachgewiesen werden. Mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte nicht gezeigt werden, dass *in vitro* eine Chlorophyll-Bindung auch an ein Proteinfragment stattfindet, das nur noch aus den Helices I und II besteht (vgl. Abb. 3.3.4).

Für die Assemblierung des LHCII *in vivo* lässt sich aus den Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen insgesamt schlussfolgern, dass

- (1) eine aktive Rolle der Chlorophyll- und Carotinoidbindung für die Membran-Insertion wahrscheinlich ist, da ohne eine Bindung Teile der Sekundärstruktur nicht ausgebildet werden.
- (2) eine Synthese von Chl b *in situ* möglich ist, da Chl a vor Chl b bindet und ein nur mit Chl a teilweise pigmentiertes Protein  $\alpha$ -helikale Struktur aufweist.
- (3) Chl b-Bindung deswegen essentiell ist für die Akkumulation des LHCII, da ohne Chl b keine stabile Pigmentbindung stattfinden kann.
- (4) die strikte Voraussetzung der Carotinoidbindung für eine Bindung von Chlorophyllen an den Lhcb1 gewährleistet, dass das gebundene Chlorophyll durch die Carotinoide gegenüber Photooxidation geschützt ist.

### **4.8 Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Verwendung verschiedener Monitore das Wissen über die Vorgänge während der Assemblierung des LHCII *in vitro*, bisher gesammelt durch die Arbeiten von Booth & Paulsen (1996) und Reinsberg *et al.* (2000, 2001), um eine Reihe von Punkten erweitert werden. Zurzeit noch ungeklärte Fragen sollten sowohl anhand von weiteren Untersuchungen mit den etablierten Monitoren, als auch durch die Etablierung neuer spektroskopischer Methoden beantwortet werden können.

#### CD-Monitor bei 222 nm:

Ein Vergleich der Ausbildung der Sekundärstruktur mit der Bindung der Pigmente bei unterschiedlichen Pigmentüberschüssen und Chl a/b-Verhältnissen sollte weitere Hinweise auf die Kopplung der beiden Prozesse geben.

Dabei erscheint besonders ein Vergleich der Amplitudenquotienten der unterschiedlichen Kinetiken eine gute Möglichkeit zu sein, um zwischen den beiden Modellen des Faltungsmechanismus unterscheiden zu können (vgl. 4.6.2).

Die Beobachtung der Faltung von Mutanten anhand des CD-Monitors bei 222 nm sollte aufdecken können, inwieweit bestimmte Strukturen des Komplexes, wie z.B. die Salz-Brücken zwischen den beiden Helices I und III, limitierend für die Ausbildung der Sekundärstruktur sind.

#### Farbstoff-Monitor:

Um zu klären, ob ein Pigmentbindungsschritt schon mit einer Reaktionszeit von 10 ms abläuft, müssten anhand des Farbstoff-Monitors Kinetiken der C-terminalen Deletionsmutante mit einer höheren Zeitauflösung aufgenommen werden.

Die Rekonstitution von Mutanten, denen einzelne Chlorophyll-Bindestellen fehlen, könnte die Identifizierung der Liganden möglich machen, die für die hoch affine Bindung von Chl a verantwortlich sind.

Ob sich bei einer ersten Bindung von Chl a geringere Aktivierungsenergien für die weiteren Schritte ergeben, als bei einer Bindung von Chl b, sollte durch eine Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der beiden Reaktionen zu testen sein. Wenn diese besteht, können die Aktivierungsenergien aus der Gleichung von Arrhenius berechnet und verglichen werden.

#### ESR-Spektroskopie:

Die Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) ist eine Form der Absorptionsspektroskopie, mit der sich Abstandsinformationen zwischen gewählten Positionen innerhalb von Proteinen ermitteln lassen. Dazu wird ein Protein an zwei Stellen mit so genannten Spinlabeln oder Spinsonden markiert, deren angeregte Zustände in Abhängigkeit des Abstandes verschieden stark miteinander interagieren können. Aus den resultierenden Signalen lässt sich nach weiteren Berechnungen die Abstandsinformation ableiten.

Zeitaufgelöste Messungen mit dieser Methode sollten Einblicke geben über die Entwicklung der Tertiärstruktur während der Faltung. Die Durchführung einer solchen Messung ist nach

persönlicher Mitteilung von PD Dr. Anja Liskay (Biochemie der Pflanzen, Universität Freiburg) im Prinzip möglich.

##### Einzelmolekülspektroskopie:

Die Möglichkeit, die Assemblierung einzelner Komplexe beobachten zu können sollte für eine Aufklärung des Faltungsmechanismus große Vorteile gegenüber der Untersuchung eines Protein-Ensembles bieten. So würde ein Vergleich der Faltung verschiedener Moleküle die Frage klären können, ob die Auflösung von zwei unterschiedlich schnellen Schritten durch die Existenz von unterschiedlich schnell faltenden Protein bedingt ist, oder ob die zwei Zeiten verschieden schnelle Faltungsschritte an einem Protein reflektieren.

Als Monitor sollte sowohl die Chlorophyll-Fluoreszenz als auch die Fluoreszenz eines Donor- oder Akzeptor-Farbstoffes geeignet sein, wobei die Wahl des Farbstoff-Monitors in diesem Fall ebenfalls die Beobachtung eines größeren Ausschnittes der Pigmentbindung zulassen sollte.

##### Assemblierung des LHCII in vitro in Lipidvesikel:

Um die Assemblierung des LHCII unter Bedingungen zu untersuchen, die denen der nativen Umgebung eher entsprechen, müsste eine Methode etabliert werden, um die Rekonstitution in Lipidvesikel zeitaufgelöst beobachtet zu können, wie es z.B. für die Faltung von bR möglich ist (Curran et al. 1999). Bisher durchführbar ist die Insertion des gefalteten LHCII in Lipidvesikel (persönliche Mitteilung Stephanie Boggasch).

## 5. Zusammenfassung

Die Struktur und Funktion des Hauptlichtsammelkomplexes des Photosystems II, des LHCII, ist durch eine Vielzahl von biochemischen und spektroskopischen Untersuchungen zu großen Teilen aufgeklärt. Außer dem Wissen, dass die Chlorophyll-Synthese obligatorisch für eine Akkumulation des LHCII *in vivo* ist, existieren dagegen wenig Daten über den genauen Ablauf der Komplex-Assemblierung, d.h. über die Ausbildung der Sekundärstruktur und Bindung der Pigmente in Zusammenhang mit der Insertion des Proteins in die Thylakoidmembran.

Die Fähigkeit des LHCII, sich *in vitro* aus seinen Bestandteilen, dem Apoprotein und den Pigmenten, selbst zu organisieren ermöglicht es, die Ausbildung der Sekundärstruktur und die Pigmentbindung unter vereinfachten Bedingungen zeitaufgelöst zu beobachten. Die Aufklärung des Faltungsmechanismus *in vitro* anhand der zeitaufgelösten Messungen soll so Rückschlüsse auf die Situation *in vivo* ermöglichen und des Weiteren Hinweise auf die Faltung von Membranproteinen im Allgemeinen liefern.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Assemblierung des LHCII *in vitro* mit verschiedenen Monitoren, basierend auf spektroskopischen Methoden, auf der Ebene der Proteinstruktur und der Ebene der Pigmentbindung beobachtet. Die Ausbildung der Sekundärstruktur wurde anhand des Anstiegs des CD-Signals bei 222 nm verfolgt, welcher charakteristisch ist für die Zunahme  $\alpha$ -helikaler Bereiche. Ein großer Teil der Pigmentbindung wurde durch die Verwendung eines protein-gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes betrachtet, der nach Anregung seine Energie auf die gebundenen Chlorophylle überträgt, so dass die Abnahme der Farbstoff-Fluoreszenz die Bindung der Pigmente widerspiegelt. Ebenfalls ein Maß für die Pigmentbindung ist die Etablierung des Energietransfers zwischen Chl b und Chl a innerhalb des LHCII, zu verfolgen anhand des Abfalls der Chl b-Fluoreszenz bei gleichzeitigem Anstieg der Chl a-Fluoreszenz (nach Anregung von Chl b). Da im Gegensatz zum Farbstoff-Monitor mindestens zwei Moleküle, Chl b und Chl a, für eine Signaländerung gebunden sein müssen, wurde ein kleinerer Ausschnitt betrachtet. Sehr spezielle Bindungsereignisse konnten anhand des CD-Signals bei 492 nm aufgelöst werden, da nur die Bindung von Chl b, Lutein und Neoxanthin für die Entstehung dieses Signals verantwortlich sind.

Grundsätzlich ließen sich auch bei der Betrachtung verschiedener Ereignisse diese immer in einen schnelleren und einen langsameren Schritt unterteilen. Nach derzeitigem Kenntnisstand findet in den beiden Schritten folgendes statt:

60 % der  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur liegen schon im SDS-denaturierten Lhcb1 vor. Die Ausbildung der restlichen 40 % an Helikalität wird erst durch die Bindung der Pigmente induziert und findet in beiden Phasen der Pigmentbindung statt. Sowohl Pigmentbindung wie Faltung finden in einem ähnlichen Zeitrahmen statt und sind miteinander gekoppelt, wobei als gemeinsamer limitierender Schritt bisher die Bindung der Carotinoide identifiziert werden konnte. In der schnelleren Phase ist die Bindung von Chl a und Lutein ausreichend für die Zunahme an  $\alpha$ -helikaler Struktur. Die Geschwindigkeit der Pigmentbindung wird nicht davon beeinflusst, wenn der gesamte Anteil der Sekundärstruktur, ausgehend von GuHCl-denaturiertem Lhcb1 ausgebildet werden muss. Eine stabile Pigmentbindung ohne Carotinoide ist nicht möglich.

In beiden Phasen findet die Bindung der Chlorophylle mit unterschiedlichen Affinitäten statt, wobei der Energietransfer zwischen Chl b und Chl a erst nach der Besetzung der weniger affinen Bindestellen etabliert wird. Bei einem hohen Chl a-Überschuss finden vermehrt Bindungsereignisse in der schnelleren Phase statt, während ein hoher Chl b-Überschuss deutlich langsamere Bindungsereignisse begünstigt. Die Bindung von Chl b ist die Voraussetzung für einen thermodynamisch stabilen Zustand des Komplexes. In der schnellen Phase bindet Chl a mit einer höheren Affinität vor Chl b, so dass die Bindung von Chl b limitierend ist für die Ausbildung des Energietransfers. Lutein bindet in dieser Phase mindestens so schnell wie Chl b. Die Bindung von Chl b in der schnelleren Phase wird durch die Bindung von Chl a und Lutein limitiert. Für die Ereignisse der langsameren Phase ist die Bindung von Chl b eine Voraussetzung. Eine Bindung von Neoxanthin findet in dieser Phase nicht statt.

Die Auflösung der zwei unterschiedlich schnellen Schritte lässt sowohl einen Faltungsmechanismus zu, bei dem sich zwei Proteinp Populationen unterschiedlich schnell falten, als auch einen Mechanismus, bei dem an einem Protein zwei unterschiedlich schnelle Gruppen von Faltungsereignissen stattfinden. Für die Faltung des LHCIIb kann nach derzeitigem Kenntnisstand der zweite Mechanismus favorisiert werden, eine endgültige Bestätigung erfordert aber weitere Experimente.

Für die Assemblierung des LHCII *in vivo* kann eine aktive Rolle der Chlorophyll- und Carotinoidbindung für die Membran-Insertion des Proteins als wahrscheinlich angesehen werden. Die strikte Voraussetzung der Carotinoidbindung für eine Bindung von Chlorophyllen an den Lhcb1 sollte dabei einen Schutz der gebundenen Chlorophylle gegenüber Photooxidation gewährleisten. Möglich erscheint die Synthese von Chl b *in situ*, durch Umsetzung von zuvor gebundenen Chl a-Molekülen. Ein Grund dafür, dass für eine Akkumulation des LHCII *in vivo* die Synthese von Chl b erforderlich ist, kann darin vermutet werden, dass *in vitro* Chl b essentiell für eine stabile Pigmentbindung ist.

## 6. Literatur

**Akiyama, S., Takahashi, S., Ishimori, K., Morishima, I. (2000).**  
Stepwise formation of  $\alpha$ -helices during cytochrome c folding.  
*Nature Struct. Biol.* **7**, 514-520

**Allen, J.F., Forsberg, J. (2001).**  
Molecular recognition in thylakoid structure and function.  
*Trends Plant Sci.* **6**, 317-326

**Allen, S.J., Kim, J.-M., Khorana, H.G., Lu, H., Booth, P.J. (2001).**  
Structure and Function in Bacteriorhodopsin: The Effect of the Interhelical Loops on the Protein Folding Kinetics.  
*J. Mol. Biol.* **308**, 423-435

**Baldwin, R.L., Rose, G.D. (1999).**  
Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states.  
*Trends Biochem. Sci.* **24**, 77-83

**Bassi, R., Croce, R., Cugini, D., Sandonà, D. (1999).**  
Mutational analysis of a higher plant antenna protein provides identification of chromophores bound into multiple sites.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10056-10061

**Bauer, J., Hiltbrunner, A., Kessler, F. (2001)**  
Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting.  
*CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 420-433

**Boekema, E. J., van Roon, H., van Breemen, J. F. L., Dekker, J. P. (1999)**  
Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes.  
*Eur. J. Biochem.* **266**, 444-452.

**Booth, P.J., Paulsen, H. (1996).**  
Assembly of Light-Harvesting Chlorophyll a/b Complex in Vitro. Time-Resolved Fluorescence Measurements.  
*Biochemistry* **35**, 5103-5108

**Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M.T., Dobberstein, B., (1987).**  
A T5-promoter-based transcription-translation system for the analysis of protein expression *in vivo* and *in vitro*.  
*Methods. Enzymol.* **155**, 416-433

**Chan, H.S., Dill, K.A. (1998).**  
Protein Folding in the Landscape Perspective: Chevron Plots and Non-Arrhenius Kinetics.  
*Proteins: Struct. Funct. Genet.* **30**, 2-33

**Charlet, A. (1998).**  
Herstellung und Charakterisierung von pigmentarmen LHC-II Komplexen.  
Diplomarbeit, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

**Chiba, K., Ikai, A., Kawamura-Konishi, X., Kihara, H. (1994).**

Kinetic Study on Myoglobin Refolding Monitored by Five Optical Probe Stopped-Flow Methods. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **19**, 110-119

**Croce, R., Remelli, R., Varotto, C., Breton, J., Bassi, R.** (1999) a.  
The neoxanthin binding site of the major light harvesting complex (LHCII) from higher plants. *FEBS Letters* **456**, 1-6

**Croce, R., Weiss, S., Bassi, R.** (1999) b.  
Carotenoid-binding Sites of the Major Light-harvesting Complex II of Higher Plants. *J. Biol. Chem.* **274**, 29613-29623

**Croce, R., Cinque, G., Holzwarth, A.R., Bassi, R.** (2000).  
The Soret absorption properties of carotenoids and Chlorophylls in antenna complexes of higher plants. *Photosynth. Res.* **64**, 221-231

**Das, S.K., Frank, H.A.** (2002).  
Pigment Compositions, Spectral Properties, and Energy Transfer Efficiencies between the Xanthophylls and Chlorophylls in the Major and Minor Pigment-Protein Complexes of Photosystem II. *Biochemistry* **41**, 13087-13095

**DeLille, J., Peterson, E. C., Johnson, T., Moore, M., Kight, A., Henry, R.** (2000).  
A novel precursor recognition element facilitates posttranslational binding to the signal recognition particle in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1926-1931

**Dill, K.A., Chan, H.S.** (1997).  
From Levinthal to pathways to funnels. *Nature struct. biology* **4**, 10-19

**Eggink, L.L., Hooper, J.K.** (2000).  
Chlorophyll Binding to Peptide Maquettes Containing a Retention Motif. *J. Biol. Chem.* **275** (13), 9087-9090

**Engelmann, D.M., Chen, Y., Chin, C-N., Curran, A.R., Dixon, A.M., Dupuy, A.D., Lee, A.S., Lehnert, U., Matthews, E.E., Reshetnyak, Y.K., Senes, A., Popot, J-L.** (2003).  
Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Letters* **555**, 122-125

**Espineda, C.E., Linford, A.S., Devine, D., Brusslan, J.A.** (1999).  
The *AtCAO* gene, encoding chlorophyll *a* oxygenase, is required for chlorophyll *b* synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10507-10511

**Frank, H.A., Violette, C.A.** (1989).  
Monomeric bacteriochlorophyll is required for the triplet energy transfer between the primary donor and the carotenoid in photosynthetic bacterial reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta* **976**, 222-232

**Galla, H-J.**, Spektroskopische Methoden in der Biochemie (1988). Thieme Verlag, Stuttgart

**Giuffra, E., Zucchelli, Sandonà, D., Croce, R., Cugini, D., Garlaschi, F.M., Bassi, R., Jennings, R.C.** (1997).

Analysis of Some Optical Properties of a Native and Reconstituted Photosystem II Antenna Complex, CP29: Pigment Binding Sites Can Be Occupied by Chlorophyll *a* or Chlorophyll *b* and Determine Spectral Forms.

*Biochemistry* **36**; 12984-12993

**Green, B.R., Pichersky, E., Kloppstech, K.** (1991).

Chlorophyll *a/b*-binding proteins: an extended family.

*Trends Biochem. Sci.* **16**, 181-186

**Heinze, I., Pfündel, E., Hühn, M., Dau, H.** (1997).

Assembly of light harvesting complexes II (LHC-II) in the absence of lutein. A study on the  $\alpha$ -carotenoid-free mutant C-2A'-34 of the green alga *Scenedesmus obliquus*.

*Biochim. Biophys. Acta* **1320**, 188-194

**Hemelrijk, P.W., Kwa, S.L.S., van Grondelle, R., Dekker, J.P.** (1992).

Spectroscopic properties of LHC-II, the main light-harvesting chlorophyll *a/b* protein complex from chloroplast membranes.

*Biochim. Biophys. Acta* **1098**, 159-166

**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

**Hobe, S.** (1995).

Trimerisierung des *in-vitro*-rekonstituierten Lichtsammelkomplexes höherer Pflanzen und spektroskopische Untersuchungen zur Pigmentorganisation.

Verlag Mainz, Wissenschaftsverlag, Aachen

**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., Fey, H., Rogl, H., Paulsen, H.** (2003).

Determination of Relative Chlorophyll Binding Affinities in the Major Light-harvesting Chlorophyll *a/b* Complex.

*J. Biol. Chem.* **278** (8), 5912-5919

**Holzwarth, A.R.**, Die primären Prozesse der Photosynthese. In: Photosynthese (1999).

Häder, D-P (Hrsg.) Thieme Verlag Stuttgart

**Hooper, J.K., Eggink, L.L.** (1999).

Assembly of light-harvesting complex II and biogenesis of thylakoid membranes in chloroplasts.

*Photosynth. Res.* **61**, 197-215

**Hooper, J.K., Eggink, L.L.** (2001).

A potential role of chlorophylls b and c in assembly of light-harvesting complexes.

*FEBS Letters* **489**, 1-3

**Horn, R., Paulsen, H.** (2002).

Folding *In vitro* of Light-harvesting Chlorophyll *a/b* Protein is Coupled with Pigment Binding.

*J. Mol. Biol.* **318**, 547-556

**Ide, J.P., Klug, D.R., Kühlbrandt, W., Giorgi, L.B., Porter, G.** (1987).

The state of detergent solubilised light-harvesting chlorophyll-*a/b* protein complex as monitored by picosecond time-resolved fluorescence and circular dichroism.

*Biochim. Biophys. Acta* **893**, 349-364

**Jansson, S.** (1994).

The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins.

*Biochim. Biophys. Acta* **1184**, 1-19

**Kabsch, W., Sander, C.** (1983).

Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features.

*Biopolymers* **22**, 2577-2637

**Kosemund, K., Geiger, I., Paulsen, H.** (2000).

Insertion of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein into the thylakoid. Topographical studies.

*Eur. J. Biochem.* **267**, 1138-1145

**Kragelund, B.B., Robinson, C.V., Knudsen, J., Dobson, C.M., Poulsen, F.M.** (1995).

Folding of a Four-Helix Bundle: Studies of Acyl-Coenzyme A Binding Protein.

*Biochemistry* **34**, 7217-7224

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

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

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

**Kuttkat, A., Edhofer, I., Eichacker, L.A., Paulsen, H.** (1997).

Light-harvesting Chlorophyll *a/b*-binding Protein Stably Inserts into Etioplast Membranes Supplemented with Zn-peophytin *a/b*.

*J. Biol. Chem.* **272**, 20451-20455

**Latt, S.A., Cheung, H.T., Blout, E.R.** (1964).

Energy Transfer. A System with Relatively Fixed Donor-Acceptor Separation.

*J. Am. Chem. Soc.* **87**, 995-1003

**Lau, F.W., Bowie, J.U.** (1997).

A method for Assessing the Stability of a Membrane Protein.

*Biochemistry* **36**, 5884-5892

**Lottspeich, F. und Zorbas, H.** (Hrsg.), *Bioanalytik* (1998). Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin

**Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.T., Cartailler, J-P., Lanyi, J.K.** (1999).

Structure of Bacteriorhodopsin at 1.55 Å Resolution.

*J. Mol. Biol.* **291**, 899-911

**Moore, M., Harrison, M.S., Peterson, E.C., Henry, R.** (2000).

Chloroplast Oxa1p Homolog Albino3 Is Required for Post-translational Integration of the Light Harvesting Chlorophyll-binding Protein into Thylakoid Membranes.

*J. Biol. Chem.* **275**, 1529-1532

**Olszówka, D., Maksymiec, W., Krupa, Z., Krawczyk, S.** (2003).

Spectral analysis of pigment photobleaching in photosynthetic antenna complex LHCIIb.

*Photochem. Photobiol. B: Biol.* **70**, 21-30

**Oster, U., Tanaka, R., Tanaka, A., Rüdiger, W.** (2000).

Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll *b* biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*.  
*Plant J.* **21**, 305-310

**Park, H., Hooper, J.K.** (1997).  
Chlorophyll synthesis modulates retention of apoproteins of light-harvesting complex II by the chloroplast in *Chlamydomonas reinhardtii*.  
*Physiol. Plant* **101**, 135-142

**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

**Plumley, F.G., Schmitdt, G.W.** (1995).  
Light-Harvesting Chlorophyll *alb* Complexes: Interdependent Pigment Synthesis and Protein Assembly.  
*Plant Cell* **7**, 689-704

**Ptitsyn, O.B.** (1995).  
How the molten globule became.  
*Trends Biochem. Sci.* **20**, 376-379

**Popot, J-L., Engelman, D.M.** (1990).  
Membrane Protein Folding and Oligomerization: The Two-Stage Model.  
*Biochemistry* **29**, 4031-4037

**Popot, J-L., Engelman, D.M.** (2000).  
Helical Membrane Protein Folding, Stability, and Evolution.  
*Annu. Rev. Biochem.* **69**, 881-922

**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

**Porra, R.J., Schafer, W., Cmiel, E., Katheder, I., Scheer, H.** (1994).  
The derivation of the formyl-group oxygen of chlorophyll *b* in higher plants from molecular oxygen. Achievement of high enrichment of the 7-formyl-group oxygen from  $^{18}\text{O}_2$  in greening maize leaves.  
*Eur. J. Biochem.* **219**, 671-679

**Qi, P.X., Die Stefano, D.L., Wand, A.J.** (1994).  
Solution Structure of Horse Heart Ferrocycytochrome *c* Determined by High-Resolution NMR and Restrained Simulated Annealing.  
*Biochemistry* **33**, 6408-6417

**Reinsberg, D.** (2000).  
Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen zur Faltung und Pigmentbindung des Lichtsammelproteins LHCII aus Photosystem II.  
Doktorarbeit, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

- Reinsberg, D., Booth, P.J., Jegerschöld, C., Khoo, B.J., Paulsen, H.** (2000).  
Folding, Assembly, and Stability of the Major Light-Harvesting Complex of Higher Plants, LHCII, in the Presence of Native Lipids.  
*Biochemistry* **39**, 14305-14313
- Reinsberg, D., Ottmann, K., Booth, P.J., Paulsen, H.** (2001).  
Effects of Chlorophyll *a*, Chlorophyll *b*, and Xanthophylls on the *in vitro* Assembly Kinetics of the Major Light-harvesting Chlorophyll *a/b* Complex LHCIIb.  
*J. Mol. Biol.* **308**, 59-67
- Remelli, R., Varotto, Sandonà, D., Croce, R., Bassi, R.** (1999).  
Chlorophyll Binding to Monomeric Light-harvesting Complex.  
*J. Biol. Chem.* **274** (47), 33510-33521
- Riley, M.L., Wallace, B.A., Flitsch, S.L., Booth, P.J.** (1997).  
Slow  $\alpha$ -Helix Formation during Folding of a Membrane Protein.  
*Biochemistry* **36**, 192-196
- Rogl., H., Kühlbrandt, W.** (1999).  
Mutant Trimers of Light-Harvesting Complex II Exhibit Altered Pigment Content and Spectroscopic Features.  
*Biochemistry* **38**, 16214-16222
- Ruban, A.V., Wentworth, M., Yakuyhevskaya, A.E., Andersson, J., Lee, P.J., Keegstra, W., Dekker, J.P., Boekema, E.J., Jansson, S., Horton, P.** (2003).  
Plants lacking the main light-harvesting complex retain photosystem II macro-organization.  
*Nature* **421**, 648-652
- Scheer, H.**, Pigmente und Antennkomplexe. In: Photosynthese (1999).  
Häder, D-P (Hrsg.) Thieme Verlag Stuttgart
- Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M.A., Schmid, F.X.** (1995).  
Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates.  
*Nature Struct. Biol.* **2** (8), 663-673
- Sreerama, N., Woody, R.W.** (1993).  
A Self-Consistent Method for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism.  
*Anal. Biochem.* **209**, 32-44
- Sreerama, N., Venyaminov, S.Y., Woody, R.W.** (2000).  
Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis.  
*Anal. Biochem.* **278**, 243-251
- Surrey, T., Jähnig, F.** (1992).  
Refolding and oriented insertion of a membrane protein into a lipid bilayer.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7457-7461
- Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Tanaka, K.N., Yoshida, K., Okada, K.** (1998).  
Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12719-12723
- Tu, C.-J., Schuenemann, D., Hoffman, N.E.** (1999).

Chloroplast FtsY, Chloroplast Signal Recognition Particle, and GTP Are Required to Reconstitute the Soluble Phase of Light-harvesting Chlorophyll Protein Transport into Thylakoid Membranes  
*J. Biol. Chem.* **274**, 27219-27224

**White, S.H., Wimley, W.** (1999).  
Membrane Protein Folding and Stability: Physical Principles.  
*Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**, 319-365

**White, R.A., Wolfe, G.R., Komine, Y., Hooper, J.K.** (1996).  
Localization of light-harvesting complex apoproteins in the chloroplast and cytoplasm during greening of *Chlamydomonas reinhardtii* at 38°C.  
*Photosynth. Res.* **47**, 267-280

**Yakushevskaya, A. E., Jensen, P. E., Keegstra, W., van Roon, H., Scheller, H. V., Boekema, E. J., Dekker, J. P.** (2001)  
Supermolecular organization of photosystem II and its associated light-harvesting antenna in *Arabidopsis thaliana*.  
*Eur. J. Biochem.* **268**, 6020-6028.

**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, C., Horn, R., Paulsen, H.** (2003)  
The Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Complex Can Be Reconstituted *in Vitro* from Its Completely Unfolded Apoprotein.  
*Biochemistry* **42**. 4527-4533

**Young, A.J., Frank, H.A.** (1996).  
Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence.  
*Photochem. Photobiol. B: Biol.* **36**, 3-15

**7.1 Abkürzungen**

A <sub>280</sub>	Absorption bei z.B. 280 nm
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperocidsulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CD	Circular-Dichroismus
Chl a	Chlorophyll a
Chl b	Chlorophyll b
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxy ribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
GuHCl	Guanidinium-hydrochlorid
EtOH	Ethanol
h	Stunde ( <i>hour</i> )
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPLC	<i>high pressure/ performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	Kilo-Base
kDa	Kilo-Dalton
KCl	Kalium-chlorid
KOH	Kalium-hydroxid
λ	Wellenlänge ( <i>Lambda</i> )
LB	Kulturmedium für Bakterien
LDS	Lithium-dodecyl-sulfat
LHC	Lichtsammelkomplex ( <i>light-harvesting-complex</i> )
LM	Lauryl-maltosid
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
m	milli (10 <sup>-3</sup> )
M	Mol
min	Minuten
MRE	<i>mean residue ellipticity</i>
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
OD	optische Dichte
OG	Octyl-glycosid
p	pico (10 <sup>-12</sup> )
P.A.	per Analysis

PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PG	Phosphatidyl-glycerin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-dodecyl-sulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Bor-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	N-(hydrocymethyl)-aminoethan
U	Enzymeinheit ( <i>unit</i> )
ÜK	Übernachtkultur
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vis	sichtbares Licht ( <i>visible</i> )
(v/v)	Volumenprozent pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )
(w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
z.B.	zum Beispiel

**7.II Sequenz des Klons S3CΔC49 (ΔLhcb1, dLhcb1)**

Bei dem Klon handelt es sich um eine Mutante des murenen Lhcb1 mit einem singulären Cystein an Position 03 und einer C-terminalen Deletion von 49 AS. In der folgenden Sequenz sind gekennzeichnet:

- die Sequenzen der verwendeten Sequenzier-Primer in kursiven Buchstaben
- die Sequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme in fetten blauen Buchstaben
- die Bereiche der transmembranen Helices durch Unterstreichung der AS-Sequenz

DS23+ &gt;

CTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACATTATAATA

EcoRI

GATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAG**AATTC**ATTAAAGAGGAGAAATTAAGC

ATGCGTAAATCTGCTACCACCAAGAAAGTAGCGAGCTCTGGAAGCCCATGGGACGGACCA

**Met**ArgLys**Cys**AlaThrThrLysLysValAlaSerSerGlySerProTrpTyrGlyPro**03**

GACCGTGTAAAGTACTTAGGCCATTCTCCGGTGAGTCTCCATCCTACTTGACTGGAGAG

AspArgValLysTyrLeuGlyProPheSerGlyGluSerProSerTyrLeuThrGlyGlu

TTCCCCGGTGACTACGGTTGGGACACTGCCGGACTCTCTGCTGACCCAGAGACATTCTCC

PheProGlyAspTyrGlyTrpAspThrAlaGlyLeuSerAlaAspProGluThrPheSer

AAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCTATGTTGGGTGCTTTGGGATGT

LysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAlaMetLeuGlyAlaLeuGlySer

GTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTCGGCGAAGCTGTGTGGTTCAAG

ValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPheGlyGluAlaValTrpPheLys

GCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTACTTGGGCAACCCAAGCTTGGTC

AlaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyrLeuGlyAsnProSerLeuVal

CATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTTATCTTGATGGGAGCTGTGCGAA

HisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnValIleLeuMetGlyAlaValGlu

BstEII

**GGTTACC**GTATTGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTTGATCCACTTTACCCAGGTGGAGlyTyrArgIleAlaGlyGlyProLeuGlyGluValValAspProLeuTyrProGlyGly

AGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCATTTCGCAGAATTGAAGGTGAGC

SerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAlaPheAlaGluLeuLysValSer

&lt; S1-/ DS178-

TTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCT

LeuIleSer-

GGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTTG

**7.III Übersichtstabelle über die verschiedenen Reaktionszeiten**

Rekonstitutions- bedingungen	Monitor	Pigmentausrüstung	$\tau_1$ (s)	$\tau_2$ (s)	$A_1/A_2$
1.0 Reaktanten (R) 1.5 Chlorophyll- Überschuss (Ü)	Farbstoff- Fluoreszenz 543 nm (stromale Schleife)	ABC	24 ± 3	182 ± 12	0.8 ± 0.1
		AC	24 ± 3	372 ± 57	2.3 ± 0.5
		BC	49 ± 15	280 ± 123	1.8 ± 1.1
	Chl b-Fluoreszenz 660 nm	ABC	48 ± 3	343 ± 18	0.8 ± 0.02
		ABC	21	164	0.7
		AC (nur 2 Messungen)	22/26		$A_1: 2.3/ 1.5$
1.0 R/ 3.0 Ü	Chl b-Fluoreszenz 660 nm	ABC	27 ± 1	179 ± 5	1.4 ± 0.03
0.5 R/ 3.0 Ü	Vis-CD 492 nm	ABC	45 ± 6	313 ± 29	0.7
1.0 R/ 1.5 Ü		1. AC	57 ± 6		$A_1: 1.1 \pm 0.1$
0.5 R/ 1.5 Ü		2. B (nach AC)		345 ± 12	$A_2: 2.7 \pm 0.1$
2.0 R/ 1.4 Ü	UV-CD 222 nm	ABC	11 ± 1	104 ± 12	2.7 ± 0.3
	Chl b-Fluoreszenz 660 nm	ABC (Reinsberg 2000)	9 ± 2	53 ± 17	0.6 ± 0.1
3.6 R/ 1.4 Ü	Chl b-Fluoreszenz 660 nm	ABC (GuHCl)	21 ± 4	135 ± 17	0.4 ± 0.1
		ABC (SDS)	17 ± 2	241 ± 19	1.7 ± 0.2

**7. IV Codes für Aminosäuren**

<b>Aminosäure</b>	<b>3-Buchstaben-Code</b>	<b>1-Buchstaben-Code</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Asn oder Asp	Asx	B
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Gln oder Glu	Glx	Z
Gycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und alle verwendeten Hilfsmittel angegeben habe.

---

Datum, Unterschrift