

**Zugänglichkeit einzelner Domänen des
Lichtsammelkomplexes LHCII:
ein Vergleich zwischen Monomeren und Trimeren**

Dissertation zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Christine Huschenbett
geb. in Ludwigshafen am Rhein

Mainz, 2001

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2002

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Photosysteme	2
1.2	Lichtsammelkomplexe der höheren Pflanzen	3
1.3	Lichtsammelkomplexe und ihre Verwandten	4
1.4	LHCII	5
1.4.1	Unaufgelöste Bereiche des LHCII	6
1.4.2	Das Trimer des LHCII	8
1.5	Die Bedeutung von Cysteinen in der Untersuchung von Proteinen	10
1.6	Ziel dieser Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Molekularbiologie	15
2.1.1	Konstruktion der LHC-Mutanten	15
2.1.2	Ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der PCR	22
2.1.3	Restriktion	25
2.1.4	Agarosegelelektrophorese	26
2.1.5	Agarosegelextraktion	27
2.1.6	Aufreinigung von Plasmiden	28
2.1.6.1	Extraktion und Fällung nach He	28
2.1.6.2	Aufreinigung über eine Säule	28
2.1.7	Konzentrationsbestimmung von DNA	29
2.1.8	Annealing	29
2.1.9	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA	30
2.1.9.1	Phosphorylierung:	30
2.1.9.2	Dephosphorylierung:	30
2.1.10	Phenolextraktion und Fällung von DNA	31
2.1.11	Ligation	31
2.1.12	Kompetente Zellen	32
2.1.13	Transformation	33
2.1.14	Sequenzierung	33
2.1.15	Anzucht von Bakterien	34
2.2	Trimerisierung	35
2.2.1	Rekonstitution zur Trimerisierung mittels Detergensabreicherung	35
2.2.2	Trimerisierung mittels Detergensabreicherung	36
2.2.3	Rekonstitution zur Trimerisierung über eine Nickel-Chelat-Säule	38
2.2.4	Trimerisierung über eine Nickel-Chelat-Säule	39
2.2.5	Trimerisierung mit Hilfe von Cyclodextrin	41
2.2.6	Saccharosedichtegradientenzentrifugation	42
2.2.7	Fällung von Trimeren	43
2.2.8	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC)	43
2.3	Pigmente	44
2.3.1	Pigmentisolation	44
2.3.2	Butanolextraktion	46
2.3.3	HPLC zur Pigmentbestimmung	46
2.3.4	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes nach Porra	47
2.4	Markierung	48

2.4.1	Markierung von freiem Protein mit SH-reaktiven Farbstoffen	48
2.4.1.1	Analytische Markierung	48
2.4.1.2	Präparative Markierung	49
2.4.2	Fällung von Protein	49
2.4.3	Test auf Reaktionsfähigkeit von TCP	50
2.4.4	Markierung von Monomeren und Trimeren	50
2.4.5	Auswertung von Fluoreszenzbanden in PAA-Gelen	52
2.4.6	Fluoreszenzspektroskopie	53
2.5	Allgemeine Methoden	54
2.5.1	Gelelektrophorese	54
2.5.1.1	Denaturierende SDS-PAGE	55
2.5.1.2	Schwach denaturierende PAGE	55
2.5.1.3	Proteinfärbung der PAA-Gele	56
2.5.2	Präparation von Einschlusskörpern	56
2.5.3	Bestimmung der LHCP-Konzentration	58
2.5.4	Westernblot	58
3	Ergebnisse	60
3.1	Konstruktion der LHC-Mutanten mit singulärem Cystein und His₆-Motiv	60
3.1.1	Rekonstitutionsfähigkeit von V229Csh	62
3.1.2	Pigmentgehalt der rekonstituierten LHC-Mutanten	64
3.2	Trimerisierung	66
3.2.1	Präparative Trimerisierungen	66
3.2.1.1	Trimerisierung mittels Detergensabreicherung:	66
3.2.1.2	Trimerisierung über eine Ni ²⁺ -Chelat-Säule:	67
3.2.1.3	Vergleich der zwei Trimerisierungsmethoden:	67
3.2.2	Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC)	68
3.2.3	Trimerisierung mit Hilfe von Cyclodextrin	71
3.2.4	Fällung von Trimeren mit Hilfe von Cyclodextrin	74
3.3	Zugänglichkeitsuntersuchungen an Monomeren und Trimeren	75
3.3.1	Vorversuche und Kontrollen	75
3.3.1.1	Vergleich der Bandenbildung in Gradienten ohne und mit TCP	75
3.3.1.2	Reaktion von RM mit TCP	76
3.3.1.3	Stabilität der Komplexe unter Markierungsbedingungen	78
3.3.1.4	Zugänglichkeit des Cysteins im Wildtyp	79
3.3.2	Zugänglichkeitsuntersuchungen	81
3.3.2.1	Ablauf 81	
3.3.2.2	Zeitabhängigkeit der Markierungseffizienz	84
3.3.2.3	Bedeutung des Fluoreszenzstandards	89
3.3.2.4	Vergleich der einzelnen Zeitwerte bei 15 und 30 Minuten Markierungsdauer	93
3.4	Markierung von LHCP	98
3.4.1	Laufverhalten RM-markierter Proteine in der denaturierenden PAGE	98
3.4.2	Kontrollen zur Optimierung der Markierung	99
3.4.3	Betrachtung von Komplexen aus Farbstoff-markiertem LHCP	101
3.4.3.1	Versuch der Strukturaussage mittels Fluoreszenz-Energietransfer	101
3.4.3.2	Behandlung markierter Trimere mit Trypsin	104
3.4.3.3	Behandlung markierter Komplexe mit Detergens	107
3.4.4	Fluoreszenzverhalten von RM an verschiedenen Orten im Komplex	110
3.4.5	Fluoreszenzlöschung	115
3.4.5.1	Fluoreszenzlöschung am freien Farbstoff	116

3.4.5.2	Fluoreszenzlöschung im Komplex	117
4	Diskussion	118
4.1	Zugänglichkeitsuntersuchungen an Monomeren und Trimeren	118
4.1.1	Aspekte der Methode.....	119
4.1.2	Unterschiede zwischen Monomeren und Trimeren und Diskussion möglicher Ursachen	122
4.1.3	Weitere Aspekte der einzelnen LHC-Mutanten	125
4.1.4	Ausblicke	130
4.1.4.1	Ausweitung auf weitere Zustände des LHCII	130
4.1.4.2	Methodische Variationen.....	132
4.1.5	Das Rekonstitutionsverhalten der LHC-Mutante S52Ch	135
4.2	Fluoreszenz-spektroskopische Betrachtung von LHCII mit angekoppeltem Farbstoff	138
4.2.1	Ausblicke	143
4.2.2	RM als Sensor für die Intaktheit von LHCII-Komplexen	144
4.2.3	Gezielte Fluoreszenz-Löschung von RM	145
4.3	Trimerisierung mit Hilfe von Cyclodextrin	146
4.4	Aufreinigung von gefaltetem LHCII mittels HIC	147
5	Zusammenfassung.....	148
6	Abkürzungsverzeichnis	150
7	Anhang	152
7.1	Anhang: Oligonukleotide.....	152
7.2	Anhang: Sequenz von D7f.3.....	153
7.3	Anhang: Fluoreszenzfarbstoffe	155
7.4	Anhang: Überblick über alle Markierungschargen der Zugänglichkeitsuntersuchungen	157
8	Literaturverzeichnis	163

1 Einleitung

Die oxygene Photosynthese von Cyanobakterien, Algen und höheren Pflanzen reichert die Atmosphäre der Erde mit Sauerstoff an. Die Entstehung dieser Organismen in der Evolution war entscheidend für die Zusammensetzung der Luft, die wir heute als so selbstverständlich einatmen. Schlüsselfunktion in der Photosynthese haben die Pigmente, die das Licht absorbieren und damit erst nutzbar machen. Chlorophylle bilden den Hauptanteil dieser Pigmente. Ungebunden und ohne Kontrolle kann ein Chlorophyll seine Funktion nicht ausüben und es wird durch unerwünschte Photochemie einen Organismus eher schädigen als ihm nützen. Aus diesem Grund werden in der Photosynthese Proteine zur Komplexierung, Anordnung und Kontrolle der Pigmente benutzt.

Bei der Photosynthese wird Lichtenergie in chemisch nutzbare Energie umgewandelt. Die Prozesse, die direkt vom Licht abhängig sind, werden in der Lichtreaktion zusammengefasst. In ihr entstehen Reduktions- und Energieäquivalente, die in der sogenannten Dunkelreaktion zur Fixierung von CO₂ genutzt werden.

Die Lichtreaktion findet in den höheren Pflanzen im Chloroplasten, genauer gesagt in und an der Thylakoidmembran statt. Die Thylakoidmembran lässt sich in verschiedene Abschnitte gliedern. Eine grobe Einteilung unterscheidet zunächst Stroma- und Granathylakoide, wobei in den Granabereichen mehrere Membranen gestapelt vorliegen. Etwas genauer kann man in den Granastapeln zwischen den Randbereichen und Endmembranen differenzieren, die PSI noch enthalten, sowie den Kernzonen, die den überwiegenden Aufenthaltsort des PSII darstellen. Die verschiedenen Zonen weisen eine typische Verteilung der Komponenten auf, in Abb. 1.1 ist dies angedeutet. Nach der Verteilung der einzelnen Komplexe liegt nahe, dass in den Granastapeln vor allem der lineare Elektronentransport stattfindet. Dafür spricht die räumliche Nähe der zwei Photosysteme mit PSI in den Randbereichen und PSII in den Kernzonen. Die Stromathylakoide entsprechend mit überwiegend PSI sollen vor allem dem cyclischen Elektronentransport dienen (siehe z.B. Albertsson, 2001).

Der genaue Mechanismus, der das Stapeln der Grana („stacking“) erklärt, ist noch nicht bekannt. Dem LHCI₂ wird allgemein eine Beteiligung zugeschrieben, auch wenn schon Mutanten beschrieben wurden, die keinen oder kaum LHCI₂ ausbilden, trotzdem aber gestapelte Thylakoide zeigen (z.B. Murray & Kohorn, 1991). Auch isolierte LHCI₂-Präparationen zeigen eine Art Stapel-Bildung (Mullet & Arntzen, 1980), wobei ein proteolytisches Entfernen des N-Terminus diese Eigenschaft verhindert (Mullet, 1983).

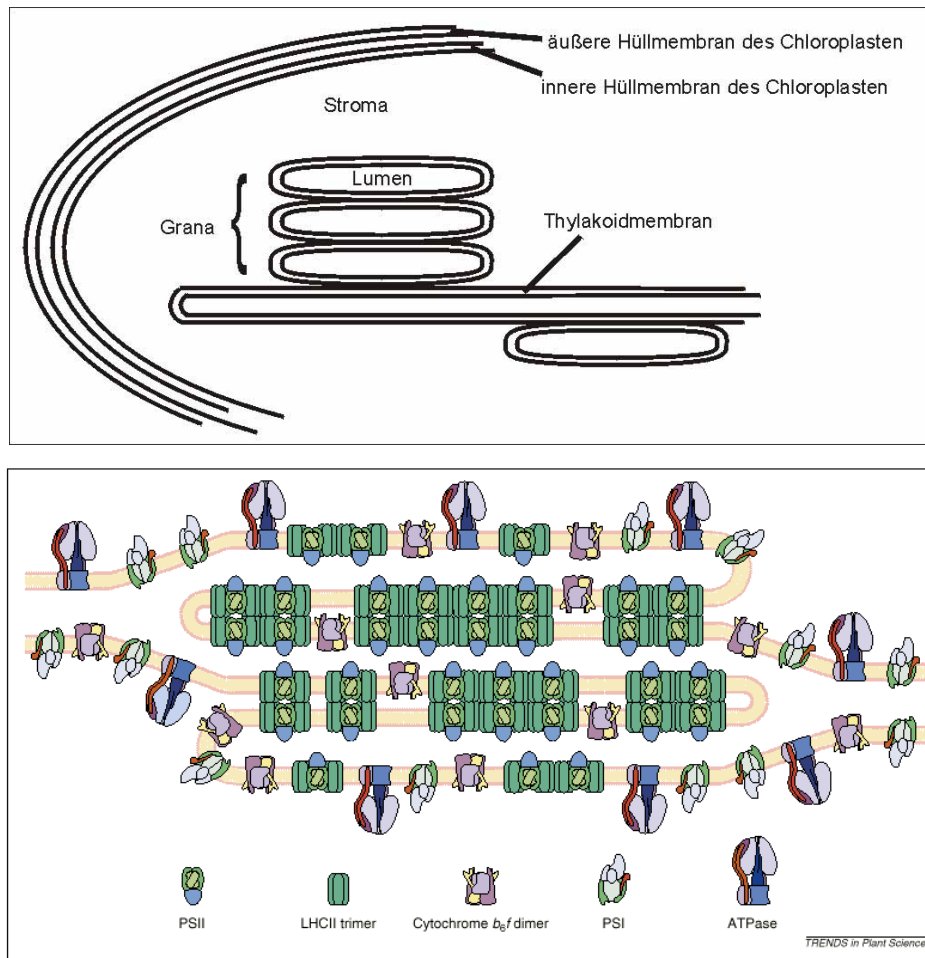


Abb. 1.1 Aufbau der Thylakoidmembran

A Schema zum Aufbau eines Chloroplasten

B Verteilung der Proteinkomplexe in der Thylakoidmembran mit PSI, PSII, LHCII, Cytochrom b_6/f -Komplex und ATPase (B aus Allen & Forsberg, 2001)

1.1 Photosysteme

Höhere Pflanzen und Cyanobakterien besitzen zwei Photosysteme (PS), die in der Elektronentransportkette hintereinandergeschaltet arbeiten. Ein PS besteht grob jeweils aus Antennen und Reaktionszentrum. PSII spaltet zudem Wasser, daraus entsteht molekularer Sauerstoff sowie Protonen und Elektronen. Letztere werden in eine Elektronentransportkette eingeschleust und schließlich über das PSI auf Reduktionsäquivalente übertragen. Purpurbakterien und Grüne Schwefelbakterien sind ebenfalls photosynthetisch aktiv, tragen aber nur ein einzelnes Photosystem und sind nicht zur Sauerstoffentwicklung fähig. Die Reaktionszentren der bekannten Photosysteme zeigen teilweise Homologien.

Über den prinzipiellen Aufbau des PSII existiert eine recht gute Vorstellung. Sie wurde durch Strukturdaten (z.B. Zouni et al., 2001), z.T. auch nur von Teilbereichen, und einem Vergleich mit bekannten Modellen anderer Photosysteme (Barber & Kühlbrandt, 1999) gewonnen. Die Organisationsform des PSII zeigt ein Dimer aus 2 Kernkomplexen mit ihren Antennen

(Boekema et al., 1995). Das Zentrum bilden die Reaktionszentren mit den inneren Antennen. Dazu gruppieren sich die äusseren Antennen oder Lichtsammelkomplexe und eine Vielzahl von weiteren kleinen Proteinen, denen noch nicht allen eine genaue Funktion zugeschrieben werden konnte.

In den Kernkomplexen des PSII ist eine vergleichsweise weite räumliche Trennung von Antennenpigmenten und den Pigmenten der Elektronentransportkette auffällig. In der Struktur des PSII wird diese Beobachtung aus anderen Photosystemen bestätigt. Nach Modellrechnungen, denen die genaueren Strukturdaten von Zouni et al. (2001) zugrunde lagen, läuft ein Großteil des Energietransfers zum Reaktionszentrum über zwei Chlorophylle der inneren Antenne (Vasil'ev et al., 2001). Das PSII hat das Reaktionszentrum in der Natur, das die energiereichste Wellenlänge zur Absorption benötigt (van Amerongen & van Grondelle, 2001). Zwei Chl a, die die primäre Ladungstrennung ausführen, werden nach ihrer Absorption um 680 nm auch P680 genannt. Sie scheinen, anders als in anderen bekannten PS, kein „special pair“ zu bilden; wahrscheinlich ist der Radikal P680⁺ jeweils nur auf einem von beiden lokalisiert (Barber & Kühlbrandt, 1999; Zouni et al., 2001). Die Struktur der Antennen des PSII muss relativ flach sein, um die hohe Energie des P680 zu halten. Dies ist sicher ein Grund für die im Vergleich zu anderen Photosystemen geringe Dichte an Antennenpigmenten und der schwachen Kopplung zwischen ihnen. Starke excitonische Wechselwirkungen würden zu einer Rotverschiebung der Pigmente führen und sind damit nicht erwünscht. Ein Nebeneffekt ist, dass damit der Energietransfer in PSII langsamer wird.

1.2 Lichtsammelkomplexe der höheren Pflanzen

In den höheren Pflanzen gibt es mehrere Lichtsammelkomplexe (LHC, light harvesting complex). Die Funktion, die sie ausüben, steckt in ihrem Namen: Sie sollen Lichtenergie einfangen (absorbieren) und weiterleiten zu den eigentlichen Reaktionszentren, in denen die Umwandlung der Lichtenergie in chemische Energie stattfindet.

Von den den 10 bekannten Lichtsammelproteinen werden 4 dem PSI zugeordnet (Lhca1-4) und 6 dem PSII (Lhcb1-6). Eine Sonderstellung nehmen die Produkte der Lhcb1- und Lhcb2-Gene ein, sie befinden sich vorwiegend am PSII, können aber auch aus den Grana-Bereichen der Thylakoide auswandern und dem PSI als zusätzliche Antenne dienen. Sie bilden den Hauptanteil des LHCII, auf den unten weiter eingegangen wird. Die anderen LHCs des PSII werden auch minore Antennen genannt. Die Lichtsammelproteine besitzen einen recht hohen Grad an Homologie in besonders konservierten Bereichen. Aus diesem Grund wird der prinzipielle Aufbau für alle von der in weiten Teilen bekannten Struktur des LHCII (Kühlbrandt et al., 1994) abgeleitet (s.u.), auch wenn für die anderen Lichtsammelkomplexe noch keine exakten Details bestimmt werden konnten. Unterschiede drücken sich vor allem im Grad der Oligomerisierung (es gibt Monomere, Dimere und Trimere) oder der Pigmentbindung (Stöchiometrie und Eigenschaften der Chlorophylle und Carotinoide) aus, natürlich auch in der letztendlichen Lage und Einbindung im jeweiligen Photosystem. Gerade die spezifischen Wechselwirkungen untereinander oder mit Komponenten des PSII-Kerns

zeigen die deutliche Abgrenzung der einzelnen Lichtsammelkomplexe voneinander. Die LHCs des PSI liegen als Dimere vor, die minoren LHCs des PSII als Monomere, der LHCII als Trimer. In einem Modell der Proteinkomplexe im PSII werden den minoren Antennen recht konkrete und feste Plätze in Kontakt zum Kern des Photosystems zugewiesen (Barber & Kühlbrandt, 1999). Der LHCII dagegen scheint mehrere Positionen einnehmen zu können (Boekema et al., 1999). Es werden drei verschiedenen Positionen eine starke (S, strong), mittlere (M, middle) oder schwache (L, loose) Bindung für Trimere des LHCII zugeordnet. Zusätzlich wird von LHCII-Assoziationen berichtet, die nicht an ein PS angedockt sind (Dekker, 1999). Die recht einheitliche Struktur besteht aus 7 zusammengelagerten Trimeren. Die Lichtsammelproteine der höheren Pflanzen sind allesamt kerncodierte Membranproteine. Sie werden, um ihren Bestimmungsort zu erreichen, zunächst in den Chloroplasten importiert, dann über einen Mechanismus mit Ähnlichkeiten zum cytosolischen SRP-System in die Thylakoidmembran inseriert (Wollman et al., 1999). Die LHCs sind nicht verwandt mit den Lichtsammelproteinen aus Bakterien (z.B. LH1 und LH2 aus Purpurbakterien und Phycobilisomen der Cyanobakterien) oder verschiedenen Algen, bilden aber untereinander eine Gruppe mit deutlichen Homologien einzelner Proteinabschnitte.

1.3 Lichtsammelkomplexe und ihre Verwandten

Die LHCs der höheren Pflanzen sind Teil einer großen Gen-Familie. Ein gemeinsames Motiv zur Einordnung ist die Sequenz der ersten bzw. dritten Transmembranhelix aus LHCII. Das doppelte Vorkommen im LHCII legt nahe, dass in der Evolution eine Genduplikation stattgefunden hat. Die Genfamilie umfasst ganz verschiedene Proteine. So wurden Proteine mit einer Transmembranhelix zunächst als HLIPs (high light inducible proteins) in Cyanobakterien gefunden, inzwischen wurden Proteine mit nur einer solchen Helix auch in höheren Pflanzen identifiziert (OHP, one helix protein). Ihre Funktion ist noch unklar. Diskutiert wird eine Dimerisierung und, möglicherweise transiente, Pigmentbindung. SEPs (stress-enhanced proteins) sind Vertreter der Proteine mit zwei Transmembranhelices. ELIPs (early light-inducible proteins) tragen drei Transmembranhelices. Ein Protein wurde identifiziert, dass vier Transmembranhelices hat: PsbS. Ihm wird eine Bindung von Pigmenten, vor allem Xanthophyllen, zugeschrieben und eine Rolle in der Regulierung der Lichtsammlung der Photosynthese (Li et al., 2000). Mit seiner Anzahl von vier Transmembranhelices wird PsbS zudem als ein mögliches Bindeglied in der Evolution von drei-Helix-Proteinen aus zwei-Helix-Proteinen gehandelt (Green & Pichersky, 1994). Demnach könnte sich folgendes abgespielt haben: zwei Proteine mit nur einer Helix fusionierten zu einem Protein mit zwei verschiedenen Helices, dieses Protein wiederum erfährt eine Genduplikation und ein vier-Helix-Protein mit jeweils zwei homologen Helices entsteht. Diejenigen Mitglieder der Lhc-Genfamilie, die nur drei Transmembranhelices haben, leiten sich davon durch eine Deletion der 4. Helix ab. Eine umfassende Suche nach Lhc-verwandten Genen in Arabidopsis führte Jansson (1999) durch. Dabei wurden Vertreter aller vier Formen mit 1, 2, 3 oder 4 Transmembranhelices gefunden.

1.4 LHCII

Der häufigste Lichtsammelkomplex in der Pflanze ist der LHCII. Unter dieser Bezeichnung verbergen sich die Genprodukte von Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3. Mengenmäßig hat Lhcb1 den größten Anteil, die Häufigkeitsverteilung der drei Proteine ist grob etwa 9 : 3 : 1 (Jansson, 1994). Kürzlich wurde über die Isolation eines Heterotrimeres aus *Arabidopsis* mit allen drei Proteinen berichtet (Jackowski et al., 2001). Somit scheint auch Lhcb3 an der Trimerbildung beteiligt. Lange Zeit war für letztgenanntes Protein die Bildung einer monomeren Form diskutiert worden, während nur für Lhcb1 und Lhcb2 Homo- und/oder Hetero-Trimere angenommen wurden (Jansson, 1994). Alle drei Proteine sind sich sehr ähnlich, die Protein-Sequenzen von Lhcb1 und Lhcb2 haben mehr als 85 % Identität, diejenige von Lhcb3 zu den beiden anderen immerhin noch mehr als 70 % (Pichersky & Jansson, 1996).

Die räumliche Struktur des LHCII wurde von Kühlbrandt et al. (1994) mittels Elektronen-Kristallographie in weiten Teilen mit einer Auflösung von 3,4 Å aufgeklärt. Das Grundgerüst bilden drei Transmembranhelices. Auf der stromalen Seite der Thylakoidmembran befinden sich der N-Terminus und eine Schleifenregion, auf der luminalen Seite sind der C-Terminus, eine Schleife, sowie eine kurze amphipatische Helix lokalisiert. Zwei der Transmembranhelices (Helix 1 und 3) sind in einem Winkel von etwa 30° zur Membranebene geneigt und in einer Art Superhelix-Struktur zueinander angeordnet. Ihre Lage wird durch zwei Ionenpaare stabilisiert, die durch einen Arginin- und einen Glutaminrest in jeder der 2 Helices zustande kommen. Die drei Transmembranhelices werden im Folgenden vom N-Terminus durchnummeriert als Helix 1, 2 und 3 bezeichnet (sie entsprechen den Helices B, C und A in Kühlbrandt et al., 1994). Die aminoterminalen Bereiche der Helices 1 und 3 und die angrenzenden Regionen besitzen eine interne Symmetrie und sind in allen LHCs besonders konserviert. Die beste Auflösung erreicht das Modell in den Transmembranbereichen, außerhalb der Membran konnten Teile der Schleifenregionen sowie N- und C-Terminus nicht näher aufgelöst werden.

Das Strukturmodell zeigt 12 Chlorophylle und zwei Carotinoide, wobei die genaue Natur der Pigmente nicht näher aufgelöst ist. Aufgrund theoretischer Überlegungen wurden 7 Chl a und 5 Chl b einzelnen Positionen zugeordnet. Diese ursprüngliche Einteilung wurde inzwischen über Punktmutationen möglicher Chlorophyllbindestellen zu einem Teil bestätigt, bei einigen Chlorophyllen aber auch in Frage gestellt (Rogl & Kühlbrandt, 1999; Yang et al., 1999; Remelli et al., 1999). Die beiden aufgelösten Carotinoide werden als Luteine angesehen. Ihre Lage in der Mitte des Komplexes trägt wesentlich zur Stabilisierung bei. Ein Hinweis auf ihre essentielle Funktion ist, dass eine *in vitro*-Rekonstitution ohne Carotinoide erst gar keine stabilen Komplexe ergibt (Paulsen et al., 1990). Die beiden Luteine scheinen in den Furchen der Superhelix-Struktur zu liegen und so die Lage des zentralen Helixpaares zu stützen. Inzwischen wurde für ein drittes Xanthophyll des LHCII eine Lage vorgeschlagen (Croce et al. 1999). Neoxanthin hat in etwa eine Stöchiometrie von einem Molekül pro Monomer und

soll sich zwischen der zweiten Helix und dem sich kreuzenden Helix-Paar befinden. Weitere Carotinoide scheinen eher assoziiert als integral vorzuliegen. In Rekonstitutionsexperimenten konnten den genannten Bindestellen zwar geringere aber vorhandene Affinitäten auch für andere als den im Modell eingesetzten Xanthophyllen nachgewiesen werden (Hobe et al., 2000; Croce et al., 1999).

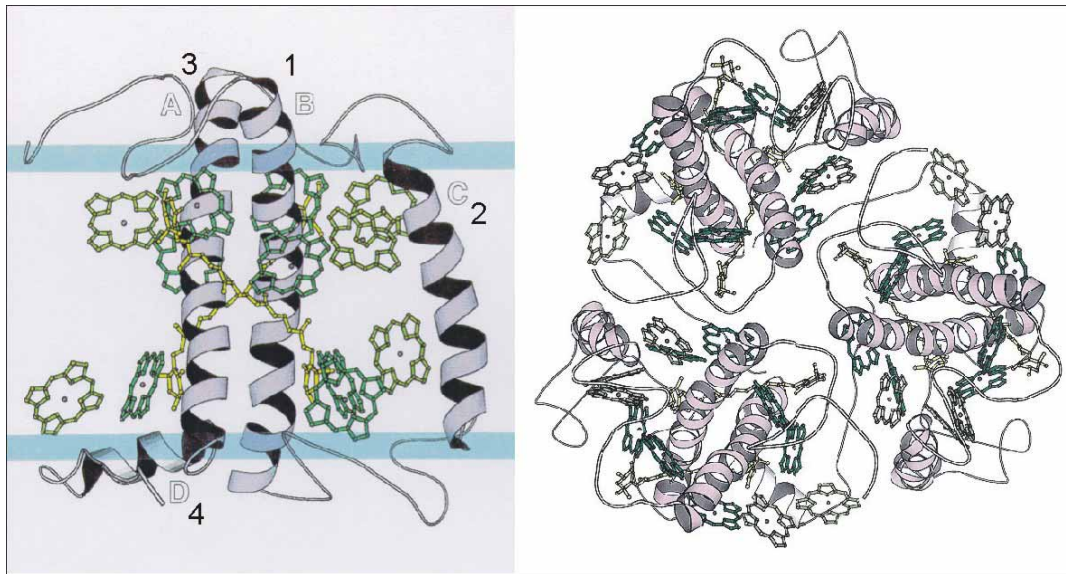


Abb. 1.2 Struktur des LHCII als Monomer und als Trimer

Die Sicht auf das Monomer erfolgt aus der Membranebene. Die Helices sind mit der in dieser Arbeit benutzten Nummerierung versehen, die Buchstaben folgen der Benennung nach Kühlbrandt et al. (1994). Die blauen Bänder deuten die Lage der Membran an, oberhalb befindet sich das Stroma des Chloroplasten, unterhalb das Lumen der Thylakoide. grün: Chlorophylle, gelb: Luteine. Das Trimer auf der rechten Seite ist als Aufsicht auf die Membran vom Stroma gesehen abgebildet. (Abb. aus Kühlbrandt et al., 1994)

Über posttranslationale Modifikationen der Proteine ist relativ wenig bekannt. Berichtet wurde zum Teil über eine Acetylierung des N-Terminus (Jansson, 1994), was einen Schutz vor Protease-Angriff bieten soll.

1.4.1 Unaufgelöste Bereiche des LHCII

Die Strukturaufklärung des LHCII nach Kühlbrandt et al. (1994) ist in den Transmembranbereichen am besten gelungen. Für einige Regionen an der Membranoberfläche dagegen lässt sich nur eine vage oder überhaupt keine Lage ableiten. Die Bereiche ohne räumliche Zuordnung befinden sich insbesondere an den beiden Enden des Proteins – der Aminoterminus bis zur 25. Aminosäure, carboxyterminal die letzten 8 Aminosäuren – aber auch der luminalen Schleife fehlen 15 Aminosäuren zur vollständigen Aufklärung. Mögliche Ursachen dieser Ungenauigkeiten könnten eine generell in diesen Bereichen fehlende Ordnung sein, aber auch ein Artefakt aus den Bedingungen der Kristallisation ist denkbar.

Vielleicht nehmen diese Abschnitte auch mehrere verschiedene aber in sich klar geordnete Zustände ein. Hinzu kommt gerade am N-Terminus eine vergleichsweise große Variation in der Sequenz verschiedener ähnlicher Proteine, die in einer LHCII- Präparation im Gemisch vorliegen können. Die Struktur geht von einem Homotrimer aus. Gerade bei isoliertem Material werden aufgrund der ähnlichen Größe und Eigenschaften leicht andere LHCs mitgeschleppt. Zudem existieren vom zugrunde gelegten Lhcb1 mehrere homologe Gene in einer Pflanze, so dass dadurch eine gewisse Variation hineinkommt.

Der unbestimmte Teil des N-Terminus trägt wichtige Funktionen im Komplex. Er enthält zum Einen das im nächsten Kapitel erwähnte Trimerisierungsmotiv und trägt damit eine Verantwortung für das Zustandekommen von Wechselwirkungen zwischen den Monomeren. Hinzu kommt, dass im Bereich des Aminoterminus eine Phosphorylierungsstelle liegt (Allen, 1992). Zudem scheint die unterschiedliche Zugänglichkeit einer aminoterminalen Region in Monomeren und Trimeren für Chloroplasten-eigene Proteasen den verstärkten Abbau von Monomeren zu fördern (Yang et al., 2000).

Zu diesen in der Kristallstruktur unaufgelösten Bereichen des LHCII kommen Aspekte, die von dieser Struktur nicht erfasst werden, ja gar nicht erfasst werden können. So erfährt der LHCII im Zuge seiner Funktion in der Thylakoidmembran Veränderungen. Die oben erwähnte Phosphorylierung des Komplexes bildet ein Beispiel. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Verteilung des LHCII auf PSII und PSI. Im phosphorylierten Zustand findet eine Umlagerung im Komplex statt, es kommt zu einer Abdissoziation vom PSII und einer erhöhten Anlagerung, wahrscheinlich im monomeren Zustand, an PSI (Allen & Forsberg, 2001). Inzwischen wurde im PSI ein Protein identifiziert (PSI-H), das als Bindestelle für phosphorylierten LHCII fungieren soll (Lunde et al., 2000).

Nach Zer et al. (1999) scheint der LHCII direkt auf Licht zu reagieren. Es wird eine Umlagerung ausgelöst, die im Experiment einen Abschnitt des Aminoterminus für Proteasen besser zugänglich macht. Als mögliche Funktion dieser Konformationsänderung wird eine Erleichterung der Phosphorylierung dieses Bereiches vorgeschlagen.

Das Xanthophyll Zeaxanthin bewirkt eine Fluoreszenzlöschung des LHCII und verschiedenener minorer LHCs (Wentworth et al., 2000). Als ein möglicher Mechanismus dafür kommt eine durch Zeaxanthin ausgelöste Konformationsänderung des LHC in Frage und nicht unbedingt eine direkte Fluoreszenzlöschung durch den Kontakt mit dem Xanthophyll. Zeaxanthin wird während des sogenannten Xanthophyllcyclus in einer Reaktion auf Lichtstress aus Violaxanthin gebildet.

Die drei aufgeführten Beispiele zeigen, dass zur Beschreibung eines biologischen Komplexes ein einzelner Zustand nicht ausreicht. Die Strukturdaten sind als ein Ausgangspunkt zu verstehen. Sie beruhen im Falle des LHCII auf Kristallen der trimeren Form des Komplexes. Auf diesen oligomeren Zustand des LHCII wird im nächsten Kapitel genauer eingegangen.

1.4.2 Das Trimer des LHCII

Der LHCII liegt in seiner funktionellen Form in der Pflanze als Trimer vor. Im Modell erscheinen mehrere Bereiche als Berührungspunkte zwischen den monomeren Untereinheiten: die äußere Flanke der zweiten Transmembranhelix, das N-terminale Ende der ersten Helix mit ihrem Übergang zum Aminoterminal, sowie N- und C-Terminus. Inzwischen haben sich verschiedene Elemente als relevant zur Bildung und Stabilität eines Trimeres herausgestellt.

Das Lipid PG ist essentiell zur Bildung und Stabilität eines Trimeres. In vivo-Untersuchungen haben besonders einen hohen Gehalt einer bestimmten Fettsäure, trans- Δ^3 -Hexadecensäure, herausgestellt (Trémolières, 1991). Zur in vitro-Trimerisierung stellte sich auch der Einsatz von Dipalmitoyl-PG als ausreichend zur Bildung von Trimeren dar (Hobe, 1995). Darauf, dass PG integraler Bestandteil eines Trimeres ist, weisen folgende Sachverhalte: Ein Angreifen des Lipids mit dem Enzym Phospholipase A₂ führt zu einem Zerfall der Trimere in Monomere (Nussberger et al., 1993; Rémy et al., 1982). Zudem lässt ein enzymatisches Abschneiden eines großen Anteiles des N-Terminus (etwa 50 Aminosäuren) in Trimeren PG abdissoziieren und den trimeren Komplex in seine monomeren Untereinheiten zerfallen. Ein sehr viel kürzeres Abspalten von nur 8 Aminosäuren hat dagegen keine derart drastische Auswirkung auf Lipidbindung und Trimer-Intaktheit (Nussberger et al., 1993). Weitere Lipide sind nach Isolation des LHCII aus der Pflanze mit einem Trimer assoziiert, von denen sich DGDG als notwendig zur Kristallisation, nicht aber als integraler Bestandteil des Trimeres herausgestellt hat (Nussberger et al., 1993).

Im Bereich des N-Terminus wurde eine Sequenz identifiziert, die zur Trimerbildung notwendige Aminosäuren enthält. Das Trimerisierungsmotiv WYXXXR hebt insbesondere die Bedeutung der aromatischen Aminosäuren Tryptophan¹⁶ und Tyrosin¹⁷ sowie des positiven Arginin²¹ hervor (Hobe et al., 1995). Als mögliche Funktion dieses Motives wird die Bindung von PG vorgeschlagen, gerade im Hinblick auf die Ergebnisse des oben erwähnten partiellen Proteaseverdaus von Nussberger et al. (1993) eine Funktion, die in dieser Region zu suchen ist. Untersuchungen zu diesem Thema sind am Laufen. Damit benötigt die Bildung stabiler Trimere einen vergleichsweise großen Abschnitt des Aminoterminal. Für eine erfolgreiche Trimerisierung ist eine Deletion nur bis zur 15. Aminosäure zulässig. Fehlt zusätzlich das Tryptophan an Position 16, so werden keine stabilen Trimere mehr erreicht (Hobe et al., 1995). Zur Ausbildung von Monomeren dagegen kann der Aminoterminal bis in den Anfangsbereich der 1. Helix deletiert sein (Cammarata & Schmidt, 1992; Paulsen & Hobe, 1992).

Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung des N-Terminus bei der Ausbildung von Trimeren ist seine Proteasezugänglichkeit. Unter milden in vitro-Bedingungen spaltet die Protease Trypsin im Monomer ein wesentlich längeres Teilstück ab, als im Trimer (Nussberger et al. 1993). Diese Tatsache wird in Experimenten zur Insertion von LHCP in Thylakoid-

membranen genutzt, um die korrekte Assemblierung des Proteins in Trimeren nachzuweisen (Kuttkat et al. 1995; Kosemund, 1999).

Des Weiteren wurde eine Proteaseaktivität in Chloroplasten entdeckt, die spezifisch einen Abschnitt am N-Terminus als Signal zum Abbau zu erkennen scheint. Ein Angriff erfolgt zudem nur im Monomer, der LHCII als Trimer dagegen bleibt weitgehend verschont (Yang et al., 2000). Diese Beobachtung hat keine direkte Auswirkung auf die Stabilität eines isolierten Komplexes ist aber von Bedeutung für die Lebensdauer eines monomeren oder trimeren Komplexes *in vivo*.

Im Bereich des C-Terminus ist das Tryptophan²²² zur Stabilisierung eines Trimers wichtig (Kuttkat et al., 1996). Austauschmutanten unterstrichen die Bedeutung des hydrophoben Charakters des Tryptophans. Standfuß (2000) schlug eine mögliche Wechselwirkung mit dem Isoleucin¹²⁴ eines angrenzenden Monomeres vor. Ein einseitiges Einsetzen einer geladenen Aminosäure führte an beiden Positionen zu einem Abschwächen oder Verlust der Trimerisierungsfähigkeit. Ein gleichzeitiges Verändern beider Aminosäuren, so dass aus der hydrophoben Wechselwirkung ein Ionenpaar entstand, erhielt die Trimerisierungsfähigkeit weitgehend.

Beobachtungen zeigen, dass auch Chlorophylle möglicherweise an den Wechselwirkungen zwischen Monomeren beteiligt sind oder zumindest an der Strukturausbildung, durch die Wechselwirkungen möglich werden (Rogl & Kühlbrandt, 1999; Yang et al., 1999).

Untersuchungen am LHCII können nicht nur mit isoliertem Material durchgeführt werden. Es besteht zudem die Möglichkeit, den Komplex aus Apoprotein mit Pigmenten und Lipiden/Detergentien zu rekonstituieren (Plumley & Schmidt, 1987; Paulsen et al. 1990; Paulsen et al., 1993). Dabei kann auch rekombinantes Protein zum Einsatz kommen. *In vitro* ist es nicht nur gelungen den LHCII in seiner monomeren Form sondern auch als Trimer zu rekonstituieren (Hobe et al., 1994; Rogl et al., 1998). Verschiedene Vergleiche der rekonstituierten Monomere und Trimere mit nativem LHCII zeigen, dass die rekombinanten Formen weitgehend die Eigenschaften der nativen Komplexe tragen. Ein Punkt ist das spektroskopische Verhalten. So findet in rekonstituierten Monomeren und Trimeren ein Energietransfer von Chl b auf Chl a statt, sichtbar als Chl a-Fluoreszenz nach Chl b-Anregung. Der Energietransfer ist ein gutes Maß für die Intaktheit der Komplexe. Rekombinante Monomere und Trimere weisen im CD-Spektrum für sie typische „Peaks“ auf. Dazu kommt, dass das Laufverhalten der rekombinanten Komplexe in einer Gelelektrophorese bzw. im Saccharosedichtegradienten der erwarteten Bandierung in monomere und trimere Form entspricht. Die Pigmentbindung während der Rekonstitution ist spezifisch und rekonstituierte Trimere bilden Kristalle, die denen nativer Trimere identisch sind (Hobe et al., 1994; Rogl, 2000).

Wird das Protein, das zur Rekonstitution verwendet wird, nicht aus der Pflanze sondern durch die Überexpression in *E.coli*-Zellen gewonnen, so ist ein Vorteil, dass man ein LHCP mit definierter Sequenz einsetzt. In einem bakteriellen Expressionssystem ist es zudem möglich, gezielte Mutationen einzufügen. Das lässt sich ausnutzen etwa in der gezielten Veränderung von Komplexeigenschaften wie der Pigmentbindung (Rogl & Kühlbrandt, 1999; Yang et al., 1999; Remelli et al., 1999) oder der Rekonstitutionsfähigkeit. Ein anderer Ansatzpunkt ist der Einbau von Monitorgruppen. Ein Beispiel bilden Motive aus mehreren Histidinen, über die das Protein nachgewiesen und aufgereinigt werden kann. Ein anderes Beispiel sind singuläre Cysteine, die eine ortsspezifische Derivatisierung ermöglichen. Die Bedeutung dieser Aminosäure soll im Folgenden näher beleuchtet werden.

1.5 Die Bedeutung von Cysteinen in der Untersuchung von Proteinen

Proteine enthalten zwei Aminosäuren mit Schwefel, eine von ihnen ist Cystein. Diese Aminosäure hat mit ihrer Thiol-Gruppe (Aminosäurerest: HS-CH₂-) eine besondere Stellung bei der Untersuchung von Proteinen erlangt. Über thiolreaktive Substanzen lässt sich ganz gezielt an Cysteinresten eine Derivatisierung vornehmen. Diese Reaktionen sind in der Regel sehr selektiv, was den Vorteil mit sich bringt, unspezifische Verbindungen vernachlässigen zu können. Die Methodik, Proteine mit singulären Cysteinen zu versehen und über deren Derivatisierung Informationen über das Protein zu gewinnen, wird sehr vielfältig angewendet. Der Ansatz geht manchmal so weit, dass für einen ganzen Abschnitt eines Proteins Mutanten mit singulärem Cystein hergestellt werden. Die Proteine werden parallel den auf das Cystein zielenden Versuchen unterzogen und geben Auskunft über die Lage oder Funktionseinbindung der einzelnen Aminosäuren der untersuchten Region. Ein solcher Ansatz wird gerne als „cysteine scanning mutagenesis“ bezeichnet. Eine Begleiterscheinung dieser Methode ist, dass Aminosäuren mit ganz unterschiedlichen Eigenschaften ausgetauscht werden. Die mögliche Bedeutung z.B. eines hydrophoben Tryptophans oder eines polaren Lysins für Struktur und Funktion kann ein Cystein kaum übernehmen. Bei der zuletzt geschilderten „en gros“-Mutagenese muss dies immer im Hinterkopf behalten werden. Schonender für die Erhaltung der intakten Struktur ist es, den Austausch auf eine Aminosäure wie Serin zu beschränken, die in ihren Eigenschaften dem Cystein am ähnlichsten ist. Der Unterschied zwischen beiden Aminosäuren besteht lediglich in der OH-Gruppe des Serins und der SH-Gruppe des Cysteins. Beschrieben wird auch der Wechsel von Threonin oder Alanin zu Cystein als ein vergleichsweise konservativer Austausch (Howorka et al., 2000). Die Methode wird gerne bei Proteinen mit unbekannter Struktur eingesetzt, um Bereiche zu bestimmen, die dem Medium zugewandt sind. Gerade Membranproteine sind häufige Untersuchungsobjekte. Brennpunkte sind dabei z.B. der Übergang zwischen Transmembranbereich und dem Medium exponierten Positionen, insbesondere bei der Vorhersage von Transmembranhelices. Auch eine vermutete Porenstruktur oder Tasche kann mittels „cysteine

scanning mutagenesis“ bestätigt werden (Hruz & Mueckler, 1999), indem im Membraninneren gelegene Aminosäuren als vom wässrigen Medium erreichbar identifiziert werden.

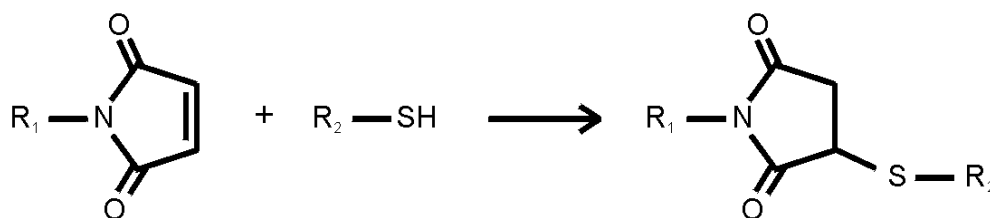
In vielen Proteinen sind Cysteine über die Bildung von Disulfidbrücken ein Struktur- und Stabilitäts-bestimmender Faktor oder aber auch mit ihrer Thiol-Gruppe an einer spezifischen Funktion des Proteins beteiligt. So lässt sich auch der umgekehrte Ansatz, der gezielte Austausch eines nativen Cysteins gegen Serin, zur Informationsgewinnung einsetzen (z.B. Hu & King, 1999; Fraser, 1989). Nicht immer ist es möglich, sämtliche Cysteine eines Proteins ohne Struktur- oder Aktivitätsverlust auszutauschen und eine Mutante gänzlich ohne Cystein aber mit den Eigenschaften des Wildtyps herzustellen. Erst, wenn dies erfolgreich geschehen ist, kann mit dem oben beschriebenen gezielten Einsatz von singulären Cysteinen begonnen werden. In besonderen Fällen ergeben sich Ausnahmen von dieser Regel, etwa wenn ein Membranprotein in Vesikeln betrachtet wird und zusätzliche Cysteine im Inneren der Vesikel über die Membran hinweg nicht von der Thiol-reaktiven Substanz erreicht werden können. Eine Alternative ist die Markierung mehrerer Cysteine im Protein und anschließender Sequenzierung von Peptiden, die die Markierung tragen. Auf diese Weise können diejenigen Cysteine identifiziert werden, die eine Derivatisierung erfahren haben.

Zwei Membranproteine, über deren Struktur viele Studien mit gezielter Cysteinmodifikation vorliegen, sind Rhodopsin (z.B. Langen et al., 1999; Altenbach et al., 1999; Dunham & Farrens, 1999) und Bacteriorhodopsin (Altenbach et al., 1990). Dabei bedienen sich die Autoren ganz unterschiedlicher Methoden, etwa der Elektronenspinresonanz (ESR) (Altenbach et al., 1990; Langen et al., 1999; Altenbach et al., 1999), der Quervernetzung zwischen Molekülen oder Molekülabschnitten (Resek et al., 1994; Cai et al., 2001), der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen (Dunham & Farrens, 1999) und anderen thiolreaktiven Substanzen (Cai et al., 1999; Klein-Seetharaman et al., 1999), sowie der radioaktiven Markierung (Ridge et al. 1995).

reaktive Gruppen:

Zur selektiven Markierung eines Cysteins werden häufig Maleimid- und Iodacetamidgruppen eingesetzt. Diese Reaktion resultiert in einer Thioether-Bindung. Der Angriff selbst geht über ein Thiolat-Ion und ist deshalb pH-abhängig.

nucleophile Addition eines Maleimids:



Weitere Verbindungen zur Cystein-Derivatisierung bilden Methanthiosulfonate (Javitch, 1998; Karlin & Akabas, 1998) und p-Mercuribenzenesulfonat (Hu & King, 1999). Außer

Iodacetamid können weitere Halogenacetamide Verwendung finden. Auch Disulfide können zur Markierung einer Thiolgruppe eingesetzt werden. Ein Beispiel ist 4,4'-Dithiodipyridin (Cai et al., 1999; Klein-Seetharaman et al., 1999), ein symmetrisches Disulfid.

Der häufigste Einsatz thiolreaktiver Verbindungen zielt auf die Zugänglichkeit von Cysteinen für die Markierungssubstanz. Auf ganz unterschiedliche Weise wird eine erfolgte Reaktion nachgewiesen. Sind Zugänglichkeitsuntersuchungen im Bereich eines aktiven Zentrums gefragt, so wird gerne die Aktivität eines Proteins nach der Reaktion mit einer thiolreaktiven Substanz gemessen (Tang et al., 1999; Lo & Silverman, 1998; Javitch et al., 1994; Javitch, 1998). Dies soll Auskunft darüber geben, ob das Fremd-Molekül eine reaktive Tasche besetzt oder den Zugang behindert und so das eigentliche Substrat nicht mehr umgesetzt werden kann. Dieser Ansatz ist häufig bei Membranporen, Transportern und Rezeptoren beschrieben. Ein anderer Weg liegt darin, ein Reaktionsprodukt nachzuweisen, beispielsweise das mit einem Farbstoff markierte Protein oder auch ein Spaltprodukt der Reaktion (Cai et al., 1999; Klein-Seetharaman et al., 1999). Einen interessanten Weg beschreiben Howorka et al. (2000). Die Autoren markieren ihre Cysteine mit einer Verbindung aus thiolreaktivem, hydrophilem Polyethylenglycol, das eine zusätzliche Größe von etwa 5 kDa in das Protein bringt. Mit einem solchen Ansatz werden nur nach außen exponierte Cysteine erreicht. Der Nachweis einer erfolgten Reaktion geschieht über einen sehr deutlichen Laufunterschied in einer denaturierenden Gelelektrophorese.

Über Cysteinderivatisierungen lassen sich noch ganz andere Aspekte als der einfachen Zugänglichkeit einer Thiolgruppe beleuchten. Wird etwa mit Fluoreszenzfarbstoffen gearbeitet, so liegt eine Messung von Energietransfer zwischen zwei Farbstoffen nahe. Die Effizienz eines Energietransfers von einem Donor auf einen Akzeptor kann als ein Maß für die Distanz der beiden benutzt werden. Der Resonanz-Energie-Transfer (RET) nach Förster gehorcht der Bedingung $E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6)$ mit E =Transfereffizienz, R_0 =Abstand mit halbmaximaler Transfereffizienz und R =Abstand zwischen Donor und Akzeptor (vgl. van der Meer et al., 1994). E ist die Messgröße, R_0 ist spezifisch für ein Donor/Akzeptor-Paar und R kann mit Hilfe der oben genannten Formel errechnet werden. Donor und Akzeptor können dabei auch z.B. fluoreszierende Substratanaloga, markierte Lipide oder ein Protein-intrinsisches Tryptophan sein. Corbalan-Garcia et al. (1993) nutzen in ihrer Untersuchung einer Ca^{2+} -ATPase mehrere Möglichkeiten an Farbstoffplatzierung. Eine Anwendung des RET bei Phospholamban untersucht die oligomere Struktur des Proteins (Li et al., 1999).

Eine andere Form der Distanzbestimmung wurde von Voss et al. (1995) dargestellt. Sie brachten ein Metallion (CuII) und eine Nitroxid-Markierung spezifisch in T4 Lysozym ein und nutzten die ESR, um den Abstand zwischen beiden zu errechnen.

Zwei Pyrenmoleküle formen in einem relativ geringen Abstand von etwa 10 Å ein Excimer, dessen Bildung durch eine Verschiebung der Fluoreszenz zu längeren Wellenlängen sichtbar wird. (~377 nm zu ~475 nm) Ein Anwendungsbeispiel unter Einbeziehung der Mutagenese

von singulären Cysteinen ist die Detektion von spezifischen Berührungspunkten bei der Aggregation der Carboanhydrase (Hammarström et al., 1999).

Wertvolle Hinweise geben umgebungssensitive Farbstoffe. Ein Beispiel bildet der Fluorophor Acrylodan, der von Palmer et al. (1996) zur Untersuchung von Streptolysin O verwendet wurde. Streptolysin O ist ein Toxin, das als Monomer an Zellmembranen bindet, inseriert und in oligomerer Form Poren ausbildet, die die Membran für Ionen und Makromoleküle durchlässig machen. Eine Wellenlängenverschiebung der Fluoreszenz von Acrylodan bezüglich polarer und unpolarer Umgebung erlaubte Bereiche einzugrenzen, die bei der Insertion und Porenbildung einen Wechsel von einer Ausrichtung ins wässrige Medium hin zur Lipidschicht auszuführen scheinen.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Der LHCII ist eines der wenigen Membranproteine, dessen Struktur durch die elektronenmikroskopische Betrachtung von Kristallen in weiten Teilen beschrieben wurde (Kühlbrandt et al., 1994). Wichtigen Elementen, wie den Transmembranhelices oder einzelnen Pigmenten konnte eine Lage zugeordnet werden. Das Modell ermöglichte eine ganze Reihe von weiteren Studien. Für etwa die Untersuchung eines Energietransfers und einer Kopplung zwischen Pigmenten ist es essentiell, die Position der Pigmente so genau wie möglich zu kennen (van Amerongen & van Grondelle, 2001; Gradinaru et al., 1998). Um die biologischen Funktionen eines Komplexes zu beschreiben, reicht ein Kristall nicht aus. Eine Reaktion auf Signale und Umgebungsveränderungen, wie einer Phosphorylierung oder Ligandenbindung, erfordert eine gewisse Beweglichkeit des Komplexes, um einen anderen Zustand einzunehmen. Hier sind Methoden gefragt, die das Protein in Lösung betrachten.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Monomere und Trimere des LHCII zu vergleichen. Über strukturelle Unterschiede zwischen beiden Zuständen ist kaum etwas bekannt. Eine Kristallisation von Monomeren, die einen direkten Vergleich von Trimeren und Monomeren ermöglichen würde, gelang bis jetzt nicht. Um so interessanter wäre es, Unterschiede zwischen beiden Formen aufzudecken. Untersucht werden sollte die Zugänglichkeit ausgewählter Positionen in beiden Komplexen. Aus den Ergebnissen wurden Hinweise auf mögliche Konformationsänderungen im Zuge der Trimerisierung oder Wechselwirkungen zwischen Monomeren erhofft.

Nebenbei sollten Informationen über Bereiche des LHCII eingeholt werden, deren Struktur noch unbekannt ist. Der trimere LHCII bietet einzelne Abschnitte, die für Funktion und Struktur des Komplexes von Bedeutung sind, aber in ihrer Lage im Kristallmodell nicht näher eingegrenzt werden konnten.

Die Vorgehensweise bestand zunächst in der Herstellung von LHCII-Mutanten, die ein singuläres Cystein an ausgewählter Position enthielten. Diese Aminosäure bietet das selektive Angriffsziel für eine Modifikation. Um die veränderten Proteine in weitere Versuche

einsetzen zu können, musste für sie die Rekonstitutionsfähigkeit zu Monomeren und zu Trimeren nachgewiesen werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte zudem der Einsatz verschiedener bestehender und neuer Methoden getestet werden, den LHCII in vitro zu trimerisieren. Dabei wurde soweit möglich ein Versuch einer Optimierung des Verfahrens und der Ausbeute angestrebt.

Kern der Arbeit waren Versuche, mittels Ankopplung von Fluoreszenzfarbstoffen Informationen über den LHCII zu gewinnen. Dabei sollte zunächst eine Methode ausgearbeitet werden, die Zugänglichkeit der singulären Cysteine im gefalteten Komplex, in Monomeren und Trimeren, zu beschreiben. Des weiteren war auch das spektroskopische Verhalten von Fluoreszenzfarbstoffen im intakten Komplex Untersuchungsgegenstand.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologie

2.1.1 Konstruktion der LHC-Mutanten

Das Protein des Lichtsammelkomplexes LHCII (LHCP) kann erfolgreich in *E.coli* überexprimiert werden. Die erforderliche Information wird dabei in den Bakterienstamm über ein Plasmid eingebracht. In dem verwendeten Expressionsvektor pDS12-RBSII (Bujard et al., 1987) ist die Sequenz des Proteins hinter einen Phagen-Promotor (P_{N25} , T5-Phage) gesetzt, das Gen selbst steht unter der Kontrolle des lac-Operons. Das Plasmid trägt außerdem die Information für eine Ampicillin-Resistenz, ein wichtiger Faktor zur Selektion transformierter Zellen. Mit diesem Expressionssystem ist die Möglichkeit gegeben, auf DNA-Ebene gezielte Veränderungen einzufügen und nach Expression Proteine mit definierter Sequenz zu gewinnen. Für einige Versuche dieser Arbeit wurden zwei gezielt eingebrachte Elemente im LHCP benötigt: zum Einen ein singuläres Cystein (singulär bedeutet im ganzen Protein befindet sich nur ein einziges Cystein) an ausgesuchten Positionen, zum Anderen das Vorhandensein eines Motives aus 6 Histidinen. Die Cystein-Gruppe dient dazu, SH-reaktive Substanzen an definierter Stelle an das Protein zu binden. Das His₆-Motiv ist ein gebräuchliches Epitop, um ein Protein an einer mit Ni²⁺ oder Cu²⁺ beladenen Oberfläche zu immobilisieren.

Die Konstruktion der Einzelcystein-Mutanten verwendete folgende schon vorhandene Klone:

Klon	Beschreibung	Herkunft
D7f.3	mature Aminosäuresequenz des LHCP	Dilly-Hartwig et al. (1998)
D7AH2	LHCP mit His ₆ -Motiv in stromaler Schleife	Kosemund (1999)
C2.4h	pLHCP mit C-terminalem His ₆ -Motiv	„
C3.2h	LHCP mit C-terminalem His ₆ -Motiv	„
37i.1	pLHCP mit singulärem Cystein nahe C-Terminus	Edhofer (1993)
37k.1	pLHCP mit singulärem Cystein in stromaler Schleife	Ottmann (1999)

Alle im Zuge dieser Arbeit hergestellten Klone basieren auf D7f.3 von Dilly-Hartwig (1998). Dieser Klon codiert das mature Protein des LHCII. Die Sequenz entspricht dem cab-Gen AB80 aus Erbse (Cashmore, 1984). Zunächst wurde durch einen Mutagenese-Primer das im murenen LHCP vorhandene Cystein an Stelle 79 durch ein Serin ersetzt (beschrieben ist die Konstruktion der Mutante in Kap. 2.1.2). Der Primer wandelte das TGT-Codon für Cystein in ein TCT-Codon für Serin um. Die entstandene Mutante exprimiert ein Protein, das kein

Cystein mehr enthält. Dieser Klon C79S bildete die Grundlage für sämtliche anderen in dieser Arbeit entstandenen Klone. Für sie bezieht sich die Nomenklatur nur noch auf neu eingefügte Cysteine und His₆-Motive (auch „His-Tag“ oder Hexahistidylrest genannt). Die Angaben zur Lage der Cysteine gehen dabei von der Numerierung der Aminosäuren in D7f.3 aus und berücksichtigen im Laufe der Klonierung zusätzlich eingefügte Aminosäuren nicht.

Bei der Herstellung sämtlicher neuer Mutanten wurde jeweils überprüft, ob der neue Klon Inclusion bodies produzierte und ob das DNA-Muster den Erwartungen entsprach. Darüber hinausgehende Tests, wie auf das Vorhandensein von SH-Gruppen oder His₆-Motiven, wurden nur bei eindeutigem Bedarf durchgeführt. Bei positiven Mutanten wurde zur Sicherstellung eine Sequenzierung durchgeführt.

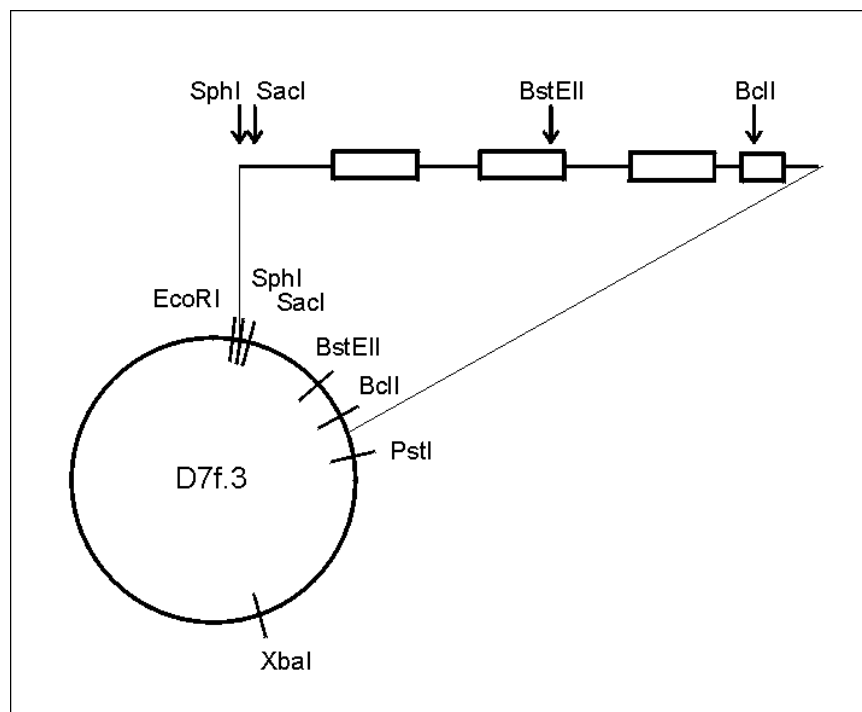


Abb. 2.1 Lageschema der verwendeten Restriktionsschnittstellen am Beispiel des Plasmides von D7f.3.

Das codierte Protein ist horizontal auf einer Linie dargestellt. Rechtecke symbolisieren die drei Transmembranhelices sowie die amphipatische Helix des gefalteten Komplexes.

Zur Konstruktion von S3C wurde der Expressionsvektor aus C79S mit SphI und SacI geschnitten. Die komplementären Einzelstrang-Oligonukleotide „SphSacI+“ und „SphSacI-“ (die Sequenz ist im Anhang aufgeführt) wurden zusammengefügt (s. „Annealing“, Kap. 2.1.8) und ersetzt als Insert das analoge Fragment von C79S. Damit wurde das ursprünglich im Protein an dritter Position befindliche Serin durch ein Cystein ausgetauscht, die Benennung des Klones nach der Lage des Aminosäure-Austausches ergibt den Namen S3C. Abb. 2.2 zeigt ein Schema zur Verdeutlichung der beschriebenen Konstruktion von S3C.

Zum Einbau eines C-terminalen „His-Tag“ in S3C wurden die Expressionsvektoren von C2.4h und S3C mit EcoRI und BstEII restringiert. Das große Fragment von C2.4h (C-terminalen Bereich codierend und Vektor) und das kleine Fragment von S3C (N-terminalen Bereich codierend) wurden ligiert, der entstandene Klon heisst S3Ch. Hier bezieht sich das im Namen angehängte „h“ auf das Vorhandensein eines Hexahistidylrestes im Protein.

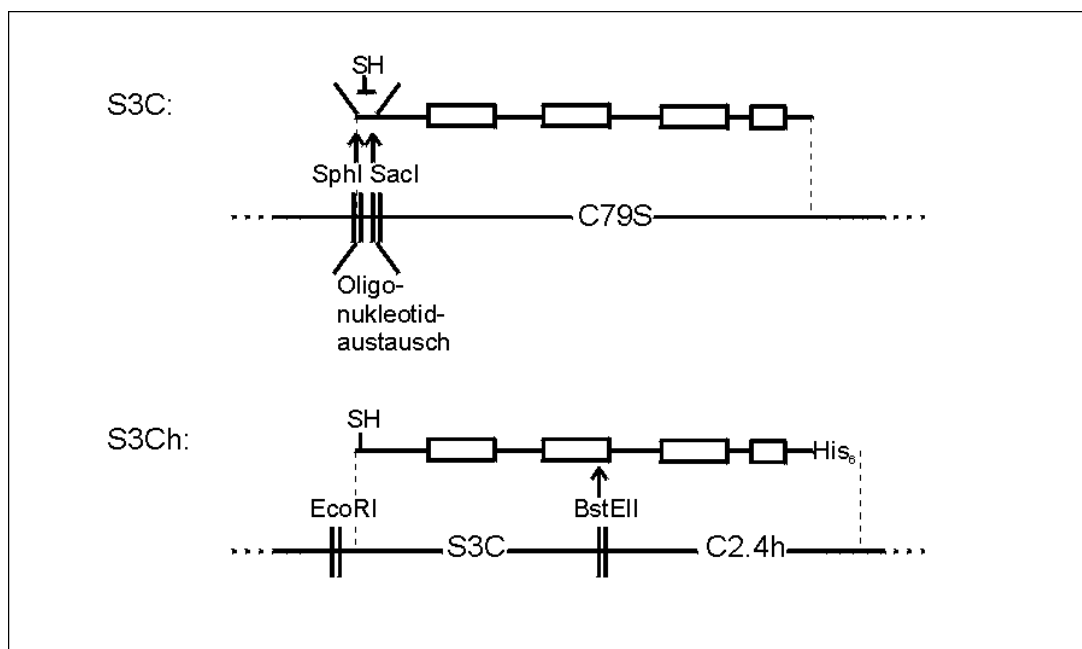


Abb. 2.2 Schema der Konstruktion von S3C und S3Ch

Für jede LHC-Mutante besteht das Schema im oberen Teil aus der Information auf Proteinebene, darunter wird jeweils ein Ausschnitt des Plasmides mit der Herkunft der Teilstücke dargestellt.

Legende: Rechtecke deuten die drei Transmembranhelices sowie die kürzere amphipatische Helix des gefalteten Komplexes an. SH: Cysteinrest; His₆: Hexahistidylgruppe; ||: Restriktionsschnittstellen.

Die Konstruktion eines LHCs mit singulärem Cystein in der stromalen Schleifenregion und einem His₆-Motiv am C-Terminus erforderte zunächst die Restriktion der Plasmide aus S3Ch und 37k.1 mit den Enzymen BclI und XbaI. Dazu war es nötig, die ursprünglich aus Zellen des *E.coli*-Stammes JM 101 gewonnene Plasmid-DNA in den Stamm SCS 110 zu transformieren. Aus diesen Kulturen gewonnene Plasmid-DNA konnte wegen dort fehlender dam-Methylierung mit den dam-Methylierungs-sensitiven Enzymen BclI und XbaI geschnitten werden. Das kleine Fragment aus S3Ch mit der Sequenz für das His₆-Motiv am C-Terminus und das Vektorfragment aus 37k.1 wurden ligiert und in JM 101 transformiert, der entstandene Klon pS160Ch codiert ein pLHCP, ein Vorläuferprotein des LHCP mit einer „precursor“-Sequenz am N-Terminus.

Um nun den N-Terminus des maturen Proteins zu erhalten, wurde mit BstEII und PstI das die stromale Schleife und den C-Terminus codierende Fragment aus pS160Ch herausgeschnitten und gegen das entsprechende Fragment aus C79S ausgetauscht. Die entstandene Mutante S160Ch trägt den N-Terminus eines LHCP.

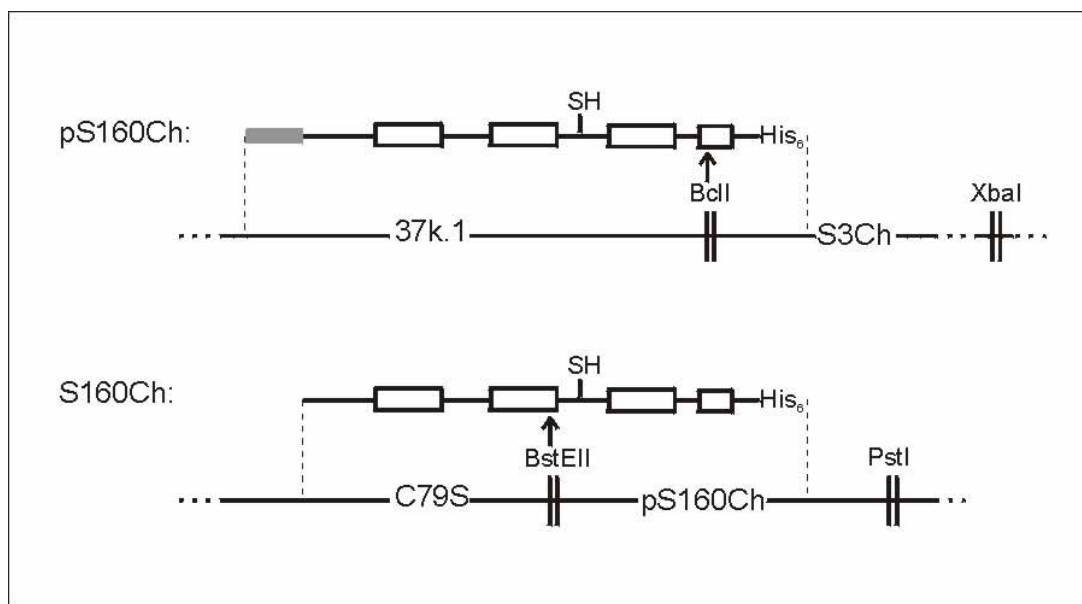


Abb. 2.3 Schema der Konstruktion von pS160Ch und S160Ch

Legende s. Abb. 2.2. Das graue Teilstück auf Proteinebene stellt den „Precursor“-Abschnitt des pLHCP dar.

Der Einbau eines Cystein nahe des C-Terminus erforderte die Plazierung eines His₆-Motives abweichend vom bisher beschriebenen Schema. S3Ch und S160Ch tragen einen Hexahistidylrest am C-Terminus angehängt. Auf diese Weise liegen Cystein und Histidine, stellt man sich den Komplex in der Membran vor, auf der jeweils anderen Seite der Membran. Um dieses Prinzip der räumlichen Trennung von Cystein und Histidin-Resten auch für eine LHC-Mutante mit Cystein auf luminaler Seite der Membran zu verwirklichen, wurden zwei neue Regionen für den „His-tag“ ins Auge gefasst: N-Terminus und stromale Schleife. Zunächst wird die Konstruktion des entsprechenden Klones mit 6 Histidinen in der stromalen Schleife beschrieben.

Zur Herstellung von V229Csh mussten wie bei S160Ch zunächst die Expressionsvektoren der Ausgangsklone D7AH2 und 37i.1 in SCS 110-Zellen transformiert werden. Der anschließende Verdau mit BstEII und BclI ergab ein Insert aus D7AH2 mit der Information des His₆-Motives der stromalen Schleifenregion und ein Vektorfragment aus 37i.1 mit der Sequenz des pLHCP-N-Terminus und des Cystein-tragenden C-Terminus. Der daraus entstandene Klon pV229Csh codiert ein pLHCP.

Zur Erlangung des N-Terminus des murenen LHCP wurde mit BstEII und PstI aus pV229Csh ein Insert mit der Information des in der Schleife befindlichen His₆-Motives und des nahe des C-Terminus eingefügten Cysteins ausgeschnitten, sowie aus dem Plasmid von C79S ein Vektorfragment. Der nach Ligation und Transformation hergestellte Klon heisst V229Csh und codiert ein LHCP.

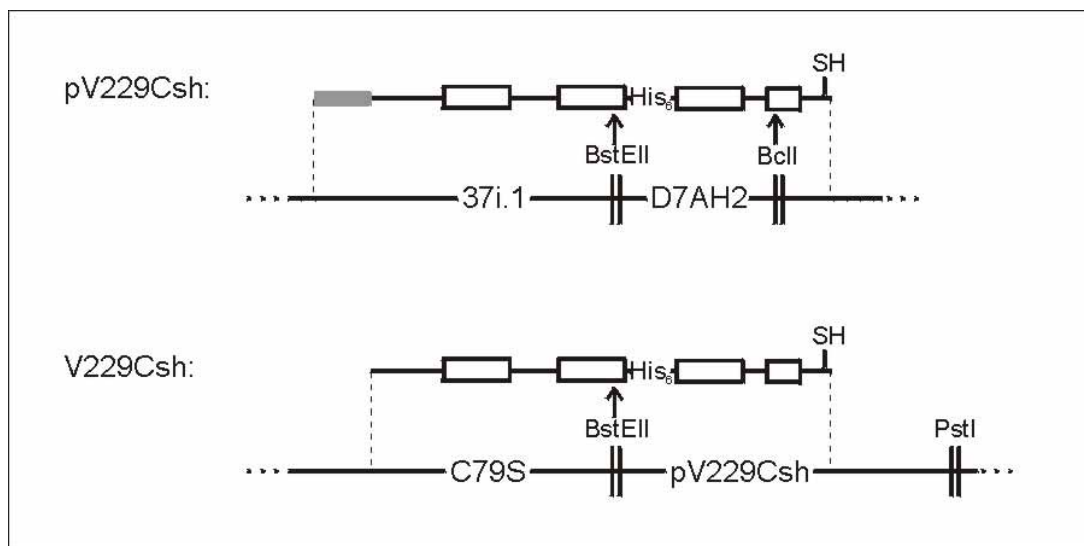


Abb. 2.4 Schema der Konstruktion von pV229Csh und V229Csh

Legende s. Abb. 2.2. Das graue Teilstück auf Proteinebene stellt den Precursor-Abschnitt des pLHCP dar.

Für die LHC-Mutante V229Ch wurde zunächst ein Konstrukt aus C79S und 37i.1 über BstEII- und PstI-Restriktion hergestellt. Das Insert aus 37i.1 trägt die Information für ein Cystein nahe des C-Terminus, der resultierende Klon V229C codiert ein LHCP. Der Erfolg wurde über die Fähigkeit des Proteins, mit einem SH-reaktiven Farbstoff (hier RM) zu reagieren, überprüft.

In das Plasmid aus V229C wurde die Information für ein His₆-Motiv über den Einbau eines Doppelstrang-Oligonukleotids aus „HisSac+“ und „HisSac-“ an der SacI-Schnittstelle eingebracht. Auf diese Weise sollte ein „Histag“ in der Nähe des N-Terminus plaziert werden. Um eine Religation des mit nur einem Enzym geschnittenen Vektors zu vermeiden wurde dieser dephosphoryliert, das Insert im Gegenzug phosphoryliert. Die nach Transformation erhaltenen Klone wurden auf "Inclusion bodies"-Produktion getestet und über einen Westernblot auf das Vorhandensein eines His₆-Motives geprüft.

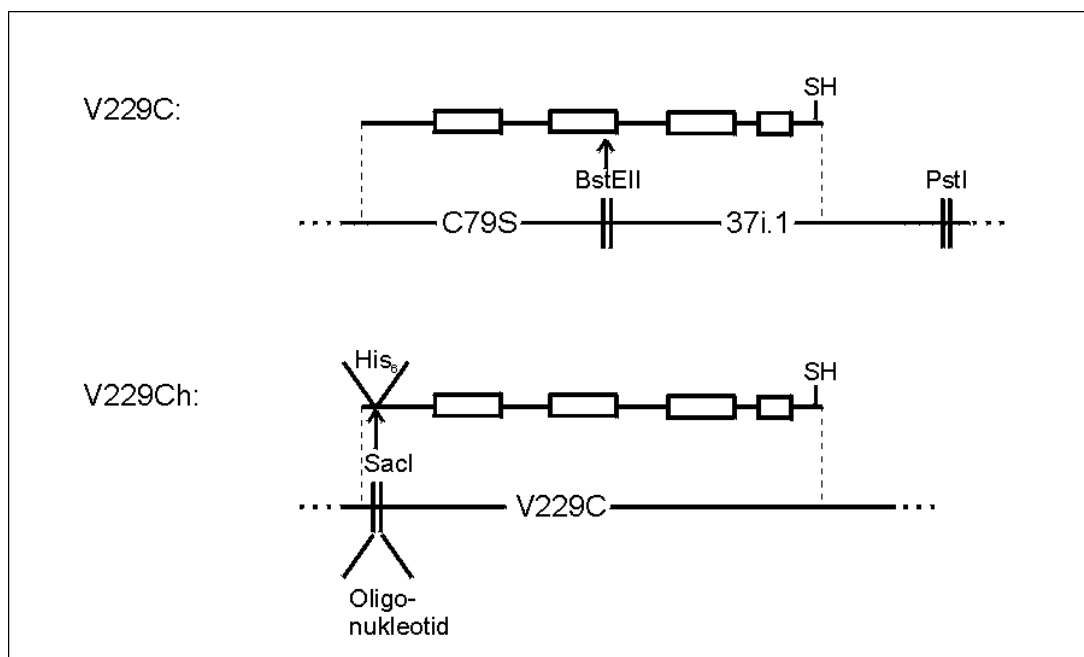


Abb. 2.5 Schema der Konstruktion von V229C und V229Ch

Legende s. Abb. 2.2.

Die Konstruktion der Klone S52Ch und S106Ch wurde von Stefanie Storf im Rahmen ihrer Diplomarbeit (2001) durchgeführt und soll hier nicht weiter erklärt werden.

Klon	Beschreibung		Ausgangs-klone	Arbeits-titel
	auf Proteinebene	auf DNA-Ebene		
C79S	LHCP ohne Cystein	wie D7f.3, aber Basenaustausch an Stelle 347: TCT statt TGT	D7f.3	Hu1
S3C	LHCP mit singulärem Cys nahe dem N-Terminus	wie C79S, aber Basenaustausch an Stelle 119: TGT statt TCT	D7f.3 C79S	Hu2
S3Ch	LHCP mit singulärem Cys nahe N-Terminus und His ₆ -Motiv am C-Terminus	wie S3C, aber (CAC CAT) ₃ -Motiv nach 807 eingefügt	S3C C2.4h	Hu4
<i>pS160Ch</i>	pLHCP mit singulärem Cys in der stromalen Schleife und His ₆ -Motiv am C-Terminus	wie 37k.1 (CAC CAT) ₃ -Motiv nach 807 eingefügt	37k.1 S3Ch	Hu5
S160Ch	LHCP mit singulärem Cys in der stromalen Schleife und His ₆ -Motiv am C-Terminus	wie C79S, aber Austausch an Stelle 589: TGC statt AGC; (CAC CAT) ₃ -Motiv nach 807 eingefügt	C79S pS160Ch	Hu10
<i>V229C</i>	LHCP mit singulärem Cys nahe C-Terminus	wie C79S, aber Austausch an Stelle 796/797: TGT statt GTT	C79S 37i.1	Hu8
V229Ch	LHCP mit singulärem Cys nahe C-Terminus und His ₆ -Motiv nahe N-Terminus	wie C79S, aber Austausch an Stelle 796/797: TGT statt GTT; Einfügung von (CAC CAT) ₃ -Motiv in SacI	V229C	Hu9
<i>pV229Csh</i>	pLHCP mit singulärem Cys nahe C-Terminus und His ₆ -Motiv in der stromalen Schleife	wie 37i.1 (CAC CAT) ₃ -Motiv nach 552 eingefügt; ApaI-Schnittstelle; enthält noch PstI/PstI-Fragment des Ursprungsvektors	D7AH2 37i.1	Hu6
V229Csh	LHCP mit singulärem Cys nahe C-Terminus und His ₆ -Motiv in der stromalen Schleife	wie C79S, aber Austausch an Stelle 796/797: TGT statt GTT; (CAC CAT) ₃ -Motiv nach 552 eingefügt; ApaI-Schnittstelle	C79S pV229Csh	Hu7
die folgenden zwei Klone wurden von Stefanie Storf während ihrer Diplomarbeit hergestellt:				
S52Ch	LHCP mit singulärem Cys vor der ersten Helix und His ₆ -Motiv am C-Terminus			SchB
S106Ch	LHCP mit singulärem Cys in der luminalen Schleife und His ₆ -Motiv nahe N-Terminus			St1.5

Tab. 2.1 Tabelle der im Zuge dieser Arbeit erstellten und verwendeten Klone mit singulärem oder keinem Cystein

Kursiv gesetzte Klone wurden nur zur Konstruktion anderer LHC-Mutanten verwendet und tauchen im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht mehr auf; sie selbst wurden nicht sequenziert.

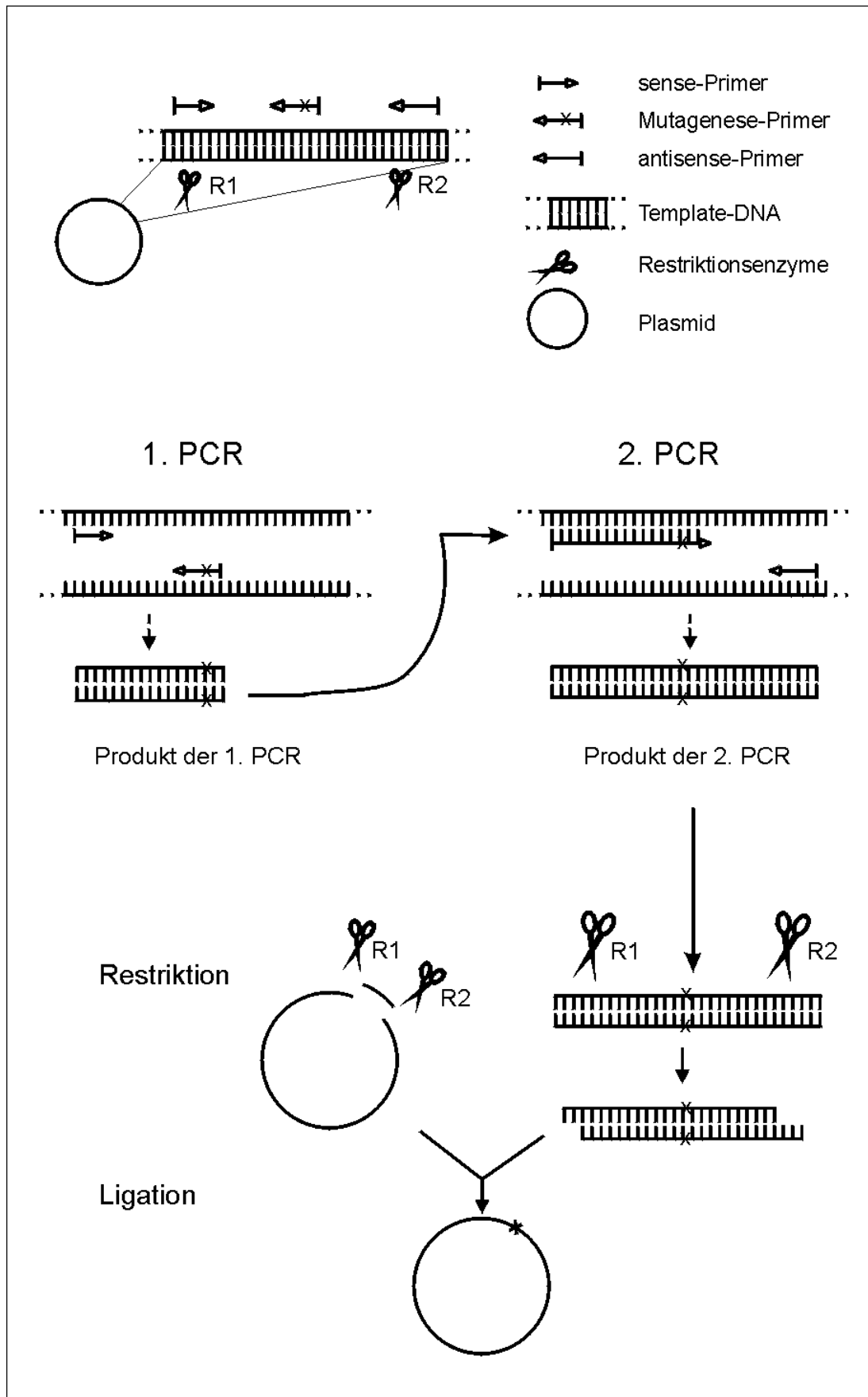
2.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe der PCR

Um eine gezielte Veränderung in einer Basensequenz einzufügen, kann man sich der PCR bedienen. Das Schema der in dieser Arbeit benutzten Methode nach Chen und Przybyla (1994) ist in Abb. 2.6 grob dargestellt. Es werden insgesamt drei verschiedene Primer benötigt: Je ein „sense“- und ein „antisense“-Primer, die die zu mutierende Sequenz flankieren, dazu ein weiterer Primer, der die gewünschte Veränderung der Basensequenz trägt. Dieser Mutagenese-Primer muss noch genügend komplementäre Anteile zur Matrizen-DNA (Template) besitzen, um eine ausreichend starke Bindung zu gewährleisten. Wichtig ist weiterhin, dass sich auf beiden Seiten der einzufügenden Mutation je eine Restriktionsschnittstelle befindet, die nur einmal im ganzen Plasmid vorkommt und die innerhalb des von den beiden anderen Primern abgesteckten Abschnittes bleibt.

Der Ablauf gliedert sich zunächst in zwei hintereinandergeschaltete PCR-Ansätze. Die erste PCR benutzt den Mutagenese-Primer zusammen mit einem der unveränderten Primer. Es entsteht ein DNA-Abschnitt, der die Mutation an seinem Rand trägt. Dieses Produkt der ersten PCR wird aufgereinigt und als Primer zusammen mit dem zweiten unveränderten Primer zur zweiten PCR eingesetzt. Das Produkt des zweiten PCR-Ansatzes ist ein DNA-Abschnitt, der die Mutation in seiner Mitte trägt, flankiert von zwei verschiedenen Restriktionsschnittstellen. Er wird über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und nachgewiesen, anschließend aus dem Gel eluiert und aufgereinigt.

Das Endprodukt der 2. PCR wird mit den beiden Restriktionsenzymen verdaut. Über Ligation mit dem ebenfalls geschnittenen Ursprungsvektor erhält man ein Plasmid, das sich nur in der gewünschten Mutation vom Ausgangsplasmid unterscheidet.

Abb. 2.6 Schema der ortsgerechten Mutagenese mit Hilfe der PCR (nächste Seite →)



Im Folgenden ist die Methode anhand des Austausches des Cysteins an Position 79 aus D7f.3 gegen ein Serin beschrieben:

Material:

PCR-Gerät: Mastercycler S330 (Eppendorf, Hamburg)

10x Pfu-Puffer (Stratagene)

Pfu-Polymerase (Stratagene)

Primer-DNA

Template-DNA

Mineralöl

25 mM dNTP

Der erste PCR-Ansatz enthielt 250 ng Template-DNA (D7f.3), je 1 μM „sense“- und „antisense“-Primer („DS23+“ als „sense“-Primer bzw. „Paulsen“ als Mutagenese-Primer), 1x Pfu-Puffer und 250 μM dNTP; 2,5 U Pfu-Polymerase wurden erst später während der ersten 95°C-Phase im PCR-Gerät zugegeben. 100 μl PCR-Ansatz in einem 0,5 ml-Eppendorfgefäß wurden mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet und kurz zentrifugiert, dann im PCR-Gerät plaziert. Das Programm bestand aus:

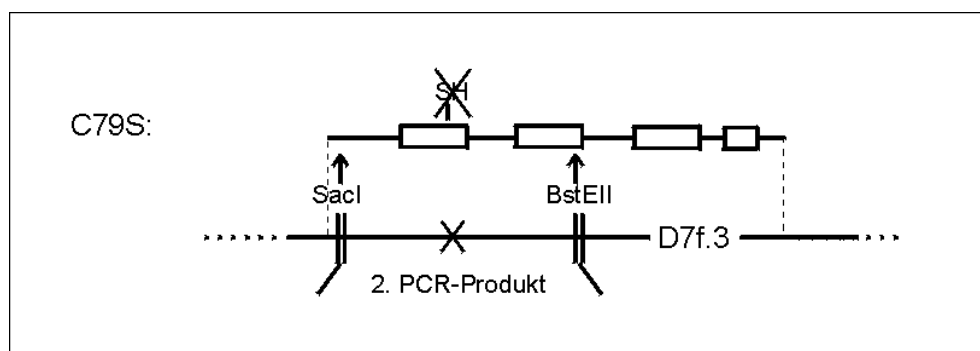
	1 x	1 min	95°C	←	Pfu-Polymerase-Zugabe
Zyklus:	25 x	(60 sec	92°C		Denaturierung
		60 sec	52°C		„Annealing“
		90 sec	72°C)		„Elongation“
	1 x	10 min	72°C		
	4°C		bis zum Abbruch		

Der PCR-Ansatz wurde auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt, das PCR-Produkt ausgeschnitten und extrahiert. Der entstandene DNA-Doppelstrang hatte eine Länge von 334 bp. Bei dieser Größe war ein Erfolg der zweiten PCR-Runde fraglich. Eine kritische Länge für einen Primer liegt bei etwa 300 bp. Um die Chancen zu erhöhen wurde der Strang durch einen Verdau mit SphI auf 246 Basen verkürzt, über ein Gel aufgetrennt und extrahiert.

Der Ansatz der zweiten PCR erfolgte nach dem Schema der ersten PCR, Abweichungen waren folgende: Als „sense“-Primer eingesetzt wurde das verkürzte Produkt der ersten PCR, als „antisense“-Primer 1 μM „LHCP 757“. Der „sense“-Primer sollte im Ansatz ebenfalls eine Größenordnung von etwa 1 μM erreichen. Nach einer Konzentrationsbestimmung (s. Kap. 2.1.7) lässt sich bei bekannter Größe des DNA-Stückes der molare Gehalt leicht ausrechnen: das mittlere Molekulargewicht eines Basenpaares beträgt 620. Die Zyklen-Anzahl der zweiten

PCR wurde auf 35 erhöht, die Annealing-Temperatur in zwei parallelen Ansätzen auf 48°C bzw. 50°C abgesenkt.

Der Ansatz der zweiten PCR wurde über ein Agarosegel aufgetrennt und die Bande mit der erwarteten Länge (489 bp) aus dem Gel extrahiert. Der DNA-Doppelstrang wurde mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *BstEII* geschnitten und gegen das analoge Fragment in D7f.3 ausgetauscht. Die entstandene Mutante heisst C79S, der Name stellt den Austausch des ursprünglichen Cysteins (C) an Position 79 gegen ein Serin (S) dar.



2.1.3 Restriktion

Restriktionsenzyme, oder auch Restriktionsendonucleasen, spalten DNA-Doppelstränge an spezifischen Stellen. Ihre Aufgabe in den Bakterien, aus denen sie ursprünglich stammen, ist es fremde DNA zu zerstören. Dazu muss die eigene DNA vor ihrem Angriff sicher gemacht werden. Dies geschieht durch Methylasen, die das gleiche Sequenzmotiv wie die entsprechende Endonuclease erkennen und eine Base der Schnittstelle methylieren. Durch diese Veränderung kann das Restriktionsenzym dort nicht mehr schneiden.

Im Laufe dieser Arbeit wurden zwei Restriktionsendonucleasen verwendet, die gegen die Methylierung der *dam*-Methylase sensitiv sind. Diese erkennt das Sequenzmotiv GATC und methyliert den enthaltenen Adenin-Rest. Sie ist im ursprünglich verwendeten *E.coli*-Stamm JM 101 vorhanden. Das zu schneidende Plasmid wurde daraufhin im *E.coli*-Stamm SCS 110, der diese Methylierung nicht anfügt, exprimiert und aus diesem isoliert.

Verwendete Restriktionsenzyme:

Enzyme	optimaler Puffer	Temperatur	sensitiv für dam-Methylierung	Sequenzmotiv
BclI	NEB3	50°C	+	T/GATCA
BstEII	NEB3	60°C	-	G/GTNACC
EcoRI	NEB U	37°C	-	G/AATTC
PstI	NEB3	37°C	-	CTGCA/G
SacI	NEB1+BSA	37°C	-	GAGCT/C
SphI	NEB2	37°C	-	GCATG/C
XbaI	NEB2+BSA	37°C	+	T/CTAGA
XmaI	NEB4+BSA	37°C	-	C/CCGGG

Die Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Als Richtlinie für die Menge an Endonuclease gilt, dass ein Unit Enzym 1 µg DNA in einer Stunde unter optimalen Bedingungen verdaut. Bei einem Doppelverdau mit zwei Enzymen gleichzeitig oder hintereinander konnten jeweils für beide Enzyme passende Bedingungen an Puffer gefunden werden.

Nach einem Restriktionsverdau wurde der Erfolg über ein Agarosegel kontrolliert. Zur Weiterverwendung wurde die DNA-Bande mit erwarteter Länge ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel extrahiert.

2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wird eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die in einem elektrischen Feld aufgetrennte DNA kann mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Letzteres interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäuren und wird bei Anregung mit UV-Licht stark fluoreszierend. Die Detektion mit Ethidiumbromid erlaubt die quantitative Auswertung der DNA-Banden, wenn ein entsprechend bekannter Standard mit aufgetragen wurde. Zur Bestimmung der Länge einzelner DNA-Fragmente lässt man einen DNA-Molekulargewichtsmarker mitlaufen. Seine Banden dienen zusätzlich als Vergleich zur DNA-Mengenbestimmung.

Material:

10 x TBE-Puffer:

1 M	Tris-HCl pH 8,3
0,83 M	Borsäure
10 mM	EDTA

Agarose

10 x Auftragspuffer:

1 mg/ml	Bromphenolblau
1 mg/ml	Xylencyanol
20 %	Glyzerin

DNA-Molekulargewichtsmarker:

BsteII-geschnittene λ -DNA
100 bp Leiter

Ethidiumbromid-Stammlösung :

10 mg/ml

Die Agarosegele bestanden je nach Größe der aufzutrennenden Probe aus 0,5-2 % Agarose. Als Richtlinie gilt, je kleiner das DNA-Fragment ist, desto höherprozentig muss das Agarosegel sein. Sie wurden hergestellt, indem die Agarose in 1 x TBE-Puffer kurz aufgekocht wurde bis sich die ganze Agarose gelöst hatte und eine klare Lösung vorlag. Diese wurde auf Glasplatten oder, für dickere Gele, in einer Wanne ausgegossen (beides muss mit Kämmen versehen sein, um Auftragstaschen zu erhalten) und abgekühlt.

Der Laufpuffer bestand aus 1 x TBE mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid. Letzteres wurde erst in der Laufkammer zu dem Puffer gegeben, um die Verseuchung mit dem cancerogenen Stoff gering zu halten.

Die DNA-Probe wurde mit 1/10 10 x Auftragspuffer versetzt und vorsichtig in die Taschen des Gels pipettiert. Der Lauf erfolgte bei niedriger Voltzahl (10 V) zum Einlaufen der Probe in das Gel, anschließend bei etwa 100-120 V.

Die DNA-Banden eines Agarosegeles wurden auf einem Leuchttisch mittels Durchstrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht (Gel Doc 1000 von Bio-Rad, München; s.a. Kap 2.4.5).

2.1.5 Agarosegelextraktion

DNA-Fragmente aus einem Agarosegel wurden mit Hilfe eines Extraktionskits (Nucleotrap[®]) von Macherey-Nagel gewonnen. Dabei erfolgt die Bindung der DNA an eine aktivierte Silica-Matrix in Gegenwart von chaotropen Salzen. Letztere stören den die DNA-Moleküle umhüllenden Wassermantel. Zur Elution der adsorbierten DNA eignet sich ein Niedrig-Salz-Puffer.

Material:

Gelextraktionskit Nucleotrap, Macherey-Nagel, Düren

Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte wie vom Hersteller angegeben. Zur Elution wurde ein 2 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,5 eingesetzt.

2.1.6 Aufreinigung von Plasmiden

Zur Aufreinigung von Plasmiden aus Zellkulturen wurden je nach weiterer Verwendung zwei unterschiedliche Methoden eingesetzt. Ging es darum in kurzer Zeit eine oder mehrere Zellkulturen zu überprüfen und zu screenen, so kam die Methode der Extraktion und Fällung nach He et al. (1989) zur Anwendung. Sollte dagegen Plasmid für eine dauerhafte Lagerung und in größerer Menge gewonnen werden, so wurde eine Aufreinigung über eine Säule eingesetzt.

2.1.6.1 Extraktion und Fällung nach He

Material:

He-Puffer:

2,5 M	LiCl
50 mM	Tris-HCl pH 8,0
4 %	Triton-X-100
62,5 mM	EDTA

Phenol/Chloroform 1:1

100 % Ethanol (-20°C)

70 % Ethanol

1,5 ml einer 5 ml-Übernachtskultur werden abzentrifugiert und in 100 µl He-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 100 µl einer Phenol/Chloroform-Mischung (1:1) wird gevortext und 2 Minuten bei RT abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird abgezogen, in ihr befindet sich die DNA. Mit 200 µl kaltem Ethanol wird die DNA, nach gutem Mixen, durch 10 min Zentrifugieren bei 4°C pelletiert. Es folgen zwei weitere Waschstschritte, zuerst mit 800 µl 70 % Ethanol, dann mit 800 µl 100 % Ethanol. Das Pellet wird nach Trocknen in 30 µl Wasser aufgenommen. Die Methode wurde nicht zur dauerhaften Reinigung und Weiterverwendung eingesetzt, sondern nur zur schnellen Überprüfung.

2.1.6.2 Aufreinigung über eine Säule

Material:

Nucleobond PC-Kit von Macherey-Nagel, Düren

Isopropanol

70 % Ethanol

Das Prinzip besteht darin, die Zellen mittels NaOH und SDS zu lysieren, anschließend im sauren Milieu Zellreste und chromosomale DNA zu präzipitieren, während Plasmid-DNA in Lösung bleibt. Die Plasmid-DNA wird dann an eine Anionen-Austauschersäule gebunden,

mit Niedrigsalzpuffer gewaschen und durch eine Erhöhung von Salzkonzentration sowie pH-Wert eluiert. Es schließt sich eine Fällung mit Isopropanol, sowie ein Waschschrift mit 70 % Ethanol an.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden die Herstellerangaben befolgt. Für eine Nucleobond AX100-Säule wurde das Pellet einer 100 ml-Kultur in LBamp-Medium verwendet. Die Aufnahme des DNA-Pellets am Schluss der Isolierung erfolgte in 50 µl dest. Wasser.

2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration in Lösung wurde über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Messung wurde dabei in Quarzküvetten durchgeführt. Die DNA-Konzentration errechnet sich wie folgt:

$$1 \text{ OD} = 50 \text{ µg/ml}$$

Kleinere DNA-Mengen, die für eine Küvettenmessung zu gering waren, wurden in einem Agarose-Gel über den Vergleich mit DNA definierter Menge abgeschätzt. Als Vergleich dienten z.B. nach einer Agarosegelelektrophorese die Banden des Molekulargewichtsmarkers. Eine weitere Möglichkeit ist das vorsichtige Aufsetzen eines Tropfens der Probe (0,5-1 µl) auf ein Agarosegel neben verschiedenen Tropfen unterschiedlicher bekannter DNA-Mengen. Nach anschließendem Einziehen der Tropfen und kurzer Inkubation des Geles in Ethidiumbromid-haltigem Puffer lassen sich die Proben auf einem UV-Leuchttisch sichtbar machen und vergleichen. Diese Methode gibt nur sehr grobe Auskunft über den Konzentrationsbereich.

2.1.8 Annealing

Komplementäre DNA-Einzel-Stränge lagern sich unter bestimmten Bedingungen spontan zu einem Doppelstrang zusammen. Diese Eigenschaft macht man sich bei dem sogenannten „Annealing“ zunutze. Dazu werden die Oligonukleotide zunächst über ihre Schmelztemperatur gebracht, um ein korrektes und vollständiges Entfalten zu gewährleisten, und anschließend langsam abgekühlt.

Material:

5x-Annealing-Puffer:

200 mM Tris pH 7,5

100 mM MgCl₂

250 mM NaCl

100 µM sense-Oligonukleotid

100 µM antisense-Oligonukleotid

Für einen 10 µl-Ansatz mit je 10 µM sense- und antisense-Oligonukleotid sowie 1x-Annealing-Puffer wird zunächst in einem kleinen Becherglas (100 ml) Wasser zum Kochen gebracht. Anschließend wird der Reaktionsansatz in das heiße aber nicht mehr sprudelnd kochende Wasser gehalten und das Ganze bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis sich das Wasser im Becherglas abgekühlt hat. Die Aufbewahrung erfolgt bei -20°C.

2.1.9 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA

Bei dem Restriktionsverdau von DNA entstehen Fragmente mit einer Phosphatgruppe am 5'-Ende und einer OH-Gruppe am 3'-Ende. In dieser Form ist das Enzym Ligase in der Lage, entsprechend passende Fragmente wieder kovalent zu verbinden.

Wurde ein Vektor nur einmal geschnitten und kann nun an dieser Schnittstelle mit sich selber ligieren, so muss er, um eine Religation zu vermeiden, dephosphoryliert werden. Dies kann durch eine Alkalische Phosphatase wie die Calf Intestinal Phosphatase (CIP) bewerkstelligt werden. Im Gegenzug muss nun das verwendete Insert an seinem 5'-Ende phosphoryliert sein, damit eine Ligation möglich wird. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide enthalten keine endständigen Phosphatgruppen und müssen nachphosphoryliert werden, um sie in diesem Fall als Insert einsetzen zu können. Die Polynucleotid-Kinase (PNK) fügt an einem 5'-Hydroxylende eine Phosphatgruppe an.

2.1.9.1 Phosphorylierung:

Material:

T4 Polynucleotid-Kinase (PNK) von NEB, 10 U/µl

10x-PNK-Puffer:

700 mM	Tris-HCl pH 7,6
100 mM	MgCl ₂
50 mM	DTT

10 mM ATP

Zu einem Reaktionsvolumen von 10 µl 1x-PNK-Puffer, 1 mM ATP und 1 µM DNA werden 2 Unit T4 PNK gegeben und das Ganze für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Kinase kann anschließend durch Inkubation bei 65°C für 1 Stunde inaktiviert werden.

2.1.9.2 Dephosphorylierung:

Material:

10x OnePhorAll Buffer Plus (OPA⁺)

Calf Intestinal Phosphatase (CIP), Pharmacia, Freiburg

Zu 10 µl 1x OPA⁺ mit 0,5-1 µg DNA werden 1,7 U CIP gegeben. Die Inkubation findet bei 37°C für eine Stunde statt. Erscheint der Verdau nicht ausreichend, so kann ein Ansatz mit

zusätzlicher Zugabe von 1,7 U CIP nach einer halben Stunde erwogen werden. Vor der weiteren Verwendung der DNA zur Ligation wird eine Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung durchgeführt.

2.1.10 Phenolextraktion und Fällung von DNA

In manchen Fällen kann DNA nach einer Reaktion in der vorliegenden Lösung nicht zur Weiterverwendung eingesetzt werden. Ein Beispiel ist die Verwendung zweier Enzyme hintereinander, deren Reaktionspuffer sich ausschließen.

Material:

1:1 Phenol/Chloroform

3 M Na-Acetat pH 5,0

100 % Ethanol (-20°C)

70 % Ethanol

Die DNA-Probe wird auf ein Volumen von 200 µl mit Wasser aufgefüllt, mit 200 µl Phenol/Chloroform 1:1 versehen, gut gevortext und 2 min bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird abgezogen und weiterverwendet. Anstatt einer reinen Phenol/Chloroform-Mischung eignet sich auch ein Gemisch aus 25:24:1 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol.

Zur Fällung der DNA wird 1/10 Volumen an Na-Acetat sowie das 2,5-fache Volumen an kaltem Ethanol dazugegeben. Das Ganze wird 10 min auf Eis stengelassen, dann 30 min bei 4°C zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit 70 % Ethanol und einer Zentrifugation für 10 min (4°C) wird das Pellet an der Luft getrocknet und kann nun in dem gewünschten Puffer aufgenommen werden.

2.1.11 Ligation

Bei der Restriktion von DNA entstehen mit den in dieser Arbeit verwendeten Enzymen kurze einzelsträngige Enden. Nimmt man mit den gleichen Enzymen geschnittene DNA-Fragmente, Insert und Vektor, so können sie sich an ihren einander komplementären Enden aneinanderlagern. Eine Ligase verbindet nun die freie OH-Gruppe am 3'-Ende und die Phosphatgruppe am 5'-Ende zu einer Phosphodiesterbindung. Aus den beiden DNA-Fragmenten ist ein einziger Doppelstrang geworden.

Material:

10x Ligasepuffer:

0,5 M	Tris-HCl pH 7,5
0,1 M	MgCl ₂
0,1 M	DTT
10 mM	Spermidin
10 mM	ATP
1 mg/ml	BSA

T4 DNA Ligase (NEB) mit 400 U/μl

Vektor und Insert in wässriger Lösung

In einem Reaktionsvolumen von 10 μl 1x-Ligasepuffer sollten Vektor und Insert idealerweise in einem molaren Verhältnis von 1 zu 2 vorliegen, Gesamt-DNA-Gehalt etwa 100 ng. Nach der Zugabe von 200 U Ligase findet die Reaktion entweder 2-3 Stunden bei 16°C oder über Nacht bei 4°C statt.

2.1.12 Kompetente ZellenMaterial:LB-MgCl₂-Agarplatten:

1 %	Tryptone
0,5 %	Hefeextrakt
1 %	NaCl
10 mM	MgCl ₂
1,5 %	Agar

Vor Agarzugabe muss der pH-Wert auf 7,5 eingestellt werden.

TYM Broth:

2 %	Tryptone
0,5 %	Hefeextrakt
0,1 M	NaCl
0,01 M	MgCl ₂
eingestellt auf pH 7,5	

Tfb 1:

30 mM	KOAc
100 mM	KCl
10 mM	CaCl ₂
5 % (w/v)	Glyzerin
50 mM	MnCl ₂

(MnCl₂ wird als 1 M Stammlösung getrennt autoklaviert und erst nach Abkühlen zu der Lösung gegeben.)

Tfb 2:

75 mM	CaCl ₂
10 mM	Na-MOPS pH 7,0
10 mM	KCl
15 % (w/v)	Glyzerin

Für die Herstellung kompetenter Zellen müssen alle verwendeten Materialien wie Medien, Lösungen, Gefäße und Geräte (z.B. Pinsel, Pipetten) steril sein.

Auf einer Platte aus LB-Medium mit MgCl₂ wird der Zellstamm ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus einer einzelnen Kolonie soll am nächsten Tag in 100 ml TYM-Broth eine Zellkultur für 4-5 Stunden bis zu einer OD von 0,8-0,9 bei 550 nm hochwachsen. Ist die erforderliche Dichte erreicht, werden die Zellen abzentrifugiert (1000-1500 x g). Ab jetzt ist es wichtig, dass die Zellen immer kalt gehalten werden. Das Pellet wird in 30-40 ml Tfb 1 vorsichtig resuspendiert, anschließend 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wird das Pellet in 4 ml kaltem Tfb 2 vorsichtig resuspendiert und auf Eis gestellt. Die erhaltene Zellsuspension wird in 50 µl-Aliquots auf Eppendorfgefäße verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -70°C.

2.1.13 Transformation

Material:

Kompetente Zellen

LB-Medium

LBamp-Agarplatten

50 µl kompetenter Zellen werden 15 Minuten auf Eis aufgetaut, mit maximal 1/10 Volumen DNA-Lösung (mindestens 1 ng DNA) versetzt und auf Eis 30 Minuten ohne Bewegung inkubiert. Anschließend erfolgt ein „Hitzeschock“ für 5 Minuten bei RT (*E.coli*-Stamm JM 101). Die Bakterien werden mit 450 µl LB-Medium ohne Ampicillin versehen und 1 Stunde bei 37°C wachsen gelassen. Anschließend werden je nach erwarteter Zelldichte 20-100 µl auf LBamp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Erfolgt die Transformation mit einem Ligationsansatz, so wird neben der Ligation mit Vektor und Insert eine Kontrolle mitgeführt, in der ein Ligationsansatz nur Vektor enthält. Dies dient dazu, den Hintergrund an Kolonien zu bestimmen, der durch ungeschnittenen oder religierten Vektor entstehen kann.

2.1.14 Sequenzierung

Um bei der Herstellung neuer Klone sicherzugehen, dass auf DNA-Ebene die gewünschte Sequenz vorhanden ist, wurden sämtliche Mutanten einer Sequenzierung unterzogen. Das

Kolonien sichtbar wurden (z.B. bei einer Transformation). Der Zusatz des Antibiotikums Ampicillin wurde zur selektiven Anzucht von Bakterien genutzt, die ein Plasmid mit Ampicillinresistenz-Gen trugen.

LB-Medium:

1 % (w/v)	Trypton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
1 % (w/v)	NaCl

LBamp-Medium:

LB-Medium, autoklaviert und abgekühlt, dem
100 µg/ml Ampicillin zugesetzt wird.

Die Medien wurden vor der Sterilisation auf pH 7,5 eingestellt, dann autoklaviert. Zum Gießen von Agarplatten wurde dem Ansatz für LB-Medium 1,5 % Agar vor Autoklavieren zugesetzt. Nach Sterilisieren wurde das Medium auf 50°C abgekühlt, mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und auf Petrischalen verteilt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.2 Trimerisierung

2.2.1 Rekonstitution zur Trimerisierung mittels Detergensabreicherung

In diesem Rekonstitutionsansatz ist das Lipid PG enthalten. Es wird zur Bildung von Monomeren nicht benötigt, wurde aber im Hinblick auf die folgende Trimerisierung dem ansonsten standardmäßigen Ansatz zur Rekonstitution von LHCP zugesetzt.

Material:

2 x Solubilisierungspuffer:

200 mM	Tris-HCl pH 9,0
10 mM	ε-Aminocapronsäure
2 mM	Benzamidin
25 % (w/v)	Sucrose
4 % (v/v)	LDS

Pigmente: nach Kap. 2.3.1

100 % Ethanol

5 mg/ml Dipalmitoyl-Phosphatidylglyzerin (PG)

1 M DTT

10 % (w/v) OG

2 M KCl

LHCP in Form von „Inclusion bodies“

Eine Rekonstitution enthielt standardmäßig 0,6 mg/ml Chlorophyll (Chl a zu Chl b = 1,5 : 1), 0,1 mg/ml Xanthophyll und 0,4 mg/ml LHCP. Das Protein in 1 x Solubilisierungspuffer wurde nach Kochen und Abkühlen mit DTT und 1/25 Volumen an PG (5 mg/ml) versetzt, so dass eine Konzentration von 200 µg/ml PG und 1 mM DTT entstand. Anschließend wurde die Lösung, die bei größeren Volumina in einem nicht geschlossenen Gefäß gekocht worden war und dadurch an Volumen verloren hatte, bei Bedarf wieder aufgefüllt.

Die Pigmente wurden in 1/10 Volumen Ethanol gelöst. Die Pigmentzugabe erfolgte mit einem feinen Strahl in einem Becherglas im Ultraschallbad oder nach Aufteilung in Aliquots während Mischen durch Vortexen. Eine Ultraschall-Behandlung von 10 Minuten schloss sich an. Die fertige Mischung wurde in 1-1,5ml-Aliquots aufgeteilt und bei -20°C eingefroren.

Detergenswechsel:

Die Rekonstitutionsansätze wurden nach ein bis drei Einfrier-/Auftau-Zyklen langsam auf Eis aufgetaut, vereinigt und ihr Volumen bestimmt. Nacheinander wurden jeweils 1/8 Volumen 10 % OG und 2 M KCl zugegeben, beides mit einer folgenden Inkubationszeit von 10 Minuten auf Eis. Bei großen Volumina geschah diese Zugabe tropfenweise und unter Mischen durch einen Magnetrührer. Der Überstand aus einer anschließenden Zentrifugation wurde in die nachfolgenden Schritte zur Trimerisierung eingesetzt.

2.2.2 Trimerisierung mittels Detergensabreicherung

Das ursprüngliche Protokoll nach Hobe (et al. 1994, 1995) enthält Gelfiltration und Anionenaustauscher-Säule zur Abtrennung von ungebundenem Pigment. Diese Schritte wurden in einigen späteren Versuchen weggelassen und die Rekonstitution direkt in die Dialyse eingesetzt.

Gelfiltration und DEAE-Säule:

Durch einen ersten Schritt wird die Rekonstitution von negativen Chlorid-Ionen befreit, um in einem zweiten Schritt LHC-Komplexe auf einer Anionenaustauschersäule binden zu können. Auf der DEAE-Säule soll überschüssiges freies Pigment entfernt werden.

Material:

Gelfiltrationssäule Sephadex G25 von Pharmacia, Freiburg
Fractogel EMD DEAE-650, Merck, Darmstadt

Beide Säulenläufe fanden bei 4°C statt. Die Rekonstitution wurde auf eine G 25-Säule, äquilibriert mit 0,7 % (v/v) Triton und 3 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,4), aufgetragen. Das Säulenvolumen betrug mindestens das dreifache Volumen der Probe, um ein effektives Abtrennen der aus dem Detergenswechsel stammenden Chlorid-Ionen zu gewährleisten.

Die grüne Fraktion der Gelfiltration wurde mit 0,7 % NG versetzt und auf eine DEAE-Säule, äquilibriert mit 0,7 % (v/v) Triton und 3 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,4), geladen. Mit einem Waschpuffer aus 0,5 % (w/v) NG und 3 mM Natrium-Phosphat (pH 7,4) wurde freies Pigment entfernt. Dabei sollte das Waschvolumen nicht höher als das dreifache Volumen des Komplex-tragenden Säulenmaterials werden. Die Elution geschah nicht durch Durchlaufen der Säule. Das die Komplexe enthaltende Säulenmaterial wurde abgenommen und abzentrifugiert. Zur Elution wurde es mit 1 % NG, 3 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,4) und 500 mM NaCl versetzt, kurz resuspendiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und in bereitgestelltem dreifachen Säulenvolumen an eiskaltem 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) verdünnt, damit die hohe Detergenskonzentration von 1 % NG nur möglichst kurz auf die Komplexe wirken konnte. Die Elution wurde wiederholt, bis der Überstand nur noch schwach grün war.

Dialyse und Ultrafiltration:

Material:

Dialyseschlauch (Size 6, Inf. Dia. 27/32''- 21,5 mm; MWCO 12-14000 Daltons) von Medicell, London UK

Centrikon-10 microconcentrator von Amicon, Beverly, USA

Rührzelle mit YM-30-Membran von Amicon, Beverly USA

10 mM Tris-HCl pH 7,0

Zur Abreicherung des Detergens wurde eine Dialyse gegen das etwa 100-fache Volumen an 10 mM Tris-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7,0 und 1 mM DTT durchgeführt. Der Ansatz geschah bei 4°C und über Nacht. Das Dialysat wurde mit eiskaltem Puffer 1:10 verdünnt und anschließend eingengt. Je nach Volumen geschah dies mit Centrikon-10 (bis zu 2 ml fassend) auf 100-300 µl Suspension oder einer Ultrafiltrations-Rührzelle mit YM 30-Membran (verschiedene Größen bis zu 200 ml fassend) auf 2-3 ml Suspension.

Solubilisierung der Suspension:

Zur Gewinnung der Trimere und Monomere musste die aus der Ultrafiltration erhaltene Suspension solubilisiert werden.

Material:

10 % (v/v) Triton-X 100

10 % (w/v) LM

Dies geschah folgendermaßen: Die Suspension, Chlorophyllgehalt um 1 mg/ml, wurde 10 min bei 4°C abzentrifugiert (12.000 x g). Überstand und Pellet wurden getrennt mit Detergens versetzt. Der Überstand wurde auf einen Triton-X 100-Gehalt von 0,5 % gebracht, das Pellet mit 0,1 % LM (Volumen des Überstandes) versetzt. Die Solubilisierung erfolgte eine Stunde

auf Eis, dann wurde die Suspension des Pellets erneut zentrifugiert, die beiden Überstände wurden auf Saccharosedichtegradienten nach Kap. 2.2.6 aufgetragen und aufgetrennt.

2.2.3 Rekonstitution zur Trimerisierung über eine Nickel-Chelat-Säule

Der Rekonstitutionsansatz enthielt abweichend zur Rekonstitution nach Kap. 2.2.1 β -Mercaptoethanol statt DTT als Reduktionsmittel. Der Grund lag in der leichten Reduzierbarkeit der Ni^{2+} -Ionen der nachfolgenden Ni^{2+} -Chelat-Säule durch DTT. Mit einer β -Mercaptoethanol-Konzentration von 50 mM wurde einerseits vermieden, dass das Protein durch die Bildung von Disulfidbrücken nennenswert an einer erfolgreichen Rekonstitution gehindert wurde. Andererseits wurde mit diesem Gehalt an β -Mercaptoethanol die Bindung des Proteins an die Säule noch nicht beeinträchtigt. Eine leichte bräunliche Färbung der Säule durch reduziertes Nickel während des Rekonstitutionsauftrages bedeutete keine wesentliche Beeinflussung der Bindekapazität.

Material:

2 x Solubilisierungspuffer:

200 mM	Tris-HCl pH 9,0
10 mM	ϵ -Aminocapronsäure
2 mM	Benzamidin
25 % (w/v)	Sucrose
4 % (v/v)	LDS

Pigmente: Totalextrakt nach 2.3.1

100 % Ethanol

10 % (w/v) OG

2 M KCl

1 M β -Mercaptoethanol

LHCP in Form von „Inclusion bodies“

Zur Rekonstitution wurden 250 μg LHCP in 600 μl Solubilisierungspuffer gekocht und nach Abkühlen mit 50 mM β -Mercaptoethanol versetzt. Pigmente wurden in Form von Totalextrakt (0,5 mg Chlorophyll) in 1/10 Volumen Ethanol unter Mischen zugegeben. Nacheinander wurden jeweils 1/8 Volumen 10 % OG und 2 M KCl zugegeben, beides mit einer folgenden Inkubationszeit von 10 Minuten auf Eis. Der Überstand einer 5-minütigen Zentrifugation bei 4°C wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert, dann noch einmal zentrifugiert. Je nach Größe dieses letzten Pellets schloss sich ein letzter Zentrifugationsschritt an, um mit dem Überstand, der auf eine 0,25 ml-Nickel-Chelatsäule (s. Kap.2.2.4) aufgetragen werden sollte, keine unlöslichen und die Säule verstopfenden Bestandteile mitzuschleppen.

2.2.4 Trimerisierung über eine Nickel-Chelat-Säule

Die Methode lehnt sich leicht verändert an die Trimerisierung nach Rogl et al. (1998) an. Anders als im dort beschriebenen Protokoll werden hier keine denaturierten Proteine sondern schon gefaltete Monomere an der Säule immobilisiert.

Nickelionen zeigen eine besondere Affinität zu Histidinen. Diese Eigenschaft wird hier ausgenutzt, indem alle Proteine mit einem Motiv aus sechs Histidinen versehen sind. Über diesen Hexahistidylrest gelingt eine Immobilisierung an der Ni²⁺-Chelat-Säule. Zur Elution des Proteins werden die Histidine mit einem Überschuss an Imidazol verdrängt.

Die Nickelionen werden auf dem verwendeten Säulenmaterial über eine IDA-Gruppe festgehalten (IDA= iminodiacetic acid). IDA besetzt bei der Chelatbindung drei von sechs Koordinationsstellen des Ni²⁺ (Kågedal, 1989). Die restlichen drei können mit Proteinen einer Probe wechselwirken. Andere mögliche Gruppen wie z.B. NTA (nitrilotriacetic acid) binden das Metallion über mehr Koordinationsstellen stärker, dafür schwächt sich die Affinität zu einem Protein als Probe ab (Porath, 1992). Ein Schema der Metallchelate von IDA und NTA ist in Hochuli et al. (1987) abgebildet.

Material:

Chelating Sepharose Fast Flow von Pharmacia Biotech

Säule: Poly-Prep Chromatography Column von Bio-Rad, Hercules, USA

0,1 M NiCl₂

50 mM Tris-HCl pH 7,5

OG-Puffer :

1 % (w/v)	OG
0,1 M	Tris-HCl pH 9,0
12,5 % (w/v)	Sucrose

TX-Puffer :

0,05 % (v/v)	Triton-X 100
0,1 mg/ml	Dipalmitoyl-Phosphatidylglyzerin
0,1 M	Tris-HCl pH 7,5

Eluat-Puffer:

0,05 % (v/v)	Triton-X 100
0,1 mg/ml	Dipalmitoyl-Phosphatidylglyzerin
10 mM	Tris-HCl pH 7,5
0,3 M	Imidazol

Vorbereitung der Säule:

Das Säulenmaterial zur Chelat-Chromatographie wurde in 20 % Ethanol bei 4°C gelagert. Die Sepharose setzte sich während der Lagerung ab, so dass sie vor jeder Entnahme aufgewirbelt werden musste. Dabei war darauf zu achten, die Flasche nur zu schwenken und nicht zu schütteln. Ein starkes Mischen würde Luft in die Suspension bringen, die sich in den porösen Kügelchen der Sepharose festsetzen und so die Erreichbarkeit der Chelat-Gruppen herabsetzen würde. Nach Aufwirbeln des Säulenmaterials wurde mit einer durch Abschneiden der äußersten Spitze in ihrer Öffnung vergrößerten Pipettenspitze gearbeitet. Das brachte den Vorteil, dass die Sepharose die Spitze beim Pipettieren nicht verstopfen konnte. Für einen Standardansatz zur Trimerisierung wurde soviel Chelating Sepharose in eine Säule pipettiert, dass sich nach Absetzen des Materials ein Säulenvolumen von 250 µl ergab. Der verwendete Säulenzylinder hatte ein Volumen von 2 ml, dazu kam ein Vorratsvolumen für Auftragspuffer von 7 ml.

Die Beladung mit Ni²⁺ geschah mit 0,4 ml 0,1 M NiCl₂. Dabei nahm das vorher weißliche Material eine leicht grünliche Farbe an. Überschüssiges Nickel wurde durch ein 3- bis 5-faches Säulenvolumen an 50 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen. Anschließend sollte die Säule einen deutlich bläulichen Farbton erreicht haben. Alle mit konzentriertem Nickel versehenen Lösungen (das bedeutete der Durchlauf des NiCl₂-Auftrages, sowie die ersten Waschfraktionen mit Tris-HCl-Puffer) wurden getrennt aufgefangen und als Nickel-Abfall entsorgt. Die nun mit Ni²⁺ beladene Chelat-Säule wurde in einem letzten Vorbereitungsschritt mit 1 Säulenvolumen OG-Puffer äquilibriert und kalt gestellt.

Trimerisierung:

Der Ablauf der Trimerisierung fand insgesamt bei 4°C statt. 250 µg LHCP wurden während der Säulenvorbereitung in einem Standardansatz nach Kap. 2.2.3 rekonstituiert, anschließend auf die Säule aufgetragen. Die Rekonstitutionsmischung wurde nur so weit einlaufen gelassen, bis der erste grüne Tropfen im Durchlauf erschien, anschließend wurde die Säule verschlossen und das Säulenmaterial mit der Rekonstitution vorsichtig vermischt. Nach 30 Minuten Inkubation wurde mit ½ Säulenvolumen OG-Puffer, dann mit 2-fachem Säulenvolumen TX-Puffer gewaschen. Mit Eluatpuffer wurden die Komplexe eluiert und die grünen Fraktionen aufgefangen. Im Standardansatz mit 250 µl Säulenvolumen hat sich der Auftrag von drei Eluatfraktionen mit den Volumina 150µl / 300µl /150µl bewährt. Der Großteil der Komplexe wurde in der zweiten Fraktion gefunden; die erste, noch farblose Fraktion konnte verworfen werden, in der dritten Fraktion waren die Komplexe schon stark verdünnt. Mit Auftrag des Imidazol-haltigen Eluatpuffers war das Loslösen der Komplexe in einer grünen Bande makroskopisch zu verfolgen.

Die zweite Eluatfraktion wurde direkt auf einen Sucrosegradienten (0,5 M Sucrose, 0,1 % (w/v) LM, 5 mM Tricin pH 7,8, 0,1 mM TCP; einmal eingefroren/aufgetaut) aufgetragen. Die

Größenordnungen beziehen sich auf ein 4,4 ml fassendes Zentrifugenröhrchen des Rotors SW 60 Ti. Durch eine Zentrifugation für 16 Stunden bei 300.000 x g und 4°C wurden Monomere und Trimere aufgetrennt.

Regeneration des Chelat-Säulenmaterials:

Zur Regeneration des Säulenmaterials wurde dieses zunächst mit hohem Detergensgehalt (2 % (w/v) SDS, 0,4 M Imidazol) gewaschen, um mögliche Proteinreste zu entfernen. Die gebundenen Nickelionen wurden mit 0,5 M EDTA von der Säule gelöst. Beide Schritte mussten getrennt erfolgen, da sich in Anwesenheit von SDS und EDTA zusammen ein Niederschlag bildete. Zum abschließenden Entfernen von gebundenem Pigment wurde schrittweise die Konzentration von Ethanol bis auf 100 % erhöht. Erst bei diesem hohen Ethanolgehalt konnten letzte Pigmentreste losgelöst werden. Ein schrittweises Erniedrigen der Ethanolkonzentration bis auf 20 % mit anschließendem Entgasen des Säulenmaterials unter Vakuum stellte die Lagerungsbedingungen her. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

2.2.5 Trimerisierung mit Hilfe von Cyclodextrin

Cyclodextrine bestehen aus ringförmig α -1,4-glykosidisch verknüpften Zuckermolekülen. Sie bilden Strukturen einer Art Höhle oder Käfig, die durch nach innen gerichtete Kohlenwasserstoffbereiche und nach außen orientierte OH-Gruppen innen einen eher hydrophoben Charakter tragen. Sie haben die Eigenschaft, mit verschiedenen hydrophoben Molekülen eine Art Einschluss-Komplex bilden zu können. Nach de Grip et al. (1998) zeigen Cyclodextrine für einige Detergentien eine sehr viel höhere Affinität als für Diacylphospholipide. Einem Lipid/Detergentien-Gemisch können so selektiv Detergentien entzogen und die im Überschuss vorhandenen Lipide möglicherweise zur Bildung von Vesikeln angeregt werden. Durch eine Adaption der Methode sollen in den Detergensmizellen vorhandene LHC-Monomere in eine Detergens-abgereicherte Umgebung, möglicherweise sogar in eine Lipidvesikelumgebung gebracht werden. Auf diese Weise soll eine Trimerisierung induziert werden.

Material:

Heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -Cyclodextrin von Aldrich

5 mg/ml PG (Dipalmitoyl-Phosphatidylglyzerin)

Standardrestitution nach Kap. 2.2.1 vor und nach Detergenswechsel

10 % (w/v) OG

100 μ l einer Standardrestitution wurden mit weiterem PG versetzt, so dass beispielsweise ein 100facher molarer Überschuss an PG über LHCP entstand. Die Cyclodextrin-Zugabe erfolgte im Ansatz ohne Detergenswechsel als 1-fache molare LDS-Konzentration, im Ansatz

mit Detergenswechsel als 1,5-fache molare OG-Konzentration. Anschließend wurde die Probe 30 Minuten auf Eis inkubiert, danach direkt auf einen reinen Saccharose-Gradienten aufgetragen.

Der Gradient bestand aus a) 0,6 M Sucrose, eingefroren und wieder aufgetaut, anschließend unterschichtet mit 200 μ l 45 % Saccharose (Volumenangabe bezogen auf einen 4,4 ml-Gradienten) oder b) 1M Sucrose, eingefroren und wieder aufgetaut.

Nach einem Ultrazentrifugenlauf über Nacht sammelten sich die Vesikel in Banden im unteren Drittel des Gradienten. Um Komplexe aus ihnen zu gewinnen und nachzuweisen wurden sie mit einem Detergens solubilisiert.

2.2.6 Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Die Saccharose- oder Sucrosedichtegradientenzentrifugation ist ein in dieser Arbeit häufig verwendetes Mittel, Komplexe unter möglichst schonenden Bedingungen aufzutrennen.

Ultrazentrifugen:

- Beckman Optima XL-100K Ultracentr. Class S
Rotoren: SW 60 Ti
SW 41 Ti
- Centrikon T-1065 von Kontron Instruments
Rotor: TST 41.14

Die Saccharosedichtegradienten wurden durch Einfrieren und Auftauen von Saccharose-lösungen im Zentrifugenröhrchen erzeugt. Durch diese Prozedur bildete sich reproduzierbar und ohne großen Aufwand ein kontinuierlicher Gradient. Durch mehrfache Einfrier/Auftau-Zyklen wurde ein Gradient in der Mitte etwas gestreckt, sowie an den Seiten gestaucht. Die Gradienten enthielten, sofern nicht anders vermerkt, zusätzlich zur Saccharose 0,1 % (w/v) LM und 5 mM Tricin (pH 7,8). Das Detergens diente dazu, die aufzutrennenden Komplexe nicht aggregieren und ausfallen zu lassen.

Standardprotokoll zur Auftrennung von Trimeren und Monomeren:

Die 4,4 ml-Gradienten bestehend aus 0,5 M Saccharose, 0,1 % (w/v) LM und 5 mM Tricin (pH 7,8) wurden einmal bei -20°C eingefroren und bei 4°C langsam aufgetaut. Nach Proben-auftrag und Austarieren der gegenüberliegenden Zentrifugenröhrchen wurde der Lauf im Rotor SW 60 Ti gestartet. Eine optimale Auftrennung ergab sich unter diesen Bedingungen mit 54.000 rpm für 16 Stunden und bei 4°C .

2.2.7 Fällung von Trimeren

Material:

Trimere aus einem Sucroседichtegradienten nach 2.2.6

Heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -Cyclodextrin von Aldrich

KCl

Zu Trimeren aus einem Sucroседichtegradienten mit 0,1 % LM wurde KCl zugesetzt, so dass eine Konzentration von 300 mM entstand. Eine kurze Inkubation für 3 Minuten auf Eis sollte sicherstellen, dass das Salz vor dem nächsten Schritt gelöst und in der Probe verteilt vorlag. Das Cyclodextrin wurde in 2,5-fachem molarem Überschuss über LM zugegeben, das Ganze für 5 Minuten auf Eis gehalten. Eine längere Inkubation war nicht nötig. Ein zu langes Einwirken des Cyclodextrin-Überschusses auf die Komplexe sollte vermieden werden, um mögliche Schäden der Trimere zu verhindern. Die sich anschließende Zentrifugation der Lösung fand für 15-25 Minuten bei 4°C statt. Bei Volumina über 2 ml eigneten sich zur Präzipitation Zentrifugenröhrchen aus Corex-Glas, da in ihnen das Pellet in Form eines dünnen grünen Belages an der Wand optimal zu erkennen war. Sie erlaubten nur eine Zentrifugation bis zu 12.000 x g. Das Pellet wurde mit immer kleineren Volumina an 300 mM und 30 mM KCl gewaschen und dabei aufgewirbelt, um es jeweils auf eine kleinere Fläche zu konzentrieren und schließlich zur Aufbewahrung in ein kleineres Eppendorfgefäß zu überführen. Eine Lagerung der Komplexe bei -20°C erfolgte in 70 μ l 21 mM KCl mit etwa 22 % Glyzerin.

2.2.8 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC)

Hydrophobe Interaktions-Chromatographie oder „Hydrophobic Interaction Chromatography“, kurz HIC genannt, besteht aus einem System von einer hydrophoben stationären Phase und einer mobilen wässrigen Phase mit hohem Salzgehalt. Eine Elution der gebundenen Moleküle kann durch Verringern der Salzkonzentration erreicht werden. Eingesetzt wird die HIC vor allem, um Proteine aufzureinigen.

Das Prinzip der HIC benutzt hydrophobe Wechselwirkungen der Probe mit der unpolaren stationären Phase, um eine Auftrennung zu erreichen. Die Verwendung von Salzen spielt in der HIC eine grosse Rolle. Die gelösten Salze stören bzw. verringern geordnete Wasserstrukturen, die sich um die hydrophoben Anteile bilden, indem sie selber Wechselwirkungen mit den Wassermolekülen eingehen. Man sagt auch, die mobile Phase wird durch Zugabe der Salze „polarer“ gemacht. Dadurch werden hydrophobe Bindungen verstärkt. Es stehen nicht mehr genug Wassermoleküle zur Verfügung, um die zur Lösung der unpolaren Bereiche notwendigen Strukturen zu bilden. Bei einer Verringerung der Salzkonzentration der mobilen Phase werden die hydrophoben Wechselwirkungen schwächer; oftmals reicht ein Weglassen des Salzes zur Elution der Probe. Die bevorzugten Salze dieser Chromatographie-Form sind nicht chaotrop und haben einen sogenannten aussalzenden

Effekt. Sie sind strukturformend, sie bilden Strukturen mit Wasser; chaotrope Salze dagegen zerstören die Wasserstruktur. Zur Einteilung der Salze kann man sich an den Hofmeisterschen Reihen orientieren. Eine positive Begleiterscheinung der HIC ist, dass die in ihr verwendeten Salze dazu neigen, Proteine in ihrem gefalteten Zustand zu stabilisieren.

HIC und Reversed Phase Chromatography (RPC) haben einen ähnlichen Ansatzpunkt, um Moleküle aufzutrennen. Beide benutzen eine hydrophobe stationäre Phase. Bei genauerer Hinsicht zeigen sich wesentliche Unterschiede zwischen beiden Formen der Chromatographie. Das Trägermaterial der HIC ist mit bedeutend geringerer Dichte an hydrophoben Liganden bestückt (die Grössenordnung liegt etwa bei einem Zehntel bis einem Hundertstel), die ausserdem in der Regel eine höhere Polarität als bei der RPC aufweisen. Typische in der HIC eingesetzte funktionale Gruppen sind Phenyl- oder Octyl-Reste. Die Bindung der Moleküle an die feste Phase der HIC ist nicht ganz so stark und kann damit auch unter sehr viel milderen Bedingungen wieder gelöst werden. Auf diese Weise ist es oft möglich, mit nativen Proteinen zu arbeiten, die nach Aufreinigung ihre intakte Struktur behalten haben. Die RPC dagegen greift aufgrund der festen Bindung zum Zusatz von unpolaren Lösungsmitteln zur Elution der Moleküle. Dies hat die Denaturierung von Proteinen zur Folge.

Weitere Informationen zum Thema HIC finden sich in Eriksson (1989), Kennedy (1990) und Chicz & Regnier (1990).

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde eine Säule gewählt, die Phenylreste als Liganden benutzt. Sie stammt aus der Hi Trap-Serie von Pharmacia und besteht aus schon vorgepacktem Material. Säulen aus dieser Reihe besitzen die Einheitsgrösse von 1 ml und tragen an ihren Enden Verbindungsstücke, die ein leichtes Anschliessen an Spritzen oder Schläuche möglich machen. Die Versuche wurden z.T. nur mit Hilfe von Spritzen, z.T. auch unter Verwendung einer Pumpe durchgeführt. Sämtliche Arbeitsschritte fanden bei 4°C statt. Die im Einzelfall verwendeten Puffer sind im Ergebnisteil aufgeführt.

Material:

Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub) aus dem HiTrap HIC Test Kit von Pharmacia Biotech

In sämtlichen Versuchsreihen wurde eine Rekonstitution nach 2.2.1 als Probe verwendet.

2.3 Pigmente

2.3.1 Pigmentisolation

Material:

Isolierungspuffer:

25 mM	Tris-HCl pH 7,5
1 mM	DTT
330 mM	Sorbitol

Aceton, dest.

Erbsen, 10-14 Tage alt

Baumwollgaze

Waring Blendor

Ether, dest.

Rotationsverdampfer

Sämtliche Schritte arbeiteten mit vorgekühlten Lösungen, Zentrifugationen fanden bei 4°C statt und pigmenthaltige Lösungen wurden soweit als möglich auf Eis gehalten.

Das obere Drittel von 10-14 Tage alten Erbsen wurde abgeschnitten (etwa 500 g Blattmaterial) und in einem Waring Blendor mit 1 l Isolierungspuffer zerkleinert. Die erhaltene Masse wurde durch 3 Lagen einer Baumwollgaze von größeren Partikeln befreit und bei 8000 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 400 ml Aceton suspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand enthielt die isolierten Pigmente. Diese konnten nun aufgetrennt oder als Totalextrakt weiterverarbeitet werden. Bei der Auftrennung nach einzelnen Pigmenten schloss sich eine Dioxanfällung (s.u.) der Chlorophylle an. Wurde die gesamte Pigmentmischung als Totalextrakt benötigt, so wurden die Pigmente im Scheidetrichter in eine Etherphase überführt, diese wurde mit Wasser gewaschen und anschließend vom Wasser abgetrennt. Die wasserfreie Etherphase wurde unter Vakuum im Rotationsverdampfer eingedampft, die trockenen Pigmente wurden in Aceton aufgenommen, aliquotiert und unter einem Stickstoffstrom eingetrocknet. Die trockenen Pigmente wurden bei -20°C gelagert.

Aufreinigung der Pigmente:

Zur Isolation von einzelnen Pigmenten wurden aus dem Totalextrakt in Aceton zunächst die Chlorophylle mit Hilfe von Dioxan ausgefällt. Zu 400 ml acetonischer Lösung wurden langsam und unter Rühren 60 ml Dioxan und 127 ml dest. Wasser gegeben, danach inkubierte das Gemisch ohne Rühren und auf Eis für mindestens eine Stunde. Nach Zentrifugation befanden sich die Chlorophylle weitgehend im Pellet, der Überstand enthielt die Xanthophylle.

Das Chlorophyllpellet wurde in Ether aufgenommen und im Scheidetrichter mit Wasser ausgeschüttelt. Die Etherphase wurde wie beim Totalextrakt beschrieben vom Wasser befreit und eingedampft. Eine Auftrennung in Chlorophyll a und b konnte mit Hilfe einer präparativen HPLC geschehen.

Die Carotinoide im Überstand der Dioxanfällung wurden mit Hilfe eines Scheidetrichters in Ether überführt und eingetrocknet. Zur Verseifung der noch vorhandenen Chlorophylle und

Lipide wurden sie in Ethanol gelöst, mit $\frac{1}{10}$ Volumen 60 % KOH versetzt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Es schloss sich eine weitere Extraktion mit Ether an, nach Befreiung von Wasserresten wurden die Carotinoide eingetrocknet.

2.3.2 Butanolextraktion

Um die Markierungsausbeute bei Monomeren und Trimeren vergleichen zu können, war es wichtig, dass Komplex- bzw. Proteinkonzentration bekannt waren. Eine Voreinstellung zur Markierung wurde aus der Messung der Absorption bei 670 nm abgeleitet. Hier ließ sich schon über den Extinktionskoeffizienten für monomeren LHCII nach Butler und Kühlbrandt (1988) von $\epsilon=546000 \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ eine Konzentration der Komplexe ausrechnen. Eine weitere Überprüfung geschah, indem aus je einem Aliquot der zur Markierung eingestellten Mischungen die Pigmente extrahiert und deren Konzentration über einen HPLC-Lauf bestimmt wurden.

Material:

2-Butanol

4 M NaCl

80 % (v/v) Aceton

Zur Extraktion der Pigmente wurden 100 μl Probe mit 66 μl 2-Butanol und 33 μl 4 M NaCl versetzt und gut gemischt. Nach $\frac{1}{2}$ Minute Zentrifugation wurde die obere Butanol-Phase in ein Gefäß gegeben, dessen Gewicht vorher bestimmt worden war. Um die Pigmente quantitativ in die Butanolphase zu überführen wurde die wässrige Phase mit 33 μl 2-Butanol nachextrahiert und beide Butanolphasen vereinigt. Über das Gewicht des Butanols wurde das genaue Volumen der Phase bestimmt (100 μl = 81 mg). Direkt vor Aufspritzen auf die HPLC wurde die Butanolphase 1:1 mit 80 % Aceton verdünnt.

2.3.3 HPLC zur Pigmentbestimmung

Die Pigmentzusammensetzung verschiedener Proben wurde mittels RP-HPLC bestimmt. Diese Methode hat den Vorteil, dass sowohl Chlorophylle und Carotinoide aus einer gemischten Lösung aufgelöst werden, als auch verschiedene Abbau- (z.B. Phäophytin) oder Umlagerungsprodukte erkannt werden können. Das Prinzip besteht darin, die verschiedenen Pigmente über eine RP-Säule (RP= reversed phase) nach ihrer Hydrophobizität aufzutrennen und gleichzeitig ein Elutionsprofil per Absorption aufzunehmen. Nach entsprechender Eichung der Apparatur kann für jedes Pigment aus der aufgenommenen Kurve durch Integration der „Peaks“ eine Konzentration in der Probe abgeleitet werden.

Material:

Analytische HPLC von Kontron (Kontron Instruments)

Säule: Intersil C 8; 5 µm; 150 x 4,6 mm (Mainzer Analystechnik, Mainz)
Vorsäule: Chromospher RP-8; 5 µm; 20 x 4,6 mm (Mainzer Analystechnik, Mainz)
Vorfilter: X-101A, 2 µm; 0,62'' x 0,62'' x .250 (Upsearch Scientific)
Software: Kroma System 2000 (Kontron Instruments)
Pumpe: Pump 420
HPLC Gradient Former 425
Detektor: Diode Array Detector 440

Die HPLC wurde mit einem Aceton/Puffer-System betrieben. Der Wasseranteil lag in gepufferter Form vor (0,1 mM Hepes/KOH pH 7,5). Die Probe wurde zur Vorbereitung auf 80 % Aceton gebracht. Der Auftrag erfolgte auf eine vorher mit 70 % Aceton äquilibrierte Säule. Ein Gradient von 70 % nach 100 % Aceton ließ zuerst die Xanthophylle eluieren, darauf die Chlorophylle, ganz zum Schluss kam, wenn vorhanden, das hydrophobe β-Carotin von der Säule. Das Gradientenprofil ist in Abb. 2.7 dargestellt. Die Detektion der verschiedenen Pigmente erfolgte bei folgenden Wellenlängen:

- Neoxanthin: 445 nm
- Violaxanthin: 443 nm
- Lutein: 448 nm
- Chlorophyll b: 458 nm
- Chlorophyll a: 432 nm

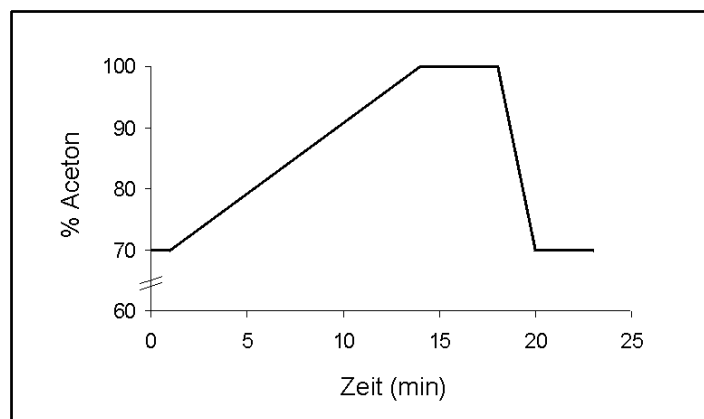


Abb. 2.7 Gradientenprofil der HPLC zur Pigmentbestimmung

2.3.4 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes nach Porra

Die Bestimmung der Chlorophyll-Konzentration erfolgte in 80 % Aceton und benutzte folgenden Formeln nach Porra et al. (1989):

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

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

Die Absorption bei 750 nm diente der Korrektur der Werte um unspezifische Streuung.

2.4 Markierung

2.4.1 Markierung von freiem Protein mit SH-reaktiven Farbstoffen

Die in Kap. 2.1 aufgeführten Mutanten mit singulärem Cystein wurden hergestellt, um selektive Markierung an den SH-Resten der Proteine durchführen zu können. Die 4 dazu im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe tragen alle eine SH-reaktive Gruppe – RM (Rhodamin Red Maleimid), FM (Fluorescein-Maleimid) und TM (Tetramethylrhodamin-Maleimid) einen Maleimid-Rest, BI (BODIPY 507/545 IA) eine Iodacetamidgruppe. Die zur Markierung freien Proteins hier aufgeführten Anleitungen können für alle 4 Fluoreszenzfarbstoffe gut angewendet werden, wenngleich eine Optimierung für RM geschah. Sämtliche Schritte mit Farbstoff fanden unter gedämpftem Licht statt. Herstellerdaten und Strukturformeln der vier Farbstoffe sind im Anhang aufgeführt.

Material:

Farbstoff als Stammlösung (2-5 mM):

FM in DMF

RM, BI und TM in DMSO

1-10 mg/ml LHCP in 1 % SDS

10 % SDS

100 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0

100 mM TCP (Tri(2 cyanoethyl-)phosphin von Molecular Probes) in DMF

1 M DTT

2.4.1.1 Analytische Markierung

Kontrollmarkierungen im kleineren Maßstab wurden durchgeführt, um die Reaktion der Farbstoffe auf variierte Markierungsbedingungen (wie z.B. Detergensgehalt und -typ, Temperatur, pH-Wert usw.) bezüglich Markierungsausbeute zu testen. Sie waren so konzipiert, dass sie für eine anschließende Auswertung über eine SDS-PAGE direkt geeignet waren. Dies betrifft insbesondere das Markierungsvolumen von i.d.R. 10-15 µl und den Proteingehalt von 0,5-1,5 µg. Ein Standardansatz als Beispiel und Richtlinie enthielt 0,5 µg Protein, 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0 und 0,5 % SDS in 10 µl, wurde mit 0,2 µl 100 mM TCP für 15 Minuten bei 37°C reduziert und anschließend mit 50-fachem molaren Farbstoffüberschuss für zwei Stunden bei 37°C zur Markierung inkubiert. Ein Abstoppen erfolgte mit 0,5 µl 1 M DTT. Einzelheiten zu den jeweiligen Markierungsansätzen sind, soweit abweichend, im Ergebnisteil dargestellt. Während der Gelelektrophorese zur Auswertung

wurde der freie Farbstoff vom Protein abgetrennt und der Markierungserfolg mehrerer Ansätze gleichzeitig konnte über Fluoreszenzbetrachtung nach UV-Anregung und/oder Auswertung nach Proteinfärbung verglichen werden.

2.4.1.2 Präparative Markierung

Die Markierung im präparativen Maßstab umfasste Proteinmengen von einigen hundert Mikrogramm bis mehreren Milligramm. Im Gegensatz zu den analytischen Markierungen im vorhergehenden Absatz sollte das markierte Protein aufgereinigt und in darauffolgenden Versuchen weiterverwendet werden. Die hier aufgeführte Anleitung ist das Ergebnis zahlreicher Ansätze und wurde während der Arbeit z.T. in leicht variiertes Ausführung angewendet:

Ein Markierungsansatz enthielt 0,5 mg/ml LHCP, 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0 und 0,5 % SDS. Er wurde mit dem Reduktionsmittel TCP versetzt, so dass etwa ein hundertfacher molarer Überschuss an TCP über Protein entstand, und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Während dieses Schrittes sollten mögliche Disulfidgruppen zwischen Proteinen zu freien SH-Gruppen reduziert werden. Anschließend wurde der Farbstoff in 23-fachem molaren Überschuss über das Protein zugegeben und der Ansatz bei 37°C für ein bis zwei Stunden inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde ein Überschuss an DTT benutzt.

Vor dem Einsatz des markierten Proteins in weiteren Versuchen, wie die Aufnahme von Fluoreszenzspektren oder Rekonstitution, musste der freie Farbstoff entfernt werden. Dies geschah über eine Ausfällung des Proteins aus der Markierungslösung, die im nachfolgenden Absatz beschrieben ist.

2.4.2 Fällung von Protein

Material:

100 mM Essigsäure

100 % Aceton

70 (v/v) Ethanol

100 % Ethanol

Zur Fällung von Protein aus einer Lösung wurden 1/10 Volumen an 100 mM Essigsäure und das 2,3-fache Volumen an 100 % Aceton dazugegeben, gut gemischt und der Ansatz über Nacht bei -20°C gelagert. Das Pelletieren des Proteins geschah über Zentrifugieren bei 4°C und 14.000 rpm. Das gefällte Protein wurde zunächst mit 70 % Ethanol gewaschen, anschließend mit 100 % Ethanol, dann getrocknet.

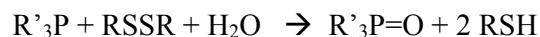
Wird eine Fällung durchgeführt, um freien Farbstoff quantitativ aus einem Markierungsansatz abzutrennen, so muss das Waschen besonders intensiv erfolgen. Dazu wird das Protein in jedem Waschschrift durch Mischen und Ultraschallbehandlung gut aufgewirbelt. Der Wasch-

vorgang sollte solange wiederholt werden, bis der Überstand farblos ist, mindestens jedoch 5-6 mal.

Der Fällungsschritt ist immer mit einem gewissen Verlust verbunden, der in der Größenordnung von bis zu 20-50 % liegen kann.

2.4.3 Test auf Reaktionsfähigkeit von TCP

Ellman's Reagenz (DTNB) ist ein Nachweismittel für freie SH-Gruppen in Proteinen, kann aber auch eingesetzt werden um Reduktionsmittel wie TCP auf Intaktheit zu überprüfen. DTNB enthält selbst eine Disulfidbrücke, die bei der Reaktion gespalten wird. Das entstandene Produkt mit freier SH-Gruppe absorbiert bei 412 nm. Zu beachten ist bei der Auswertung, dass bei Reaktion mit einem Protein DTNB in zwei Produkte gespalten wird, eines mit freier SH-Gruppe (5-Thio-2-Nitrobenzoesäure, absorbierend bei 412 nm) und ein Produkt, dass über eine Disulfidbrücke mit dem Protein verbunden ist (keine Absorption bei 412 nm). Über den Extinktionskoeffizienten von 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure läßt sich so aus der Absorption direkt die molare Konzentration der SH-Gruppen im Protein ausrechnen. Bei Reaktion mit einem TCP dagegen liegen anschließend pro reaktionsfähigem TCP zwei Produkte mit SH-Gruppe vor, so dass die Absorption bei 412 nm durch zwei geteilt werden muss, um aus ihr die Konzentration an reaktionsfähigem TCP zu errechnen.



Zu beachten ist weiterhin, dass die Probenlösung keine weiteren Reduktionsmittel wie DTT oder 2-Mercaptoethanol enthalten darf.

Material:

Ellman's Reagenz: 5,5'-Dithiobis-(2-nitro-benzoic acid) (DTNB)

Ellman's Reagenz-Lösung: 4 mg/ml DTNB in 100 mM Na-phosphat (pH 8,0)

100 mM TCP in DMF

Zum Testen des Reduktionsmittels auf Reaktivität wurden je 1 ml einer 200 µM, 50 µM und 10 µM Lösung des TCP in 100mM Na-Phosphatpuffer mit 20 µl Ellman's Reagenz-Lösung versetzt, gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Absorptionmessung bei 412 nm. Der Extinktionskoeffizient für das reduzierte Produkt 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure liegt bei $\epsilon_{412} = 13.600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

2.4.4 Markierung von Monomeren und Trimeren

Die hier beschriebene Markierung von gefalteten Komplexen wurde dazu eingesetzt, die Zugänglichkeit der singulären Cysteine für den Farbstoff RM zu testen.

Material:

Gradientenbanden von Monomeren und Trimeren nach 2.2.4

100 mM TCP in DMF

Refraktometer: Atago Handrefraktometer HSR-500 (Leo Kuebler GmbH, Karlsruhe)

Eichlösungen mit verschiedenen Saccharose-Konzentrationen

2-2,5 mM RM in DMSO

1 M DTT

Die Gradientenbanden wurden auf gleiche Sucrosekonzentration und gleiche Absorption bei 670 nm gebracht. Aus dem Extinktionskoeffizienten für monomeren LHCI bei 670 nm nach Butler und Kühlbrandt (1988) errechnete sich die Konzentration der Komplexe ($\epsilon = 5,46 \cdot 10^5 \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). In den meisten Ansätzen lag sie zwischen 0,55 und 0,65 μM . Die Komplexe inkubierten mit etwa 300-fachem molaren TCP-Überschuss über Protein bei 10°C für eine Stunde, um sämtliche SH-Gruppen in den reduzierten Zustand zu bringen. Die Markierung erfolgte mit 23-fachem Überschuss an RM bei 10°C. Zum Abstoppen nach verschiedenen Zeiten wurde jeweils ein Aliquot mit 15 μl von jedem Markierungsansatz abgenommen und zu 0,5 μl 1 M DTT gegeben.

Auswertung:

Zur Auswertung der Markierungen wurde zu den 15 μl -Aliquots jeweils 5 μl Sparmix gegeben. Die Proben wurden für eine Minute gekocht, nach Abkühlen und kurzem Anzentrifugieren auf ein 15-prozentiges PAA-Gel aufgetragen. Der Elektrophoreselauf mit SDS-Laufpuffer nach Kap.2.5.1.1 bestand aus einer kurzen Einlaufphase mit 80 V und anschließender Auftrennung mit 120-150 V. Wenn die Lauffront der Proben gerade aus dem Gel herausgelaufen war, dauerte der Lauf bei 150 V noch etwa eine halbe Stunde. Hatte man sehr stark gefärbte Proteinbanden, die schon während des Laufes zu sehen waren, so konnte man sich an ihnen orientieren und den Lauf zur besseren Auftrennung verlängern.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf Fluoreszenz der Banden mit markiertem LHCP geprüft (s. unten), anschließend wurden die Proteinbanden mit Hilfe von Coomassie angefärbt.

Korrekturen:

Zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Gele wurde z.T. ein Fluoreszenzstandard beim Elektrophoreselauf mitgeführt. Der Fluoreszenzstandard bestand aus RM-markiertem S3Ch. Die verwendete Markierungscharge, eine Standardmarkierung von freiem Protein nach Kap. 2.4.1.2 mit 2 mg/ml LHCP und 3,2-fachem RM-Überschuss sowie nur 15 Minuten Reduktionsdauer durch 2 mM TCP vor der Markierung, hatte etwa eine Markierungsausbeute von 50 %. Das Protein war gefällt, dann in 1 % SDS zu 1 mg/ml aufgenommen worden. Zur Elektrophorese wurde es auftragsfertig mit Sparmix verdünnt (s. Kap. 2.5.1.1). Bewährt hat

sich eine Stammlösung mit 0,0088 mg/ml, in die Elektrophorese eingesetzt wurden dann 10 µl des Gemisches pro Tasche, also 0,088 µg. Bei dieser Menge war eine im Vergleich zu der Bandbreite der Proben passende Intensität der Fluoreszenzbande zu messen, eine Proteinbande nach Coomassie-Färbung dagegen war kaum zu erkennen. Würde eine auf Proteinebene gut nachweisbare Menge dieses Standards aufgetragen, so läge die Fluoreszenz an der oberen Grenze der Verwertbarkeit. Der Fluoreszenzstandard wurde lediglich zum relativen Angleichen verschiedener Gele, nicht aber zur tatsächlichen Quantifizierung benutzt.

Ein weiterer Korrekturfaktor diente der Feststellung der genauen Proteinmenge in den einzelnen Ansätzen. Dazu wurde der Luteingehalt der zur Markierung eingesetzten Komplexmischung mittels Butanolextraktion der Pigmente und darauffolgender HPLC bestimmt (Kap. 2.3.3). Die Errechnung der molaren LHCP-Konzentration stützte sich auf die Annahme von zwei Luteinen pro Monomer. Diese zusätzlich zur A_{670} -Messung durchgeführte Kontrolle des Proteingehaltes wurde als genauer angesehen. Bei 670 nm wird die Absorption der Chlorophylle erfasst, letztere weisen eine größere Schwankungsbreite im Komplex auf, insbesondere auch zwischen Monomeren und Trimeren. Zur groben und schnellen Einstellung der Komplexe auf gleiche Konzentration reichte die Messung allemal aus, um genauere Werte zu erhalten war die nachträgliche Kontrolle über den Luteingehalt angebracht.

2.4.5 Auswertung von Fluoreszenzbanden in PAA-Gelen

Material:

Gel Doc 1000 von Bio-Rad, München

Software: Molecular Analyst 1.5 von Bio-Rad, USA

PAA-Gele, deren Proben mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert worden waren, wurden anschließend auf Fluoreszenzintensität der Proteinbanden ausgewertet. Dazu wurden sie mit UV-Licht (Maximum bei 302 nm) durchstrahlt, die Fluoreszenz im sichtbaren Bereich konnte mit einer Kamera aufgenommen werden. Die Lampen des Transilluminators (Leuchttisch) waren auf „analytical“ geschaltet. Speziell die PAA-Gele der Zugänglichkeitsuntersuchungen aus Kap. 2.4.4 wurden mit einer Blendenöffnung von 2 aufgenommen, die Brennweite der Kamera stand auf 25-30 mm. Sie wurden standardmäßig über 0,7, 1,2 und 2,0 Sekunden Belichtungszeit integriert. Das entstandene Bild ordnete jedem Bildpunkt einen Grauwert zu. Die Aufnahme und weitere Auswertung geschah mit dem Programm Molecular Analyst 1.5 von Bio-Rad. Die Zugänglichkeitsuntersuchungen in Kap. 3.3 verwendeten in der Regel die Werte der 1,2 s-Integration zur quantitativen Auswertung.

Schon während der Bildaufnahme ließ sich über die Funktion „Show Saturation“ kontrollieren, ob und wo gesättigte Bereiche im Bild vorkamen. Sättigung bedeutet, dass das Programm über einen Wert hinaus keine Abstufungen des Grauwertes mehr vornehmen kann. Sie wird insbesondere bei langen Belichtungszeiten erreicht und lässt sich somit über die

Wahl der Integrationszeit etwas steuern. Bei Betrachtung einer großen Menge an Werten muss bedacht werden, dass diese nicht so weit streuen dürfen, dass die stärksten Werte gesättigt und die schwächsten noch gar nicht aufgelöst sind.

Das ursprüngliche Bild zeigte helle Fluoreszenzbanden vor einem dunklen Hintergrund. Die Auswertung gelang einfacher, indem das Bild invertiert wurde, so dass dunkle Banden vor hellem Hintergrund erschienen. Auf diese Weise waren Abstufungen durch das menschliche Auge besser zu kontrollieren. Um jede Bande wurde ein Rechteck gelegt, dann die Intensität über diese Fläche integriert. Um eine möglichst gleichmäßige Auswertung auch gerade bei schwachen Banden zu erhalten, wurde eine einheitliche Rechteckgröße gewählt, die immer etwas größer als die eigentliche Bande war. Als Hintergrund wurde über eine Kontrollfläche ein durchschnittlicher Grauwert pro Bildpunkt errechnet und vom Messwert abgezogen. Die Bandenfluoreszenz durfte im Ursprungsbild keiner Sättigung unterliegen.

Im Prinzip lässt sich auf die gleiche Weise ein schwarz/weiß eingescanntes Proteingel nach Coomassiefärbung auswerten. Der Nachteil dabei ist ein wesentlich unruhigerer Hintergrund und nur ein kleiner Spielraum an Proteinkonzentration, in dem vernünftige Werte gemessen werden können ohne sofort gesättigte Bildpunkte zu erhalten.

2.4.6 Fluoreszenzspektroskopie

Mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde in dieser Arbeit die Intaktheit des Energietransfers auf Chlorophyll a im Komplex getestet. Die sensibilisierte Fluoreszenz von Chl a nach Anregung von Chl b wird als Hinweis benutzt, ob ein LHCII-Komplex korrekt gefaltet und intakt vorliegt. Eine weitere Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie war die Betrachtung des Verhaltens mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe alleine und gebunden an Monomere bzw. Trimere.

Die Fluoreszenzmessung in Lösung fand in einer Küvette mit Schichtdicke 5 mm statt. Die Messanordnung des Gerätes detektierte die Emission im rechten Winkel zum Anregungslicht.

Material:

Fluorimeter: FluoroMax-2 von SPEX/ISA, Grasbrunn

Küvettenkühlung

Software: Datamax for Windows

Zur Fluoreszenzmessung an Komplexen wurden Proben aus dem Saccharosedichtegradienten verwendet. Im Standardfall wurde die Probe 1:10 mit Gradientenlösung (0,4-0,6 M Sucrose, 0,1 % LM, 5 mM Tricin pH 7,8) verdünnt und erreichte damit eine gut einsetzbare Konzentration unter 0,1 μ M bezogen auf monomeren LHCII. Die Messung fand i.d.R. bei 12°C statt, die über eine Wasserdurchflusskühlung der Küvettenhalterung erreicht wurden.

1) Messparameter „emission acquisition“ (Emissionsspektrum):

Bandbreite („Slit“):	Excitation	3 nm
	Emission	3 nm
Integrationszeit:		0,1 s
Wellenlängenintervall :		1 nm

Die Excitationswellenlänge ist jeweils bei den Spektren angegeben.

2) Messparameter „excitation acquisition“ (Anregungsspektrum):

Bandbreite („Slit“):	Excitation	3 nm
	Emission	3 nm
Integrationszeit:		0,1 s
Wellenlängenintervall :		1 nm

Die Emissionswellenlänge ist jeweils bei den Spektren angegeben.

3) Messparameter „multigroup acquisition“:

Bandbreite („Slit“):	Excitation	3 nm
	Emission	3 nm
Integrationszeit:		0,1 s
Messintervall:		10 s

<u>Anregung:</u>		<u>Emission:</u>
a) 560 nm	→	680 nm
b) 560 nm	→	588 nm
c) 460 nm	→	660 nm
d) 460 nm	→	680 nm

In dieser Form der Fluoreszenzmessung wurden keine Spektren aufgenommen. Die Daten bestehen aus Einzelwerten für jedes aufgeführte Paar an Anregungs- und Emissionswellenlänge, hier ergeben sich 4 Werte (a-d) pro Messintervall. Die Datenreihen zeigen eine Veränderung der Emission über die Zeit.

2.5 Allgemeine Methoden

2.5.1 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von denaturierten Proteinen oder gefalteten Komplexen wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) benutzt. Das Prinzip lehnt sich an die Methode von Laemmli (1970) an. Gelelektrophoresen mit Farbstoff-markiertem Protein oder intakten Komplexen wurden generell im Dunkeln durchgeführt.

2.5.1.1 Denaturierende SDS-PAGE

SDS-Laufpuffer:

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1 %	SDS
0,5 mM	EDTA

Sammelgel:

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

Trenngel:

15 %	Polyacrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid = 30:1)
400 mM	Tris-HCl pH 8,8
8 %	Glyzerin
0,07 %	APS
0,05 %	TEMED

Sparmix, 3-4-fach konzentriert:

4 %	SDS
1,4 M	β -Mercaptoethanol
24 %	Glyzerin
100 mM	Tris-HCl pH 6,8
0,4 mM	Bromphenolblau

Die denaturierende PAGE trennt Proteine vorwiegend nach ihrer Größe auf. Das Dodecylsulfat des Laufpuffers lagert sich als Detergens an die einzelnen Proben-Moleküle an und überdeckt mit seiner negativen Ladung die Eigenladungen der Proteine. Diese wandern deshalb in einem elektrischen Feld zur positiven Anode und trennen sich dabei nach ihrer Größe auf.

Die Proben zur denaturierenden SDS-PAGE wurden mit 1/3-1/4 Volumen an Sparmix versetzt, gekocht, kurz anzentrifugiert und aufgetragen. Der Lauf erfolgte im Sammelgel bei 80 V, im Trenngel bei 120-180 V. Handelte es sich um mit RM oder TM markiertes LHCP, so wurde der Lauf nicht wie sonst vor Auslaufen der Lauffront gestoppt, sondern zur besseren Auftrennung zwischen markiertem und unmarkiertem Protein mindestens eine halbe Stunde nach Auslaufen des Bromphenolblaus des Auftragspuffers verlängert.

2.5.1.2 Schwach denaturierende PAGE

Während dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Laufpuffersysteme für eine schwach denaturierende Gelelektrophorese verwendet. Die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

entsprachen in beiden Fällen der der denaturierenden SDS-PAGE. Die Proben wurden nicht denaturiert, lediglich, wenn nötig, mit Glycerin zum Auftragen beschwert. Während des Laufes erfolgte eine Kühlung der Gelkammern auf 4°C. Die Proben liefen mit 40 V in das Gel ein, dann wurde die Spannung auf 80-100 V erhöht.

Beide Systeme unterschieden sich in ihren Laufeigenschaften. Der Deriphatpuffer erwies sich als schonender für LHC-Komplexe, die Laufgeschwindigkeit der Proben allerdings war insgesamt gegenüber der Elektrophorese mit LDS-Puffer verringert. Eine Nutzung von Deriphat zur Elektrophorese wurde bereits von Peter und Thornber (1991) beschrieben.

LDS-Laufpuffer:

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0,1 %	LDS
0,5 mM	EDTA

Deriphat-Laufpuffer:

0,15 %	Deriphat 160 (Disodium N-Lauryl Iminodipropionate) von Henkel
48 mM	Glycin
12 mM	Tris

2.5.1.3 Proteinfärbung der PAA-Gele

Die Gele wurden unter Schütteln zunächst für mindestens 20 Minuten mit Coomassie-haltiger Lösung gefärbt, dann 15 Minuten im 1. Entfärber inkubiert, zuletzt über Nacht zusammen mit einem Schwamm zum Aufsaugen der Farbe im 2. Entfärber gelagert.

Färbelösung:

0,25 %	Coomassie Brilliant Blue G250
40 %	Ethanol
7 %	Eisessig

1. Entfärber:

10 %	Ethanol
7 %	Essigsäure

2. Entfärber:

10 %	Essigsäure
------	------------

2.5.2 Präparation von Einschlusskörpern

Das Apoprotein des LHCII kann mit Hilfe eines Expressionsvektors in *E.coli* überexprimiert werden. In dem in dieser Arbeit verwendeten Exxpressionssystem steht das Gen des LHCP unter der Kontrolle des lac-Operons. Die Produktion des Proteins kann daher durch das Lactose-Analogon IPTG induziert werden. LHCP als Membranprotein ist in wässriger Umgebung nicht löslich. Es sammelt sich in sogenannten Einschlusskörpern („Inclusion

bodies“) in den Bakterienzellen an. Diese können nach Aufbrechen der Zellen aufgereinigt werden.

Material:

LBamp-Medium:

1 % (w/v)	Trypton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
1 % (w/v)	NaCl
100 µg/ml	Ampicillin

1 M IPTG

DTT

1 mg/ml DNase I

French Pressure Cell

Detergenspuffer:

200 mM	NaCl
1 % (w/v)	Desoxycholsäure
1 % (w/v)	Nonidet P40
20 mM	Tris-HCl pH 7,5
2 mM	EDTA
10 mM	β-Mercaptoethanol

Tritonpuffer:

0,5 % (w/v)	Triton X-100
20 mM	Tris-HCl pH 7,5
1 mM	EDTA
10 mM	β-Mercaptoethanol

20 mM Tris-HCl pH 7,5

Ein Ansatz mit 800 ml LBamp-Medium wird mit 50 ml einer Vorkultur angeimpft. Nach etwa 1 Stunde Inkubation (37°C unter Schütteln) bzw. dem Erreichen einer Extinktion von 0,5 bei 500 nm erfolgt eine Induktion mit 800 µl IPTG, nach 4 Stunden wird die Kultur durch Abzentrifugieren der Zellen geerntet. Das Pellet wird in 30 ml Wasser mit 24 mg DTT und 110 µl DNase I resuspendiert und 3 Minuten im Ultraschallbad behandelt, anschließend auf Eis gehalten. Die Zellen werden durch zweimalige Behandlung mit einer French Press aufgebrochen. Das durch anschließende Zentrifugation erhaltene Pellet wird je einmal mit Detergenspuffer und Tritonpuffer gewaschen. Eine gute Resuspendierung in jedem Schritt erfolgt mit Hilfe von Vortexer und Ultraschallbad. Sollte die Konsistenz des Pellets schleimig, Fäden ziehend sein, so muss das Waschen mit Detergens- und Tritonpuffer wiederholt werden. Nach einem letzten Waschen mit 20 mM Tris-HCl pH 7,5 werden die „Inclusion bodies“ in 2 ml 20 mM Tris-HCl pH 7,5 aufgenommen und eingefroren.

2.5.3 Bestimmung der LHCP-Konzentration

Material:

A₂₈₀-Puffer:

10 mM	Tris-HCl pH 6,8
2 %	SDS
1 mM	β-Mercaptoethanol

10 µl der Probe wurden mit 990 µl A₂₈₀-Puffer versetzt und gekocht, anschließend für mindestens 15 Minuten abgekühlt. Aus der Absorption bei 280 nm berechnete sich nach Hobe (1995) die LHCP-Konzentration wie folgt:

$$0,1 \text{ OD} = 52,5 \text{ µg/ml}$$

Wichtig bei dieser Messung ist das Mitführen einer gleichbehandelten Referenz ohne Protein, die auch Zusätze des Probenpuffers, wie z.B. Detergens, enthält.

2.5.4 Westernblot

Die Methode des Westernblots zum Nachweis des Histidintags an Proteinen wurde nach Kosemund (1999) durchgeführt. Die Detektion erfolgte abweichend über einen Antikörper, der ein Motiv von 5 Histidinen erkennt. Der sekundäre Antikörper trug gleichbleibend eine alkalische Phosphatase, deren enzymatische Reaktion dazu diente, die Markierung sichtbar werden zu lassen.

Material:

Westernblot:

Westernblot-Puffer:

20 mM	Tris
150 mM	Glyzin
0,05 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Methanol

Blotkammer, Schwämme, Whatmanpapier

Nitro-Cellulose-Membran von Pharmacia (0,2 µm)

Antikörperreaktion:

10x TBS:

1,5 M	NaCl
100 mM	Tris-HCl pH 7,5

5x TBSTT (TBS-Tween/Triton-Puffer):

2,5 M	NaCl
0,25 % (v/v)	Tween 20
100 mM	Tris-HCl pH 7,5
1 % (v/v)	Triton X-100

Blocking-Lösung:

3 % (w/v) BSA in 1x TBS-Puffer
Anti-His₅-Antikörper (Maus) von Qiagen
Anti-Maus-Antikörper

Detektionsreaktion:

5 % (w/v) BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Idolylphosphat)
NBT: 5 % (w/v) NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid)
70 % (v/v) DMF

AP-Puffer:

100 mM NaCl
5 mM MgCl₂
100 mM Tris-HCl pH 9,5

Die Proteinbanden eines PAA-Geles wurden mit Hilfe eines Tankblotsystems auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das Markieren der Banden mit spezifischen Antikörpern erfolgte nach folgendem Protokoll :

- Nitro-Cellulose-Membran mit 1x TBS abspülen
- 1 Stunde (bis zu über Nacht) in Blocking-Lösung inkubieren
- 2x 10 Minuten mit 1x TBSTT waschen
- 1x 10 Minuten mit 1x TBS waschen
- 1 Stunde mit Anti-His₅-Antikörper (Maus) inkubieren (1:2000 in 1x TBS mit 1,5% BSA)
- 2x 10 Minuten mit 1x TBSTT waschen
- 1x 10 Minuten mit 1x TBS waschen
- 1 Stunde mit Anti-Maus-Ak inkubieren (1:25.000 in 1x TBSTT)
- 4x 10 Minuten mit 1x TBSTT waschen

Detektion:

Zum Sichtbarmachen der mit Antikörper markierten Banden wurde die Blot-Membran mit 5 ml AP-Puffer, 33 µl NBT und 16,5 µl BCIP versehen. Im Laufe der nächsten halben Stunde kamen die bläulich violetten Banden zum Vorschein. War die Stärke der Banden ausreichend, so wurde die Farbreaktion durch Waschen mit Wasser beendet und die Membran zur Aufbewahrung getrocknet.

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion der LHC-Mutanten mit singulärem Cystein und His₆-Motiv

Die Markierungs- und Zugänglichkeitsuntersuchungen in Kap 3.3 und 3.4 erforderten die Konstruktion geeigneter LHC-Mutanten. Die Veränderungen des LHCP verfolgten dabei zwei Ziele:

- Die LHC-Mutanten sollten gezielt an einer definierten Stelle zu markieren sein. Dies wurde dadurch erreicht, dass Proteine mit einem „singulären“ Cystein hergestellt wurden. Diese Proteine tragen in ihrer Aminosäuresequenz jeweils nur ein einziges Cystein. An seiner SH-Gruppe können unter entsprechenden Bedingungen Thiol-reaktive Substanzen ganz selektiv angreifen.
- Eine zweite Veränderung des maturen Proteins betrifft die Möglichkeit der *in vitro*-Trimerisierung des LHCP. Die Methode nach Rogl et al. (1998) erfordert die zeitweise Immobilisierung des Proteins an einer Ni²⁺-Chelat-Säule. Um diese Option zu erhalten wurde in die entsprechenden LHC-Mutanten ein Motiv aus 6 hintereinanderliegenden Histidinen („His-tag“ oder Hexahistidylrest) eingefügt.

Die Lage der Cysteine bzw. der His₆-Motive der im Einzelnen verwendeten LHC-Mutanten soll in Abb. 3.1 verdeutlicht werden.

Die Konstruktion der LHC-Mutanten ist in Kap 2.1.1 beschrieben. Zwei der LHCP-Derivate (S52Ch und S106Ch) wurden von Stefanie Storf während ihrer Diplomarbeit (2001) hergestellt. Die gezielt in die jeweiligen Mutanten eingesetzten Cysteine liegen in verschiedenen Domänen des LHCII: nahe des N-Terminus, direkt vor der ersten Transmembranhelix, in luminaler bzw. stromaler Schleife, sowie nahe des C-Terminus. Ein zur Trimerisierung benötigter Hexahistidylrest wurde in jeder LHC-Mutante jeweils so plaziert, dass er sich, bei Betrachtung des LHCII in der Membran, auf der jeweils entgegengesetzten Membranseite zu dem singulären Cystein befand.

Von den in Tab. 2.1 aufgeführten Klonen exprimierten alle bis auf einen Vorläufer-Klon das veränderte Protein des LHCII. In pV229Csh ließ sich mit den in Kap. 2.5.2 dargelegten Bedingungen keine Produktion von Einschlusskörpern erreichen. Da dieser Klon nur zur Konstruktion von V229Csh benutzt wurde und diese LHC-Mutante die korrekte Sequenz und Expression des Proteins zeigte, wurde das Verhalten der Vorläufer-Mutante nicht näher untersucht.

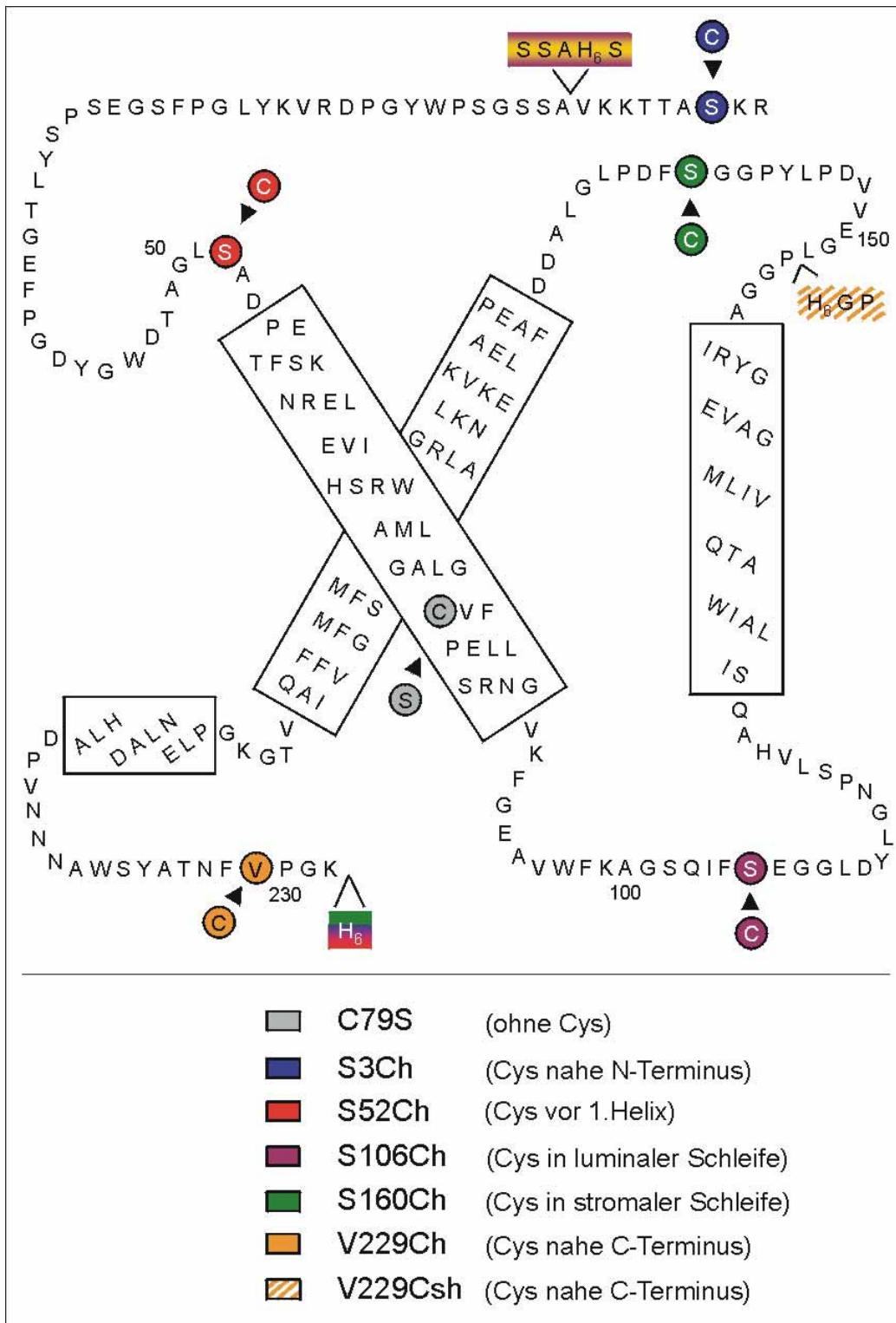


Abb. 3.1 Schema des matten LHCII und der abgeleiteten LHC-Mutanten mit singulärem Cystein und His₆-Motiv.

Der Austausch des im matten LHCII vorhandenen Cysteins an Stelle 79 gegen ein Serin (grau) ist in allen anderen aufgeführten Mutanten ebenfalls vorhanden; ansonsten folgt ihre Benennung der Lage des jeweiligen singulär eingefügten Cysteins. Die Nummerierung orientiert sich an der Sequenz des matten LHCP (D7f.3) und berücksichtigt zusätzlich eingefügte Abschnitte nicht.

Fünf der in Abb. 3.1 aufgeführten LHC-Mutanten mit singulärem Cystein ließen sich gut zu Monomeren und Trimeren rekonstituieren. Ein Protein (S52Ch) bildete nur Monomere. Auf das abweichende Verhalten von V229Csh wird im nächsten Kapitel näher eingegangen.

3.1.1 Rekonstitutionsfähigkeit von V229Csh

Bei der Konstruktion einer Mutante mit singulärem Cystein nahe dem C-Terminus musste ein Ort für das His₆-Motiv abweichend von den anderen Mutanten gefunden werden. Letztere tragen ihren „His-Tag“ direkt am C-Terminus angehängt. Diese Stelle kam für eine V229C-Mutante nicht in Frage. Der Abstand von Cystein und His₆ von 3 Aminosäuren ließe keine Aussage über die Zugänglichkeit des Cystein in einem dem murenen LHCII entsprechenden Komplex zu. Als Alternative wurden zwei Varianten ausgewählt: Einmal ein Einbau der Histidine in die stromale Schleifenregion, zum Anderen ein Einbau in der Nähe des N-Terminus. Eine LHCII-Mutante mit His₆-Motiv in der erwähnten Schleife wurde schon von Kosemund (1999) für Insertionsexperimente benutzt.

V229Csh zeigte in der Abb. 3.2 auf dem Gel keine Komplexe, im Saccharosegradienten dagegen waren deutlich eine Monomerbande und ganz schwach ein Hauch von Trimeren zu erkennen. Die Gelelektrophorese ist die stringendere Methode zur Auftrennung, d.h. sind die Komplexe instabil, so gehen sie während der Elektrophorese leicht kaputt. Im Gradienten dagegen konnte unter schonenden Bedingungen nachgewiesen werden, dass eine Rekonstitution von V229Csh möglich ist. Eine Trimerisierung der instabilen Monomere könnte in sehr geringem Ausmaße ebenfalls stattgefunden haben, wie eine Bande auf Höhe der Trimere nahelegt.

Aufgrund der Instabilität und der geringen Ausbeute der Komplexe von V229Csh wurde mit dieser LHC-Mutante nicht weitergearbeitet. Als Alternative mit Cystein nahe C-Terminus wurde V229Ch hergestellt. Diese Mutante erreicht, wie Abb. 3.2 zeigt, eine normale Ausbeute an Monomeren und Trimeren. Auffällig ist bei V229Ch ein starke Verschmierung der Trimerbande im Gradienten, sowie zusätzliche Banden im Gel. Auf diese Beobachtung wird in Kap. 3.3.1.1 noch einmal eingegangen.

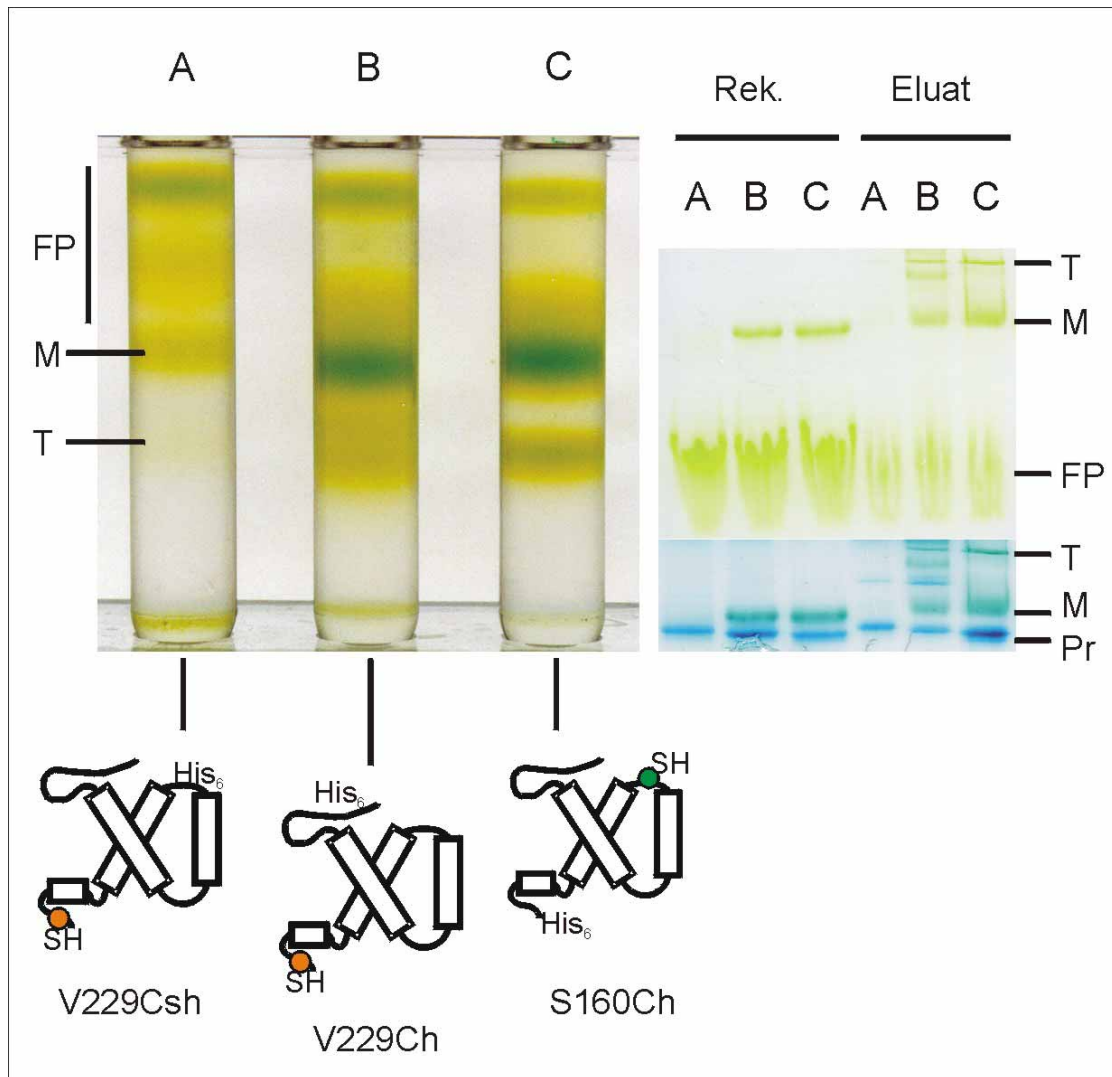


Abb. 3.2 Rekonstitution und Trimerisierung von V229Csh, V229Ch und S160Ch

V229Csh (A) wurde wie V229Ch (B) und S160Ch (C) nach Kap.2.2.4 rekonstituiert, trimerisiert und über einen Saccharosedichtegradienten ohne TCP aufgetrennt. Rekonstitution (Rek.) und Trimerisierung (Eluat der Ni²⁺Chelat-Säule) wurden zusätzlich über eine schwach denaturierende PAGE mit Deriphat-Puffer überprüft. M: Monomere; T: Trimere; FP: freies Pigment; Pr: freies Protein; x,xx: Artefaktbanden durch Disulfidbrücken zwischen freiem Protein (x) oder zwischen 2 Monomeren untereinander oder einem Monomer und einem Apoprotein (xx).

3.1.2 Pigmentgehalt der rekonstituierten LHC-Mutanten

Alle fünf LHC-Mutanten, die in die Zugänglichkeitsuntersuchungen von Kap. 3.3.2 eingesetzt werden sollten, wurden auf ihren Pigmentgehalt nach Rekonstitution untersucht. Abb. 3.3 gibt einen Überblick über das Verhalten aller Proteine, noch einmal unterschieden nach Monomeren und Trimeren. Dargestellt ist die Pigmentzusammensetzung einer monomeren Einheit, normiert auf einen konstanten Gehalt von 2 Luteinen. Durch diese Auftragung werden Schwankungen des Luteingehaltes nicht sichtbar. Sollte der Luteingehalt in stöchiometrischem Rahmen von 2 Luteinen pro Monomer abweichen, so sollte daraus eine entsprechend drastische Veränderung des Chlorophyllgehaltes resultieren. Da dies bei keiner Mutante auftritt, wird die Normierung auf die zwei zentralen Luteine des LHCII als ein Standard für eine monomere Einheit aufrechterhalten.

Es fällt auf, dass das jeweilige Trimer mehr Chlorophylle enthält, als das dazugehörige Monomer. Die Chlorophyllzunahme betrifft beide Chlorophyllspezies, je Mutante in unterschiedlichem Ausmaß. Das Chl a- zu Chl b-Verhältnis nimmt von jedem Monomer zum Trimer leicht ab. Die Differenz im Chlorophyllgehalt zwischen Monomeren und Trimeren ist demnach etwas stärker durch einen Chl b-Unterschied bestimmt. Diese Beobachtung des bevorzugten Chl b-Verlustes im Monomer gegenüber dem Trimer bei der Aufreinigung über einen Saccharosedichtegradienten berichtet auch Rogl (2000).

Das Chl a- zu Chl b-Verhältnis liegt für alle LHC-Mutanten zwischen 1 und 1,17 und damit im Rahmen des Wildtypproteins. Als Vergleich dient C3.2h, entsprechend dieser Arbeit rekonstituiert und trimerisiert über eine Nickel-Chelat-Säule (Bender, persönliche Mitteilung). Je nach Rekonstitutionsmethode und eingesetzter Pigmentmischung kann das Chl a- zu Chl b-Verhältnis in den Komplexen schwanken.

An Xanthophyllen wird in diesem Fall außer Lutein nur Neoxanthin aufgeführt. Der Gehalt ist in allen Mutanten sehr ähnlich, wieder wird ein leichter Anstieg im Trimer beobachtet. Die Werte liegen etwas unter einem Neoxanthin pro 2 Luteinen. Zusätzlich zu den zwei Luteinen, denen im Strukturmodell nach Kühlbrandt et al. (1994) zentrale Positionen zugeordnet werden, wird eine weitere Xanthophyllbindestelle mit Präferenz für Neoxanthin angenommen (Croce et al., 1999). Der hier unter eins liegende Wert kann der Methode der Rekonstitution und einem Verlust bei der Aufarbeitung zugeschrieben werden und ist nicht weiter verwunderlich. Das dritte Xanthophyll, Violaxanthin, war ebenfalls in allen Komplexen vorhanden. Die nur geringe Menge dieses Xanthophylls erlaubte es aufgrund des niedrigen Signal/Rausch-Verhältnisses nicht, eine verlässliche Auswertung vorzunehmen. So lässt sich nur anmerken, dass Violaxanthin in dem für LHCII typischen substöchiometrischen Rahmen blieb.

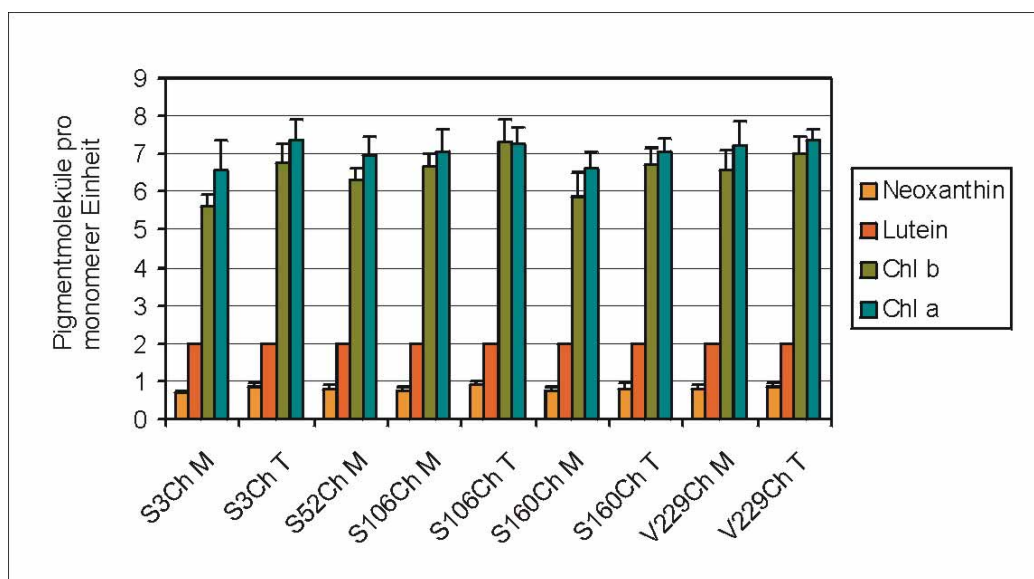


Abb. 3.3 Pigmentgehalt von Monomeren und Trimeren der LHCII-Mutanten

Der Pigmentgehalt der Komplexe wurde mittels HPLC bestimmt. Zur Standardisierung wurde auf zwei Luteine pro monomerem Komplex normiert. Die Zahlen stellen den Mittelwert aus 5 Rekonstitutionen mit jeweils zwei HPLC-Läufen, also insgesamt 10 Messungen dar. Verwendet wurden die Rekonstitutionen der Zugänglichkeitsuntersuchungen aus Kap. 3.4.2.

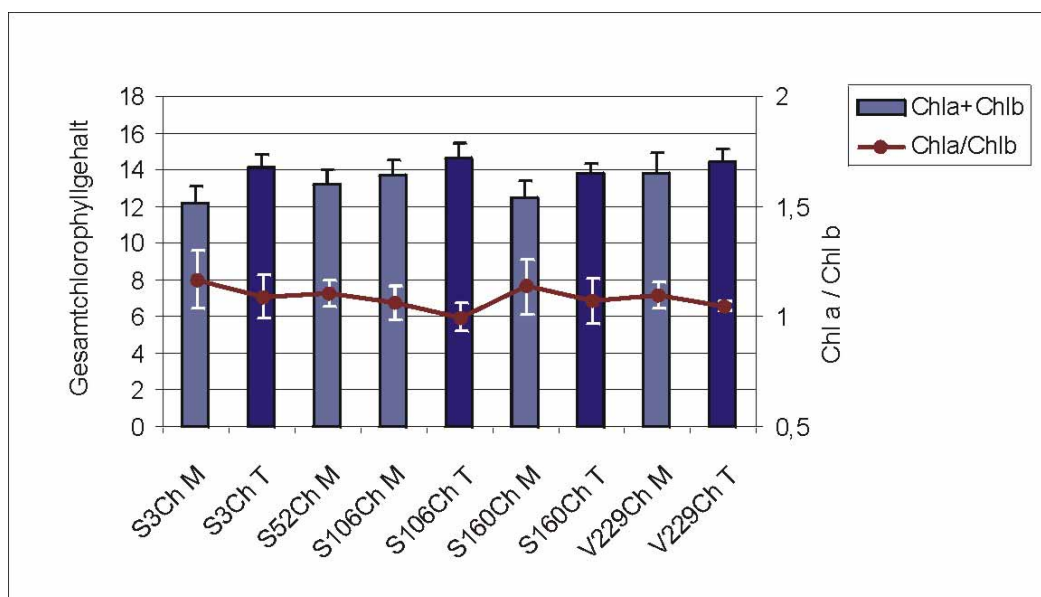


Abb. 3.4 Gesamtchlorophyllgehalt und Chl a- zu Chl b-Verhältnis

3.2 Trimerisierung

3.2.1 Präparative Trimerisierungen

Im Laufe dieser Arbeit wurden präparativ zwei verschiedene Arten der Produktion von Trimeren aus rekombinantem LHCP benutzt. Eine generell anwendbare Methode wurde von Hobe (Hobe et al., 1994; Hobe, 1995) entwickelt. Zur Trimerisierung nach Rogl et al. (1998) ist eine spezielle Mutation des Proteins erforderlich. Das LHCP benötigt einen Hexahistidylrest, um im Laufe des Versuchs auf einer Ni^{2+} -Chelat-Säule immobilisiert werden zu können. Für beide Methoden ist nachgewiesen worden, dass die entstandenen Trimere die Eigenschaften nativer Komplexe aufweisen (Hobe et al., 1994; Hobe 1995; Rogl, 2000).

3.2.1.1 Trimerisierung mittels Detergensabreicherung:

Die Trimerisierung nach Hobe (1995) enthält die Schritte der folgenden Aufzählung. Die wesentlichen Punkte werden kurz dargestellt. Die genaue Ausführung der Methode ist in Kap. 2.2.2 beschrieben.

- Rekonstitution (in Anwesenheit von PG)
- Abreicherung von Chlorid-Ionen aus dem Detergenswechsel über eine Gelfiltrations-säule
- Abreicherung von Pigmenten über eine DEAE-Säule
- Detergensabreicherung mittels Dialyse
- Konzentrierung über Ultrafiltration
- Solubilisieren der Suspension und Aufreinigung mittels Saccharosedichtegradienten zur Gewinnung sauberer Trimerbanden

Es wurden Versuche unternommen, die Bildung von Trimeren über verschiedene Variationen zu verbessern.

Ein besonders kritischer Schritt der Methode ist die Elution der Komplexe von der DEAE-Säule in Anwesenheit von 1 % NG. Die hohe Detergengkonzentration führt rasch zu einem Zerfall der intakten Monomere (Hobe, 1995). Aus diesem Grund setzten einige Variationen an der Verbesserung oder Umgehung dieses Schrittes an. Als eine Alternative zur Abreicherung der Pigmente über eine Ionenaustauschersäule wurde die „Hydrophobe Interaktions-Chromatographie“ (HIC) ins Auge gefasst. Die Ergebnisse dazu sind in Kap. 3.2.2 dargestellt.

Nach einem Weglassen der Pigmentabreicherung und direktem Einsetzen der Rekonstitution in die Dialyse mit anschließender Ultrafiltration zeigte sich noch immer die Entstehung von Trimeren. Auf diese vereinfachte Art ist demnach auch eine Trimerisierung gut möglich.

Gleichwohl ist für exakte spektroskopische Untersuchungen eine Verminderung des freien Pigmentanteils aus der Rekonstitution vorzuziehen. Sie verkleinert das Risiko der unspezifischen Assoziation von Pigmenten an Komplexe während des Ablaufes der Trimerisierung.

Ein Versuch, die Ausbeute an Trimeren zu erhöhen, bestand darin, dem Dialysepuffer 5 % Saccharose oder 8 % Glycerin zuzusetzen. Beide Substanzen erhöhen die Viskosität der Lösung und sind dafür bekannt, Komplex-stabilisierend zu wirken. In diesem Fall hatten sie keinen steigernden Effekt auf die Bildung von Trimeren.

Ein weiterer Ansatz wollte mit einer Solubilisierung der in der Ultrafiltration entstandenen Suspension mittels 1 % (w/v) OG in Anwesenheit von 0,2 mg/ml PG und anschließender erneuter Dialyse und Ultrafiltration zusätzliche Komplexe zur Bildung von Trimeren anregen. Die Ausbeute an Trimeren veränderte sich durch diese Prozedur nicht sichtbar.

3.2.1.2 Trimerisierung über eine Ni²⁺-Chelat-Säule:

Die ursprüngliche Methode nach Rogl et al. (1998) immobilisiert freies Protein auf einer Ni²⁺-Chelat-Säule und lässt die Faltung zu Monomeren erst durch anschließende Pigmentzugabe auf der Säule geschehen. In dieser Arbeit wurde eine Abwandlung der Methode benutzt, in der schon rekonstituierte Monomere an der Ni²⁺-Säule immobilisiert wurden. Dadurch ließ sich die Ausbeute an Trimeren wesentlich erhöhen. Die Methode ist in Kap. 2.2.4 beschrieben.

3.2.1.3 Vergleich der zwei Trimerisierungsmethoden:

Die Ausbeuten beider Methoden liegen in einem ähnlichen Rahmen. Bei einer Trimerisierung mittels Dialyse und Einengung ohne vorherige Pigmentabtrennung entsteht eine konzentrierte Suspension. Aus ihr konnten nach Solubilisierung und Aufreinigung über einen Sucrosegradienten etwa 3 % des Chlorophylls der konzentrierten Suspension in der Trimerbande wiedergefunden werden. Um diese Zahl in einen Vergleich einzusetzen muss bedacht werden, dass ein Verlust an Pigment durch ausfallende Aggregate während der Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration eintritt. Die eigentliche Prozentzahl an in den Trimeren wiedergefundenem Chlorophyll aus dem ursprünglichen Rekonstitutionsansatz dürfte etwas geringer sein. Bei der Trimerisierung mit Hilfe einer Ni²⁺-Säule fanden sich etwa 2 % des überhaupt in die Rekonstitution eingesetzten Chlorophylls in der Trimerbande wieder.

Vorteile der Trimerisierung mittels Metallchelatchromatographie sind die kürzere Versuchsdauer und gute Anwendbarkeit auch in kleinem Maßstab. Des Weiteren lassen sich Waschschritte am immobilisierten Komplex während des Ablaufes einfach durchführen, um z.B. Pigmente abzutrennen oder Lipide hinzuzufügen. Aus den genannten Gründen wurde diese Art der Trimerisierung in den meisten Versuchen dieser Arbeit benutzt.

3.2.2 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC)

Es wurde nach einer schonenden Methode gesucht, die freien Pigmente aus einer Rekonstitution abzutrennen. Der Weg über eine DEAE-Säule nach Hobe et al. (1994), siehe auch Kap 3.2.1.1, ist vergleichsweise stark angreifend für den gefalteten LHCII. Die dort verwendete NG-Konzentration von 1% bei der Elution führt recht schnell zu einem Abnehmen der intakten Komplexe.

Bei der Suche nach einer Alternative bietet sich die HIC an. Ihr auftrennendes Prinzip benötigt hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Probe und stationärer Phase. Der LHCII als Membranprotein trägt einen hohen Anteil an unpolaren Bereichen an seiner Oberfläche. Es ist zu erwarten, dass über sie eine gute Bindung an eine HIC-Säule erfolgt. Das Elutionsprinzip der HIC beruht auf einer Verringerung der Ionenstärke im Puffer. Somit besteht die Erwartung, eine Elution auch ohne stark erhöhte und damit stressende Detergentskonzentration zu erreichen. Ganz auf Detergentien zu verzichten ist nicht möglich, da ein Membranprotein wie der LHCII ohne Hilfe nicht in Wasser in Lösung gehalten werden kann. Da die Detergentsmoleküle mit ihrem unpolaren Anteil um die Bindung an die Liganden konkurrieren können, sind sie ein sensibler Punkt im Aufbau.

Die freien Pigmente sind vergleichsweise unpolare Moleküle. Ob sich Bedingungen finden lassen, unter denen ihr Laufverhalten auf einer HIC-Säule von dem des intakten LHCII abweicht, war eine Ausgangsfrage dieser Versuche.

Die ersten Versuche wurden mit Triton-X 100 als Detergens und 3mM Natrium-Phosphatpuffer in sämtlichen Wasch- und Elutionspuffern durchgeführt. Zur Elution der Komplexe sollte ein Verringern der anfangs vorhandenen NaCl-Konzentration führen (von 1 M bzw. 0,5 M in einer Stufe auf 0 M). Zu diesen Versuchsreihen lässt sich festhalten, dass überall schon am Anfang mit Auftragen und erstem Waschen ein Großteil der Komplexe von der Säule gespült wurde. Dies war sowohl bei Triton-Konzentrationen von 0,5 % als auch 0,1 % der Fall. Ein nach Weglassen des Salzes erreichter zweiter Peak zeigte bei der Überprüfung über ein schwach denaturierendes Gel nur noch mäßig intakte Monomere.

Der Einsatz von CHAPS in Äquilibrierungs- und Waschpuffern führte dazu, dass sämtliche Komplexe und Chlorophylle aus der Rekonstitution auf der HIC-Säule zurückgehalten wurden. Die Säule wurde grün und ließ sich mit CHAPS-haltigen Puffern auch nach Weglassen des Salzes nur minimale Mengen an Komplex und/oder Pigment auswaschen. In Abb. 3.5 sind exemplarisch diejenigen Waschfraktionen mit aufgetragen, die eine sehr leichte Grünfärbung zeigten. In ihnen ist kein Protein zu detektieren, der Inhalt der Fraktionen wird daher als vernachlässigbar angesehen. Die eigentliche Elution der gebundenen Probe wurde erst mit dem Wechsel zu einem anderen Detergens, Triton-X 100, erreicht. Intakte Komplexe kamen zuerst von der Säule, mit leichter Verzögerung freies Pigment und freies LHCP. Auf diese Weise kam tatsächlich eine Trennung von Monomeren und freiem Pigment zustande.

Das Bindungsverhalten auf der Säule ist allerdings umgekehrt wie ursprünglich erhofft. Die freien Pigmente und das freie, nicht mehr im Monomer gefaltete Protein werden besser an der Säule gehalten. Ein Immobilisieren intakter Komplexe und anschließendes Waschen dagegen ist auf die gezeigte Art nicht möglich.

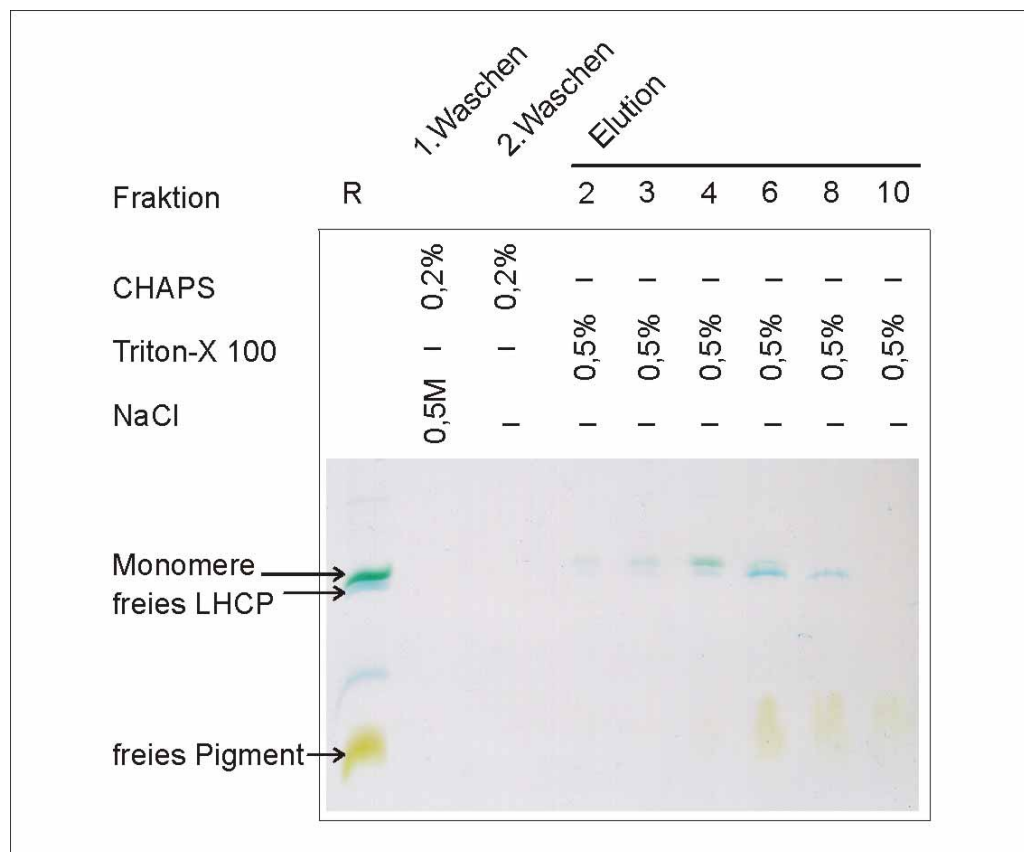


Abb. 3.5 HIC mit CHAPS und Triton

Auf eine 1ml-Säule (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (low sub)) wurden nach Äquilibrieren mit einem 5-fachem Säulenvolumen Startpuffer (0,1 % CHAPS, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl) 300 µl Rekonstitution nach Kap. 2.2.1 aufgetragen. Es folgte ein Waschen mit erneut 5-fachem Säulenvolumen Startpuffer, anschließend mit jeweils den selben Volumina an variierten Puffern: **1.** 0,2% CHAPS, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl; **2.** 0,2% CHAPS, 20 mM Tris-HCl pH 8,0; **3.** 0,5% Triton-X 100, 20 mM Tris-HCl pH 8,0. Es wurden jeweils 20 µl ausgewählter Fraktionen auf ein 15 %-iges Gel aufgetragen, der Lauf erfolgte unter schwach denaturierenden Bedingungen mit LDS-Laufpuffer. Das Gel ist mit Coomassie gefärbt. R = Rekonstitution

Eine Variation der oben beschriebenen Säule mit einem Triton-Gradienten zur Elution des LHCIII zeigte, Abb. 3.6, ebenfalls eine Auftrennung in Fraktionen, die Monomere enthalten, und Fraktionen mit freiem Protein und Pigmenten. Ein Loslösen der Komplexe schien erst bei 0,3 % Triton-X 100 zu geschehen. Dieses Verhalten ließ sich auf einer reinen Triton-Säule ohne CHAPS und NaCl nicht wiederholen. Hier kam das Protein schon beim Waschen mit niedrigster Triton-Konzentration von 0,1 % von der Säule (ohne Abb.).

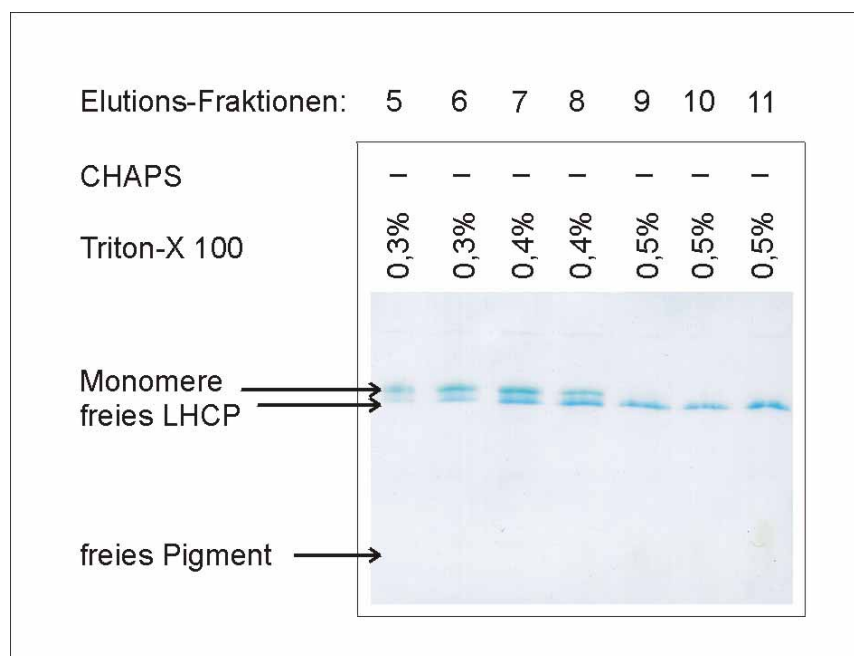


Abb. 3.6 HIC mit CHAPS und Triton-Gradient

Die HIC-Säule wurde wie in Abb. 3.5 mit Startpuffer äquilibriert, mit Rekonstitution beladen und mit Startpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte ein Waschen mit 4-fachem Säulenvolumen 0,2% CHAPS, 20 mM Tris-HCl pH 8,0. Zur Elution wurde eine steigende Konzentration an Triton benutzt: Nacheinander wurde je ein einfaches Säulenvolumen mit **1.** 0,1 %, **2.** 0,2 %, **3.** 0,3 %, **4.** 0,4 % Triton-X 100 aufgetragen, dann ein mehrfaches Säulenvolumen von **5.** 0,5 % Triton-X 100 zum Freiwaschen der Säule (alle Puffer mit 20 mM Tris-HCl pH 8,0). Gelauftrag und -lauf wie in Abb. 3.5.

Ein weiterer Versuch mit dem Einsatz von 1 % OG in Äquilibrierungs- und Startpuffer ließ gar keine Bindung des Proteins auf der Säule zu. Protein und Monomere eluierten direkt mit Auftrag und Waschen.

Die Methode der HIC wurde nicht weiterverfolgt. Nach einer Auswertung der Gelelektrophoresen schienen die über eine HIC-Säule gewonnenen Monomere vergleichsweise instabil. Zu dem damaligen Zeitpunkt wurde dies mit einer Stressung der Komplexe durch Wechselwirkungen mit der Säule erklärt. Im Nachhinein bin ich nicht mehr ganz dieser Meinung. Der Wechsel zu einem veränderten Laufpuffersystem der Gelelektrophorese, mit Deriphat als Detergens (siehe Kap 2.5.1.2), zeigte in anderen Versuchen wesentlich schonendere Bedingungen für gefalteten LHCII als das hier verwendete System mit LDS. Der hohe Anteil an freiem Protein in den Monomerfraktionen der HIC ist möglicherweise durch den Zerfall während der Gelelektrophorese überbewertet. Höchstwahrscheinlich brächte eine Wiederholung der Versuche dieses Kapitels mit einer schonenderen Auswertung ein besseres und brauchbareres Ergebnis für die Qualität der Monomere.

3.2.3 Trimerisierung mit Hilfe von Cyclodextrin

Es kam die Idee auf, durch das direkte Überführen von Monomeren aus der Detergensumgebung der Rekonstitution in eine Lipidvesikelumgebung die Bildung von Trimeren zu induzieren. Die Trimerisierungsmethode nach Hobe (1994,1995) enthält Detergen-abreicherung und Anwesenheit von Lipiden als zwei wesentliche Punkte. Eine zu hohe Konzentration an Detergens fördert durch ihren solubilisierenden Effekt eher das Auseinanderweichen als die Zusammenlagerung von Komplexen und ist daher nicht anzustreben. Lipide dagegen werden inzwischen als Bestandteil eines Trimers angesehen, möglicherweise könnte aber auch das Vorliegen von Monomeren in einer Lipiddoppelschicht einen zusätzlichen positiven Effekt auf die Aneinanderlagerung zu Trimeren ausüben. Eine Methode, solubilisiertes Rhodopsin mit Hilfe von Cyclodextrinen in eine Lipidumgebung zu bringen, wurde von de Grip et al. (1998) beschrieben. Die Autoren nahmen als Maßstab für den Erfolg ihrer Rekonstitution die Wiederherstellung des typischen Verhaltens von Rhodopsin in einer Membranumgebung. Ein ähnlicher Ansatz sollte ausprobiert werden, um Monomere in Lipidvesikel zu bringen. Ging es de Grip et al. um eine Rekonstitution eines Proteins, so wurde hier erhofft, dass durch die Ähnlichkeit zur Membranumgebung die Zusammenlagerung von Monomeren zu Trimeren bewirkt werden würde.

Zu diesen Versuchen eingesetzt wurde eine normale Standardrekonstitution, angereichert mit einem entsprechenden PG-Überschuss. Wie in Abb. 3.7 zu sehen, konnten mit der Methode nach Kap. 2.2.5 Aggregate oder Vesikel produziert werden. Sofort auffällig ist, dass sich nahezu alle Pigmente der Rekonstitution in diesen Banden wiederfinden. Ob die Lipide tatsächlich in Vesikelform vorlagen, wurde nicht untersucht. Um diese Aussage zu verifizieren müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, z.B. ein Betrachten unter dem Elektronenmikroskop könnte weiterhelfen. Bei Versuchen, die auf das Vorhandensein sauberer Vesikel aufbauen, wäre dies anzuraten. Die schon makroskopisch deutlich sichtbaren Strukturen deuten auf das Vorhandensein von Aggregaten. In vorliegendem Fall ging es zunächst nur um die Produktion von Trimeren, weshalb die genaue Art der Strukturen außer Acht gelassen wurde. Im Folgenden wird weiter von Vesikeln gesprochen.

In den Ansätzen A und B mit 100-fachem PG-Überschuss zeigten sich 2 Banden. Ein Unterschied zwischen beiden bezüglich Komplexgehalt konnte nicht ausgemacht werden. Es ist anzunehmen, dass sich zwei verschiedene Größen an Vesikeln bildeten, die unterschiedlich bandierten. Mit nur 50-fachem PG-Überschuss zeigte sich dieses Phänomen nicht.

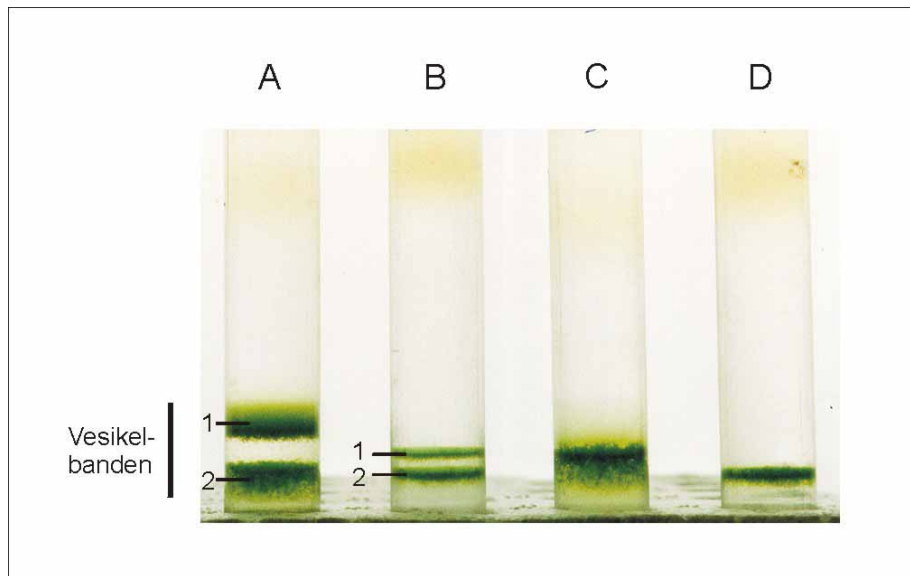


Abb. 3.7 Vesikelbildung mit Cyclodextrin

Eine Standardrekonstitution wurde wie in 2.2.5 beschrieben mit PG versetzt, in A und B mit 100-fachem PG-Überschuss, in C und D mit 50fachem, und mit Cyclodextrin weiterbehandelt; A und C sind Rekonstitutionen ohne, B und D mit Detergenswechsel. Der Auftrag erfolgte auf einen 0,6 M Sucroседichtegradienten (2x eingefroren/aufgetaut), der mit 200 µl 1,3 M Saccharose unterschichtet worden war, der Lauf fand im Rotor SW 60 Ti für 16 Stunden bei 4°C und 40.000 rpm statt.

Die Ansätze mit Detergenswechsel während der Rekonstitution hatten wesentlich schärfere Vesikelbanden. Ohne Detergenswechsel waren die Banden sehr viel breiter und fransten aus. Ein Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne Detergenswechsel war die Cyclodextrinkonzentration. Vor OG-Zugabe und KCl-Fällung war die Konzentration des Detergens LDS genau bekannt, danach richtete sich die Zugabe von Cyclodextrin als 1:1 molares Verhältnis zum Detergens. Nach Ausfällung des KDS-Niederschlages dagegen war unklar wieviel Rest an Dodecylsulfat in der Lösung verblieben war (die Fällung ist nicht quantitativ). Aus diesem Grund wurde die Cyclodextrinkonzentration als 1,5-molarer Überschuss über den errechneten OG-Gehalt gewählt, um zusätzliches SDS mit abzufangen.

Um Komplexe in den Vesikelbanden nachzuweisen wurden diese zunächst solubilisiert, dann über eine schwach denaturierende PAA-Gelelektrophorese bzw. einen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. In beiden Fällen tauchten sowohl Monomer- als auch Trimer-Banden auf (Abb. 3.8 u. Abb. 3.9). Zusätzlich gab es einen großen Anteil, der bei der Gelelektrophorese in den Auftragstaschen hängen blieb oder im Gradienten eine eigene dicke Bande bzw. ein Pellet bildete. Diese Reste wurden als eine Mischung aus Pigmentaggregaten und nicht vollständig solubilierten Vesikelresten angesehen.

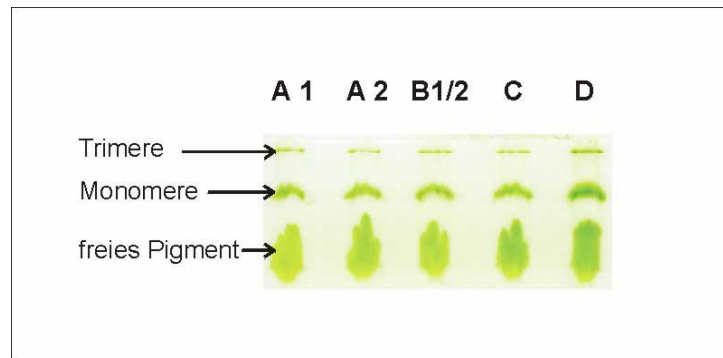


Abb. 3.8 Trimernachweis über ein PAA-Gel

Vesikel aus Abb. 3.7 wurden 1:2 mit Wasser verdünnt, abzenrifugiert und das Pellet mit 0,5 % LM versetzt, sowie mit 13 % Glycerin beschwert. Die schwach denaturierende Elektrophorese fand mit LDS-Laufpuffer in einem 15%igen Gel statt.

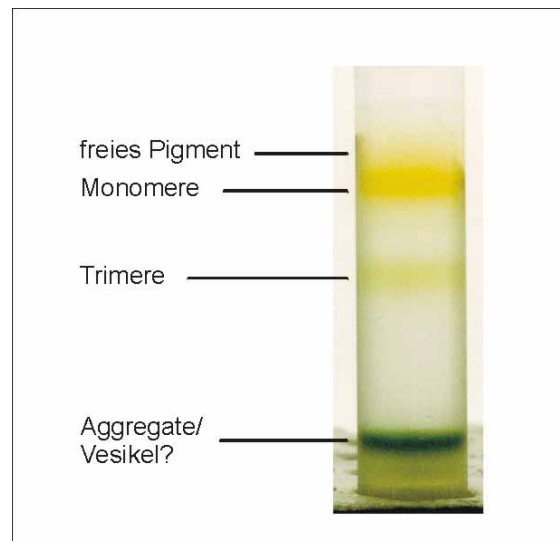


Abb. 3.9 Trimernachweis im Saccharosedichtegradienten

Vesikel aus einem Ansatz nach Kap. 2.2.5 wurden mit 0,1 % LM für 3,5 Stunden auf Eis solubilisiert und auf einen Saccharosedichtegradienten (0,6 M Saccharose, 0,1 % LM; 1 Einfrier-/Auftau-Zyklus) aufgetragen. Der Lauf erfolgte für 16 Stunden bei 4°C und 40.000 rpm (Rotor SW 60 Ti). Die Komplexbanden wurden anschließend über eine schwach denaturierende PAGE als Monomere und Trimere verifiziert (ohne Abb.).

Aus den Versuchen wird ersichtlich, dass mit der in Kap. 2.2.5 beschriebenen Methode tatsächlich die Bildung von Trimeren erreicht werden kann. Eine quantitative Bewertung wurde nicht durchgeführt, es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Ausbeute im Rahmen der zuvor beschriebenen Methoden oder darunter lag.

Ein Kontrollansatz (ohne Abb.), in dem das Cyclodextrin weggelassen wurde, ergab ebenfalls eine pigmentgefärbte Vesikelbande. Zusätzlich war der ganze obere Bereich des Gradienten bis kurz über die Vesikelbande kräftig grün gefärbt. Eine Überprüfung im Gel zeigte, dass

sich das Protein über den grünen Bereich verteilt aufhielt, während in der Vesikelbande keine Komplexe nachzuweisen waren.

3.2.4 Fällung von Trimeren mit Hilfe von Cyclodextrin

Eine Fällung von Trimeren mit Hilfe von Biobeads wurde von Hobe (et al. 1994, 1995) beschrieben. Dabei wird der Lösung in Anwesenheit von KCl Detergens entzogen, eine abschließende Zentrifugation soll die Komplexe pelletieren. Ein auftauchendes Problem dabei ist die saubere Abtrennung der Biobeads, da sich diese beim Zentrifugieren z.T. am Gefäßboden absetzen würden.

Cyclodextrin hat ebenfalls eine der Lösung Detergens entziehende Wirkung. Es kam die Idee auf, diese lösliche Substanz die Kügelchen der Biobeads ersetzen zu lassen. Der Vorteil wäre ein leichte Abtrennbarkeit mit dem Überstand. Zahlreich Vorversuche, die nicht im Einzelnen aufgeführt werden sollen, führten zu folgendem Protokoll: Eine Trimerbande aus dem Sucrosegradienten mit 0,1 % LM wurde mit 300 mM KCl versetzt und 3 Minuten auf Eis inkubiert. Cyclodextrin wurde in 2,5-fachem molarem Überschuss über LM zugegeben, eine weitere Inkubation auf Eis erfolgte für 5 Minuten. Direkt anschließend wurde die Lösung für 20 Minuten bei 4°C bei etwa 12.000 x g zentrifugiert. Das Pellet bestand meist in einem grünen Belag der Wand und wurde zuerst mit 300 mM KCl, dann mit 30 mM KCl gewaschen und aufgewirbelt. Dieses Pellet konnte bei -20°C aufbewahrt werden. Ein Solubilisieren des Pellets zeigte immer einen relativ großen Anteil an Aggregaten, der nicht mehr in Lösung zu bringen war, außerdem das Auftauchen von einem geringen Teil an Monomeren. Um wirklich saubere Trimere aus auf diese Weise gelagerten Komplexen zu erhalten war eine erneute Aufreinigung über einen Sucrosegradienten erforderlich.

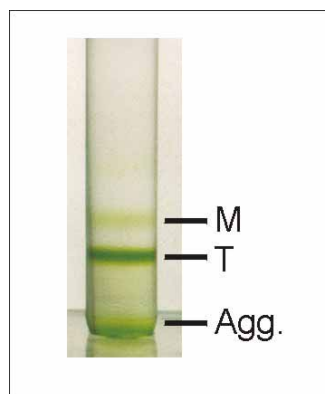


Abb. 3.10 Reinheit von mit Hilfe von Cyclodextrin gefällten Trimeren

Trimere, hergestellt nach 2.2.2 aus D7f.3, wurden wie in Kap. 2.2.7 beschrieben gefällt. Das Trimer-Pellet wurde direkt nach der Fällung einige Minuten mit 0,1 % LM solubilisiert und auf einen Sucrosegradienten aufgetragen. M: Monomere, T: Trimere, Agg.: Aggregate

3.3 Zugänglichkeitsuntersuchungen an Monomeren und Trimeren

3.3.1 Vorversuche und Kontrollen

3.3.1.1 Vergleich der Bandenbildung in Gradienten ohne und mit TCP

Bei der Auftrennung eines Trimerisierungsansatzes über einen Saccharosedichtegradienten mit 0,1 % LM und 5 mM Tricin zeigten sich bei den verwendeten LHC-Mutanten Unterschiede. In zwei Fällen (V229Ch und S106Ch) war die Trimerbande über einen weiten Bereich verschmiert oder weit nach unten verschoben. Durch den Zusatz von einem Reduktionsmittel wie DTT oder TCP zum Sucrosegradienten konnte dieses Phänomen verhindert werden und ein typisches Bandenmuster für Monomere und Trimere trat auf (Abb. 3.11). Eine Kontrolle einzelner Trimerbandenfraktionen aus den Gradienten ohne Reduktionsmittel über ein schwach denaturierendes Gel zeigte zusätzliche Banden (ohne Abb.). Sie werden Komplexen oder Proteinen zugeschrieben, die über ihre Cysteine eine Disulfidbrücke mit anderen Komplexen oder freiem Protein eingegangen sind. Die Tatsache, dass diese zusätzliche Bandenbildung mit Hilfe eines Reduktionsmittels beseitigt werden konnte, weist auf das Vorhandensein von Disulfidbrücken hin. Ein effektives Verhindern der unerwünschten Banden im Saccharosedichtegradienten konnte nur durch im gesamten Gradienten verteiltes TCP hervorgerufen werden. Ein punktueller Zusatz von 2 mM TCP zum Eluat der Nickel-Chelat-Säule vor Auftrag auf einen Gradienten ohne Reduktionsmittel reichte dazu nicht aus.

Die anderen zur Trimerisierung verwendeten LHC-Mutanten zeigten keine veränderte Banden-Bildung mit und ohne Reduktionsmittel im Sucrosegradienten. Bei S3Ch waren als Besonderheit zwei sehr dünne grüne Banden unterhalb der Trimerbande zu entdecken, die auch nicht bei Zusatz eines Reduktionsmittels wie DTT oder TCP zum Sucrosegradienten verschwanden. Ihre Natur wurde nicht weiter aufgeklärt, da es sich nur um einen geringen Anteil der Komplexe handelte und die eigentliche Trimerbande sauber war. Mit S52Ch ließen sich erst gar keine Trimere produzieren, S160Ch dagegen zeigte eine saubere und klar abgesetzte Trimer-Bande.

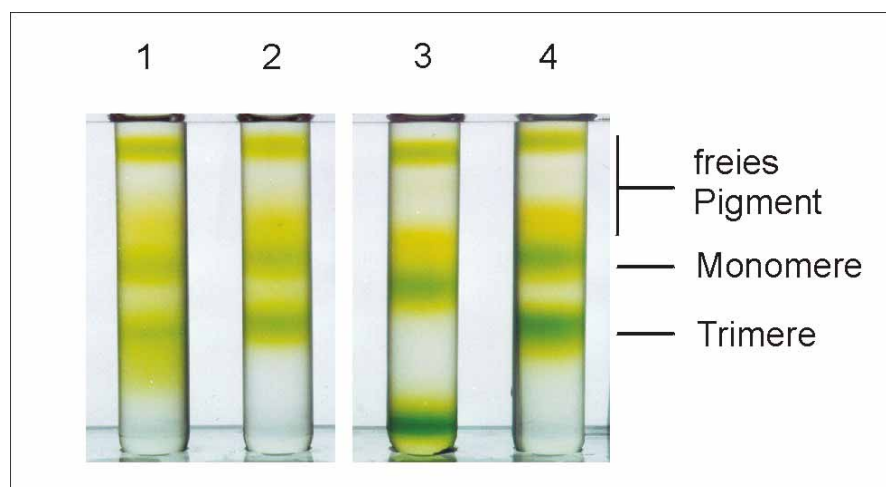


Abb. 3.11 Bandenbildung ohne und mit Reduktionsmittel:

Die LHC-Mutanten V229Ch (1 und 2) und S106Ch (3 und 4) wurden nach 2.2.4 rekonstituiert und trimerisiert. Jeweils die Hälfte eines Ansatzes wurde auf einen Sucrosegradienten ohne TCP (1 und 3) und einen Gradienten mit 0,4 mM TCP (2 und 4) aufgetragen.

3.3.1.2 Reaktion von RM mit TCP

Laut Hersteller ist bei Reaktionen mit SH-reaktiven Substanzen ein Abtrennen des Reduktionsmittels TCP vor Farbstoffzugabe in den meisten Fällen nicht nötig. Der mögliche Schluss daraus, dass die reaktive Gruppe der Sulphydryl-reaktiven Farbstoffe mit dem Phosphin überhaupt nicht reagieren kann, lässt sich leider nicht ziehen. Die Reaktion eines verwandten Phosphins, Tris-(2-carboxyethyl)-Phosphin, mit Maleimid- und α -Haloacyl-Gruppen wurde von Shafer et al. (2000) beschrieben. Ein Abschätzen des Ausmaßes der Reaktion von RM und TCP als Konkurrenz zur eigentlichen Markierung des Proteins mit RM wurde demnach als notwendig erachtet, um eine Beobachtung des Markierungsansatzes über die Zeit interpretieren zu können.

Wie in Abb. 3.12 zu sehen wurde die Reaktionsfähigkeit von RM mit Protein mit andauernder Exposition zu TCP tatsächlich herabgesetzt. Der dort gewählte molare Überschuss an TCP über RM war 66-fach. Der Farbstoff reagierte unter den gewählten Bedingungen nicht sofort ab, wie es mit DTT zu erwarten gewesen wäre, sondern über einen Zeitraum von zwei Stunden. Dies ist konform mit der Beobachtung, dass in frühen Markierungsversuchen mit Monomeren und Trimeren ein allgemeines Abflachen der Markierungskinetiken zu längerer Markierungsdauer etwa in diesem Zeitrahmen stattfand. Anzumerken ist, dass dort z.T. noch wesentlich größere TCP-Überschüsse vorlagen.

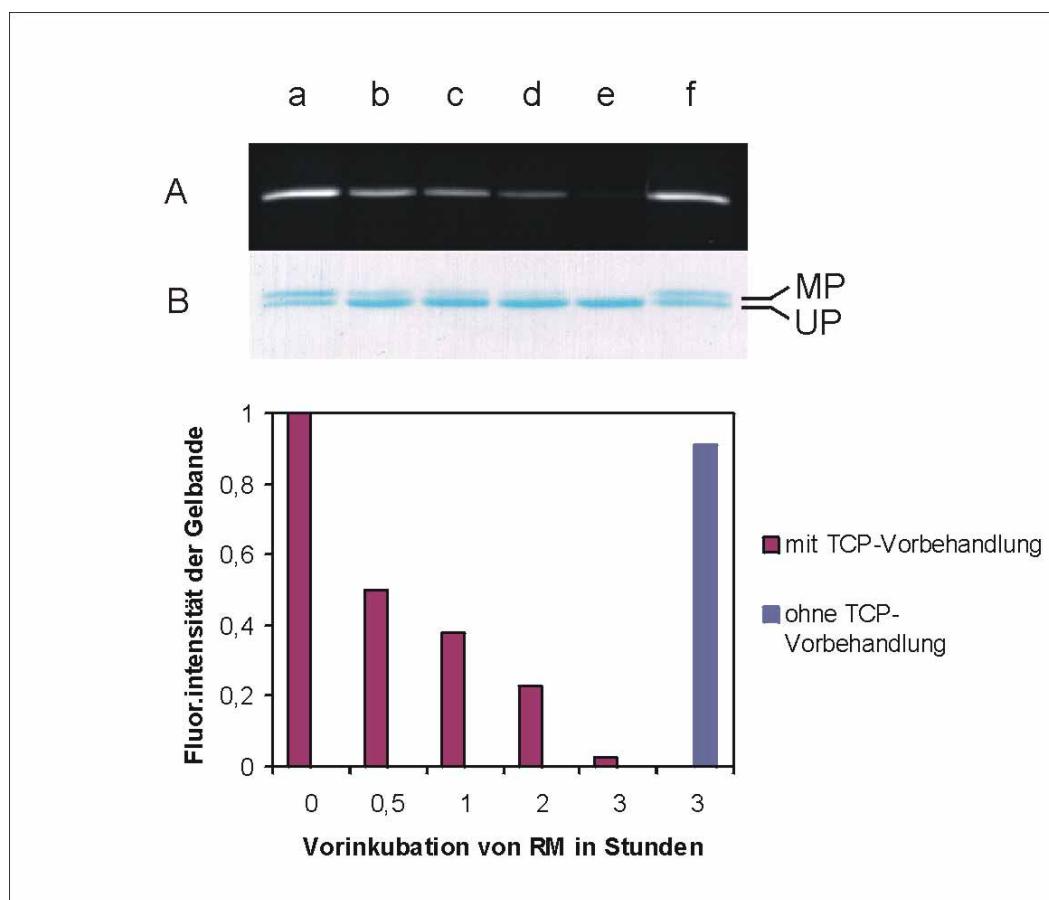


Abb. 3.12 Reaktivität von TCP mit RM

RM (0,033 mM) wurde in Gradientenumgebung (0,6 M Sucrose, 0,1 % LM, 5 mM Tricin pH 7,8) mit TCP (2 mM) verschiedene Zeiten (**a**: 0 h, **b**: 0,5 h, **c**: 1 h, **d**: 2 h, **e**: 3 h) bei 10°C vorinkubiert. Parallel dazu wurde Protein (S106Ch; 0,45 mg/ml) mit einem 111-fachen Überschuss an TCP (2,2 mM) für eine Stunde reduziert (halbkonzentrierte Gradientenlösung mit 0,45 % SDS). Anschließend wurde je 1 µl Proteinlösung zu je 14 µl RM-Lösung gegeben und zusammen für 1 ¼ Stunden inkubiert, dann die Reaktion mit 0,5 µl 1 M DTT abgestoppt. Der molare Farbstoffüberschuss über Protein war 26-fach. Im Kontrollansatz (**f**) wurde der Farbstoff RM wie in e vor Proteinzugabe 3 Stunden vorinkubiert, jedoch ohne TCP. Alle Schritte liefen bei 10°C ab. Die Proben wurden über eine denaturierende SDS-PAGE aufgetrennt und nach 2.4.5 ausgewertet. A: Fluoreszenz nach UV-Anregung, B: Coomassie-gefärbtes Gel; MP: markiertes Protein, UP: unmarkiertes Protein

Ganz auf ein Reduktionsmittel konnte für die Zugänglichkeitsuntersuchungen an Monomeren und Trimeren nicht verzichtet werden. Es wurde zum Einen gebraucht, um saubere Gradientenbanden zu erhalten (s. Kap. 3.3.1.1). Hinzu kam ein weiterer Reduktionsschritt direkt vor der Farbstoffzugabe, um sicherzugehen, dass alle Sulfhydrylgruppen reduziert und damit angreifbar zur Markierung vorlagen. Diese beiden Anwendungen konnten aufgrund der leichten Reaktion von Cysteinresten zu Disulfidbrücken nicht aus dem Versuchsablauf gestrichen werden.

Als Reaktion auf das Ergebnis aus Abb. 3.12 wurde die TCP-Konzentration im Markierungsprotokoll insgesamt reduziert. Zur Vermeidung unscharfer Trimerbanden von V229Ch und S106Ch im Sucrosegradienten konnte die TCP-Konzentration bis auf 0,1 mM reduziert

werden. Für einen Großteil der Komplex-Markierungen wurde darauf geachtet, dass der molare Überschuss an TCP das 200- bis 300-fache des Proteins nicht mehr überstieg. Außerdem wurden nur noch Markierungswerte der ersten zwei Stunden zur Auswertung herangezogen, in einigen Markierungsreihen wurde eine zusätzliche RM-Zugabe nach 1-2 Stunden Markierung durchgeführt.

3.3.1.3 Stabilität der Komplexe unter Markierungsbedingungen

Ein Anliegen war, die Komplexe mit den Bedingungen der Markierung möglichst wenig zu stressen, so dass keine Verfälschung durch sich entfaltende und damit zugänglicher werdende Proteine eintrat. Um dies zu überprüfen wurden Komplexe eine vergleichsweise lange Zeit den Markierungsbedingungen ausgesetzt und anschließend über Auftrennung über einen weiteren Sucrosegradienten auf ihre Intaktheit geprüft. In Abb. 3.13 ist das Ergebnis für S3Ch und C3.2h zu sehen. In beiden Fällen sind saubere Monomer- und Trimerbanden zu erkennen. Ein sehr geringer Anteil an freiem Pigment bei Monomer- und Trimeransatz und eine sehr schwache Bande an Monomeren im Trimeransatz zeigen, dass nur sehr wenige Komplexe im Laufe des Versuches zerfallen sind. Ihr Anteil im Falle des S3Ch entspricht bei weitem nicht dem Anteil an Protein, der mit RM markiert worden ist.

Eine Überprüfung für S106Ch, S160Ch und V229Ch ergab ein ähnliches Bild (ohne Abb.). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die folgenden Versuche vorausgesetzt, dass der Markierungsablauf unter den gewählten Bedingungen nicht zu einem nennenswerten Zerfall intakter Komplexe führt.

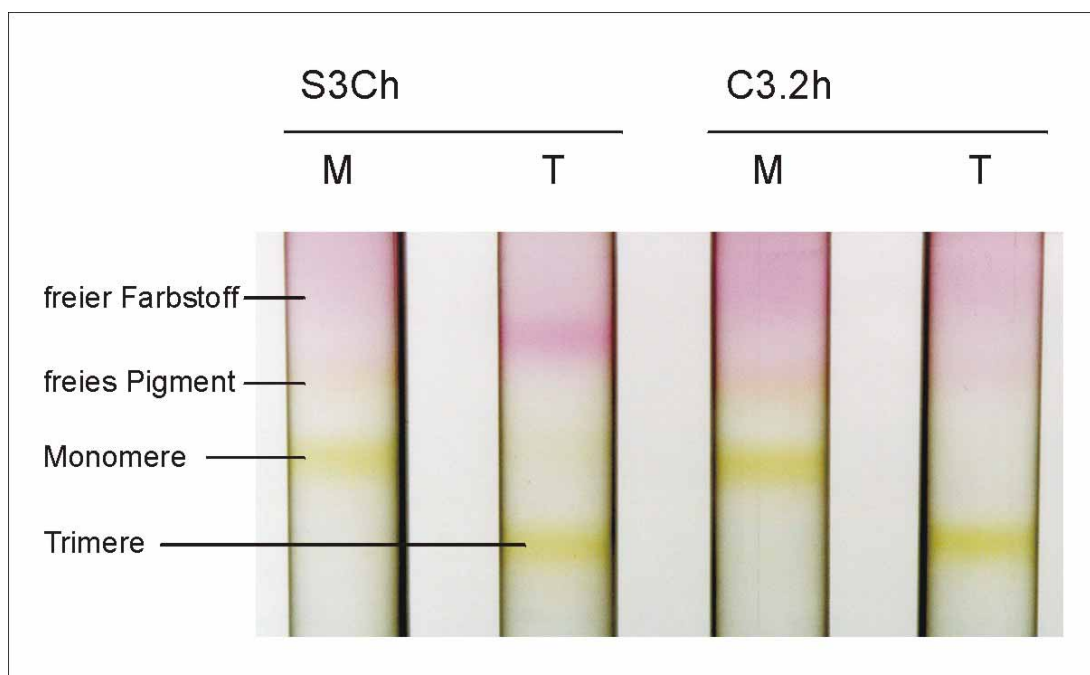


Abb. 3.13 Stabilität der Komplexe während einer Markierung

Protein von C3.2h und S3Ch wurde nach 2.2.4 trimerisiert und über einen Saccharosedichtegradienten ohne TCP in Monomere und Trimere aufgetrennt. Die Komplexe wurden auf eine Konzentration von $1,1 \mu\text{M}$ eingestellt, mit 2 mM TCP 15 Minuten reduziert, dann mit 36,6-fachem RM-Überschuss über Protein markiert, alles bei 10°C . Ein großes Aliquot der Markierungsansätze wurde nach 6 Stunden Markierung abgestoppt, etwa 1:1 mit $0,1 \%$ (w/v) LM verdünnt und über einen zweiten Sucrosegradienten erneut aufgetrennt. M: Monomermarkierung, T: Trimermarkierung.

3.3.1.4 Zugänglichkeit des Cysteins im Wildtyp

Für die Zugänglichkeitsuntersuchungen einzelner Domänen in Monomeren und Trimeren wurden Bereiche ausgewählt, die mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit nach außen exponiert vorliegen. Keines der neu eingefügten Cysteine befindet sich im Transmembranbereich des Komplexes, im Gegensatz zu dem im murenen LHCII vorhandenen Cystein. Dieses liegt mitten in der ersten Transmembranhelix und sollte für große, wasserlösliche Moleküle kaum erreichbar sein. Um diese Aussage zu verifizieren, wurde in Abb. 3.14 eine Markierungsreihe von C3.2h im Vergleich mit S3Ch durchgeführt. Tatsächlich stellte sich nur ein minimaler Markierungserfolg für C3.2h ein. Die Größenordnung lag in der eines erwarteten Hintergrundes.

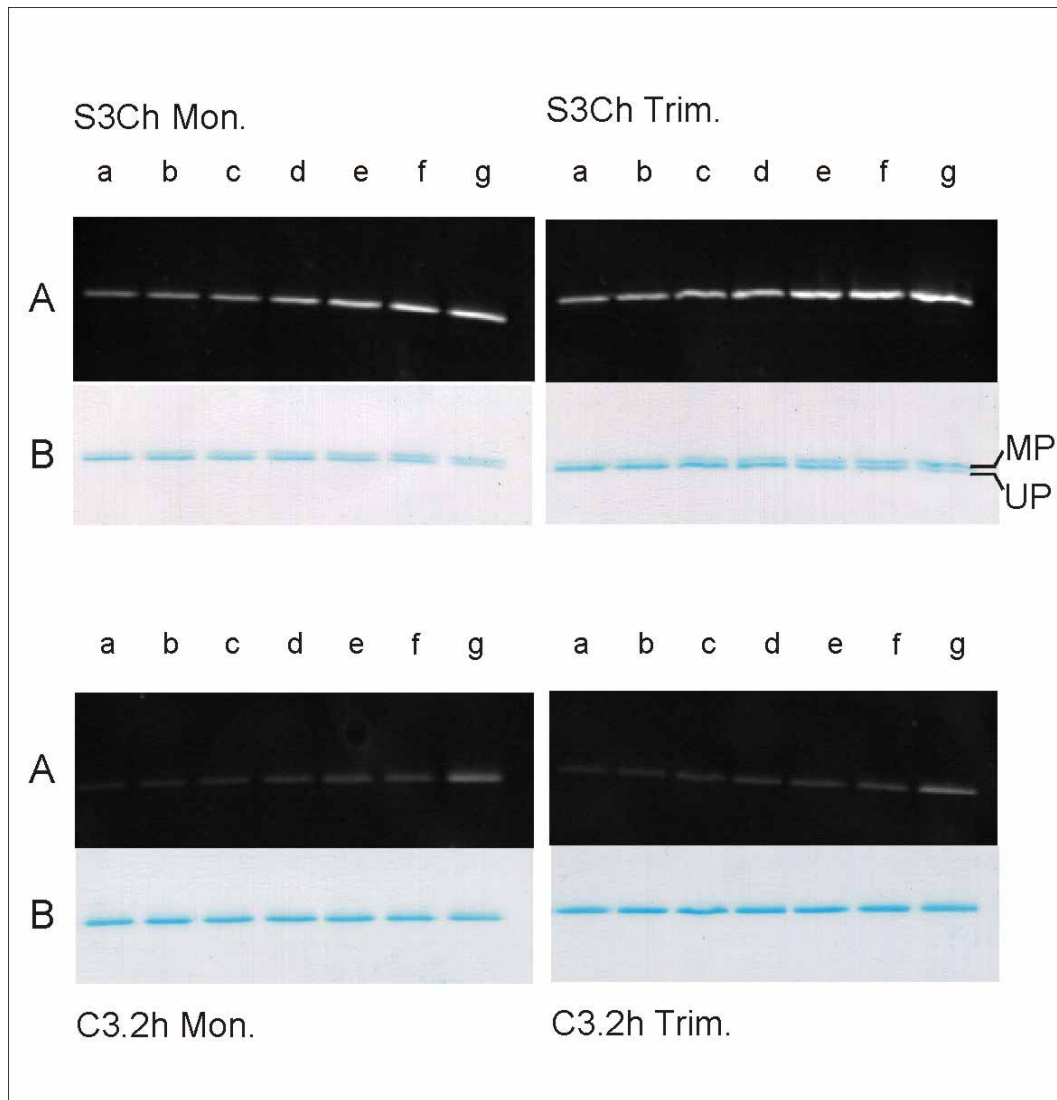


Abb. 3.14 Markierbarkeit der SH-Gruppe in Komplexen aus C3.2h im Vergleich zu S3Ch

Markierungsansätze aus Abb. 3.13 wurden nach **a**: ¼, **b**: ½, **c**: 1, **d**: 2, **e**: 4 und **f**: 6 Stunden mit Hilfe von DTT abgestoppt. Ein Aliquot wurde zusätzlich nach 6 Stunden Markierung bei 10°C für 2 weitere Stunden bei 37°C inkubiert (**g**). Auswertung erfolgte über eine SDS-PAGE.

A: Fluoreszenz nach UV-Anregung; Integrationszeit 2 s; B: Coomassie-gefärbte Proteinbanden;

MP: markiertes Protein; UP: unmarkiertes Protein

3.3.2 Zugänglichkeitsuntersuchungen

Die Zugänglichkeit der Cysteine in intakten LHCII-Komplexen wurde über ihre Fähigkeit, mit dem Fluoreszenzfarbstoff RM zu reagieren, untersucht. Die Auswertung basierte darauf, nach Denaturieren der Komplexe die markierten Proteine von freiem Farbstoff und Pigmenten abzutrennen, anschließend den gebundenen Farbstoff über seine Fluoreszenz zu detektieren.

3.3.2.1 Ablauf

Das Prinzip des Versuchsablaufes umfasst folgende Schritte:

- Produktion von Monomeren und Trimeren
- Aufreinigung über einen Sucrosegradienten
- Einstellung der Gradientenbanden auf gleichen Saccharosegehalt
- Einstellen auf gleiche Absorption bei 670 nm
- Reduktion mit TCP
- Markierung mit RM
- Abnahme und Abstoppen mehrerer Aliquots nach verschiedenen Zeiten
- Denaturierung der Proben und Auftrennen über eine SDS-PAGE
- Messung der Fluoreszenz des markierten Proteins nach UV-Anregung
- Einrechnen eines Fluoreszenzstandards; Kontrolle der Komplexkonzentration über die Bestimmung des Luteingehaltes der Ausgangsproben

In Abb. 3.15 ist die Bandenverteilung aller verwendeten LHCII-Mutanten im Sucrosegradienten nach Rekonstitution und Trimerisierung gezeigt. Mitgeführt in den Markierungsversuchen wurde eine Mutante, S52Ch, die keine Trimere bildete.

Es wurden nur Versuchsansätze mit allen fünf Proteinen parallel durchgeführt, um einen Vergleich zwischen Markierungsreihen mit möglichst ähnlichen Bedingungen zu erreichen.

Nach der Markierung der Komplexe (s. 2.4.4) lagen diese in einem Gemisch von markiertem und unmarkiertem Komplex, sowie freiem Farbstoff vor. Um eine Aussage über den Markierungserfolg mit Hilfe der fluoreszierenden Eigenschaften von RM zu treffen, musste zunächst eine räumliche Trennung von gebundenem und ungebundenem Farbstoff erfolgen. Eine eindeutige Auswertung war möglich, da der freie, nicht mit dem Protein verbundene Farbstoff über eine Gelelektrophorese abgetrennt werden konnte.

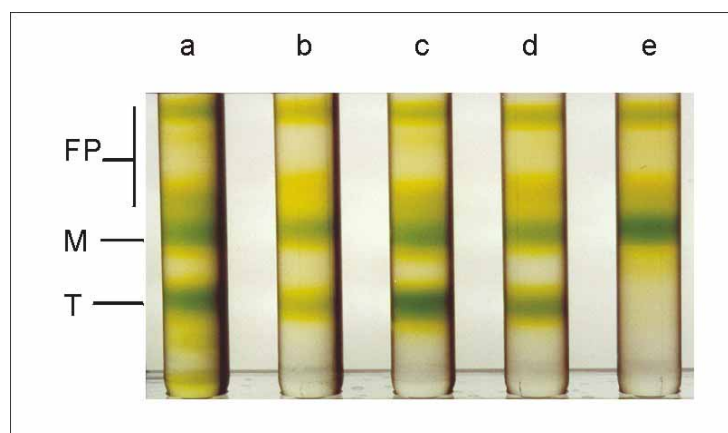


Abb. 3.15 Bandenbildung im Sucrosegradienten

Sucrosegradienten mit Monomeren und Trimeren von S3Ch (a), V229Ch (b), S160Ch (c), S106Ch (d) und S52Ch (e); Rekonstitution und Trimerisierung erfolgten nach 2.2.4 FP: freies Pigment, M: Monomere, T: Trimere

Nach Auftrennung der Proben über eine SDS-PAGE wurden die Proteinbanden mit UV-Licht angeregt und die Fluoreszenz im sichtbaren Licht fotografiert (2.4.5). Ein quantitativer Vergleich zwischen den einzelnen fluoreszierenden Proteinbanden war mittels Integration der Helligkeitswerte in diesen Banden möglich. Ein Beispiel für eine Markierungsreihe ist in Abb. 3.16 dargestellt. Alle Proben einer Versuchsreihe einer LHCII-Mutante wurden zusammen auf ein Gel aufgetragen. Dies vereinfachte den Vergleich der zusammengehörigen Proben. Im oberen Teil der Abbildung wird die Fluoreszenz des Farbstoffes sichtbar. Ihre Intensität diente dazu, für jedes Gel ein Diagramm anzufertigen, das den Verlauf der Markierungszunahme über die Zeit darstellte.

Die im unteren Teil der Abbildung sichtbaren Proteinbanden eines Gels waren eine gute Kontrolle, die Auswertung zu überwachen. Aus ihnen konnte z.B. abgeschätzt werden, ob Abweichungen mit zuviel oder zu wenig Proteingehalt in einer Datenreihe vorkamen. Abb. 3.16 zeigt hierfür ein Beispiel. Die Proteinmenge des 130-Minuten-Wertes ist eindeutig zu gering, so dass dieser Datenpunkt in die abschließende Bewertung nicht einbezogen wurde. Bei ausreichender Proteinmenge war außerdem bei vier der fünf LHCII-Mutanten das Auftauchen einer zweiten Proteinbande, bestehend aus LHCP+RM, zu beobachten (vgl. 3.4.1). Eine quantitative Auswertung der Markierungsausbeute über das Verhältnis der Coomassie-gefärbten Banden von markiertem und unmarkiertem Protein zeigte sich als nicht genau genug. Somit wurde das Bandenmuster nur als makroskopische Kontrolle zusätzlich zur Fluoreszenz genutzt.

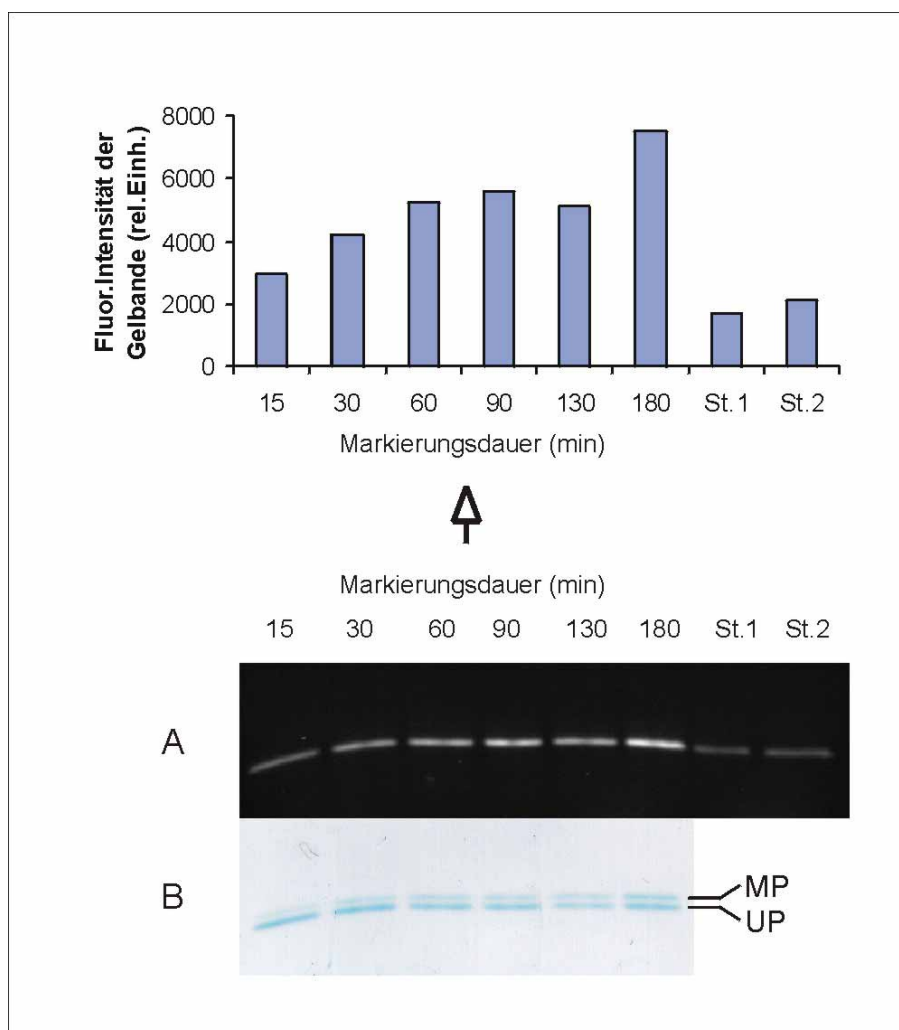


Abb. 3.16 Markierungsreihe von S106Ch-Monomeren

Eine Trimerisierung von S106Ch nach 2.2.4 wurde in Monomere und Trimere aufgetrennt, die Monomere wurden nach 2.4.4 mit RM markiert. A: Fluoreszenz nach UV-Anregung; B: Coomassie-gefärbtes Proteingel; MP: markiertes LHCP, UP: unmarkiertes LHCP, St.1 und 2: Fluoreszenzstandard nach 2.4.4

Die aus den Fluoreszenzbanden gewonnenen Datenpunkte wurden zwei Korrekturen unterzogen (2.4.4). Im Fluoreszenzbild aus Abb. 3.16 sind zusätzlich die beiden Banden des Fluoreszenzstandards zu sehen. Sie bestanden aus RM-markiertem Protein, das auf jedem PAA-Gel mitgeführt wurde, um systematische Unterschiede zwischen einzelnen Gelen feststellen und herausrechnen zu können. Damit sind Unterschiede gemeint, die nicht aus Streuungen der einzelnen Werte herrühren, sondern aus Schwankungen der Fluoreszenzintensität im ganzen PAA-Gel, begründet vor allem durch sehr unterschiedliche Hintergründe in verschiedenen Gelen. Die Menge des Standards ist gering gewählt, so dass hier auf Proteinebene keine Banden zu erkennen waren.

Der zweite Korrekturfaktor bezog sich auf den Proteingehalt der Markierungsansätze, der nachträglich bestimmt wurde. Er diente dazu, Proteinschwankungen, die bei der Einstellung auf gleiche Absorption bei 670 nm auftreten konnten, auszugleichen.

3.3.2.2 Zeitabhängigkeit der Markierungseffizienz

Aus den Einzelwerten einer Messreihe mit verschiedenen Markierungszeiten ließ sich ein Zeitverlauf abbilden. Die Grafik ergab jeweils eine Kurve, die eine Zunahme der Markierungsausbeute über die Zeit zeigte. In Abb. 3.17 sind beispielhaft 2 Sätze von Markierungsreihen mit allen 5 verwendeten Proteinen dargestellt. Die Markierungszeiten in Abb. 3.17 (A) waren etwas länger (15, 30, 60, 90, 135, 180 Minuten), die Markierungsreihen der Abb. 3.17 (B) waren auf einen kürzeren Zeitraum konzentriert (7,5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 Minuten). Das Versuchssystem erlaubte unter praktikablen Gesichtspunkten nur eine vergleichsweise geringe Anzahl von Datenpunkten pro Markierungsreihe aufzunehmen. Aus diesem Grund war die Datendichte nicht so hoch, um eine Streuung der Datenpunkte herausmitteln zu können. Im Anhang (7.4) wird ein Überblick über alle fünf letztlich für diese Arbeit verwendeten Markierungschargen gegeben.

Die Kurven für jeweils eine Komplexform eines Proteins zeigten auch zwischen verschiedenen Markierungsreihen eine zu große Streuung, als dass sich aus einigen wenigen Messreihen ein durchschnittlicher Kurvenverlauf zuverlässig mitteln ließe. Dennoch soll versucht werden, eindeutige Tendenzen in nachvollziehbarer Form darzustellen. Um diese in fassbare und übersichtliche Werte zu bringen wurden in Kap. 3.3.2.4 einheitliche Zeitpunkte herausgegriffen und miteinander verglichen.

A

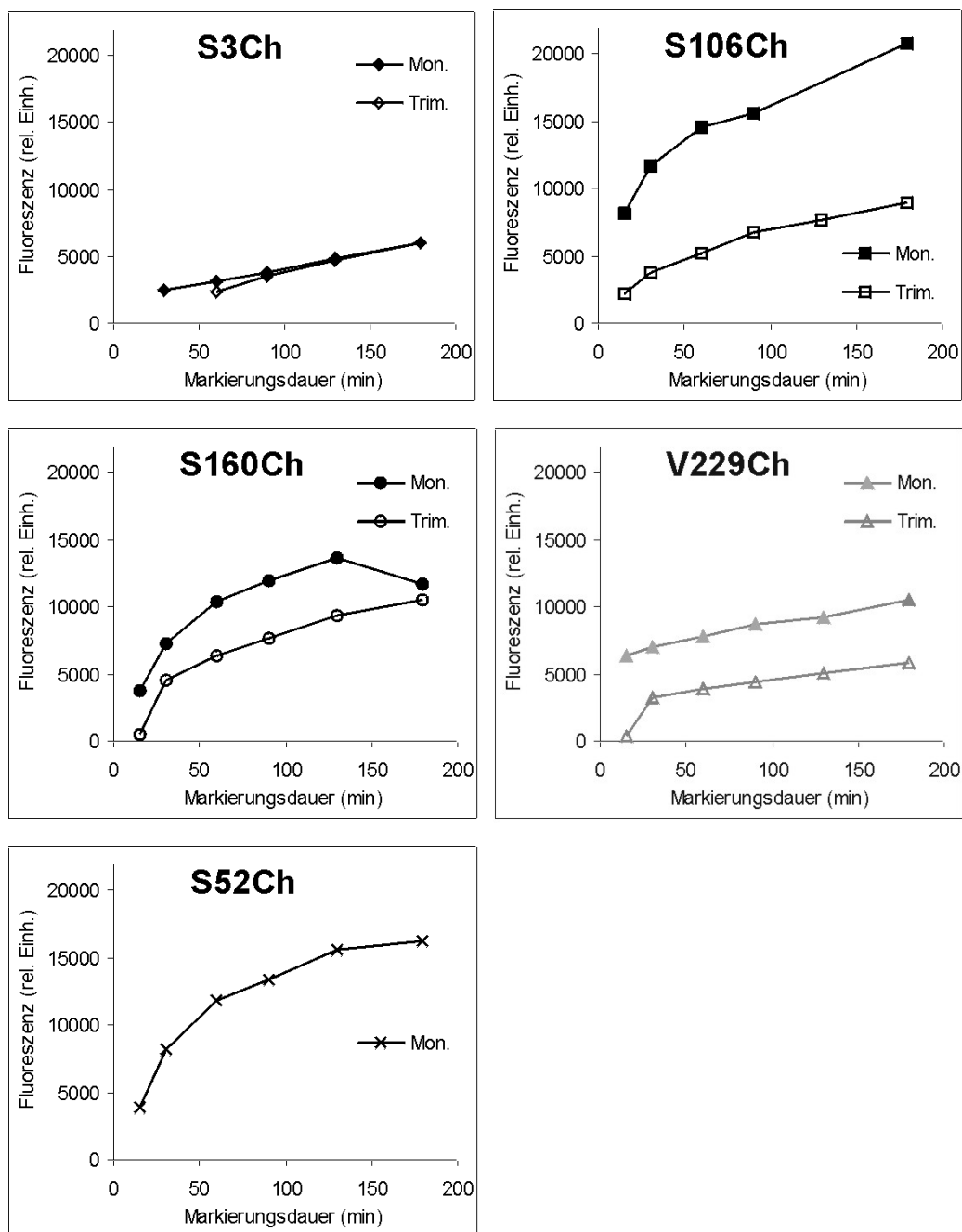


Abb. 3.17 Betrachtung zweier Markierungschargen (s.a. folgende Seite)

Fünf verschiedene LHC-Mutanten wurden nach 2.2.4 trimerisiert und in Monomere und Trimere aufgetrennt. Die Markierung der Komplexe geschah nach 2.4.4 mit (A) einem 250-fachen TCP- und 23-fachem RM-Überschuss, bzw. (B) mit einem 3000-fachen TCP- und 46-fachem RM-Überschuss. Eine Korrektur der Werte wurde nach 2.4.4 mittels Fluoreszenzstandard und Proteinbestimmung durchgeführt. Die Korrekturfaktoren sind in Abb. 3.18 abgebildet.

B

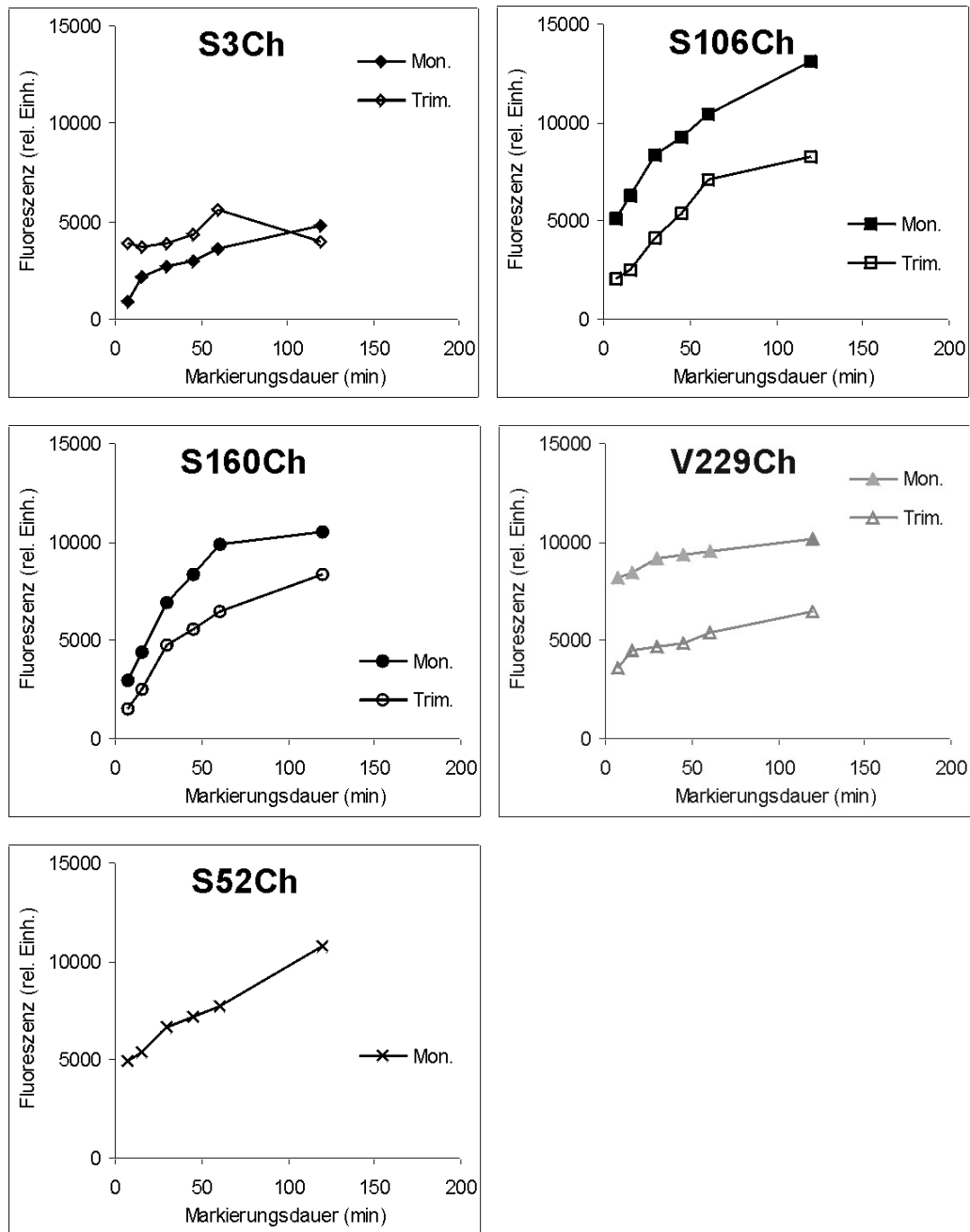


Abb. 3.17 B

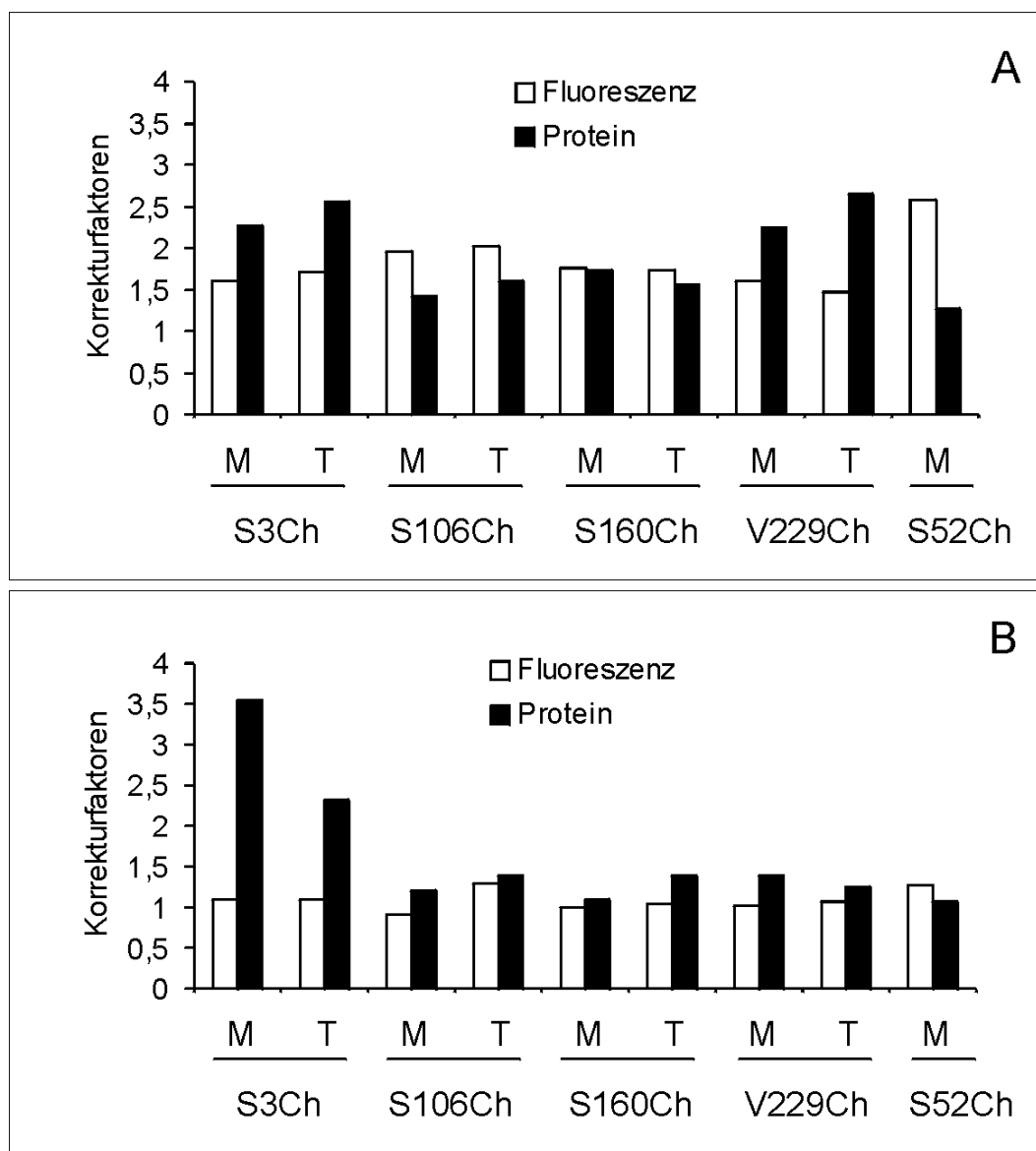


Abb. 3.18 Korrekturfaktoren

Abgebildet sind die Korrekturfaktoren der Markierungsreihen aus Abb. 3.17 A und B, die Ermittlung ist in 2.4.4 beschrieben. Der Faktor „Fluoreszenz“ bezieht sich auf einen in jedem Gel mitgeführten Standard einheitlicher Fluoreszenzstärke. Der Faktor „Protein“ bezieht sich auf den nachträglich für jede Probe über den Luteingehalt ermittelten genauen Proteingehalt. (A) Die Werte für S3Ch und V229Ch weichen in dieser Charge vom restlichen Proteingehalt etwas ab, da in sie von vorneherein eine etwas geringere Komplexkonzentration aufgrund schwächerer Dichtegradientenbanden eingesetzt wurde. (B) Die Werte für S3Ch weichen in dieser Charge vom restlichen Proteingehalt deutlich ab, da in sie von vorneherein eine geringere Komplexkonzentration aufgrund schwächerer Dichtegradientenbanden eingesetzt wurde.

Ein wirklicher Nullwert wurde bei keiner der zur Auswertung verwendeten Kurven aufgenommen. Eine Kontrolle, in der das die Reaktion abstoppende DTT schon vor Farbstoff-Zugabe im Ansatz vorgelegt wurde, ergab keine sichtbare Fluoreszenzbande mehr (ohne Abb.). Aus diesem Grund wurde diese Kontrolle in allen weiteren Versuchen weggelassen.

Der kürzeste Markierungszeitraum, der bei einer Parallelbehandlung der 9 Ansätze mit Komplexen aller 5 Proteine erreicht wurde, lag bei 2 Minuten. Schon in dieser kurzen Markierungszeit zeigten sich im Wesentlichen die Charakteristika, die weiter unten bei der Gegenüberstellung der 15- und 30-Minutenwerte herausgearbeitet werden sollen.

Die Kurvenformen ließen sich im Wesentlichen in 2 Gruppen aufteilen: Ein schneller Anstieg am Anfang auf eine Plateauphase, die im Verlauf der Markierung nur noch gering verändert wurde, war bei S3Ch, V229Ch (s. z.B. Abb. 3.17 B) und z.T. auch bei S52Ch zu sehen. Einen kontinuierlichen Anstieg mit langsamem Übergang in ein Abflachen der Kurve zeigten S106Ch und S160Ch, in seltenen Fällen auch S52Ch. Die meisten Kurven (aller Proteine) zeigten auch in den späten Werten eine leicht ansteigende Drift. Es fand noch immer eine Markierung statt, wenn auch in geringem Umfang. In früheren Vorversuchen wurde eine Verlängerung der Inkubation über Nacht durchgeführt. Eine geringe Zunahme war über den langen Zeitraum in allen Fällen noch da, eine 100-prozentige Markierung konnte allerdings nicht erreicht werden.

Die Kurvenform der Markierungen scheint zunächst einer Sättigung zuzustreben, erreicht sie aber unter den gewählten Bedingungen nicht. Im Durchschnitt kommt es bei allen Komplexen zu einer mehr oder weniger schnellen Reaktion die von einem langsameren Anstieg abgelöst wird. Das mögliche Sättigungsniveau der ersten Reaktion liegt bei verschiedenen LHC-Mutanten auf sehr unterschiedlicher Höhe.

Ein fast linearer Anstieg ist bei einigen Proteinen im Bereich der ersten halben Stunde, in Ausnahmefällen auch bis zu einer Stunde beobachtet worden. In diesem Bereich ließ sich am ehesten eine Aussage über die Markierbarkeit der Komplexe treffen. Längere Zeiträume waren schwierig zu bewerten. Einige Diagramme zeigten ein Abflachen der Kurve bei längerer Markierungsdauer. Es ist wahrscheinlich, dass eine abflachende Kurvenform durch fehlendes reaktives RM erzeugt oder verstärkt wurde. Es ist bekannt, dass einer Markierung der Cysteine eine Konkurrenzreaktion des Farbstoffes mit dem Reduktionsmittel TCP gegenübersteht (3.3.1.2). Zumindest ein Teil dieser Kurvenform wird diesem Effekt zuzuschreiben sein. Auf TCP zu verzichten war nicht möglich, so dass das Abflachen sowohl aufgrund von unreaktivem RM als auch von schlechter oder nicht mehr reagierenden Komplexen nicht getrennt werden konnte.

Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob bei Abflachen der Kurven die Komplexe überhaupt noch reaktionsfähig waren, wurde in einigen Fällen eine zweite Farbstoffzugabe nach ein bis zwei Stunden versucht. Bei vorheriger Verlangsamung der Steigung nur durch unreaktiv werdendes RM wäre ein Ansteigen der Kurve in der Größenordnung der Anfangswerte zu erwarten gewesen. Die Ergebnisse waren nicht eindeutig. Teilweise ließ sich bei S106Ch, S160Ch und S52Ch ein erneutes Ansteigen der Markierungseffizienz beobachten. Dies war aber nicht immer und in gleichem Maße zu wiederholen. Lediglich S3Ch und V229Ch schienen von dem erneuten Farbstoffangebot durchweg unbeeindruckt. In Abb. 3.19 ist als Beispiel eine Markierungsreihe mit Komplexen aus S160Ch herausgegriffen. Eine zusätzliche

Farbstoffzugabe geschah in diesem Fall nach 110 Minuten. Die Wahl fiel auf diesen Zeitbereich, da hier eine Abflachung der Kurve nach erstem Farbstoffzuschuss zu erwarten war. Die erneute RM-Gabe hat einen sichtbaren Effekt bei den Trimeren; bei ihnen ist hier eine Zunahme der Markierung nach zusätzlichem Farbstoffangebot zu erkennen. Die Monomere dagegen haben in diesem Beispiel im Vorfeld eine zu große Schwankung, als dass der Effekt deutlich von der bisherigen Markierungszunahme zu unterscheiden wäre.

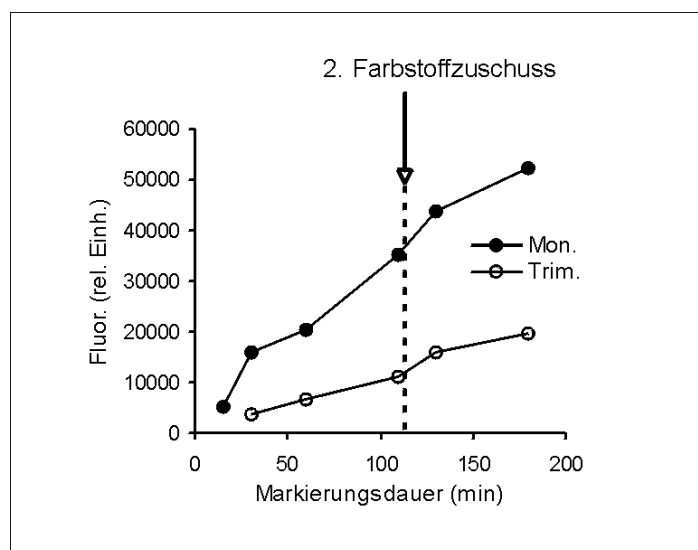


Abb. 3.19 Farbstoffnachschuss während der Markierung

S160Ch wurde nach 2.2.4 trimerisiert und in Monomere und Trimere aufgetrennt. Die Markierung der Komplexe wurde nach 2.4.4 mit einem 250-fachen TCP- und 23-fachem RM-Überschuss durchgeführt. Direkt nach Entnahme des 110-Minuten-Wertes fand eine erneute Farbstoffzugabe mit 23-fachem RM-Überschuss statt. Die Werte wurden mittels Fluoreszenz-Standard und Proteinkonzentration nach 2.4.4 korrigiert.

3.3.2.3 Bedeutung des Fluoreszenzstandards

Abb. 3.20 zeigt Markierungsreihen, die jeweils einen Zeitraum von 180 Minuten umfassen. Die 12 Datenpunkte einer Reihe wurden in zwei Gruppen eingeteilt: die 6 Anfangswerte bis 45 Minuten und die späten Werte ab 45 Minuten. Der 45-Minuten-Wert selbst war zweimal vorhanden. Jeweils 6 zusammengehörige Markierungsproben wurden auf ein PAA-Gel aufgetragen. Das bedeutet, in dieser Abbildung ist das Ergebnis von 18 PAA-Gelelektrophoresen zu sehen, jeweils eine Markierungsreihe eines Komplexes auf zwei Gele verteilt. Nach Korrektur der Reihen mittels Fluoreszenz- und Protein-Standard ergab sich zwischen den 45-Minuten-Werten einer Probe, die auf verschiedene PAA-Gele aufgetragen wurden, immer noch eine Abweichung teilweise von teilweise 20 %, in einem Fall besonders drastisch von 36 % (s. Tab. 3.1). Dies führte in den Diagrammen zu einem Sprung bei 45 Minuten. Die Werte eines Geles ergaben zusammen einen vergleichsweise homogenen Kurvenverlauf, so dass der Sprung offensichtlich zwischen den einzelnen Gelen erfolgte und nicht allein auf die Streuung eines einzelnen Wertes zurückgeführt werden konnte.

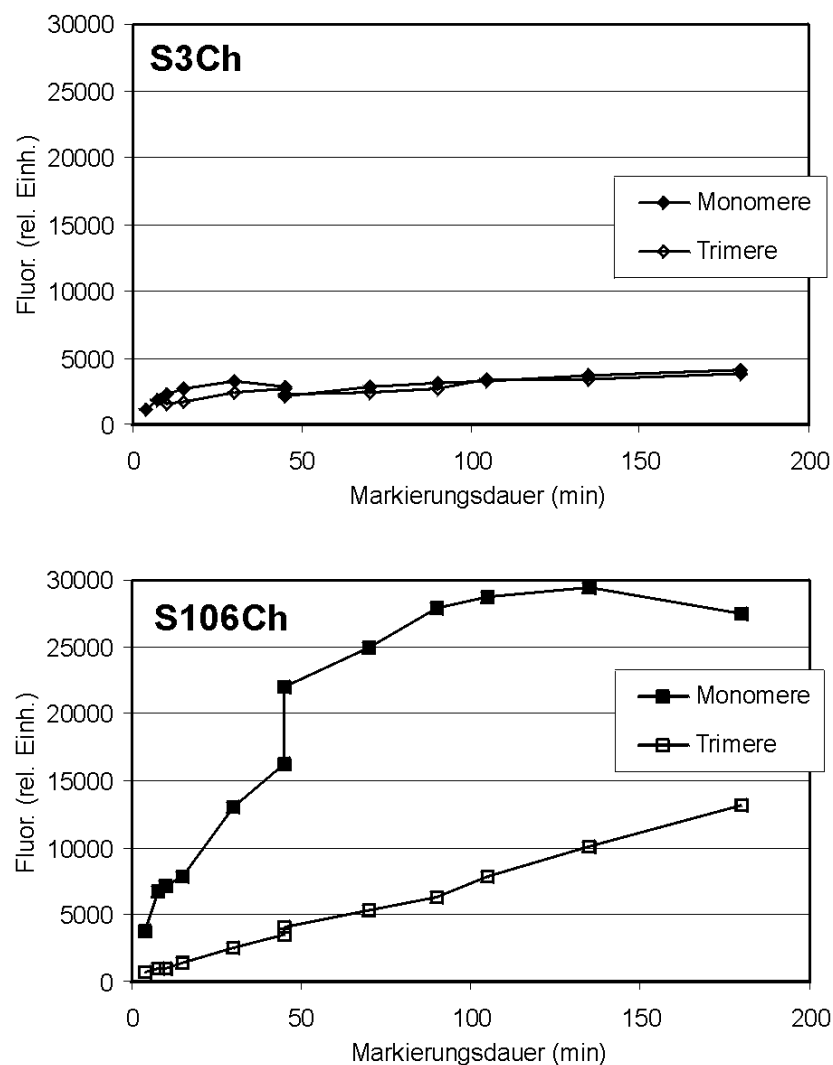
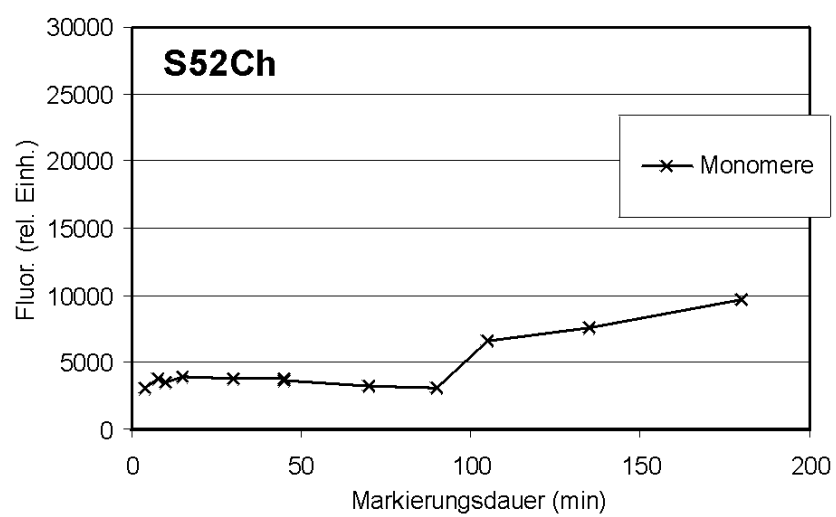
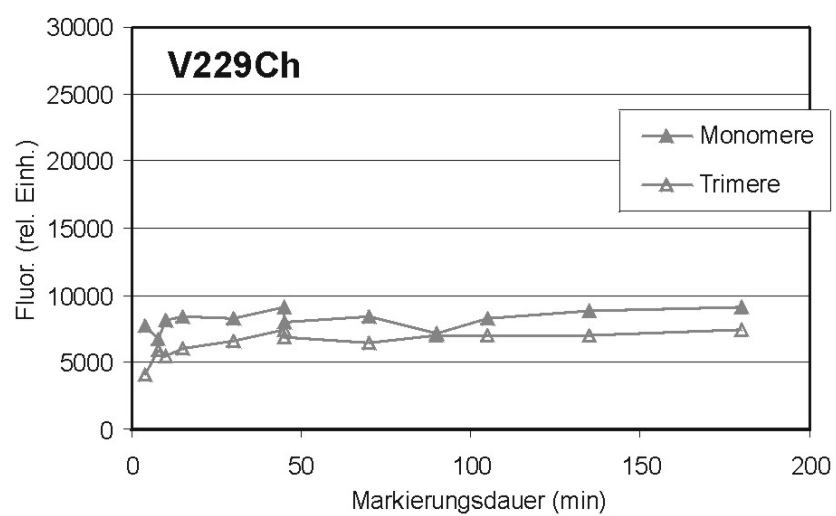
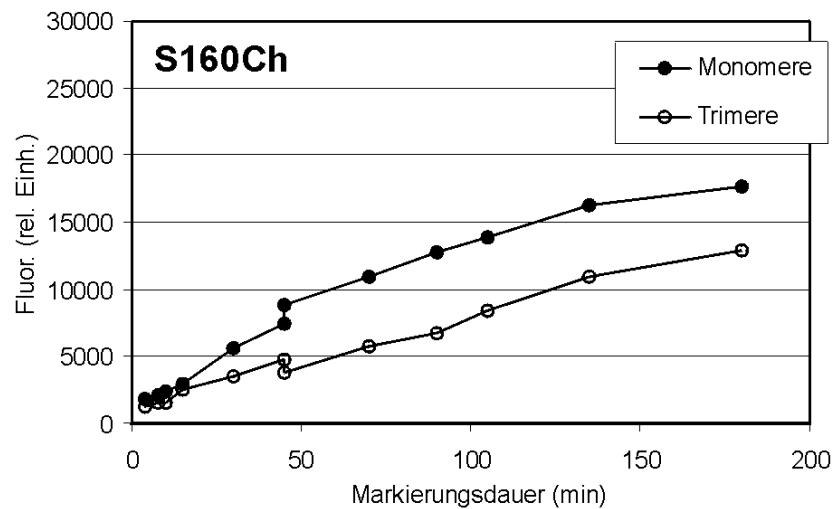


Abb. 3.20 Markierungscharge M74 – Ein Beispiel zur Variation der Werte

A: Alle 5 LHC-Mutanten wurden nach 2.2.4 trimerisiert und in Monomere und Trimere aufgetrennt. Die Markierung der Komplexe wurde nach 2.4.4 mit 250-fachem TCP und 23-fachem RM-Überschuss durchgeführt. Nach Entnahme des 90-Minutenwertes wurde erneut RM in 23-fachem Überschuss zugegeben. Die Auswertung erfolgte für jede Probe indem die frühen und späten Werte über eigene PAA-Gele aufgetrennt und ausgewertet wurden. Ein Aliquot für 45 Minuten Markierung existierte auf beiden Gelen. Die Werte sind nach 2.4.4 mittels Fluoreszenzstandard und Proteinkonzentration korrigiert.



	S3Ch Mon.	S3Ch Trim.	S106Ch Mon.	S106Ch Trim.	S160Ch Mon.	S160Ch Trim.
vor Korrektur	63	76	82	121	120	81
nach Korrektur	75	82	136	116	119	80

	V229Ch Mon.	V229Ch Trim.	S52Ch Mon.	
vor Korrektur	80	98	84	
nach Korrektur	87	92	97	

Tab. 3.1 Variation eines Wertes bei der Auswertung über verschiedene Gele

Die Tabelle bezieht sich auf die Werte bei 45 Minuten Markierungsdauer aus Abb. 3.20. Angegeben ist, wieviel Prozent der Wert der 2. Auftragsgruppe (45-180 Minuten) vom Wert der ersten Auftragsgruppe (4-45 Minuten) ohne und mit Korrektur beider durch den Fluoreszenzstandard erreicht.

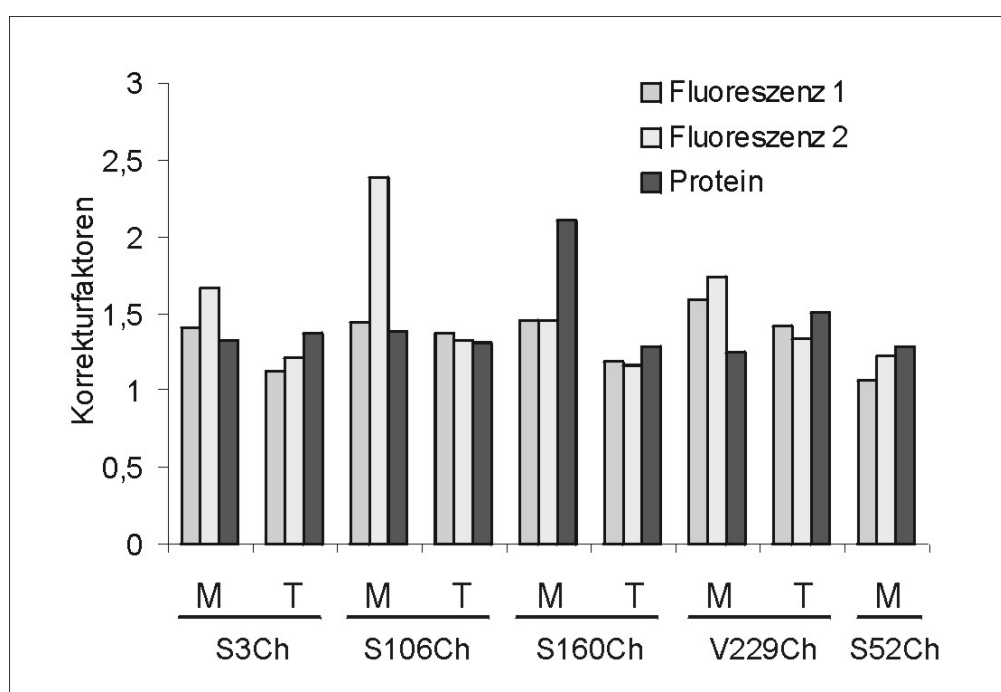


Abb. 3.21 Korrekturfaktoren zu M74

Korrekturfaktoren nach 2.4.4 zu der Markierungscharge M74 in Abb. 3.20. Abgebildet sind die Rechenfaktoren, mit denen die Messwerte multipliziert wurden. Fluoreszenz 1: Fluoreszenzstandard der Gele für 4-45 Minuten, Fluoreszenz 2: Fluoreszenzstandard der Gele für 45-180 Minuten, Protein: Korrekturfaktor nach Proteinbestimmung.

Die Korrektur durch den Fluoreszenzstandard sollte eigentlich dazu dienen, relative Variationen zwischen mehreren PAA-Gele auszugleichen. Die Größenordnung dieser Variation zeigen z.B. die Werte des Fluoreszenzstandards in Abb. 3.21 In Tab. 3.1 dagegen ist die Variation eines einzelnen Messwertes vor und nach Korrektur aufgeführt, stellvertretend für das insgesamte Verhalten zwischen zwei Gelen. In 5 der 9 Beispiele wird eine deutliche Annäherung der Werte durch Korrektur erreicht, in 2 Fällen tritt kaum eine Änderung ein, 2 Werte verschlechtern sich, einer drastisch. Die Kurve der Monomere von S106Ch wurde in

Abb. 3.20 durch die Korrektur im längeren Markierungszeitraum stark überhöht. Dies lässt sich durch den Vergleich mit früheren Markierungen eindeutig sagen.

3.3.2.4 Vergleich der einzelnen Zeitwerte bei 15 und 30 Minuten Markierungsdauer

Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Markierungen wurden einheitliche Zeitpunkte herausgegriffen und gegenübergestellt. In Abb. 3.22 wurden diese Werte von fünf Markierungsreihen gemittelt (die Werte im Einzelnen sind im Anhang noch einmal zusätzlich abgebildet). Zwei dieser Reihen hatten gegenüber den restlichen drei den doppelten RM-Überschuss und den 1000-fachen TCP-Gehalt. Trotz dieser Unterschiede im Ansatz ließen sich die Ergebnisse gut in Einklang bringen. Ausgewählt wurden die Fluoreszenzintensitäten nach 15 und 30 Minuten Markierungsdauer, da sich dieser Zeitraum für die Beobachtung wichtiger Vorgänge eignet. Zu diesen Zeiten waren in allen zur Auswertung herangezogenen Messreihen Datenpunkte vorhanden.

Folgende Tendenzen lassen sich ableiten:

Vergleich zwischen Monomeren und Trimeren:

Bei S106Ch, S160Ch und V229Ch zeigte die Markierung der Monomere eine deutlich größere Ausbeute als diejenige der Trimere. Die Größenordnung lag bei der doppelten bis dreifachen Menge an markiertem Protein (s.a. Abb. 3.23).

Für S3Ch lässt sich in Bezug auf den Vergleich von Monomeren und Trimeren keine genaue Aussage treffen. Die Werte insgesamt lagen etwa in der Größenordnung der Trimere der vorgenannten drei Mutanten. Auffallend dabei ist die schlechte Markierbarkeit des Cysteins schon im Monomer von S3Ch. Im Vergleich zeigte sich teilweise die bessere Markierungsausbeute bei S3Ch-Monomeren, z.T. bei -Trimeren.

S52Ch ließ sich nur in Bezug auf Monomere bewerten, da sich mit dieser Mutante keine Trimere bildeten. Die Komplexe zeigten im Kontext mit den anderen Mutanten eine vergleichbar gute Markierungsausbeute, die sich in der Größenordnung der Monomere von S106Ch, S160Ch und V229Ch einordnen lässt.

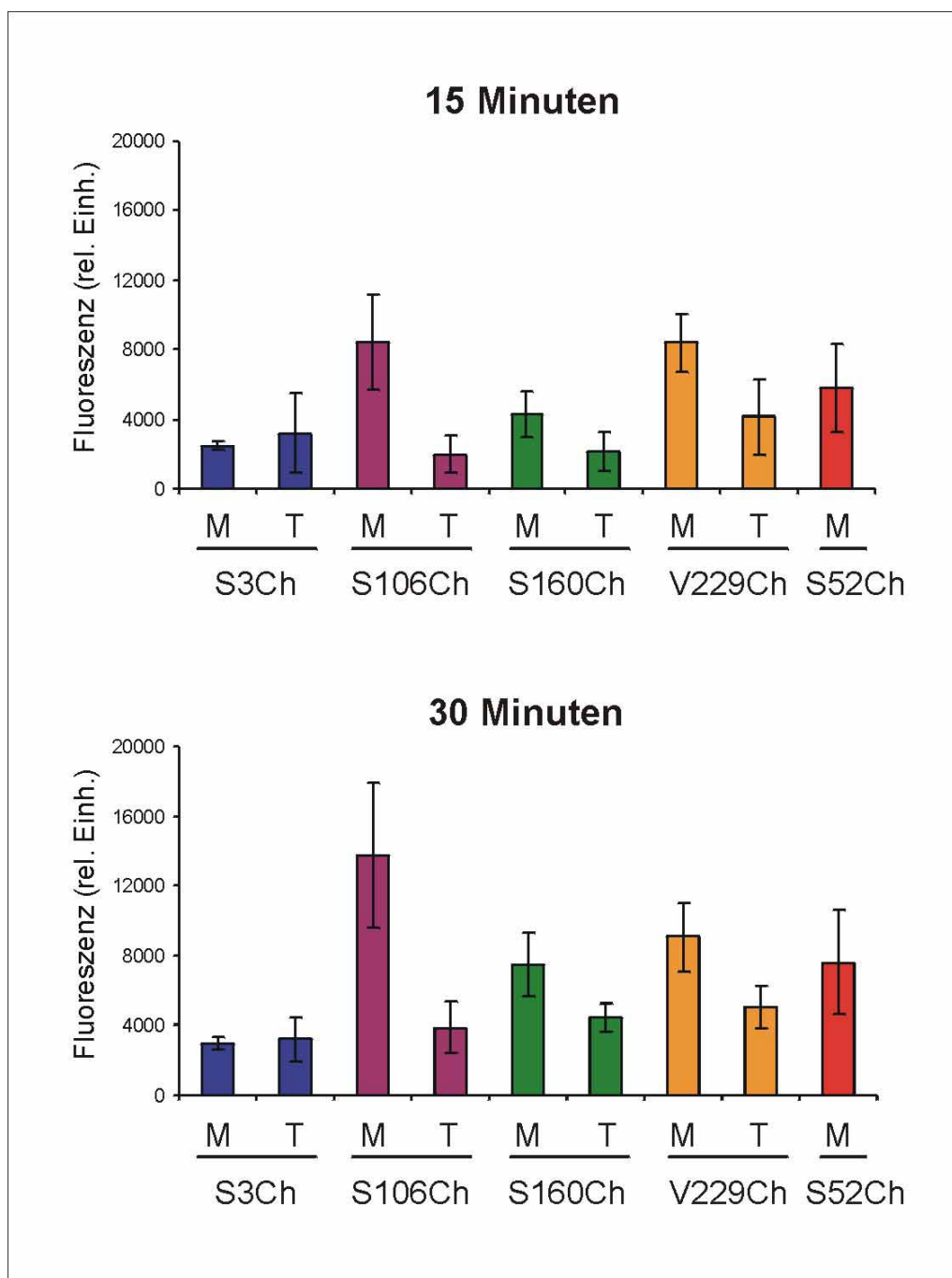


Abb. 3.22 Vergleich einzelner Zeitpunkte mehrerer Markierungsreihen

Die fünf LHC-Mutanten S3Ch, S106Ch, S160Ch, V229Ch und S52Ch wurden nach 2.2.4 rekonstituiert, trimerisiert und in Monomere und Trimere aufgetrennt. Die Markierung der Komplexe geschah nach 2.4.4 mit einem 3000-fachen TCP- und 46-fachem RM-Überschuss bzw. mit einem 250-fachen TCP- und 23-fachem RM-Überschuss. Es wurden jeweils die korrigierten Fluoreszenzwerte bei 15 und 30 Minuten herausgegriffen und gemittelt. M: Monomere; T: Trimere.

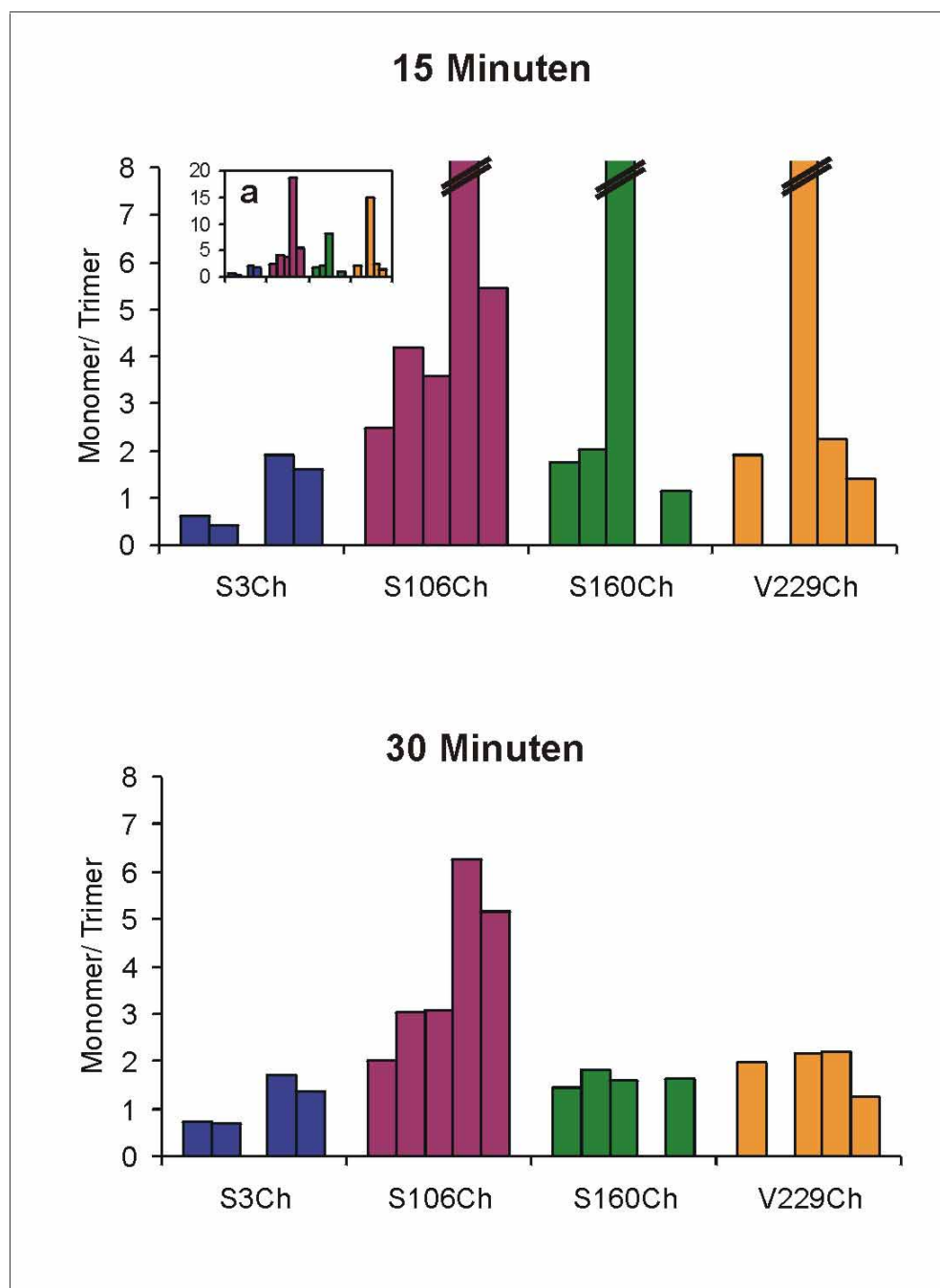


Abb. 3.23 Verhältnis der Markierungsausbeute von Monomeren zu Trimeren

Die Ergebnisse der Markierung von Monomeren und Trimeren aus Abb. 3.22 wurden miteinander in Beziehung gesetzt. Dazu wurde für jede einzelne Markierungscharge die Fluoreszenz aus der Monomermarkierung durch die der Trimermarkierung geteilt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse jeder einzelnen Markierungscharge, da drei Werte bei 15 Minuten stark aus dem Rahmen fallen und einen Mittelwert unnötig überhöhen würden. Ihre Proportionen werden im Einsatz (a) deutlich.

Vergleich der LHCII-Mutanten S106Ch, S160Ch und V229Ch untereinander:

Ein exakter Vergleich zwischen den Monomeren von S106Ch, S160Ch und V229Ch ist aufgrund der Schwankungen zwischen den einzelnen Markierungsreihen schwierig. Betrachtete man lediglich die ganz frühen Werte im Minutenbereich bis zu einer Viertelstunde, so war in den meisten Markierungsreihen eine Abstufung zwischen den drei LHC-Mutanten zu erkennen. Die Monomere von S160Ch waren am schwächsten markiert, diejenigen von S106Ch etwas stärker und V229Ch erzielte in dieser Zeitstufe die größte Markierungsausbeute. Über einen längeren Zeitraum verwischte sich diese Aussage. Die Unterschiede zwischen den Trimeren der erwähnten Proteine sind nicht so stark ausgeprägt und wurden deshalb nicht genauer bewertet.

Deutliche Unterschiede zeigten sich bei Betrachtung der 15- und 30-Minuten-Werte als Zeitverlauf. Die Monomere von V229Ch erreichten sehr schnell einen vergleichsweise hohen Grad an Markierung, veränderten sich dann aber über die Zeit nicht mehr gravierend. Monomere von S106Ch und S160Ch dagegen zeigten mit fortschreitender Inkubationszeit eine weitere Zunahme der Markierung, außerhalb des 30-Minuten-Zeitraumes übertrafen sie V229Ch deutlich.

Abb. 3.24 zeigt das Verhältnis der Steigungen zwischen 0-15 Minuten und 15-30 Minuten Markierungsdauer. Obwohl eine sehr große Standardabweichung für die einzelnen Komplex-typen angezeigt wird, ist ein Vergleich der Dimensionen gut abzuschätzen. Für S160Ch und S106Ch ist die Steigung im Anfangsbereich genauso bis doppelt so hoch wie im späteren Verlauf zwischen 15 und 30 Minuten. Dies gilt sowohl bei Monomeren als auch bei Trimeren. Gravierend dagegen ist der Unterschied zwischen Anfangssteigung und folgender Steigung bei V229Ch. Diese LHC-Mutante zeigte bei Monomeren und Trimeren zwischen 15 und 30 Minuten Markierungsdauer kaum noch einen Anstieg in der Ausbeute. Nicht ganz so ausgeprägt, aber vorhanden, war dieses Verhalten auch bei S3Ch zu beobachten.

Der herausgegriffene Zeitraum von 15 Minuten erfasst nicht die kürzeren Markierungszeiten, die in einigen Messreihen zusätzlich aufgenommen wurden. Die kürzeste Markierungsdauer lag bei 2 Minuten. Schon in diesem Zeitraum zeigte sich bei S3Ch und V229Ch das Erreichen ihrer Plateauphase mit nur noch geringer Veränderung der nachfolgenden Markierungsausbeute.

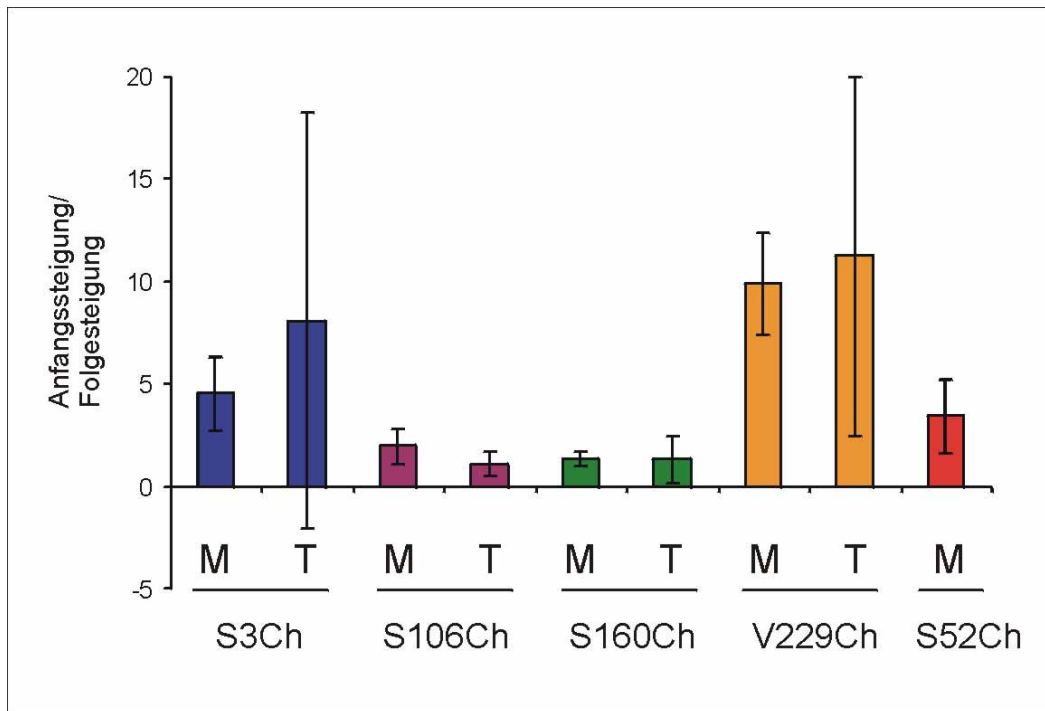


Abb. 3.24 Verhältnis von Anfangssteigung und Folgesteigung

Vergleich der Steigungen zwischen 0 und 15 Minuten und zwischen 15 und 30 Minuten.

Für alle 5 Markierungsreihen der Abb. 3.22 wurden die Steigungswerte zwischen Anfang und 15 Minuten, sowie zwischen 15 und 30 Minuten errechnet und miteinander ins Verhältnis gesetzt.

3.4 Markierung von LHCP

Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse befassen sich alle mit Proteinen, an die im ungefalteten Zustand Farbstoffe gebunden wurden. Eine Aussage über den Komplex erlauben diese Konstrukte erst, wenn sich eine Faltung des Proteins an die Farbstoffbindung anschließt. Die Arbeit mit Fluoreszenzfarbstoffen kann auf unterschiedliche Weise eine Information über ein gefaltetes Protein ergeben. Ein Beispiel ist die Lage zweier Farbstoffe zueinander, über die mittels Resonanztransfer eine Aussage erreicht werden soll (Kap.3.4.3.1), ein weiteres die Zugänglichkeit eines Farbstoffes für Fluoreszenzlöcher (Kap.3.4.5). In einem pigmentierten Komplex wie dem LHCI besteht zudem die Möglichkeit einer Energieübertragung von einem Farbstoff auf Pigmente oder umgekehrt.

3.4.1 Laufverhalten RM-markierter Proteine in der denaturierenden PAGE

Im Laufe dieser Arbeit wurden Markierungen des LHCP mit 4 verschiedenen Farbstoffen durchgeführt. Bei einem Teil von ihnen war eine Veränderung der Laufeigenschaften des Proteins in der denaturierenden PAA-Gelelektrophorese zu bemerken. Zu 5 LHC-Mutanten liegen Daten für den Farbstoff RM vor, die anderen drei Farbstoffe wurden nur zur Markierung der LHC-Mutante S3Ch benutzt. FM und BI zeigten mit diesem Protein keinen Unterschied im Laufverhalten, die beiden Rhodamin-Farbstoffe TM und RM dagegen verlangsamten das S3Ch-Protein deutlich (ohne Abb.).

Abb. 3.25 zeigt 5 verschiedene LHC-Mutanten, die mit RM markiert wurden. Da die Markierung durchgehend nicht ganz vollständig war, wird der Einfluss der Markierung auf das Migrationsverhalten der Proteine sichtbar in Form von Doppelbanden, von denen nur eine Bande aus Farbstoff-markiertem Protein besteht. Interessanterweise ruft dieser Farbstoff nicht bei allen Proteinen die gleiche Veränderung der Laufgeschwindigkeit hervor. Bei S3Ch, V229Ch und S106Ch ist eine Verlangsamung der Wanderung durch das Gel zu sehen, bei S52Ch scheint sich keine große Änderung zu ergeben, S160Ch dagegen bewegt sich im RM-markierten Zustand schneller als das unmarkierte Protein. Der zunächst naheliegende einfache Erklärungsansatz, das Protein würde durch den zusätzlichen Farbstoff schwerer und verlangsamt seine Laufgeschwindigkeit entsprechend der Größe, kann hier offensichtlich nicht angewendet werden.

Mit Hilfe der zusätzlich im Gel auftauchenden Proteinbande lässt sich ohne großen Aufwand eine Abschätzung der Markierungsausbeute vornehmen. Die in Abb. 3.25 verwendeten Proben haben eine sehr gute Markierungseffizienz von etwa 90 %. Die vier LHC-Mutanten, die bei Markierung einen Laufunterschied zeigen, lassen diese Zahl aus dem Verhältnis der Proteinbanden ohne und mit RM erkennen. Die 5. Mutante, S52Ch, lässt diese einfache

Möglichkeit nicht zu. Die Größenordnung ihrer Markierungsausbeute ergibt sich aus einem Vergleich sowohl ihrer Protein- als auch der Fluoreszenzbanden mit den jeweiligen Banden der anderen Proteine, so dass sich auch für S52Ch eine hohe Markierungseffizienz von 80-90 % abschätzen lässt.

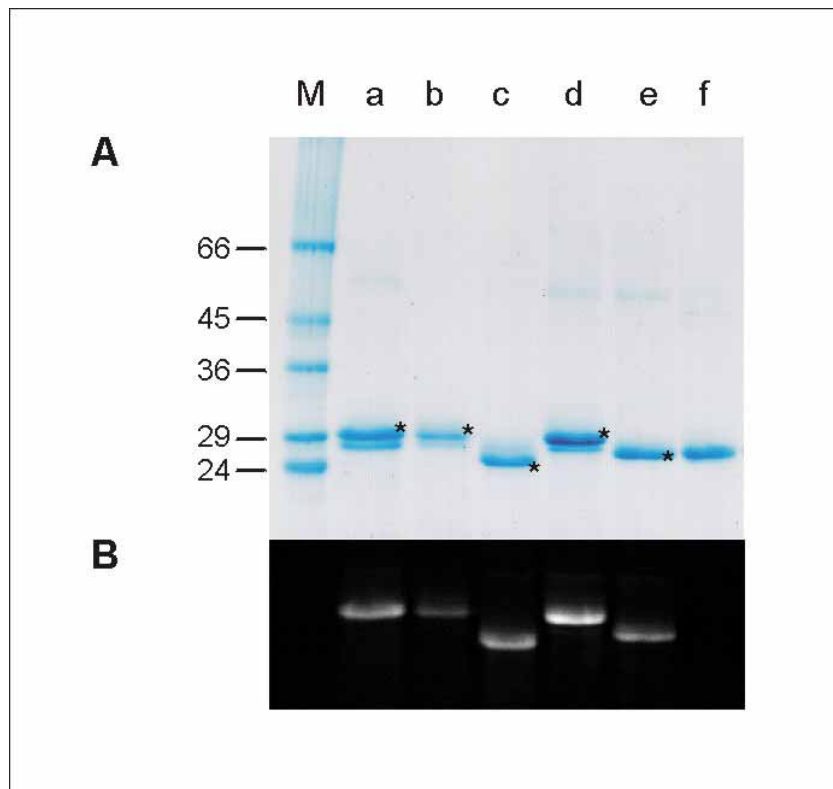


Abb. 3.25 Laufverhalten RM-markierter Proteine in einer SDS-PAGE:

LHCP wurde nach 2.4.1.2 markiert und anschließend gefällt. Die Überprüfung des Markierungserfolges geschah mittels denaturierender PAGE mit SDS-Laufpuffer. **a:** S3Ch, **b:** V229Ch, **c:** S160Ch, **d:** S106Ch, **e:** S52Ch; **f:** als unmarkierter Vergleich reines S3Ch-Protein (1 µg); **A:** Proteingel nach Coomassiefärbung; **B:** Fluoreszenz nach UV-Anregung; M: Proteingrößenmarker, *: markiertes Protein

3.4.2 Kontrollen zur Optimierung der Markierung

Das in vielen Versuchen optimierte Rezept zur Markierung des LHCP ist in Kap. 2.4.1.2 beschrieben. Um möglichst hemmende Bedingungen auszuschließen, wurden im Laufe der Arbeit verschiedene Kontrollen durchgeführt. Zwei Beispiele seien hier aufgezählt.

Ein kritischer Punkt für die Effizienz der Markierung ist die Reduktion des Proteins vor der eigentlichen Markierungsreaktion. Die Thiolgruppen der Cysteine bilden leicht miteinander Disulfidbrücken aus. In diesem Zustand kann die Maleimid- bzw. Iodacetamidgruppe des Farbstoffes nicht angreifen. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde TCP benutzt, da es vor der eigentlichen Markierungsreaktion nicht unbedingt abgetrennt werden muss. Abb. 3.26

zeigt, dass die Ausbeute an markiertem Protein abhängig von der vorherigen Einwirkzeit des Reduktionsmittel ist. Zwischen 15 und 45 Minuten kann eine leichte Steigerung hervorgerufen werden. Als Konsequenz aus diesem Ergebnis wurde die Dauer der Reduktion des freien Proteins in den weiteren Versuchen auf mindestens eine Stunde gesetzt.

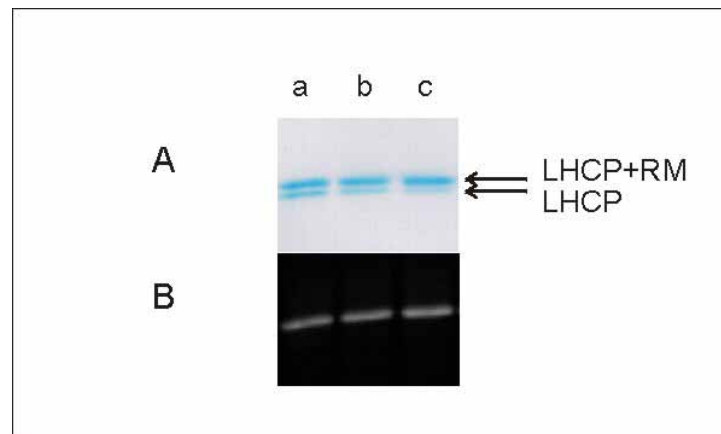


Abb. 3.26 Abhängigkeit der Markierungsausbeute von der Dauer der Reduktion des Proteins

Ein Ansatz zur analytischen Markierung nach Kap. 2.4.1.1 mit 0,5 µg LHCP (S3Ch) in 15 µl wurde mit 2 mM TCP für **a**: 15, **b**: 30, **c**: 45 Minuten bei 37°C reduziert, dann mit 50-fachem molaren Überschuss an RM für 1 Stunde inkubiert. **A**: Proteingel nach Coomassiefärbung; **B**: Fluoreszenz nach UV-Anregung.

Im Hinblick auf die Untersuchungen in Kap. 3.3, in denen die Markierungsreaktion in der Umgebung eines Saccharosedichtegradienten stattfinden sollte, wurde getestet, welchen Einfluss die in einem Gradienten enthaltenen Komponenten auf die Reaktion nehmen. Als Grundlage wurden die optimalen Bedingungen zur Bindung des Farbstoffes RM vorgelegt und einzeln Saccharose, LM oder Tricin zugesetzt. Mit Saccharose und Tricin ist eine leichte Verschlechterung zu sehen, LM scheint die Reaktion positiv zu beeinflussen.

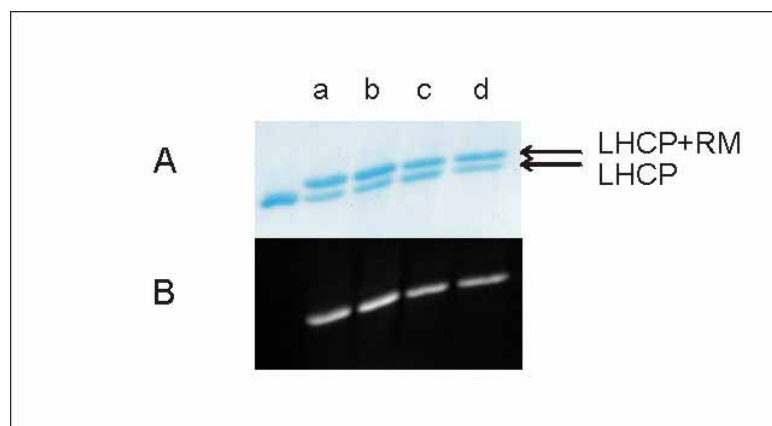


Abb. 3.27 Einfluss der Komponenten eines Sucrosegradienten auf die Markierung mit RM

Ein Ansatz zur analytischen Markierung nach Kap. 2.4.1.1 mit 0,4 µg LHCP (S3Ch) in 10 µl wurde mit **a**: keinem Zusatz, **b**: 0,1 % LM, **c**: 0,6 M Sucrose, **d**: 5 mM Tricin versetzt. Jeder Ansatz wurde daraufhin mit

2 mM TCP ½ Stunde reduziert, dann mit 28-fachem molarem Überschuss an RM markiert. **f**: LHCP ohne RM-Zusatz. **A**: Proteingel nach Coomassiefärbung; **B**: Fluoreszenz nach UV-Anregung.

3.4.3 Betrachtung von Komplexen aus Farbstoff-markiertem LHCP

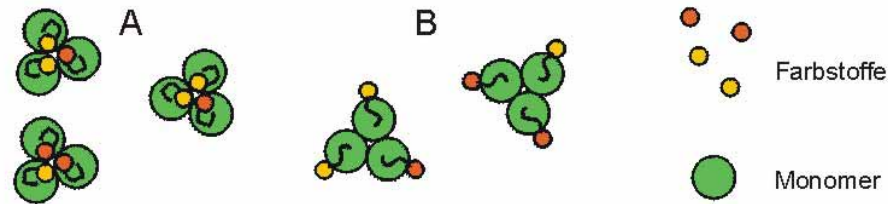
Die 4 Farbstoffe waren so ausgewählt, dass ihre Absorptions- und Fluoreszenzmaxima etwa zwischen den Wellenlängen 490 und 600 nm liegen sollten. Diese Spanne umfasst einen Bereich, in dem der LHCII eine vergleichsweise geringe Absorption zeigt. Eingegrenzt wird dieser Abschnitt durch starke Absorption der Chlorophylle und Carotinoide im kürzerwelligen Bereich, sowie starke Absorption und Fluoreszenz der Chlorophylle zu längeren Wellenlängen hin. In dieser „Grünlücke“ – der Name daher, dass das grüne Licht vergleichsweise wenig absorbiert wird – ist die Wahrscheinlichkeit besonders groß, zusätzlich eingebrachte Farbstoffe neben den Pigmenten des Komplexes spektroskopisch beobachten zu können.

Zunächst soll am Beispiel von S3Ch, einem LHCP mit Cystein nahe N-Terminus und C-terminalem Hexahistidylrest, das Verhalten der Farbstoffe im Komplex dargestellt werden. Die Markierungsausbeuten der verwendeten Proteine waren nicht konstant gleich hoch, sie lagen zwischen 50-90 %. Das markierte Protein wurde rekonstituiert und trimerisiert nach Kap. 2.2.4, anschließend über einen Saccharosedichtegradienten nach Kap. 2.2.6 von freiem Pigment und Protein abgetrennt. Die Monomere und Trimere des Gradienten wurden auf ihr Fluoreszenzverhalten bei Farbstoff- oder Chlorophyll-Anregung geprüft. Keiner der vier Farbstoffe verhinderte eine Faltung und Rekonstitution.

Es war auffällig, dass die im intakten Komplex, sowohl Monomer als auch Trimer, befindlichen Farbstoffe durchweg nur sehr wenig Eigenfluoreszenz zeigten. Erhöht werden konnte die Fluoreszenz durch verschiedene Vorgänge: zum Einen durch das Abtrennen des Farbstoffes vom intakten Komplex (s. Kap. 3.4.3.2), durch die Behandlung mit Detergentien (s. Kap.3.4.3.3) und durch ein Denaturieren mittels Kochen (s. Kap. 3.4.4).

3.4.3.1 Versuch der Strukturaussage mittels Fluoreszenz-Energietransfer

Nur kurz soll hier auf den Versuch eingegangen werden, mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer eine Aussage über die Lage der N-Termini im Trimer zu erhalten. Die LHC-Mutante S3Ch trägt ein singuläres Cystein nahe dem N-Terminus, das eine spezifische Markierung an dieser Stelle erlaubt. Werden nun zwei Sorten an Monomeren mit jeweils einem anderen Fluoreszenzfarbstoff zu Trimeren vereinigt, so bilden sich Trimere, die zwei verschiedene Farbstoffe tragen. Haben die N-Termini eine feste Lage zueinander so kommen die Farbstoffe in definierte Abstände. Das kann bedeuten sehr eng beieinander in der Mitte eines Trimers (A) oder weit auseinander in den Randbereichen des Komplexes (B). Der Unterschied zwischen beiden Extremen liegt in etwa bei 60-70 Å (entsprechend 6-7 nm).



Es wurden zwei Fluoreszenzfarbstoff-Paare ausgesucht, die in ihren spektroskopischen Eigenschaften als Donor und Akzeptor fungieren könnten. Es handelte sich zum Einen um FM und TM als erstes Paar, sowie um BI und RM. Abb. 3.28 verdeutlicht die Lage ihrer Anregungs- und Emissions-Maxima.

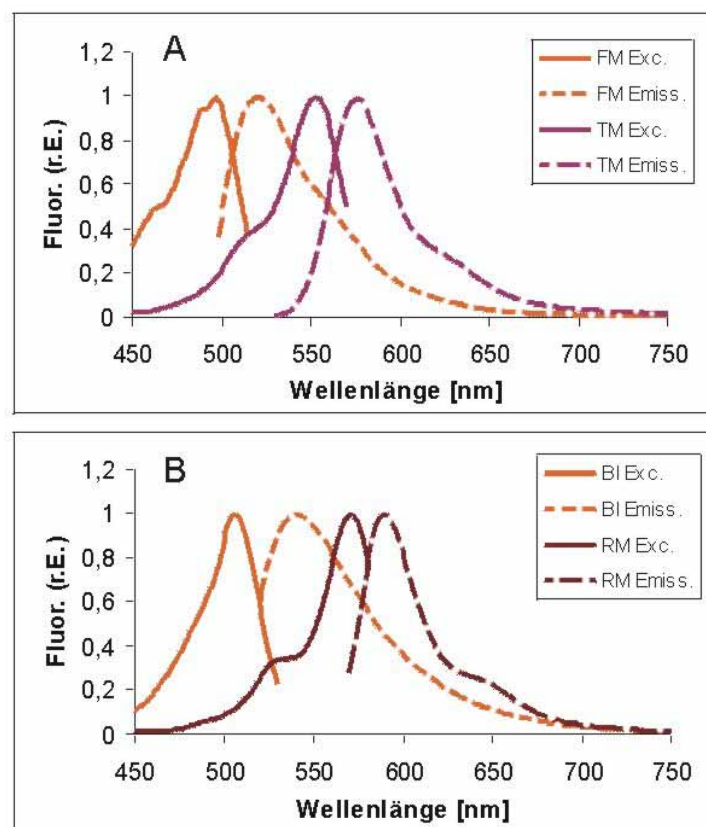


Abb. 3.28 Excitations- und Emissionsspektren der Donor/Akzeptor-Paare FM/TM bzw. BI/RM

A: Die Spektren von FM und TM stammen von markiertem LHCP (S3C), das über einen Saccharosegradienten aufgereinigt und als Bande mit freiem Protein gesammelt wurde. Messparameter Anregungs-/Emissionsspektrum für FM: Emission bei 520 nm/ Anregung bei 492 nm; für TM: Emission bei 575 nm/ Anregung bei 520 nm.

B: BI und RM lagen als freier Farbstoff in Sucrosegradientenumgebung (0,5 M Sucrose, 0,1 % LM, 5 mM Tricin pH 7,8) vor. Messparameter für BI: Emission bei 540 nm/ Anregung bei 508 nm; für RM: Emission bei 588 nm/ Anregung bei 560 nm.

Exc.: Excitationspektrum; Emiss.: Emissionsspektrum

In Abb. 3.29 sind Emissionsspektren von Trimeren abgebildet, die jeweils beide Farbstoffe eines Donor/Akzeptor-Paares tragen. Deutlich wird, dass bei Anregung des jeweiligen Donors eine starke Chl a-Fluoreszenz auftritt. Der LHCI absorbiert durchaus an den Anregungswellenlängen der 4 Farbstoffe, so wird eine Chlorophyll-Fluoreszenz an sich nicht zu vermeiden sein. Die molaren Extinktionskoeffizienten für LHCI in der Umgebung des Sucrosegradienten befinden sich in dem Bereich von 508 nm (Anregung von BI) bis 560 nm (Anregung von RM) immerhin noch zwischen $220.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (extrapoliert aus dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 5,46 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für monomeren LHCI bei 670 nm nach Butler und Kühlbrandt, 1988). Unangenehmer dagegen ist die geringe Fluoreszenz der Farbstoffe im Komplex. Wie in den folgenden Kapiteln zu sehen sein wird, ist die Farbstoff-Emission im Komplex zu einem großen Teil gelöscht. Gründe dafür können in einem Energietransfer auf die Pigmente des LHC zu suchen sein, eine andere Erklärung führt zu einem Einfluss der Umgebung im Komplex auf den Farbstoff.

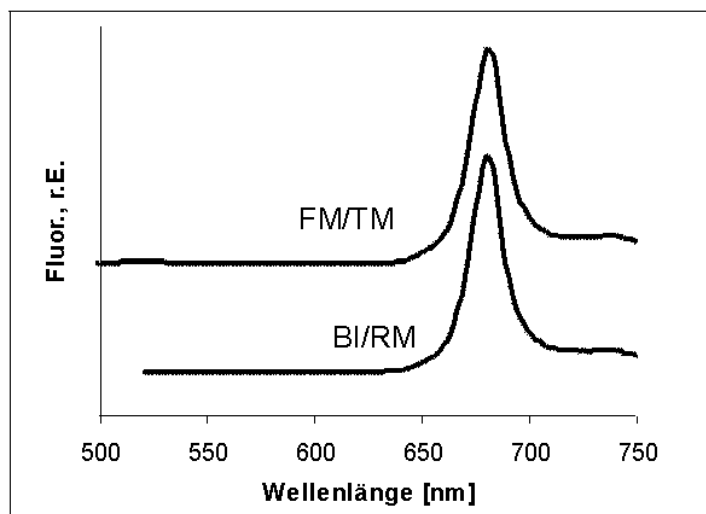


Abb. 3.29 Emissionsspektren von Trimeren mit angekoppeltem Donor/Akzeptor-Paar

Mit den Farbstoffen eines Donor/Akzeptor-Paares (FM und TM bzw. BI und RM) markiertes LHCP (S3Ch) wurde jeweils vereinigt und nach 2.2.4 trimerisiert, anschließend wurden die Trimere über einen Saccharosedichtegradienten aufgereinigt. Emissionsspektren wurden nach Anregung des jeweiligen Donors aufgenommen (d.h. Anregung von FM bei 492 nm und von BI bei 508 nm).

Aufgrund der starken Fluoreszenzlöschung aller 4 Farbstoffe im intakten Komplex und der zunächst unbekanntem Ursachen wurde der Energietransfer zwischen den Farbstoffen nicht weiterverfolgt. Beobachtungen zur Umkehr der Fluoreszenzlöschung werden im Folgenden an LHC-Komplexen dargestellt, die jeweils nur einen Farbstofftyp tragen.

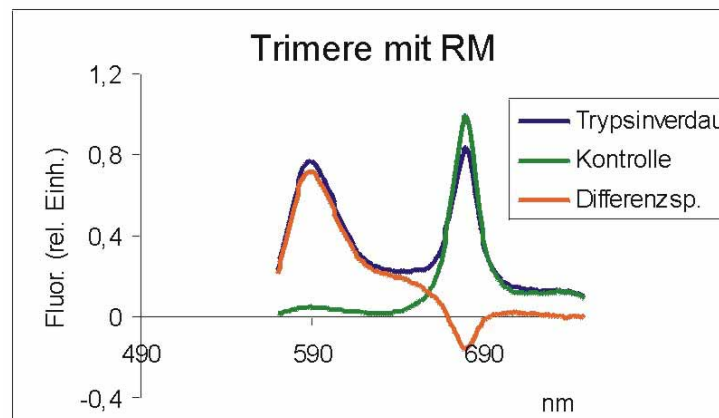
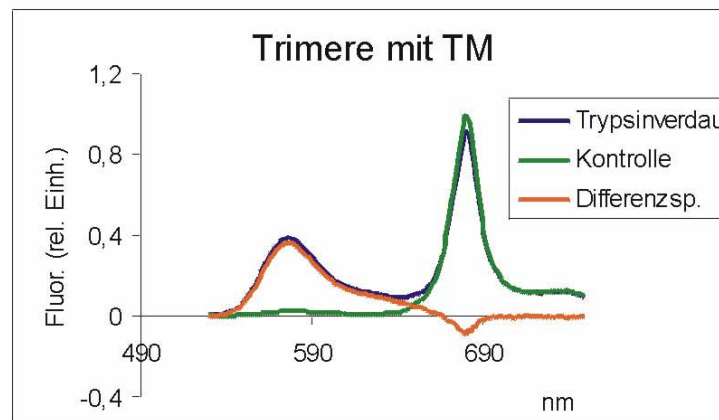
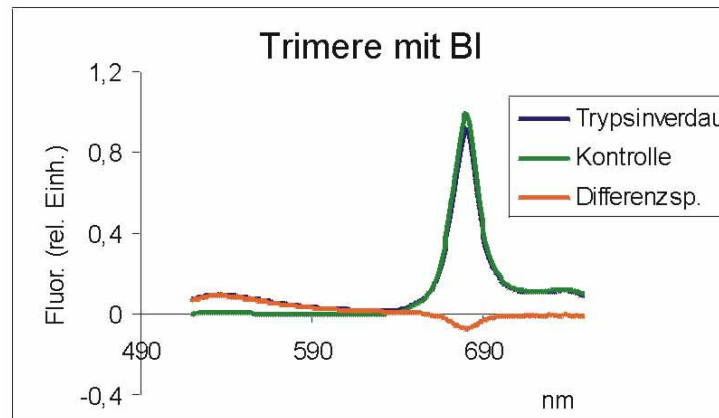
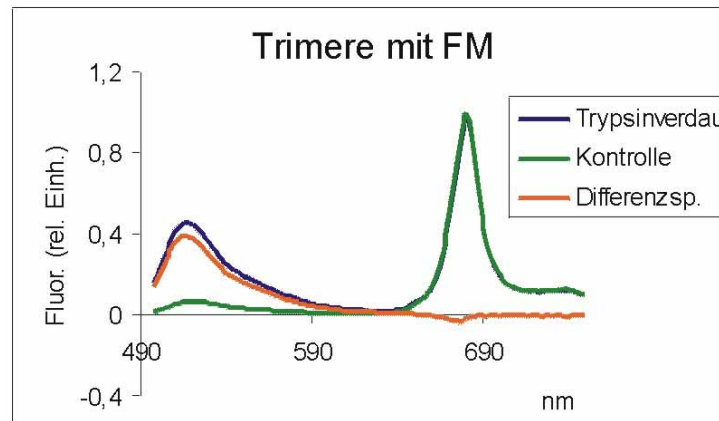
3.4.3.2 Behandlung markierter Trimere mit Trypsin

Das singuläre Cystein der LHC-Mutanten S3Ch, bzw. S3C, befindet sich nahe des N-Terminus. Diese Lage erlaubt ein selektives Abtrennen eines an dieser Stelle gebundenen Farbstoffes von einem intakten Komplex. Der Verdau mit der Protease Trypsin spaltet nach Nußberger et al. (1993) im Trimer nur die ersten 8 Aminosäuren eines Proteins ab, der trimere Komplex an sich soll intakt bleiben. Da das Cystein als dritte Aminosäure des Proteins in dem losgelösten Bereich liegt, sollte eine räumliche Trennung zwischen dem Farbstoff einerseits und den Pigmenten im gefalteten Komplex andererseits geschehen und damit ein eventuell stattfindender Energietransfer vom Farbstoff auf Chlorophyll unterbunden werden.

Abb. 3.30 legt dar, dass alle 4 verwendeten Farbstoffe nach Proteaseverdau von rekonstituierten Trimeren eine deutliche Zunahme ihrer Fluoreszenz zeigen. Im Gegenzug dazu ist jeweils eine schwache Abnahme der Chlorophyllfluoreszenz zu sehen. Die Intaktheit der Komplexe wurde über den Energietransfer von Chl b nach Chl a überprüft (ohne Abb.).

Abb. 3.30 Trypsinverdau von markierten Trimeren aus S3Ch – Effekt auf Farbstoff- und Chlorophyllfluoreszenz bei Farbstoff-Anregung (siehe nächste Seite →)

Mit FM, BI, TM oder RM markiertes Protein wurde nach Kap. 2.2.4 trimerisiert und über einen Saccharose-dichtegradienten aufgetrennt. Der molare Gehalt an monomerem Protein der Trimerbanden lag zwischen 0,3 und 1 μ M. **FM:** 100 μ l der Trimerbande wurden mit 5 μ l Trypsin (10 mg/ml) versetzt, 20 Minuten bei RT inkubiert, anschließend mit 500 μ l Gradientenlösung (0,6 M Sucrose, 0,1 % LM, 20 mM Tris-HCl pH 8,0) verdünnt und im Fluorimeter gemessen. Die Kontrolle ohne Trypsin wurde bis auf die Trypsinzugabe gleich behandelt. Die Anregung erfolgte bei 492 nm. **BI:** 33 μ l Trimerbande wurden mit 300 μ l Gradientenlösung (0,4 M Sucrose, 0,1 % LM, 5 mM Tricin pH 7,8) und 5 μ l Trypsin (10 mg/ml), bzw. 5 μ l Wasser in der Kontrolle, versetzt. Nach einer Inkubation für 20 Minuten auf Eis wurde die Fluoreszenz nach Anregung bei 508 nm gemessen. **TM:** Die Trimerbande wurde direkt mit 0,1 mg/ml Trypsin für 30 Minuten bei RT behandelt, anschließend 1:8 mit Gradientenlösung (0,6 M Sucrose, 0,1 % LM, 5 mM Tricin pH 7,8) verdünnt und die Fluoreszenz nach Anregung bei 520 nm gemessen. **RM:** 30 μ l Trimerbande wurden mit 300 μ l Gradientenlösung (0,5 M Sucrose, 0,1 % LM, 5 mM Tricin pH 7,8) und 5 μ l Trypsin (10 mg/ml), bzw. 5 μ l Wasser in der Kontrolle, versetzt. Nach einer Inkubation für 20 Minuten bei 12°C wurde die Fluoreszenz nach Anregung bei 560 nm gemessen. Abgebildet sind die Emissionsspektren der Trimere mit und ohne Trypsinbehandlung nach Anregung des jeweiligen Farbstoffes, sowie das Differenzspektrum zwischen beiden.



Eine Denaturierung von RM-markiertem Trimer durch 2-minütiges Kochen in Anwesenheit von 1 % SDS verhindert die in 0,1 % LM mögliche Bildung von Aggregaten. Dies hat zur Folge, dass diese Art der Denaturierung eine wesentlich höhere Zunahme der RM-Fluoreszenz zeigt gegenüber der Denaturierung in der Lösung des Sucrosegradienten. Es ergeben sich etwa 80 % der durch den Verdau mit Trypsin erreichbaren Fluoreszenz des Farbstoffes. Die Behandlung der Komplexe mit Trypsin und damit das Abtrennen des Farbstoffes von Protein und Pigmenten zeigte im Gesamtvergleich die stärkste mögliche Zunahme der Farbstofffluoreszenz.

Die Behandlung von freiem, RM-markiertem Protein mit Trypsin führte zu einer geringen Zunahme der Farbstofffluoreszenz bei 588 nm (Tab. 3.2). Die Größenordnung der etwa 1,25-fachen Emission entspricht dem Unterschied zwischen mittels Kochen in Anwesenheit von SDS denaturiertem Trimer und der durch Trypsinverdau desselben erreichbaren Fluoreszenz.

In Tab. 3.2 sind die Auswirkungen einiger Versuche, die im Trimer weitgehend gelöschte Fluoreszenz des Farbstoffes RM wieder hervorzubringen, gegenübergestellt.

	1 % SDS 5 Minuten	Kochen	Kochen mit SDS	Verdau mit Trypsin	Trypsinverdau von freiem LHCP+RM
Prozent der mit Trypsinverdau erreichbaren Fluoreszenz	13%	20-60 %	80 %	100 %	--
Vielfaches der Ausgangsfluoreszenz	2,5-3	10-20	20	15-30	1,25

Tab. 3.2 Fluoreszenzverhalten des Farbstoffes RM

Trimere aus RM-markiertem S3Ch wurden auf verschiedene Weise behandelt, um die Fluoreszenz des Farbstoffes RM zu erhöhen. Die zugrundeliegenden Versuche sind in Kap3.4.3.2 und 3.4.3.3 beschrieben. Als Ausgangsfluoreszenz wird der Wert der RM-Emission bei 588 nm im intakten Trimer in der Umgebung des Sucrosegradienten bezeichnet, bzw. des freien Proteins in Gradientenlösung mit 0,1 % SDS. „Kochen mit SDS“ heißt, den unverdünnten Trimeren wurde 1% SDS zugefügt, die Lösung wurde 1-2 Minuten gekocht und zur Messung 1 zu 10 mit Gradientenlösung (0,4-0,6 M Sucrose, 0,1 % LM und 5mM Tricin pH 7,8) verdünnt. Die Trypsinbehandlung des freien Proteins geschah mit 0,002 µg/µl LHCP+RM in Gradientenlösung mit 0,1 % SDS unter Inkubation mit 0,24 mg/ml Trypsin für 30 Minuten bei RT.

3.4.3.3 Behandlung markierter Komplexe mit Detergens

Über einen Sucrosegradienten aufgereinigte Komplexe liegen in einer Lösung mit 0,1 % LM als Detergens vor. Im vorangehenden Kapitel ist zu sehen, dass in dieser Umgebung nur eine geringe Fluoreszenz der vier an Trimere gebundenen Farbstoffe zu detektieren ist und dass die Emission nicht der an sich möglichen Fluoreszenz des freien Farbstoffes entspricht. Ein anderer Ansatzpunkt, um einen Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten der markierten Komplexe zu nehmen, ist die Änderung der Bedingungen durch die Zugabe verschiedener Detergentien. Im Wesentlichen wurde unter diesem Gesichtspunkt der Farbstoff RM gebunden an die LHC-Mutante S3Ch betrachtet.

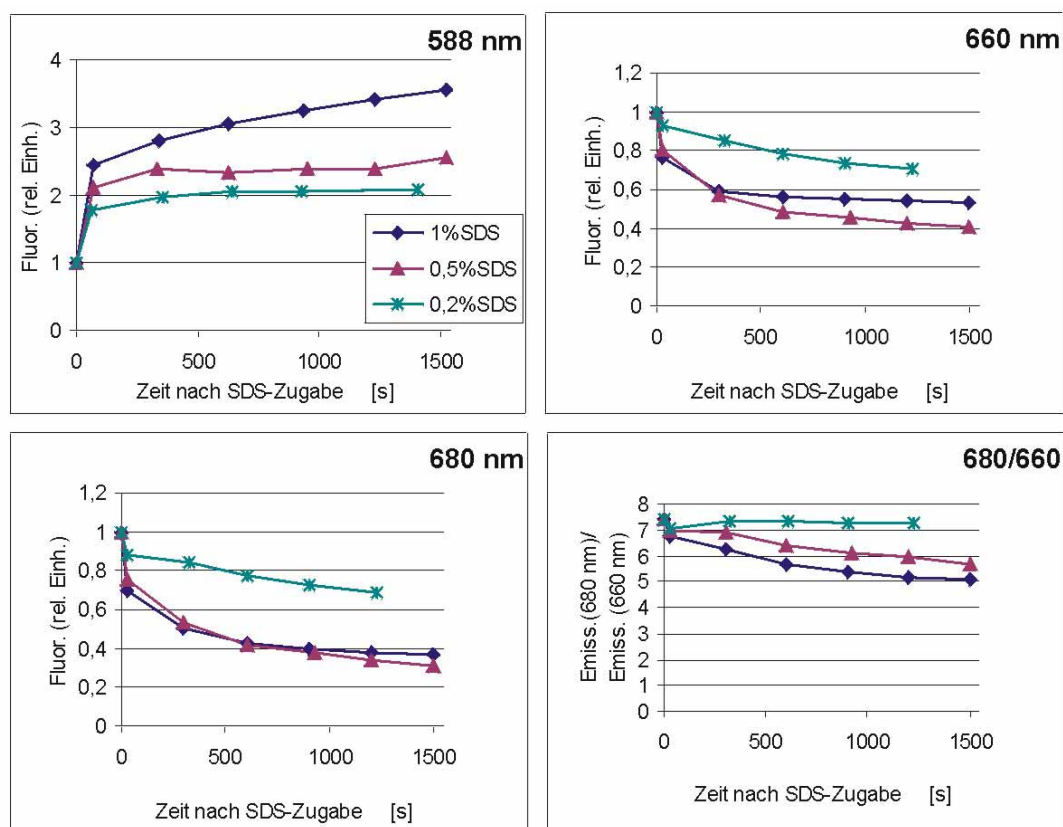


Abb. 3.31 Einfluss von SDS auf die Fluoreszenz von RM-markierten Trimeren aus S3Ch

RM-markiertes LHCP wurde nach 2.2.4 trimerisiert und über einen Sucrosegradienten aufgetrennt. Die Trimerbande wurde mit Gradientenlösung (0,4 M Sucrose, 0,1 % LM und 5mM Tricin pH 7,8) und einer zehnpromigen SDS-Lösung auf 1/10 verdünnt, so dass schließlich in der Lösung **a**: 0,2 %, **b**: 0,5 % und **c**: 1 % SDS vorlagen. SDS wurde zuletzt zugegeben und startete die Zeitnahme. Die Probe wurde während der Messung auf einer Temperatur von 12°C gehalten. Die Diagramme geben die Abnahme bzw. Zunahme der Emission bei 588 nm (RM, nach 560 nm-Anregung), bzw. bei 660 nm (Chl b) und 680 nm (Chl a) (beides nach Anregung bei 460 nm) bezogen auf die jeweilige Ausgangsfluoreszenz vor Detergenzugabe wieder. Zusätzlich ist die Änderung im Verhältnis von Chl a- zu Chl b-Fluoreszenz dargestellt (680/660).

Die Anwesenheit von SDS lässt die Fluoreszenz von RM im Trimer deutlich ansteigen (Abb. 3.31). 1 % SDS erzeugt dabei nach 20 Minuten etwa die 3-3,5-fache Emission bei 588 nm. Die Stärke der Veränderung der Emissionen ist abhängig von der Konzentration des Detergens. Je mehr SDS vorhanden ist, desto stärker nimmt auch die Fluoreszenz von RM zu.

Die Fluoreszenz im Bereich der Chlorophylle nimmt insgesamt ab, sowohl bei Betrachtung der Emission bei 660 nm (Chl b), als auch bei 680 nm (Chl a). Dies ist ein Vorgang, der auch bei Komplexen ohne Farbstoff in dieser Größenordnung zu beobachten ist. Die Chlorophylle wurden bei Farbstoff-(560 nm; ohne Abb.) und bei Chl b-Anregung (460 nm; Abb. 3.31) betrachtet. Die Fluoreszenzabnahme liegt in beiden Fällen in ähnlicher Größenordnung. In der Regel ist die Vollständigkeit des Energietransfers von Chl b nach Chl a eine Richtlinie für die Intaktheit der LHCII-Komplexe. Das generelle Verschwinden der Chlorophyll-Fluoreszenz nach SDS-Zugabe lässt allerdings eine Aussage schwer werden. Es tritt keine verstärkte Chl b-Fluoreszenz auf, die ein Hinweis für denaturierende oder instabilere werdenden LHC-Komplexe wäre. Da die Fluoreszenzlöschung sowohl nach Anregung bei RM-Absorption (560 nm) als auch bei Chl b-Absorption (460 nm) auftritt und in Komplexen ohne Farbstoff ebenfalls, kann die Abnahme der Chlorophyll-Fluoreszenz nicht oder nicht alleine durch ein Unterbrechen eines möglichen Energietransfers von RM auf Chlorophylle der Komplexe begründet werden.

SDS ist das einzige getestete Detergens, das zu einer starken Erhöhung der RM- Fluoreszenz im Trimer führt, ohne gleichzeitig durch Ansteigen der Chl b-Emission bei 660 nm einen direkten Hinweis auf einen Zerfall der Komplexe zu geben.

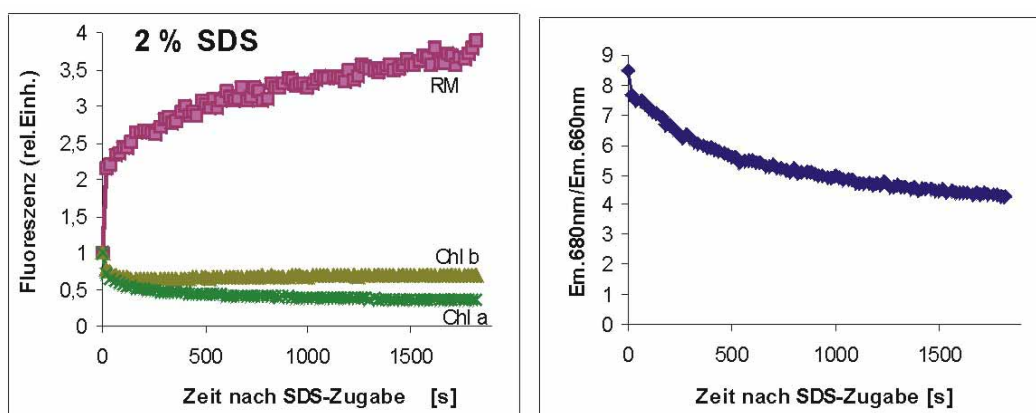


Abb. 3.32 Einfluss von 2 % SDS 000330

LHCP mit einem Gehalt von etwa 1/3 RM-markiertem Protein wurde nach 2.2.4 trimerisiert und über einen Sucrosegradienten aufgetrennt. Die Behandlung der Trimere erfolgte nach Abb. 3.31, so dass die Komplexe letztendlich in 2 % SDS vorlagen. Die Aufnahme der Werte erfolgte in diesem Fall als Einzelmessung alle 10 Sekunden mittels „multigroup acquisition“. Weitere Messbedingungen und Erklärung der Diagramme wie Abb. 3.31.

Der Unterschied zwischen der Zugabe von 1 % und 2 % SDS ist nicht sehr groß, auffällig ist das Verhalten der Chl b-Fluoreszenz (Abb. 3.32). Sie fällt zunächst wie bei geringeren SDS-Konzentrationen schnell ab, nimmt dann aber ab ungefähr 200 s wieder langsam zu. Die hohe Konzentration an SDS von 2 % lässt den denaturierenden Effekt des Detergens in diesem Fall durch eine deutliche Verminderung des Energietransfers erkennen.

Nach 1500 s (oder 25 Minuten) ist in den meisten Diagrammen kein konstanter Wert erreicht. Die Kurven scheinen teilweise einer Sättigung zuzustreben, teilweise eine fast lineare Steigung im späten Verlauf anzunehmen. Dieser Umstand, die Veränderung über einen langen Zeitraum, muss bei Vergleichen zwischen punktuellen Messungen unbedingt berücksichtigt werden.

Monomere zeigen im Hinblick auf SDS im Prinzip ein ähnliches Verhalten wie Trimere. Die Zunahme der RM-Fluoreszenz bei SDS-Zugabe war meist etwas schneller, sofern nicht schon von Beginn an eine im Vergleich zum Trimer geringere Löschung der Farbstoff-Fluoreszenz vorlag. Letzteres ist bei Monomeren leicht zu beobachten, sichtbar im Spektrum an einem deutlichen Peak im Bereich der RM-Fluoreszenz um 588 nm. Zusätzlich taucht im Spektrum eines Monomers schneller eine schwache Schulter im Bereich der Chl b-Emission um 660 nm auf, bedingt durch einen im Vergleich zum Trimer nicht mehr vollständigen Energietransfer von Chl b nach Chl a.

Das ungeladene Detergens OG hat einen schwächeren Einfluss auf die Farbstofffluoreszenz im Trimer als SDS (Abb. 3.33). Nach 5 Minuten Einwirken von 1 % OG verdoppelt sich die Emission bei 588 nm lediglich. Der Effekt auf die Chlorophylle der Komplexe zeigt fast ein Verdoppeln der Chl b-Emission bei geringem Abfallen der Chl a-Emission. Das bedeutet eine Verschlechterung des Energietransfers von Chl b nach Chl a.

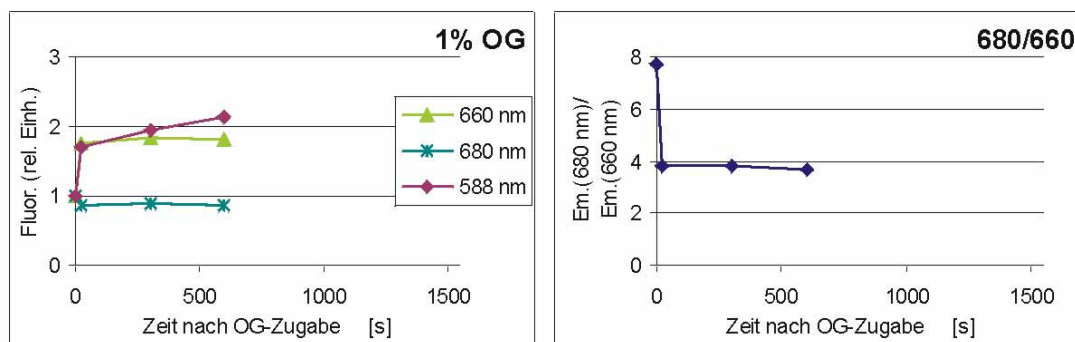


Abb. 3.33 Einfluss von OG

Die Trimerbande wurde mit Gradientenlösung (0,4 M Sucrose, 0,1 % LM und 5mM Tricin pH 7,8) und einer zehnprozentigen Detergens-Lösung auf 1/10 verdünnt, so dass schließlich in der Lösung 1 % OG vorlag. Messbedingungen und Diagramme siehe Abb. 3.31.

Der Einsatz von Triton-X 100 (0,5 % in Abb. 3.34) zeigt zwar einen raschen und starken Anstieg der RM-Fluoreszenz, aber auch einen Energietransfer von Chl b nach Chl a, der zum Erliegen kommt. Sichtbar wird dies durch das zuletzt unter eins liegende Verhältnis von Chl a- zu Chl b-Emission.

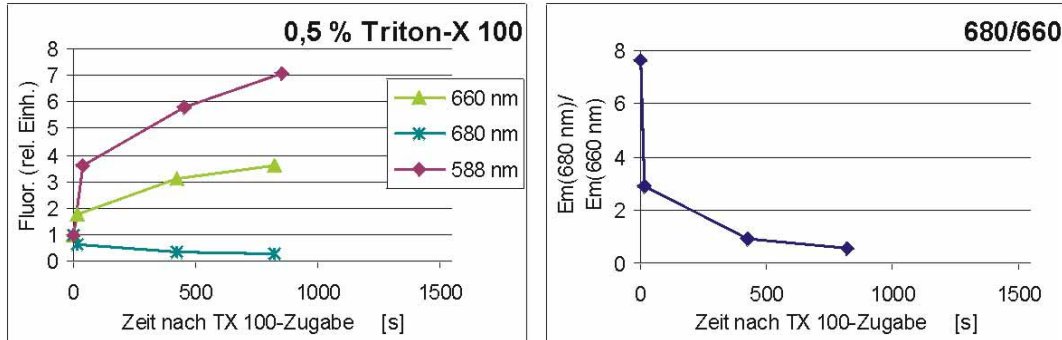


Abb. 3.34 Einfluss von Triton-X 100

Die Trimerbande wurde mit Gradientenlösung (0,4 M Sucrose, 0,1 % LM und 5mM Tricin pH 7,8) 1:9 verdünnt, dann mit 1/10 Volumen 5 % Triton-X 100 versetzt, so dass die Komplexe in 0,5 % Triton-X 100 vorlagen. Mit Detergenzugabe startete die Zeitnahme. Messbedingungen und Diagramme siehe Abb. 3.31.

Eine Erhöhung der Konzentration des im Sucrosegradienten vorhandenen Detergens LM auf 0,5-1 % hatte kaum einen Effekt auf die Höhe sowohl der Chlorophyll- als auch der RM-Fluoreszenz.

3.4.4 Fluoreszenzverhalten von RM an verschiedenen Orten im Komplex

Ein Einfluss der Bindung an einen Komplex auf die Fluoreszenz des Farbstoffes RM lässt sich bei Komplexen aus S3Ch eindeutig zeigen. S3Ch trägt bei einer Markierung mit RM den Farbstoff nahe dem N-Terminus. Bei Verdau von Monomeren und Trimeren mittels Trypsin bleibt der eigentliche Komplex intakt, lediglich ein Teil des N-Terminus und mit ihm der Farbstoff wird abgetrennt (Kap 3.4.3.2). Andere in dieser Arbeit verwendete Proteine bieten diese Möglichkeit nicht. Bei ihnen ist aufgrund der Lage des Cysteins kein selektives Abtrennen des Farbstoffes bzw. eines farbstofftragenden Peptidfragmentes vom intakten Komplex möglich.

Um eine Aussage über das Fluoreszenzverhalten von RM, gebunden an verschiedenen Orten im Komplex, treffen zu können, wurde der Vergleich der Fluoreszenz vor und nach Denaturieren gewählt. Abb. 3.35 zeigt Fluoreszenzemissionsspektren bei Anregung im Farbstoffmaximum der ausgesuchten Komplexe. Verwendet wurden diejenigen 5 Proteine, die auch in Kap. 3.3 zu Zugänglichkeitsuntersuchungen eingesetzt wurden. Unter ihnen mitgeführt wurde die schon im Trypsinverdau aus Kap 3.4.3.2 verwendete LHC-Mutante S3Ch. Zur Denaturierung wurden die Komplexe für eine Minute gekocht. Bei allen Proben, sowohl Monomere als auch Trimere, war anschließend ein starker Anstieg der RM-

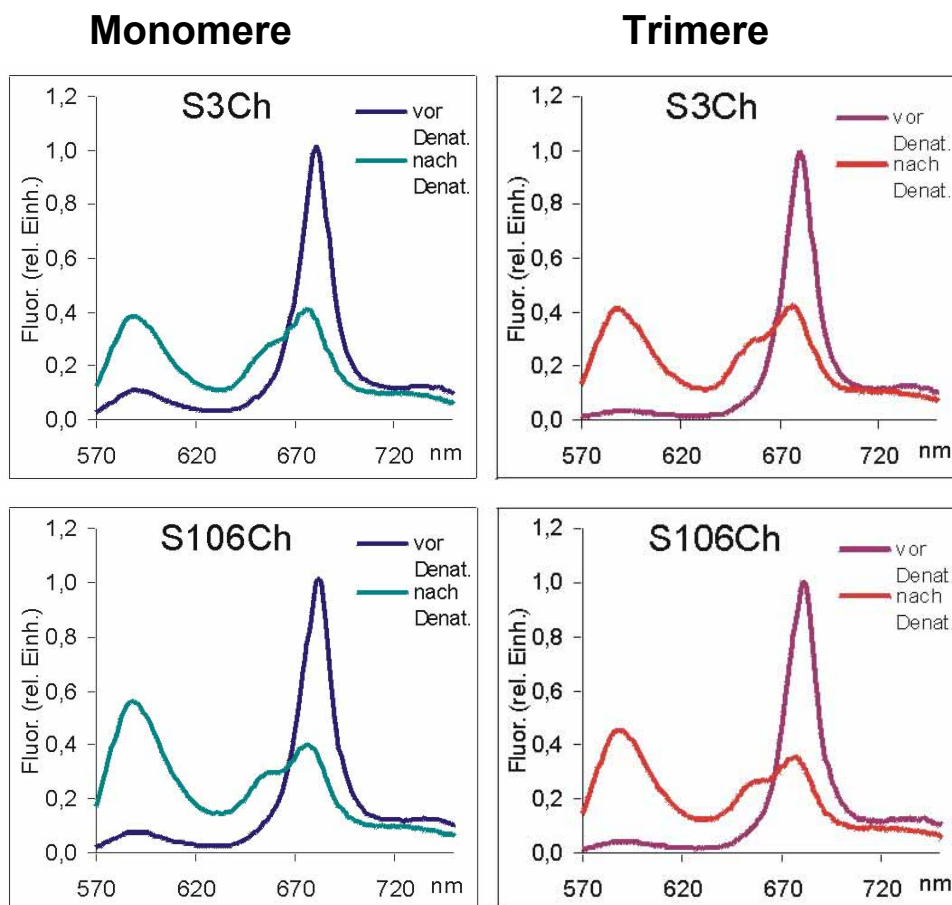
Fluoreszenz zu sehen. Das gleichzeitige Zurückgehen der Chlorophyll-Fluoreszenz kann nicht als ein Beweis für Energietransfer gewertet werden, da dieses Verhalten auch bei Komplexen ohne Farbstoffanbindung auftritt.

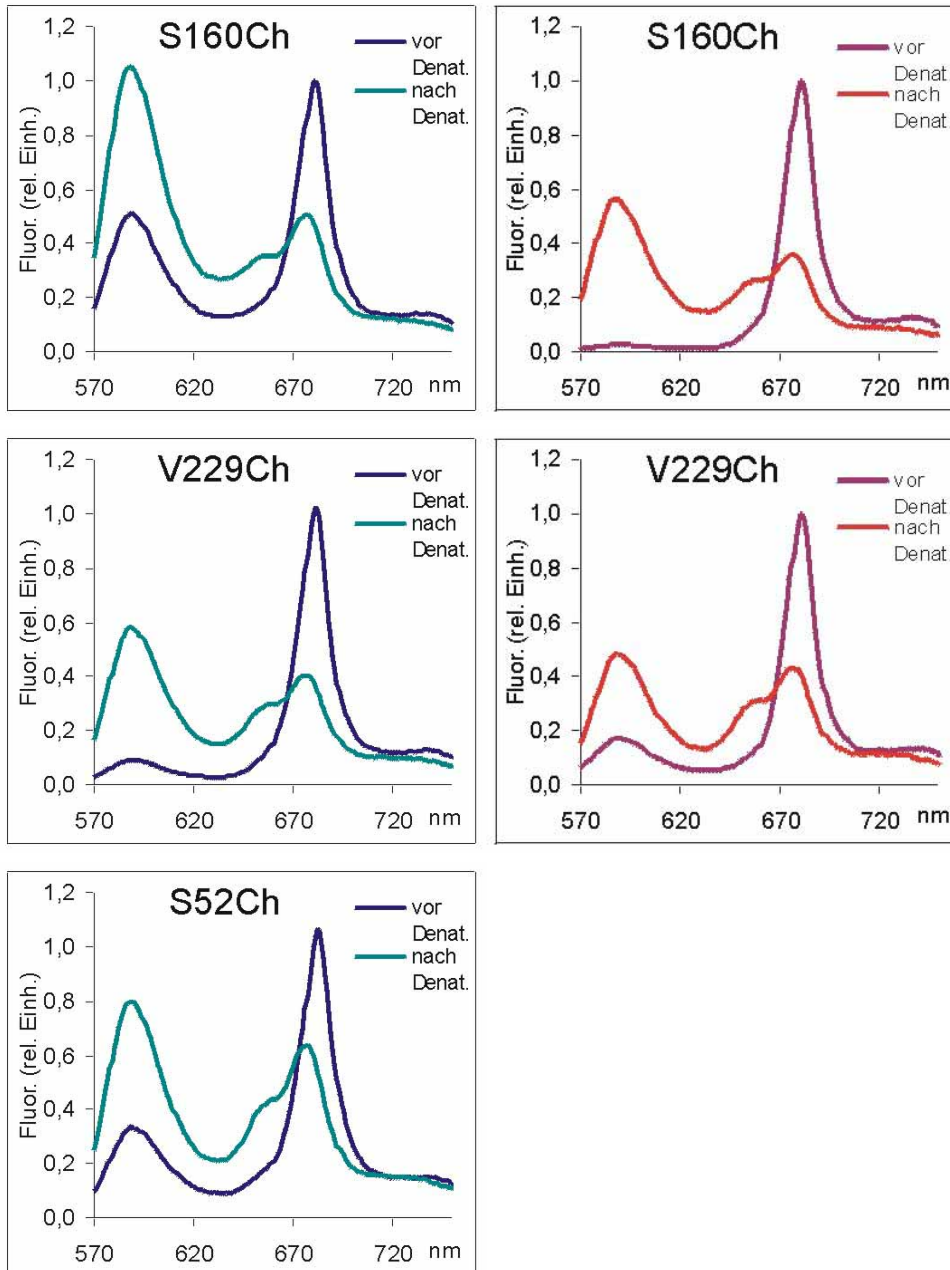
Unterschiede sind in der schon im intakten Komplex sichtbaren RM-Fluoreszenz zu erkennen. Besonders hoch ist diese bei S160Ch- und S52Ch-Monomeren.

Abb. 3.35 Fluoreszenzemissionsspektren von RM-markierten Monomeren und Trimeren vor und nach Denaturierung: Anregung bei 560 nm

Protein der LHC-Mutanten wurde nach 2.4.1.2 mit RM markiert, nach 2.2.4 rekonstituiert, trimerisiert und über einen Sucrosegradienten aufgereinigt nach 2.2.6. Die Monomer- und Trimer-Banden wurden mittels Gradientenlösung (0,5 M Sucrose, 0,1 % LM und 5mM Tricin pH 7,8) ungefähr auf eine Absorption von 0,035 bei 670 nm und damit eine Konzentration von 0,064 μM monomeren LHC eingestellt. Anregung erfolgte bei 560 nm. Die Denaturierung der Proben bestand in Kochen für 1 Minute ohne weiteren Detergenzusatz. Die Kurven sind jeweils auf die Chlorophyllfluoreszenz bei 681 nm vor Denaturierung der Proben normiert.

blau: Monomere; rot: Trimere





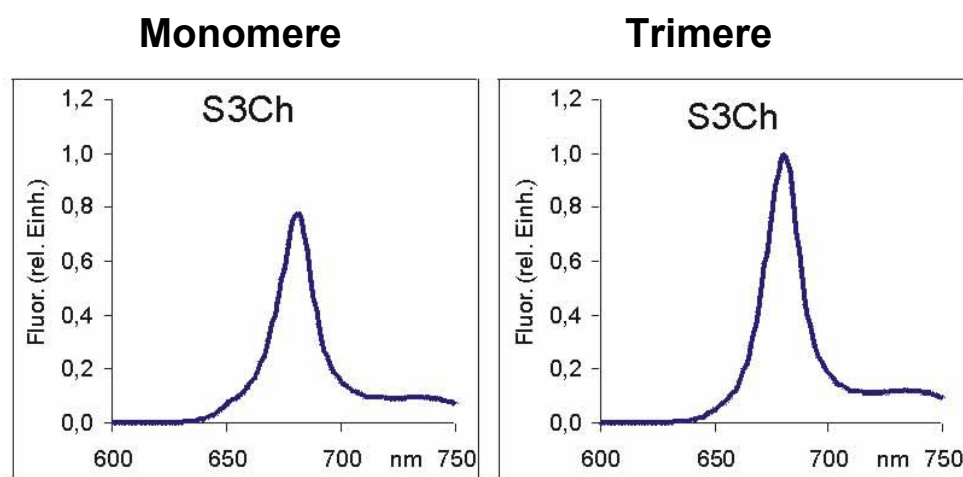
Nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine Trimerisierung aufgrund des vorhandenen Farbstoffes schwieriger wird und so zur Trimerbildung bevorzugt Monomere ohne Farbstoff gelangen. Dies war allerdings bei Betrachtung der Ausbeute an Monomeren und Trimeren im Saccharosedichtegradienten (ohne Abb.) bei den meisten Proteinen makroskopisch nicht zu bestätigen. Die Markierungsausbeute der eingesetzten Proteine war so hoch (80-90 % des Proteins waren jeweils markiert; verwendet wurden die in Abb. 3.25 aus Kap 3.4.1 auf Effizienz überprüften Markierungschargen), dass starke Effekte sichtbar sein müssten. Lediglich S106Ch zeigte, ganz untypisch für diese LHC-Mutante, eine etwa doppelt so starke Monomer- wie Trimerbande. Normal ist für dieses Protein ungefähr eine Gleichverteilung der Monomer- und Trimer-Ausbeute.

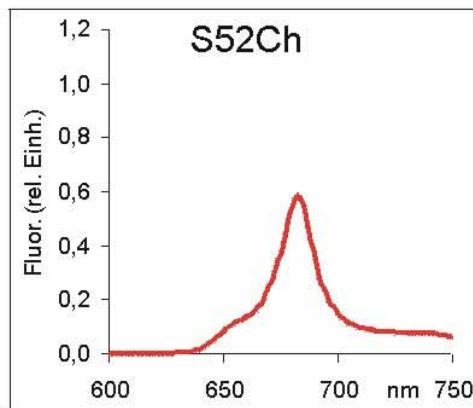
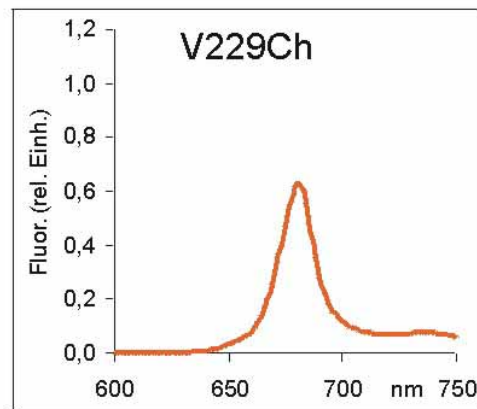
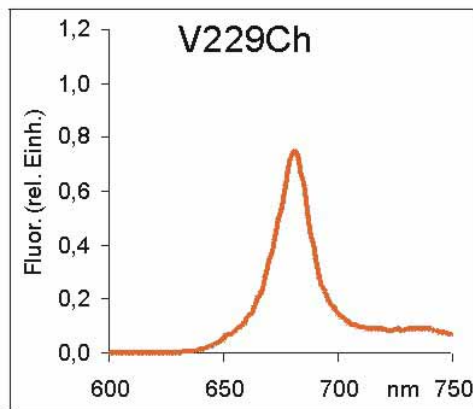
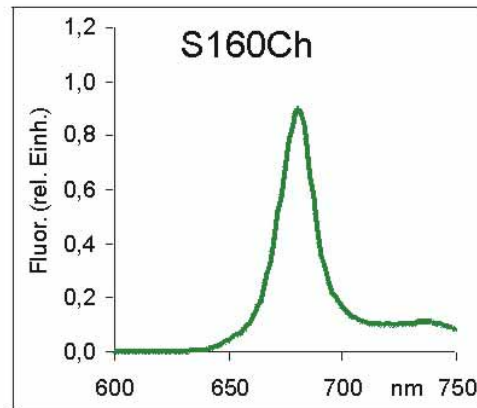
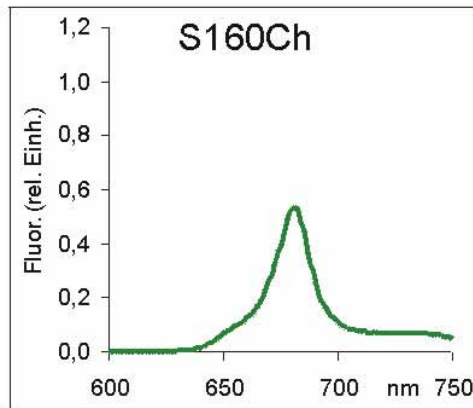
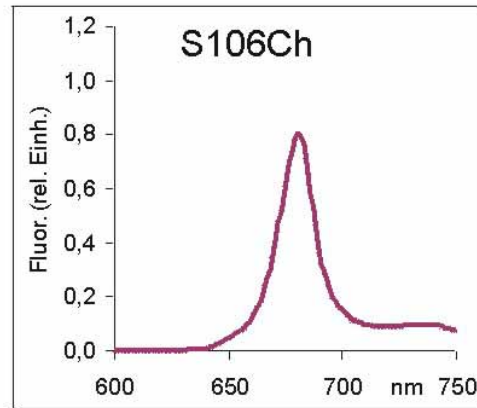
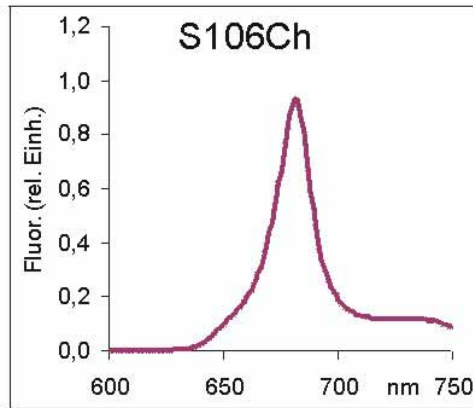
Die Vollständigkeit des Energietransfers von Chl b nach Chl a kann als Zeichen für die Intaktheit der Komplexe gewertet werden. Ist bei Anregung von Chl b keine Chl b-Fluoreszenz zu detektieren, so kann ein effizienter Energietransfer von Chl b nach Chl a erfolgen. Taucht dagegen eine Emissions-Schulter bei 660 nm, also im Bereich der Chl b-Emission auf, so kann der Energietransfer nicht mehr optimal ablaufen. Völlig denaturierte Komplexe zeigen unter den in Abb. 3.35 beschriebenen Bedingungen kaum noch Chl a-Fluoreszenz.

Abb. 3.36 zeigt Emissionsspektren der RM-markierten Komplexe bei Chl b-Anregung. In allen Fällen ist ein Energietransfer zu Chl a zu erkennen, sichtbar an der Fluoreszenzkurve mit Maximum bei 681 nm. In Abb. 3.37 sind Differenzspektren zu sehen, die den Unterschied zwischen der Fluoreszenz bei Chl a- bzw. Chl b-Anregung zeigen. Diese Art der Auftragung bringt die schon in Abb. 3.36 bei einigen Kurven zu erkennende Schulter der Chl b-Emission deutlicher hervor. Während sämtliche Trimere optimalen Energietransfer nach Chl a zeigen, ist bei allen Monomeren ein geringer Anteil an Chl b-Emission zu sehen. Am stärksten tritt diese Schulter bei den Monomeren von S160Ch und S52Ch hervor, den beiden Komplextypen, die in Abb. 3.35 im intakten Komplex die höchste Farbstofffluoreszenz, im Verhältnis zur Chlorophyll-Fluoreszenz, zeigen.

Abb. 3.36 Fluoreszenzemissionsspektren von RM-markierten Monomeren und Trimeren: Anregung bei 460 nm

Die intakten Komplexe aus Abb. 3.35 wurden bei 460 nm, im Bereich der Chl b-Absorption, angeregt.





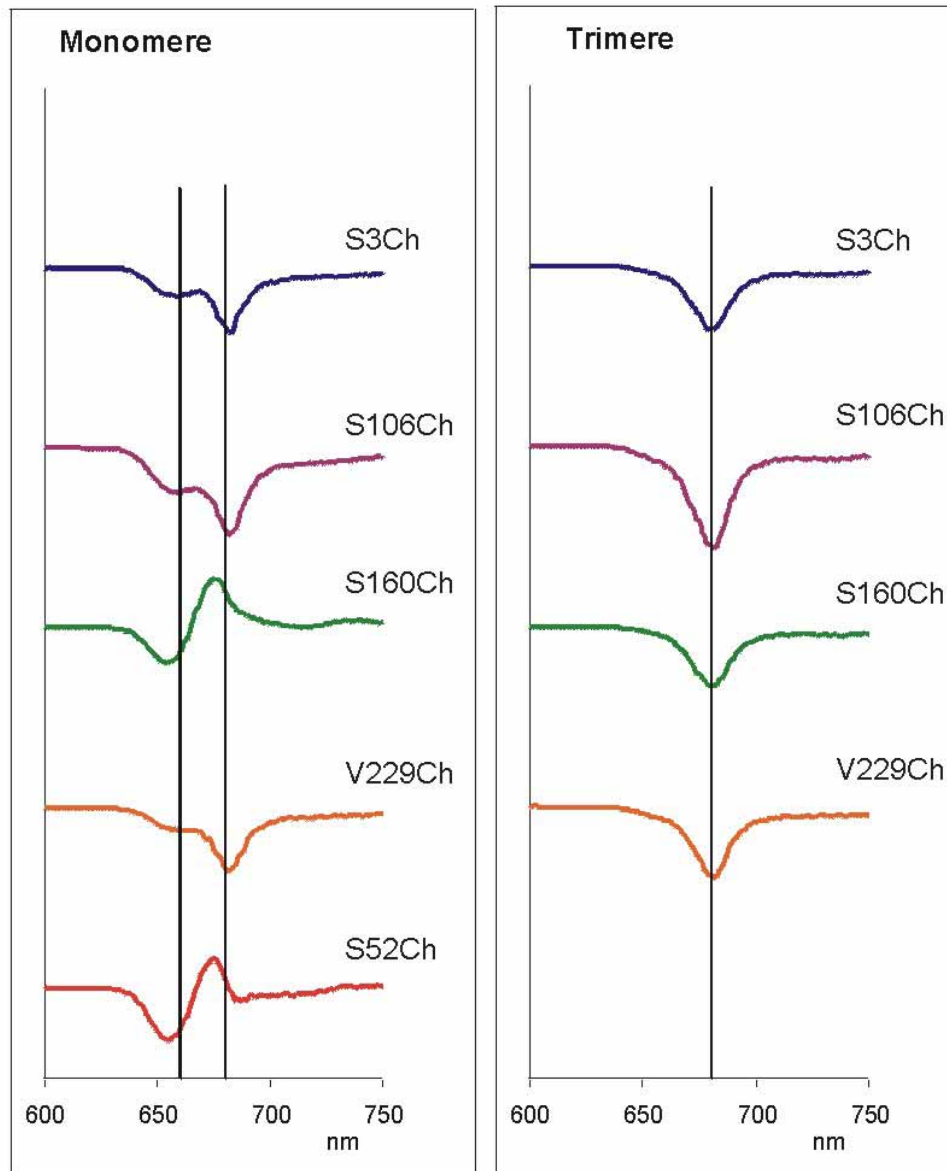


Abb. 3.37 Differenzspektren zwischen Fluoreszenzemission nach Chl a-Anregung (410 nm) und Chl b-Anregung (460 nm)

Verwendet wurden die Komplexe aus Abb. 3.35 und Abb. 3.36, Normierung erfolgte jeweils auf die 681 nm-Fluoreszenz bei Chl a-Anregung (410 nm).

Die Lage der senkrechten Linien im Spektrum soll die Lage der Emission bei 660 nm (Chl b) und 681 nm (Chl a) verdeutlichen.

3.4.5 Fluoreszenzlöschung

Im Zuge der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Markierung des LHCI kam die Idee auf, die Zugänglichkeit dieser Farbstoffe im Komplex zu messen. Der Einsatz von Fluoreszenzlöschern (englisch „Quencher“) ist eine häufig verwendete Methode, um eine

Aussage über die Exponiertheit von Fluoreszenzfarbstoffen oder fluoreszierenden Aminosäuren (z.B. Tryptophan) innerhalb eines gefalteten Proteins zu treffen. Ein Ziel war, die Zugänglichkeit in Monomeren und Trimeren aus S3Ch zu vergleichen und daraus einen Hinweis auf die Lage des N-Terminus zu erhalten.

Gelänge es einen Fluoreszenzlöcher zu finden, der die Fluoreszenz des Farbstoffes, hier RM, löscht (und dabei die Fluoreszenz der Komplex-eigenen Chlorophylle verschont), so ließe sich aus dem Grad der Fluoreszenzlöschung eine Aussage treffen, ob der Farbstoff eher nach außen exponiert oder im Innern verborgen vorliegt.

3.4.5.1 Fluoreszenzlöschung am freien Farbstoff

Zunächst wurde der freie Farbstoff RM auf sein Verhalten unter Zugabe eines Fluoreszenzlöschers untersucht. Als Fluoreszenzlöcher eingesetzt wurden ein Iodid (LiI) und Acrylamid, zwei häufig verwendete Fluoreszenzlöcher. LiI wurde statt dem in vielen Veröffentlichungen auftauchenden KI vorgezogen, da Kalium-Ionen zur Ausfällung des Detergens SDS führen, indem sie einen störenden KDS-Niederschlag bilden. Mit LiI wurde dies nicht beobachtet.

Der freie Farbstoff in Wasser zeigte deutlich eine Abnahme der Fluoreszenz bei Zugabe von LiI. Iodid scheint demnach als Fluoreszenzlöcher für RM in Frage zu kommen. Die Bedingungen einer Lösung mit freiem Protein oder Komplex müssen allerdings immer ein Detergens enthalten. LHCP als Membranprotein würde sonst aggregieren und ausfallen. Daher wurde die Reaktion des Farbstoffes auf Iodid mit 1 % SDS bzw. 0,1 % LM im Ansatz untersucht. SDS schien die Löschung der Fluoreszenz zu verhindern, LM nur abzuschwächen. In Tab. 3.3 sind einige Werte vergleichend gegenüber gestellt.

Es lässt sich anmerken, dass allein der Zusatz von 1 % SDS zum freien Farbstoff dessen Fluoreszenz um das 2,6-fache erhöhte, der Zusatz von 0,1 % LM erhöhte die Fluoreszenz um das 1,4-fache.

Bedingungen für RM (0,14µM)	Wasser	1 % SDS	0,1 % LM	10 mM Tricin pH 7,8	1 % SDS 10 mM Tricin pH 7,8
Fluoreszenzlöcher	0,1 M LiI*	0,1 M LiI*	0,1 M LiI*	0,5 M Acrylamid	0,5 M Acrylamid
Fluoreszenz in Prozent vom Ausgangswert	60 %	96 %	88 %	120 %	97 %

* mit 0,1 M LiCl; dies wurde zugesetzt, um bei einer später vorgesehenen Variation der LiI-Konzentration durch Anpassen des LiCl die Ionenstärke der Lösung immer gleich zu halten. Chlorid-Ionen werden nicht als Fluoreszenz-Löcher angesehen.

Tab. 3.3 Effekt von Iodid und Acrylamid auf RM unter verschiedenen Bedingungen

Fluoreszenzanregung jeweils bei 560 nm, Emissionsmessung von 570-750 nm.

An freies Protein (S3Ch) gekoppelter Farbstoff in SDS-haltiger Lösung zeigte ein dem freien RM vergleichbares Verhalten auf LiI-Zugabe.

Acrylamid erhöhte um etwa ein Fünftel der Ausgangsemission die Fluoreszenz des freien Farbstoffes, statt sie zu vermindern. Lag der Farbstoff in einer 1 %-igen SDS-Lösung vor, so war kein signifikanter Effekt auf die Fluoreszenz durch Acrylamid zu sehen. Acrylamid wurde daher nicht weiter als geeigneter Fluoreszenzlöcher für RM in Erwägung gezogen.

3.4.5.2 Fluoreszenzlöschung im Komplex

Komplexe mit markiertem und unmarkiertem Protein aus S3Ch wurden zur Betrachtung von Fluoreszenzlöschung nach 2.2.4 rekonstituiert und über einen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt. Die Behandlung von RM-markierten Monomeren und Trimeren mit 0,1 M LiI führte jeweils zu einer geringen Abnahme der Farbstofffluoreszenz bei 588 nm und der Chlorophyllfluoreszenz bei 680 nm (Anregung bei 560 nm). Die Verringerung lag bei beiden Wellenlängen etwa in der gleichen Größenordnung und betrug nur wenige Prozent der Ausgangsfluoreszenz. Dieser Effekt auf die Chlorophyllfluoreszenz trat auch bei Chl b-Anregung (460 nm) auf und in unmarkierten Komplexen. Bei einem Versuch der Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes unter diesen Bedingungen ist demnach auch mit Schwankungen der Chlorophyllfluoreszenz zu rechnen. In Anbetracht der Tatsache, dass die eigentliche Farbstofffluoreszenz in intakten Trimeren gegenüber der Chlorophyllfluoreszenz nur sehr gering ist (Kap 3.4.3), wurden weitere Versuche in Richtung gezielter Fluoreszenzlöschung nicht unternommen.

4 Diskussion

4.1 Zugänglichkeitsuntersuchungen an Monomeren und Trimeren

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag darauf, Unterschiede zwischen Monomeren und Trimeren des LHCII aufzudecken. Der Gesichtspunkt ist deshalb so interessant, da über strukturelle Veränderungen innerhalb eines Monomeres, die möglicherweise bei der Trimerisierung eintreten, noch nichts genaues bekannt ist. Eine Kristallisation und Strukturbestimmung des LHCII mit vergleichsweise guter Auflösung gelang bisher nur mit Trimeren (Kühlbrandt et al., 1994). Die Grundzüge der Struktur sind sicher auf Monomere übertragbar, wie das Vorhandensein der drei Transmembranhelices oder die grundsätzliche Lage der aufgelösten Pigmente. Doch sehen Teilstrukturen, die erst durch Wechselwirkungen im Trimer stabilisiert werden, im Monomer vielleicht ganz anders aus. Herausgegriffen wurden Bereiche, die nicht am helicalen Grundgerüst oder etwa der Bindung von essentiellen Chlorophyllen beteiligt sind, also insbesondere die ausserhalb der Membran liegenden Regionen. Die Strukturbestimmung für das Modell des LHCII wurde an Kristallen aus detergenssolubilisierten Trimeren durchgeführt. Durch die Packung des Kristalles können kristallbedingte Zustände entstehen, wie sie in einem freien LHCII überhaupt nicht vorliegen. Diese Option muss bei der Betrachtung des Modelles immer im Hinterkopf behalten werden. Das hier verwendete System betrachtet die Komplexe in Lösung. Artefakte in der Faltung, wie sie möglicherweise durch die Kristallisation entstehen, können so vermieden werden.

Mutationen zur Einfügung singulärer Cysteine wurden in verschiedenen Domänen des LHCII plaziert. In die Zugänglichkeitsversuche einbezogen wurde jeweils eine Position nahe den beiden Enden des Proteins, in stromaler und luminaler Schleifenregion, sowie, außer Konkurrenz, kurz vor der ersten Transmembranhelix. Die zuletzt erwähnte LHC-Mutante, S52Ch, nahm insofern eine Sonderstellung ein, da sie wegen fehlender Trimerbildung nur im monomeren Zustand untersucht werden konnte. Damit entsprach sie nicht der eigentlichen Fragestellung, nämlich dem Vergleich zwischen zwei Zuständen des LHCII, zwischen Monomeren und Trimeren.

Die Reaktion des Farbstoffes RM mit einem Cysteinrest eines Proteins hängt von mehreren Faktoren ab. Da ist zunächst einmal die sterische Erreichbarkeit – wird die Thiol-Gruppe verdeckt oder ist der Farbstoff zu groß, um sie mit seiner reaktiven Gruppe zu erreichen, so kommt eine Verbindung nicht zustande. Eine weitere Rolle spielt die Umgebung, in der das Cystein sich befindet – ein Farbstoff wie RM, der eine positive und eine negative Ladung trägt, kann die Sulfhydryl-Gruppe eher an dem wässrigen Medium zugänglichen Stellen erreichen, weniger in hydrophoben Bereichen oder gar über eine Membran hinweg. RM trägt zwar auch weite aromatische und aliphatische Bereiche, so dass eine Anlagerung an

Detergentien möglich erscheint, in das Micellen- oder auch Membran-Innere sollte der Farbstoff mit seiner Ladung jedoch nicht eindringen. Liegt ein Cystein lokal in einem eher hydrophoben Milieu vor, so wird seine Reaktivität herabgesetzt. Ein Übergang zu einem Thiolat-Ion und damit die Möglichkeit einer nucleophilen Addition mit der Maleimidgruppe wird unwahrscheinlicher.

4.1.1 Aspekte der Methode

Die Stärke der verwendeten Methode liegt in einem relativen Vergleich zwischen verschiedenen Zuständen eines Proteins. In dieser Arbeit stellen Monomer und Trimer zwei Formen des LHCII dar. Unter sonst gleichen Bedingungen wird die Zugänglichkeit von Cysteinen an einer definierten Position in der monomeren und oligomeren Form des LHCII gegenübergestellt.

Ein eindeutiger Vorteil der Methode ist die Umgebung, in der sich die Komplexe während der Markierung befinden. Sie bleiben nach der vergleichsweise schonenenden Aufreinigung über einen Saccharosedichtegradienten in der schwach detergenshaltigen Lösung. Dies ist eine Umgebung, in der viele Untersuchungen am LHCII vorgenommen werden, etwa die spektroskopischen Messungen des Kap. 3.4. Zur Detektion der Markierung ist anschließend der intakte Komplex selbst nicht mehr erwünscht, das Protein wird denaturiert.

Streuung, Geschwindigkeit und Ausbeute

Die verwendete Methode zeigt eine starke Streuung. Nur geringe Unterschiede gehen in diesen Schwankungen unter. Aufgrund der Streuung und der damit verbundenen Ungenauigkeit werden sämtliche Trimere und dazu die Monomere von S3Ch als gleicher Level behandelt. Dies gilt zumindest für die in dieser Arbeit näher betrachteten Anfangswerte, eine Markierungsdauer über einer Stunde zeichnete auch bei Trimeren eindeutig verschiedene Tendenzen ab. Aussagekräftige Unterschiede zwischen LHC-Mutanten treten deutlicher zwischen Monomeren zu Tage. Dabei müssen sie nach frühen und späten Werten getrennt werden. Die LHC-Mutanten nehmen einen unterschiedlichen Zeitverlauf in der Zunahme ihrer Markierungsausbeute. Um den Vergleich zwischen verschiedenen LHC-Mutanten in genauere Zahlen fassen zu können, müsste die Methode verfeinert werden. Ideal wäre eine Reaktionskinetik, aus der sich Reaktionskonstanten zu einem direkten Vergleich der Mutanten ausrechnen lassen. Durch einen hohen Überschuss einer Substanz lässt sich eine Reaktion mit zwei Reaktionspartnern als eine Reaktion pseudo-erster Ordnung ausführen. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird dadurch bei bekannten Konzentrationen ein direktes Maß für die Konstante. Da im vorliegenden Fall außer der Reaktion von RM mit Cystein die Konkurrenzreaktion von RM mit TCP stattfindet, ist dieser einfache Fall nicht mehr gegeben. Die Reaktionsgeschwindigkeit von RM mit den Cysteinen des Proteins ist zumindest im Falle von S106Ch und S160Ch nicht von der Konzentration an RM unabhängig, wie es im Idealfall eines ausreichenden Überschusses gegeben sein sollte. Dies zeigt der Effekt, den eine

Konzentrationserhöhung des Farbstoffes 1 bis 2 Stunden nach Beginn der Reaktion bei Komplexen aus diesen beiden Proteinen noch ausübt.

Viele Untersuchungen an Einzelsysteinmutanten, die in der Literatur beschrieben sind, geben keine Auskunft über die Vollständigkeit der Reaktion mit der Cysteingruppe. Stützt sich die Messung auf die Funktionsfähigkeit des Proteins, wie häufig der Fall, so lässt sich zwar eine Aussage über Ausrichtung und Bedeutung einer Aminosäure bezüglich einer Reaktions- oder Rezeptor-Tasche treffen, nicht aber eine quantitative Korrelation mit dem tatsächlichen Markierungsgrad. Eine genaue Beobachtung über die Zeit geben dagegen Klein-Seetharaman et al. (1999) und Cai et al. (1999). Der molare Anteil an umgesetztem Substrat kann dort während der Reaktion aus der Absorption eines Reaktionsproduktes direkt bestimmt werden. Es lässt sich ablesen, in wieviel Prozent des Proteins das singuläre Cystein zu einem herausgegriffenen Zeitpunkt reagiert hat. Die vollständige Reaktion aller Thiolgruppen einer Mutante variierte von weniger als einer Minute bis zu mehreren Stunden, z.T. wurde gar keine Reaktion beobachtet. Diese Ergebnisse beziehen sich auf die Reaktion eines symmetrischen Disulfides (4,4'-Dithiodipyridin) zu einem asymmetrischen Disulfid mit Cystein. Bei Dunham & Farrens (1999) wird die vollständige molare Umsetzung von Cysteinresten mit einer Maleimidgruppe innerhalb von etwa 30 Sekunden beschrieben. In beiden Fällen ist in den Reaktionsansätzen kein Reduktionsmittel vorhanden, ganz anders als in den in dieser Arbeit aufgeführten Versuchen. Eine Umsetzung aller Cysteine einer LHCII-Probe wurde in Kap. 3.3 nicht erreicht. Auch eine Reaktion über mehr als 18 Stunden zeigte zwar immer noch eine leichte Zunahme, aber keine Vollständigkeit. Ob dieser Umstand an den Reaktionsbedingungen lag, hier ist insbesondere die Anwesenheit des Reduktionsmittels TCP gemeint, oder ob ein Teil der Komplexe Cysteine mit geringerer Reaktivität aufweist, ist nicht ganz geklärt. Sämtliche LHCII-Ansätze enthalten TCP, um Disulfidbrücken zwischen Proteinen zu vermeiden. Dass im Falle des LHCII einige Mutanten eine große Neigung zur Disulfidbrückenbildung zeigen, liegt sicher teilweise an der Aufarbeitungsmethode. Die Trimerisierung über eine Säule soll die Monomere in so starke räumliche Nähe bringen, dass eine Zusammenlagerung zu Trimeren ausgelöst oder gefördert wird. Durch diese Nähe wird zwangsläufig auch die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen erleichtert. Eine Spaltung dieser Disulfidbrücken nach Trimerisierung und vor der Aufreinigung über einen Sucrosegradienten reichte allerdings nicht aus, um distinkte Banden zu erhalten. Diese wurden nur mit kontinuierlich im Gradienten vorhandenem Reduktionsmittel erreicht. Dies ist ein klarer Hinweis, dass sich die störenden Disulfidbrücken auch zwischen LHCII in Lösung bilden können.

Die im Vergleich zu Dunham & Farrens (1999) insgesamt langsamen Reaktionskinetiken des Maleimids RM aus Kap.3.3.2.2 können aus lokalen Gegebenheiten der jeweiligen Cysteine resultieren. Wahrscheinlicher ist jedoch ein großer Einfluss der Reaktionsbedingungen. Das im Ansatz vorhandene Reduktionsmittel TCP reduziert auch zu einem gewissen Anteil Maleimidgruppen (Shafer et al, 2000). Solange sein Einsatz nicht vermieden werden kann, ist

seine Konkurrenz mit der Thiolgruppe um die Maleimidgruppe des Farbstoffes leider in Kauf zu nehmen.

Farbstoffwahl

In den Untersuchungen zur Zugänglichkeit einzelner Cysteine wurde eine einzige Substanz zur Markierung verwendet – der Farbstoff RM. Für die Interpretation der Ergebnisse stellt dies eine Einschränkung dar, da die Auslegung der Ergebnisse sehr stark von der eingesetzten Substanz abhängt. Für eine allgemeinere und genauere Aussage ist der Einsatz mehrerer Farbstoffe anzuraten, die unterschiedliche Eigenschaften aufweisen, beispielsweise eine andere Größe und Form haben oder keine ionische Ladung tragen.

So trägt der Farbstoff RM außer einer eher negativen Sulfonsäuregruppe eine positive Ladung, die durch sein System aus konjugierten Doppelbindungen delokalisiert ist. Ein gegenseitig abstoßender Effekt mit positiv geladenen Lysinen oder Argininen des LHCII muss daher durchaus in Betracht gezogen werden. Basische Aminosäuren befinden sich sowohl auf stromaler als auch auf luminaler Seite des Proteins. Besonders das Vorkommen an Amino- und Carboxyterminus lässt den Raum offen für Spekulationen über ihre Lage und Ausrichtung im Monomer oder im Trimer. Ohne genauere Informationen über diese Bereiche ist jede der Positionen mit singulärem Cystein potentiell betroffen. Die Häufung von Lysinen gerade am N-Terminus macht die Position des Cysteins in S3Ch besonders auffällig. Die Möglichkeit ist nicht von der Hand zu weisen, dass die schlechte Markierungsausbeute in Monomeren und in Trimeren durch eine schlechte Erreichbarkeit aufgrund von Ladungsabstossung zustande kommt. Die Markierung denaturierten Proteins von S3Ch in Kap. 3.4 wird dadurch nicht benachteiligt, jedoch ist in dem dort verwendeten Ansatz das anionische Detergens SDS enthalten. Durch seine negative Sulfatgruppe könnte eine gewisse Abschirmung der positiven Lysine erreicht werden, die bei der Reaktion der gefalteten Komplexe ohne SDS nicht eintritt. Auch eine Abstoßung der negativen Ladung der Sulfonsäuregruppe von RM oder eine Ladungsanziehung können die Reaktion von RM mit Cysteinen der verschiedenen LHC-Mutanten erschweren oder begünstigen.

Eine weitere Besonderheit von RM ist eine kurze Kohlenstoffkette als „Spacer“ zwischen Farbstoff und reaktiver Gruppe (2 C-Atome lang). Durch diesen schmalen „Arm“ als Verlängerung wird eine Anbindung des nicht gerade kleinen Farbstoffmoleküls auch an verborgeneren Stellen möglich. Das Cystein aus S160Ch etwa liegt in einer Art Tasche oder Grube, die aber von außen dem Medium zugänglich ist. In einer solchen Situation kann der Spacer eine Reaktion von RM mit der Thiolgruppe erlauben, auch wenn der eigentliche Farbstoff aufgrund seiner Größe möglicherweise gar nicht in die Tasche passt.

4.1.2 Unterschiede zwischen Monomeren und Trimeren und Diskussion möglicher Ursachen

An drei der untersuchten Positionen hat der LHCII ein in Monomeren und Trimeren voneinander abweichendes Verhalten. Eine Reaktion des singulären Cysteins nahm mit der Trimerisierung der Monomere sichtbar bei S106Ch, S160Ch und V229Ch ab. Anders als in den Schleifenregionen ist bei Monomeren von V229Ch schon sehr früh ein Punkt der plus/minus Sättigung erreicht, an dem der übrigbleibende Rest der Monomere nur noch sehr langsam oder möglicherweise gar nicht mit dem Farbstoff RM reagiert. Es sieht so aus als würde eine Trimerisierung die gute Erreichbarkeit dieser Monomerpopulation verhindern. Die vierte LHC-Mutante, S3Ch mit der Thiolgruppe nahe Aminoterminus, zeigte sowohl in Monomeren als auch in Trimeren eine recht schlechte Markierungseffizienz und wich damit vom Muster der anderen drei Proteine ab. Die Unterschiede, die zwischen Monomeren und Trimeren auftauchen, liegen im Bereich der Streuung der Messmethode. Die Beobachtung der schlechten Ausbeute ist recht auffällig, da gerade der Aminoterminus mit seinen weiten unaufgelösten Bereichen ein Kandidat für große Beweglichkeit und damit in einer vereinfachten Vorstellung für eine gute Erreichbarkeit von außen ist. Wie auch bei den anderen drei LHC-Mutanten kann eine Ursache für das Verhalten aus den Ergebnissen nicht direkt abgelesen werden. Die minimale Aussage, die sich von vorhandenen Unterschieden zwischen Monomeren und Trimeren ableiten lässt, ist, dass im Zuge der Trimerisierung für jede der betrachteten Positionen eine Veränderung stattgefunden haben muss, die diese Differenzen hervorruft. Das Fehlen solcher Unterschiede zwischen Monomeren und Trimeren bei S3Ch bedeutet nicht entsprechend, dass hier in beiden Formen der gleiche Zustand für den Aminoterminus vorliegen muss. Die geringe Erreichbarkeit schon im Monomer gibt allerdings Raum für Spekulationen über eine Einbindung des Aminoterminus auch in der monomeren Form in eigene Komplex-Strukturen, die eine Exposition des Cysteins verhindern.

Grenzflächen zwischen Monomeren:

Die einfachste Erklärung für die schlechtere Zugänglichkeit einiger Cysteine in Trimeren ist eine sterische Hinderung durch das direkte Aufeinandertreffen der angrenzenden Monomere. Eine direkte Beteiligung der untersuchten Domänen an Monomer/Monomer-Wechselwirkungen im Trimer wird am ehesten von N- und C-Terminus erwartet. Beide Regionen sind für die Stabilität eines Monomeres vernachlässigbar, weite Bereiche können in einem Monomer sogar fehlen. Für den Aufbau eines Trimeres dagegen sind Elemente nötig, die nahe Amino- bzw. Carboxyterminus liegen. Beide Bereiche sind in der LHCII-Kristallstruktur nicht bzw. nur teilweise aufgelöst. Die Unabdingbarkeit für die Trimerisierung spräche für eine möglicherweise direkte Lokalisation an der Monomer/Monomer-Grenzfläche. Das Reaktionsverhalten des Cysteins nahe dem C-Terminus in V229Ch weist tatsächlich auf einen Unterschied zwischen Monomeren und Trimeren hin.

Vier Aminosäuren vom C-Terminus entfernt scheint das Monomer eine bessere Zugänglichkeit aufzuweisen als das Trimer – zumindest gilt diese Aussage für einen kleinen Teil der Monomere. Die Position des Cysteins in S3Ch als der 3. Aminosäure am Aminoterminus hat demgegenüber ein ganz anderes Verhalten. In beiden Fällen liegt der N-Terminus unter Bedingungen vor, die eine Reaktion der Thiolgruppe mit RM zu einem großen Teil verhindern oder stark verlangsamen. Beziehen direkte Wechselwirkungen zwischen Monomeren des Trimers den aminoterminalen Bereich ein, so ist deren Fehlen im reinen Monomer kein ausreichender Grund, um die Markierungseffizienz des Cysteins zu erhöhen.

Stromale und luminale Schleife scheinen im Modell nicht direkt an Berührungspunkten zwischen Monomeren beteiligt. Einzig denkbares Szenario für einen direkten Einbezug wäre ein Zustandekommen von Wechselwirkungen mit dem N-Terminus (im Falle der stromalen Schleife) bzw. C-Terminus (im Falle der luminalen Schleife) eines angrenzenden Monomeres.

Konformationsänderungen:

Ein wichtiger Gesichtspunkt zur Erklärung von Unterschieden zwischen Monomeren und Trimeren ist eine mögliche Strukturänderung, die im Zuge der Trimerisierung eintritt. Damit werden vielleicht Bedingungen geschaffen, die ein Verdecken, eine sterische Unzugänglichkeit oder Einführen anderer Umgebungseigenschaften für das Cystein bedeuten.

Es ist vorstellbar, dass der LHC-Komplex in einem Trimer eine sozusagen dichtere, kompaktere und starrere Packung erfährt als in einem Monomer. Die generell höhere Stabilität der Trimere unter den in Kap. 3.3 verwendeten Bedingungen deutet auf eine gewisse gegenseitige Stütze der drei Monomere. Beide Komplexformen zeigen einen Energietransfer von Chl b auf Chl a, was gerne als ein Zeichen für die Intaktheit der Komplexe gewertet wird. Auffällig ist dabei, dass bei Monomeren leicht ein sehr geringer Anteil an Chl b-Fluoreszenz auftaucht (vgl. auch Kap. 3.4.4). Ein Vorgang, der auf einen Zerfall eines kleinen Teils der Monomere hindeuten kann. Unterstelle ich einem Monomer eine generell in sich größere Beweglichkeit, so besteht für ein singuläres Cystein, das nicht gerade im Micelleninneren sitzt, eine größere Wahrscheinlichkeit, für die Maleimidgruppe des RM in irgendeinem Moment besser erreichbar zu sein als in der kompakten Faltung der Trimere. Diese sehr allgemein gefasste Erklärung stützt sich nicht auf spezifische Konformationsänderungen, wie sie zwischen Monomeren und Trimeren natürlich auch bestehen können. Konformere des Proteins schaffen zunächst einmal für die betroffene Region andere Bedingungen. Sie können unterschiedlich weite Bereiche betreffen, z.B. lediglich eine Neuausrichtung eines Aminosäurerestes bis hin zur Verlagerung einer ganzen Helix. Gerade in den beiden Schleifenregionen, die nicht die offensichtliche Monomer-Monomer-Grenzfläche bilden, ist eine Konformationsänderung als Grund der veränderten Reaktionsgeschwindigkeit gut vorstellbar. Die Bereiche der Schleifen stellen nicht eine sonst aufgabenlose Verbindung zwischen zwei Transmembranhelices dar, sondern tragen durchaus zur Stabilität und Pigmentbindung bei. Dies wurde von Heinemann (1999) gezeigt. Besonders

spannend sind spezifische Konformere des LHCII im Hinblick auf veränderte Funktionen von Monomeren und Trimeren. Etwa die Energieweiterleitung im Komplex könnte über eine Regelung in der Pigmentumgebung beeinflusst werden.

Konformere, deren Auftauchen nicht strikt an einen der beiden Zustände als Monomer oder Trimer gebunden ist, führen zu der Bildung von verschiedenen Populationen innerhalb der monomeren oder trimeren Form. So zeigt etwa V229Ch in seinem monomeren Zustand ein solches Verhalten, das auf verschiedene Konformere zurückgehen kann. Ein Teil der Cysteine nahe des C-Terminus, weniger als 1/3 der Monomere, lässt sich sehr schnell und gut durch die Maleimidgruppe des Farbstoffes erreichen. In dem Rest der Monomere liegt das Cystein, drei Aminosäuren vom C-Terminus entfernt, in einer nur noch schwer für die Reaktion mit dem Farbstoff zugänglichen Form vor. Die viertletzte Aminosäure des LHCII liegt in einem Bereich, dessen Lage unbekannt ist. Die Vermutung des Modells zeigt einen C-Terminus, der im Trimer eindeutig eine Kontaktstelle zum angrenzenden Monomer bildet. Bestätigt sich diese vorläufige Lokalisation, so muss der Carboxyterminus im Monomer eine andere Lage einnehmen, wenn er sich nicht frei vom Komplex wegrichten soll. Falls er im Monomer doch ausgestreckt ist, so ist eine sehr gute Zugänglichkeit eines Cysteins²²⁹ wahrscheinlich, genauso wie es ein Teil der Monomere ja zeigt. Die Schlussfolgerung bietet sich an, dass die Populationen zwei verschiedene Zustände abbilden: Einmal den ausgestreckten C-Terminus, wie er sonst im Trimer, dort allerdings in eine eigene Struktur eingebunden, vorliegt, und einen „rückgefalteten“ C-Terminus, der nur im Monomer auftaucht.

Pigmentausrüstung:

Eine Pigmentbestimmung der einzelnen LHC-Mutanten zeigte Unterschiede zwischen Monomeren und Trimeren auf. Trimere enthielten im Durchschnitt mehr Chlorophyll als Monomere. Für diese Tatsache sind verschiedene Ursachen denkbar: (a) Der Standard von zwei Luteinen, der der Berechnung des Pigmentgehaltes pro monomere Einheit zugrunde liegt, schwankt. (b) Ein schwacher Pigmentverlust, der während der Aufreinigung im Sucrosegradienten eintritt, ist im Trimer geringer als im Monomer. (c) Ein Trimer bindet, spezifisch oder unspezifisch, mehr Chlorophyllmoleküle als ein Monomer und der Unterschied ist keinem Verlust im Monomer zuzuschreiben. Ein einfaches Schwanken des Luteingehaltes ist als einzige Ursache unwahrscheinlich, da der „Verlust“ an Chlorophyll im Monomer beide Chlorophyllsorten unterschiedlich betrifft. Es verschwindet in allen Mutanten mehr Chl b als Chl a. Blicke noch ein tatsächlicher Pigmentverlust im Monomer durch die Aufreinigung oder eine zusätzliche Pigmentbindung im Trimer. Da einer Pigmentbestimmung immer eine vorherige Aufreinigung und Trennung des Rekonstitutionsgemisches vorangehen muss, ist es nicht möglich, zwischen diesen beiden Fällen zu unterscheiden. In der Kristallstruktur nach Kühlbrandt et al. (1994) wurden 12 Chlorophylle identifiziert. Die Monomere der LHC-Mutanten liegen mit ihrem Chlorophyllgehalt alle bei oder über 12 Chlorophyllen. Es steht nicht zu erwarten, dass sie einen Mangel in den zentralen Chl-Bindestellen und damit eine mögliche Änderung im Gefüge des Komplexes haben. Weitere

spezifische Bindestellen wurden bei Kühlbrandt et al. (1994) nicht angenommen, wenn auch eine unklare Struktur im Komplex auf aminoterminaler Seite besteht, deren Natur als assoziiertes Lipid, als Teil des Proteins oder als 13. Chlorophyll nicht näher festgelegt werden konnte.

Die Trimere der LHC-Mutanten zeigen untereinander eine geringere Schwankung. Der Chlorophyllgehalt liegt bei allen um 14. Wie oben erwähnt liegt nahe, dass 13. und 14. Chlorophyll unspezifisch assoziiert sind. Dennoch lässt sich eine Bevorzugung bestimmter Positionen nicht ausschliessen. Eine zusätzliche Pigmentausrüstung eines Trimeres könnte etwa zu der Stabilisierung einer Struktur durch Chlorophyll führen oder zu der Induktion einer Änderung in der Konformation. Ein Verdecken der Cysteine, die in Domänen der Membranoberfläche eingefügt wurden, durch Chlorophyll ist aufgrund der Hydrophobizität des Pigmentes weniger wahrscheinlich. Es wird sich eher in Micellen und in Kontakt zu lipophilen Bereichen des Proteins als im wässrigen Medium aufhalten.

Das Serin¹⁶⁰ ist nach Pichersky & Jansson (1996) Teil eines Motives zur Luteinbindung. Die Autoren identifizierten als gemeinsame Sequenzeigenschaft eine polare Aminosäure, umgeben von 4 unpolaren Resten. Der Vorschlag des Luteinbindungsmotives mit der Grundsequenz WFDPL dient als Anhaltspunkt zu Identifizierung möglicher Bindestellen in verschiedenen Lichtsammelproteinen, ist aber nicht als absolute Vorgabe zu verstehen. In der vorliegenden Sequenzgruppe SFDPL übernimmt das Aspartat den polaren Part. Das Serin dieser Sequenz fiel bei strikter Auslegung des Motives insofern heraus, als dass an seiner Position eine unpolare Aminosäure stehen müsste. Die Funktion der Luteinbindung erfordert eine Orientierung des Motives Richtung Komplexinneres, da die Luteine sich innerhalb der Membranebene befinden. Hierdurch wird eine Stellung impliziert, die sich zwischen Transmembranbereich und exponierten Regionen der Komplexoberfläche des LHCII befindet. Eine Störung der Luteinbindung in S160Ch durch die Mutation ist nicht offensichtlich. In einem Pigmentvergleich der einzelnen LHC-Mutanten verhält sich S160Ch nicht auffällig, so dass ein möglicher Einfluss des Cysteins auf die Luteinbindung nicht in einer Beeinträchtigung der weiteren Pigmentbindung zu Tage tritt.

4.1.3 Weitere Aspekte der einzelnen LHC-Mutanten

S3Ch

Der N-Terminus des LHCII konnte in seiner Struktur noch nicht näher aufgeklärt werden. Das Modell nach Kühlbrandt et al. (1994) verfolgt die Lage des Protein-Rückgrates erst ab der Aminosäure 26, einem Glycin. In diesem Anfangsstück des Proteins befinden sich dennoch wichtige Bereiche. Ein Großteil des N-Terminus ist zur Ausbildung von Monomeren nicht notwendig. Der Gedanke liegt nahe, dass ein bedeutender Teil seiner Aufgaben nicht in der Stabilität des Komplexes, sondern in der Interaktion mit der Umgebung, mit umliegenden Bereichen, zu suchen ist. Das kann die Wechselwirkung mit anderen Monomeren bei der

Trimerbildung sein, die Bindung von PG, die Abdissoziation von PSII und Anlagerung an PSI nach Phosphorylierung des LHCII oder auch die Wechselwirkung mit Komponenten der gegenüberliegenden Thylakoidmembran im Zuge der Grana-Stapelung.

Die Sequenz des N-Terminus ist der zwischen verschiedenen Lhcb1 am stärksten variierende Bereich. Als Gemeinsamkeit lässt sich in höheren Pflanzen das Vorhandensein von mehreren positiv geladenen Aminosäuren innerhalb der ersten 10 Aminosäuren feststellen, (2-3 Lysine (K) dazu ein Arginin (R)). Der Beginn des Proteins ist mit der Abfolge RK jeweils identisch. Eine stärkere Konservierung der Sequenz tritt erst ab der Position 14, einem Serin, ein, um dann im Trimerisierungsmotiv WYXXXR keine Abweichung mehr zu dulden. Die auffallende Konzentrierung der Lysine im Anfangsbereich legt den Schluss auf eine mögliche Funktion nahe. Diese vermutete Funktion könnte, wenn sie in verschiedenen Pflanzen auf ähnliche Weise ausgeübt wird, von einer exakten Sequenz und damit der Konservierung einer eng eingegrenzten Lage relativ unabhängig sein.

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
P07371	<i>Pisum sativum</i>	Lhcb1*2	R	K	S	A	T	T	K	K	V	A	S	S	G	S	P	W	Y	G	P	D	R	V	K	
P27490	<i>Pisum sativum</i>	Lhcb1*4	R	K	S	A	T	T	K	K	V	A	S	S	G	S	P	W	Y	G	P	D	R	V	K	
P04777	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lhcb1*1/2	R	K	T	V	A	K	P	K	G	P	-	S	G	S	P	W	Y	G	S	D	R	V	K	
P04778	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lhcb1*3	R	K	T	V	A	K	P	K	G	P	-	S	G	S	P	W	Y	G	S	D	R	V	K	
P13851	<i>Sinapsis alba</i>	Lhcb1*1	R	K	T	V	-	K	P	T	G	P	-	S	G	S	P	W	Y	G	S	D	R	V	K	
P04779	<i>Petunia sp.</i>	Lhcb1*8	R	K	T	V	T	K	A	K	P	V	S	S	G	S	P	W	Y	G	P	D	R	V	K	
P07369	<i>Lycopersicon esculentum</i>		R	K	T	A	T	K	A	K	P	A	S	S	G	S	P	W	Y	G	P	D	R	V	K	
P12333	<i>Spinacia oleracea</i>	Lhcb1*1	R	K	T	A	G	K	P	K	T	V	Q	S	S	S	P	W	Y	G	P	D	R	V	K	
P12469	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Lhcb1*3	R	K	T	A	S	K	A	K	P	V	S	S	S	S	P	W	Y	G	P	N	R	V	K	
P12470	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	Lhcb1*5	R	K	T	A	N	K	A	K	P	V	S	S	G	S	P	W	Y	G	P	D	R	V	K	
P27491	<i>Nicotiana tabacum</i>	Lhcb1*4	R	K	T	V	T	K	A	K	P	V	S	S	G	S	P	W	Y	G	P	D	R	V	K	
P27495	<i>Nicotiana tabacum</i>	Lhcb1*3	R	K	T	A	S	K	A	K	T	V	S	S	G	S	P	W	Y	G	P	D	R	V	K	
P27469	<i>Nicotiana tabacum</i>		R	K	T	V	T	K	A	K	P	L	S	S	G	S	P	W	Y	G	P	D	R	V	K	
P12471	<i>Glycine max</i>	Lhcb1*5-1	R	K	T	A	S	K	T	-	-	V	S	S	G	S	P	W	Y	G	P	D	R	V	K	
P04784	<i>Triticum aestivum</i>	Lhcb1*1	R	K	T	A	A	K	A	K	Q	V	S	S	S	S	P	W	Y	G	S	D	R	V	L	
P08963	<i>Hordeum vulgare</i>	Lhcb1*1	R	K	T	A	A	T	K	K	V	-	-	-	G	S	P	W	Y	G	P	D	R	V	K	
Q40065	<i>Hordeum vulgare</i>		R	K	T	A	A	K	A	K	Q	V	S	S	S	S	P	W	Y	G	A	D	R	V	L	
P12329	<i>Zea mays</i>	Lhcb1*2	R	K	T	V	G	K	P	K	V	A	A	S	G	S	P	W	Y	G	P	D	R	V	K	
P06671	<i>Zea mays</i>	Lhcb1*1	R	K	T	A	A	K	A	K	P	A	A	A	S	G	S	P	W	Y	G	P	D	R	V	L
P27497	<i>Zea mays</i>	Lhcb1*3	R	K	T	A	A	K	A	K	P	A	A	S	S	G	S	P	W	Y	G	P	D	R	V	L
Q00827	<i>Zea mays</i>		R	K	T	A	A	K	P	K	P	A	R	S	G	S	P	W	Y	G	A	D	R	V	L	
P12330	<i>Oryza sativa</i>	Lhcb1*1	R	K	T	A	A	K	P	K	P	A	A	S	S	G	S	P	W	Y	G	A	D	R	V	L

Abb. 4.1 Alignment des N-Terminus von Lhcb1 aus verschiedenen höheren Pflanzen

Das Alignment stellt die Proteinsequenzen verschiedener dicotyler und monocotyler Pflanzen gegenüber. In der ersten Spalte stehen die Zugangsnummern der Proteindatenbank des EMBL. Die Bezeichnung der einzelnen Lhcb1-Gene folgt Jansson et al. (1992), Referenzen siehe dort. Die Nummerierung über den Aminosäuren bezieht sich auf Lhcb1*2 von *Pisum sativum*. Grau unterlegt sind die basischen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K).

Die Lage der positiven Aminosäuren verdient näherer Betrachtung. Sie liegen in zwei „Clustern“ in einem Abstand von 3-4 Aminosäuren. Dies ist ein Abstand, durch den sie bei

Ausbildung einer α -helicalen Struktur in unmittelbare Nähe gebracht würden. Aufgrund der Abstossung zwischen mehreren positiven Ladungen ist eine solche Struktur im unveränderten Protein weniger wahrscheinlich. Durch eine Phosphorylierung in unmittelbarer Nachbarschaft dagegen könnte die negative Phosphatgruppe diese Abstossung aufheben und durch eigene elektrostatische Wechselwirkungen ersetzen. In der Folge wäre eine α -helicale Struktur nun denkbar, ein Gedanke, der schon von Allen (1992) beschrieben wurde. Bei Nilsson et al. (1997) wird in dem Modellsystem eines Peptidabschnittes, der die Sequenz des LHCII-Aminoterminus trägt, von einer Strukturveränderung nach Phosphorylierung berichtet, die in dieser Richtung liegt.

Die Position 3 liegt mitten zwischen den konservierten positiven Ladungen und ist im Falle einer durch sie erreichten Struktur immer betroffen. Die positive Ladung der Lysine lässt leicht an eine Assoziation mit negativen Aminosäuren oder der negativen Kopfgruppe eines Lipides denken. Die zur Trimerisierung essentielle PG-Bindestelle scheint zwar weiter im Protein zu liegen, eine schwächere Assoziation weiterer Lipide ist zusätzlich möglich. Ist diese Bindung nicht essentiell zur Stabilität und schwach genug, um bei einer Aufreinigung ausgewaschen zu werden, so wird sie in einer Stöchiometrie nur schwerlich auftauchen. Bei entsprechend schonender Aufarbeitung könnten in diesem Bereich assoziierte Lipide eine Markierung des Cysteins³ behindern.

S106Ch

Das Serin des muren LHCP an Position 106 liegt in einem Bereich der luminalen Schleife, der im Modell nach Kühlbrandt et al. (1994) nicht näher aufgelöst werden konnte. Die trotzdem eingezeichnete Lage in Abb. 4.3 kann daher als eine Spekulation angenommen werden. Das Serin¹⁰⁶ wurde zur Mutation ausgewählt, da es in der Vorhersage im Modell in Richtung Lumen exponiert scheint. Eine gewisse Exponiertheit konnte durch die Ergebnisse in Kap. 3.3.2 bestätigt werden. Das an dieser Stelle plazierte Cystein wurde in den Zugänglichkeitsuntersuchungen im Monomer insgesamt am besten erreicht. Zusätzlich ist die Neigung, mit anderen LHCII-Komplexen oder Apoproteinen Disulfidbrücken zu bilden, sehr stark. Dies ging in Kap. 3.3.1.1 so weit, dass sich in Saccharosedichtegradienten ohne Reduktionsmittel fast die gesamte Trimerbande verschob und schwerer wurde. Bei der im Modell angenommenen exponierten Lage eines Cystein¹⁰⁶ ist es denkbar, dass sich Disulfidbrücken zwischen Trimeren ohne sterische Hinderung ausbilden können. Dies würde die sehr weit nach unten verlagerte Trimerbande von S106Ch in einem Saccharosedichtegradienten ohne Reduktionsmittel erklären. Nicht ganz in das Bild der Exponiertheit und vom Komplex wegdeutenden Ausrichtung passt das Verhalten von S106Ch bei der Rekonstitution und Trimerisierung von schon mit RM vormarkiertem Protein. In einer Einzelmessung wurde dies in Kap. 3.4.4 getestet. Wenn ein Trimer tatsächlich in der Lage ist, an Position 106 mit einem anderen Trimer eine Disulfidbrücke einzugehen, so sollte doch ein Farbstoff an dieser Stelle einer Trimerbildung nicht im Wege stehen. Es zeigte sich aber, dass

S106Ch eine leichte Verschlechterung der Trimerausbeute im Verhältnis zur Monomerausbeute aufwies. Vielleicht ist dies ein Hinweis auf eine vergleichsweise hohe Beweglichkeit dieses LHCII-Abschnittes. Durch sie könnte der Farbstoff in eine Lage kommen, die eben doch die Trimerbildung behindert. Die fehlende Auflösung in der Kristallstruktur nach Kühlbrandt et al. (1994) spricht für eine Unordnung oder zumindest nicht einheitliche Ordnung dieses Abschnittes. Die postulierte Beweglichkeit kann die Position eines Cystein¹⁰⁶ in die Richtung der Monomer-Monomer-Grenzfläche eines Trimeres bringen. Eine Veränderung dieser Grenzfläche durch ein angeheftetes RM würde ja gerade stören. Auf diese Weise muss die Bewegungsfreiheit aber keinen negativen Einfluss auf die Reaktion des freien Cysteins mit RM im Monomer nehmen. Erst im Trimer würde eine sterische Hinderung der Zugänglichkeit durch ein zweites Monomer an dieser Grenzfläche geschaffen.

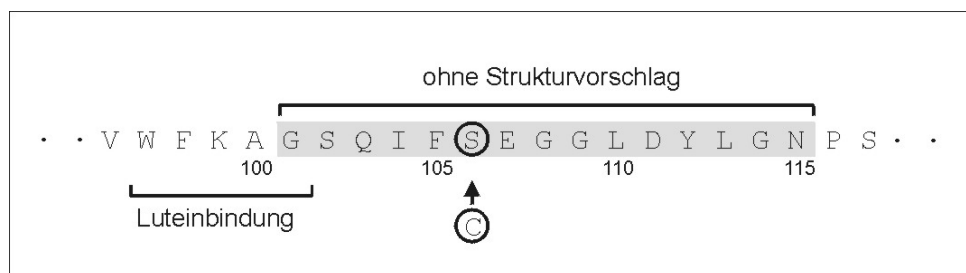


Abb. 4.2 Sequenzausschnitt des LHCII: Lage der Position 106

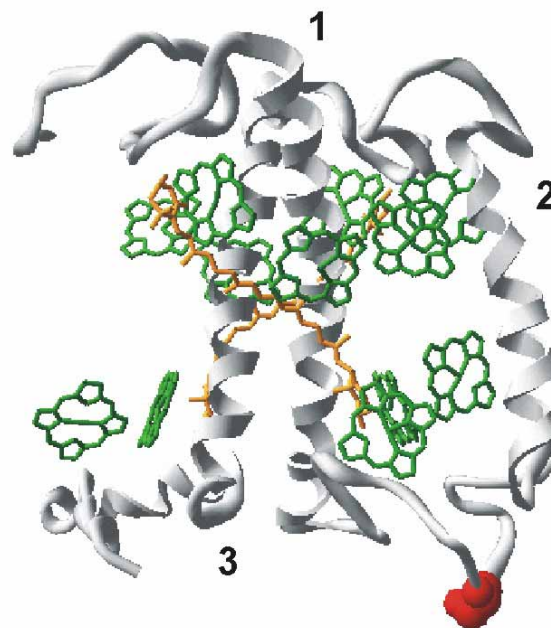


Abb. 4.3 Modell des LHCII mit hervorgehobenem Serin an Position 106

Die Transmembranhelices 1, 2 und 3 sind gekennzeichnet. Zur Erstellung der Bilder wurde „Swiss pdb viewer“ v3.51 benutzt.

S160Ch

Die stromale Schleife konnte im Strukturmodell nach Kühlbrandt et al. (1994) ganz nachgezogen werden. Die Position 160 ist weniger exponiert eingezeichnet als das Serin¹⁰⁶ der luminalen Schleifenregion. Diese „Verborgtheit“ drückt sich auch im Reaktionsverhalten für RM aus. Der Farbstoff reagiert langsamer, kann aber, ähnlich wie bei S106Ch, mit einem zunächst fast linearen Anstieg das Cystein der Komplexe erreichen. Ganz anders sieht es mit der Verbindung eines gefalteten Komplexes zu anderen großen Komplexen oder Apoproteinen des LHCII aus. Die LHC-Mutante S160Ch zeigt keine Neigung untereinander Disulfidbrücken auszubilden (Kap. 3.3.1.1). Das Serin¹⁶⁰ scheint in einer Art Tasche zu liegen, die dem Medium zwar zugänglich ist, aber einen gewissen sterischen Ausschluss schafft. Der Cysteinrest eines zweiten Komplexes ist insgesamt kürzer als der Spacer von RM, das Protein voluminöser als der Farbstoff, so dass zwei Thiol-Gruppen womöglich sterisch nicht zueinander gelangen können, anders als Thiol- und Maleimid-Gruppe. Möglicherweise kommt zu diesem räumlich begrenzenden Aspekt der Position auch eine hydrophobe Beschaffenheit der lokalen Umgebung. Sie würde die Reaktivität eines Cysteins an dieser Stelle zusätzlich herabsetzen. Dafür spricht, dass sich rund um die Position sehr viele hydrophobe Aminosäuren befinden.

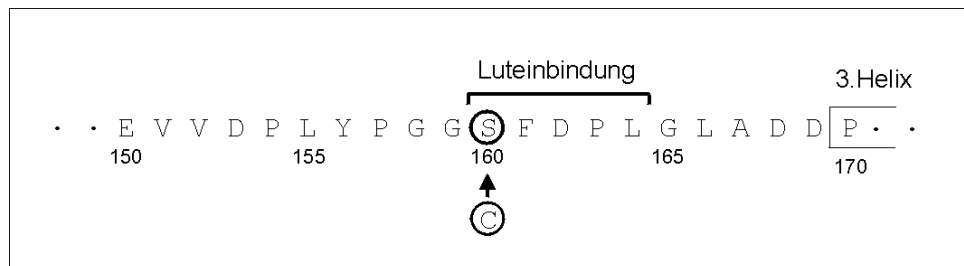


Abb. 4.4 Sequenzausschnitt des LHCII: Lage der Position 160

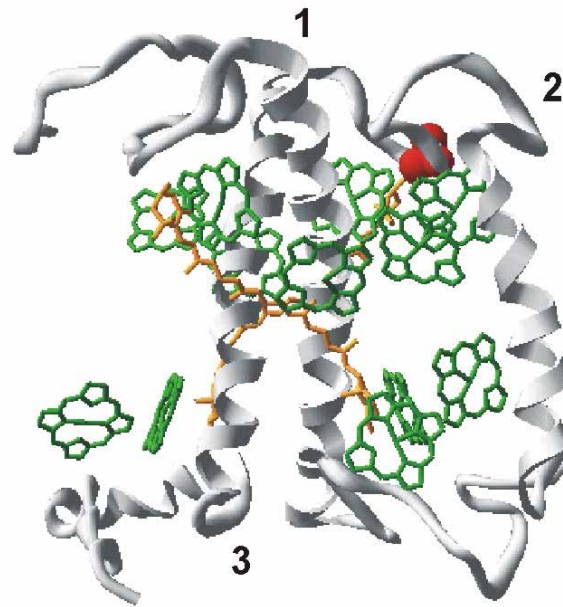


Abb. 4.5 Modell des LHCII mit hervorgehobenem Serin an Position 160

Die Transmembranhelices 1, 2 und 3 sind gekennzeichnet. Zur Erstellung der Bilder wurde „Swiss pdb viewer“ v3.51 benutzt.

V229Ch

V229Ch weist als Auffälligkeit die in Kap. 4.1.2 erwähnten zwei Monomer-Populationen auf, von denen eine sehr gut, die andere sehr schlecht mit RM reagiert. Es gibt einen weiteren Hinweis, dass zumindest ein Teil der C-Termini sehr gut erreichbar ist. Offensichtlich können sich Disulfidbrücken zwischen gefalteten Komplexen mit freiem LHCP und/oder weiteren Komplexen bilden (Kap. 3.3.1.1). Die Lage des Cysteins drei Aminosäuren vom C-Terminus entfernt scheint es sterisch zu erlauben, dass zu einem anderen so großen Komplex eine Verbindung geknüpft wird. Anders als bei S106Ch ist die Trimerbande von V229Ch in einem Saccharosedichtegradienten ohne Reduktionsmittelzusatz durch die Derivatisierung mittels Disulfidbrücken über einen weiten Bereich verschmiert, nicht aber ganz verschoben. Diese Tatsache deutet an, dass sich zwar Bindungen zu einzelnen Apoproteinen oder Monomeren auch von Trimeren aus ausbilden können, wahrscheinlich weniger häufig erscheinen dagegen Disulfidbrücken zwischen Trimeren.

4.1.4 Ausblicke

4.1.4.1 Ausweitung auf weitere Zustände des LHCII

Ziel der Zugänglichkeitsuntersuchungen war, Unterschiede zwischen Monomeren und Trimeren aufzuzeigen. Diese Fragestellung kann auf andere Zustände des LHCII übertragen

werden. Zu nennen ist dabei z.B. eine Betrachtung von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Komplex. Die Phosphorylierung ist ein Regulationsmechanismus, bei dem sich außer der Einbringung der geladenen Phosphatgruppe auch eine bis jetzt in ihrem Ausmaß nur vermutete Strukturänderung im LHCII vollzieht. Eine Phosphorylierungsstelle wurde mit Threonin⁵ nahe dem N-Terminus identifiziert. Es ist möglich, dass bei einer Umlagerung des Aminoterminus weitere Bereiche der stromalen Seite des LHCII betroffen sind. So ist nicht nur eine Markierung von S3Ch ohne und mit Phosphorylierung interessant, sondern auch von S160Ch unter denselben Bedingungen.

Die integrale Position der Pigmente im LHCII lässt erwarten, dass eine Veränderung des Pigmentgehaltes Auswirkungen auf die Struktur und Konformation des gesamten Komplexes nehmen kann. Ein Beispiel, das unter diesem Aspekt untersucht werden kann, ergeben Monomere, die mit unterschiedlichen Xanthophyllen rekonstituiert wurden.

Das Lipid PG ist zur Trimerisierung notwendig und deshalb in allen Ansätzen der Zugänglichkeitsuntersuchungen dieser Arbeit vorhanden. Eine spezifische Bindung von PG schon im Monomer wird vermutet. Hinweise darauf könnte eine LHCII-Mutante geben, die ein singuläres Cystein enthält, das geschickt neben die Bindestelle des Lipides plaziert wurde. Der Vergleich einer Markierung von Monomeren, die einmal mit und einmal ohne PG im Ansatz rekonstituiert wurden, sollte mit PG eine schlechtere Markierungsausbeute ergeben. Diese Erwartung resultiert daraus, dass das Cystein bei richtiger Positionierung durch PG verdeckt werden kann.

Von Zer et al. (1999) wird eine nach Belichtung verbesserte Zugänglichkeit des N-Terminus für Phosphorylierung oder Trypsinverdau berichtet. Es wäre interessant zu untersuchen, ob dies für die Zugänglichkeit des Cysteins in S3Ch für einen Farbstoff ebenfalls gilt. Denkbar ist auch die Konstruktion einer neuen LHCII-Variante mit singulärem Cystein direkt an der Schnittstelle der Protease Trypsin oder an der Phosphorylierungsstelle (wahrscheinlich Threonin⁵; Allen, 1992), da hier ein Einfluss der Belichtung auf die Struktur am wahrscheinlichsten gegeben ist. Um die Strukturänderung im Komplex zu beobachten, macht ein anderer Ansatz mit eben dieser konstruierten LHC-Mutante Sinn. Die Ergebnisse aus Kap. 3.4.3 und 3.4.4 legen nahe, dass es einen Einfluss der Proteinfaltung auf die Rhodamin-Fluoreszenz eines angekoppelten RM gibt. Im intakten Komplex ist die RM-Fluoreszenz weitgehend gelöscht, mit einsetzender Denaturierung steigt sie an. Es ist nun denkbar, dass schon ein „Aufrichten“ der Farbstoff-tragenden Struktur zu einer Erhöhung der sichtbaren Rhodamin-Fluoreszenz führt. Mit dem Wort „Aufrichten“ wird die Vermutung beschrieben, dass die durch Licht induzierte Strukturänderung im LHCII ein Herausragen und Exponieren eines Proteinabschnittes hervorruft. Auf diese Weise würde sowohl die direkte Proteinumgebung eines dort gebundenen RM aufgehoben, als auch ein größerer Abstand zwischen Farbstoff und Pigmente gebracht. Möglicherweise reicht dies schon aus, um die Fluoreszenzlöschung von RM zu verringern. Das bedeutet, mit Belichtung des LHCII sollte auch die RM-Fluoreszenz ansteigen. Dieser Versuch erfordert, dass der Farbstoff durch die Belichtungsintensität nicht beschädigt wird. Der Vorgang des „Aufrichtens“ ist nach Zer et al.

(1999) reversibel. Eine Zunahme der RM-Fluoreszenz im Licht sollte demnach im Dunkeln langsam wieder zurückgehen, um schließlich den Ausgangsstand der Fluoreszenzlöschung zu erreichen.

4.1.4.2 Methodische Variationen

Markierungssubstanz

Die Zugänglichkeitsuntersuchungen dieser Arbeit verwenden den Farbstoff RM zur Markierung. Um die Beobachtungen nicht nur von den Eigenschaften einer Markierungssubstanz abhängig zu machen, lassen die Versuche sich ohne Weiteres variieren. Einem Einsatz einer größeren Bandbreite an Fluoreszenzfarbstoffen ohne einer großen Protokolländerung in der Methode steht nichts entgegen. Wie schon in Kap. 4.1.1 ausgeführt beeinflusst die Farbstoffwahl unweigerlich das Ergebnis. Womöglich wäre das Cystein in S160Ch ohne den kurzen C₂-Spacer des RM schwerer oder gar nicht erreichbar oder ein Aminoterminus ohne positive Ladungen in S3Ch mit RM besser markierbar. Diese Fragen lassen sich erst in weiteren Versuchen beantworten. Variierende Ergebnisse könnten Hinweise auf ein neue und genauere Sicht geben. Auf diese Weise würde verhindert werden, einem - aus welchem Grund auch immer - bei nur einer Substanz auftauchenden Phänomen nachzugehen.

Detektion

Der Nachweis des Protein-gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes erfordert die Abtrennung von freiem Farbstoff sowie von Pigmenten des LHCII-Komplexes. Dieser Schritt wird in dieser Arbeit durch eine denaturierende Gelelektrophorese erreicht. Die Auswertung über Fluoreszenzbanden zeigt leider leicht vergleichsweise große Streuungen, u.a. aufgrund von schwankendem Hintergrund und Unregelmäßigkeiten im Gellauf. Aus diesem Grund ist ein guter Ansatzpunkt zur Verfeinerung der Methodik die Detektion der Markierung.

Ein völlig anderer Ansatz ist das Immobilisieren des denaturierten Proteins auf einer Oberfläche, etwa in der Vertiefung einer Mikrotiterplatte. Durch den Hexahistidylrest der LHC-Mutanten ist dies bei einer Beschichtung der Oberfläche mit z.B. Ni-NTA möglich. Gelingt ein Immobilisieren quantitativ und kann ein Waschen der Probe in der Mikrotiterplatte ohne großen Proteinverlust durchgeführt werden, so ist eine anschließende Detektion des gebundenen Farbstoffes spektroskopisch über Fluoreszenz oder eventuell gar Absorption möglich. Eine Schwierigkeit ist das in dieser Arbeit in jedem Markierungsansatz vorhandene Reduktionsmittel. Es kann über eine Reduktion der Nickelionen eine korrekte Immobilisierung verhindern. Inwieweit es tatsächlich stört, muss ausgetestet werden. Außerdem wird zur Denaturierung der Komplexe das Detergens SDS benötigt, um eine Aggregation des Proteins zu verhindern. Mit Dodecylsulfat-haltigem Puffer aber wurde auf der Nickel-Chelat-Säule ein Auswaschen von LHC-Protein beobachtet, so dass keine vollständige Bindung einer Proteinprobe möglich war. Diese beiden Punkte, Reduktionsmittel und Detergens, sind nicht ohne weiteres aus dem Protokoll zu entfernen. Das Potential, sie

soweit zu reduzieren, dass eine spektroskopische Quantifizierung möglich wird, muss für jedes Protein geprüft werden. Ein Verringern des Reduktionsmittels TCP erscheint zumindest bei einem Teil der LHC-Mutanten realistisch, da S3Ch und S160Ch weniger zu Disulfidbrücken neigen.

Zur genauen Beobachtung des Zeitverlaufes einer Markierung ist eine Reaktion vorteilhaft, deren Produkt eine neue spektroskopische Eigenschaft aufweist, etwa das Auftauchen von Fluoreszenz oder Absorption. Über diese Eigenschaft kann die stattfindende Reaktion im Markierungsansatz zeitgleich mit der Markierung nachgewiesen werden. Die oben erwähnte Aufreinigung des markierten Proteins von freiem Farbstoff ist nicht nötig. Im Falle des LHCII kann ein solches System über einen weiten Wellenlängenbereich nicht genutzt werden, da die Komplex-eigene Absorption und Fluoreszenz zu stark ist. Hinzu kommt die Möglichkeit eines Energietransfers vom Farbstoff auf Pigmente des LHCII, so dass eine Farbstofffluoreszenz unter Umständen gar nicht erst sichtbar wird. Kann ein Detektionssystem gefunden werden, dessen Absorption sich in ihrer Intensität vom LHCII ausreichend abhebt oder dessen Fluoreszenz oberhalb 700-750 nm liegt, so kann auch bei dem pigmentierten Komplex des LHCII eine Markierung spektroskopisch verfolgt werden.

Eine andere spektroskopische Methode, die im Hinblick auf die Beweglichkeit von Gruppen oder ihrer Zugänglichkeit erfolgsversprechend ist, ist die Elektronenspinresonanz (ESR). So wurde z.B. mit ihrer Hilfe von Langen et al. (1998) ein Annexin untersucht. Außer den bekannten Formen eines löslichen Monomeres und eines an der Membran assoziierten Trimeres wurde ein weiterer Zustand gefunden, der in der Membran inseriert ist und dessen Auftauchen mit einer starken Änderung der Struktur verbunden ist. Die ESR beobachtet die Absorption von Mikrowellen durch paramagnetische Substanzen. Als Spin-Sonden werden stabile organische Radikale in Proteine eingebracht, z.B. Nitroxide. Ihre Reaktion auf Umgebungsveränderungen oder ihre Erreichbarkeit für Ascorbinsäure, die Nitroxide reduziert, können im Spektrum abgelesen werden. Diese Methode hätte für den LHCII den Vorteil, dass keine Interferenz mit der Eigenabsorption des Komplexes zu erwarten ist. Inwieweit das Einbringen eines Radikales durchführbar ist und ob dieser Wechselwirkungen mit den Pigmenten ausübt, muss bei konkreten Versuchen eingegrenzt werden.

Die Nutzung der singulären Cysteine kann auch auf eine andere Weise als der Markierung mit einem Farbstoff erfolgen. Ein Biotinmaleimid etwa bietet die Möglichkeit einer Aufreinigung und Selektion eben über die eingefügte Biotingruppe. Ein Ablauf könnte so aussehen: Der markierte Komplex wird denaturiert und über seine Biotingruppe an eine Säule mit immobilisiertem Avidin gebunden. In diesem Fall stört das Reduktionsmittel des Ansatzes nicht, anders als bei einer Nickel-Chelat-Säule. Nach einigen Waschschrritten wird mit freiem Biotin eluiert und eine Quantifizierung erfolgt direkt über das Elutionsprofil, das bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgenommen wird.

Ein völlig anderer Ansatz würde erneut die Existenz singularer Cysteine nutzen. Bei Cai et al. (2001) wird die spezifische Einführung von durch Licht aktivierbaren quervernetzenden Gruppen („photoactivatable crosslinker“) in Rhodopsin beschrieben. Mit spezifischer Einführung ist die Reaktion mit singulären Cysteinen des Rhodopsins gemeint. Die „Crosslinker“ sollen dort nach Aktivierung eine kovalente Bindung zu dem Liganden Transducin ausbilden und so Auskunft über die relative Lage des singulären Cysteinrestes zu Transducin geben. Das Besondere an der beschriebenen Methode ist, dass nicht nur die Aussage getroffen wird, dass eine Reaktion stattgefunden hat, sondern im weiteren Verlauf mittels Massenspektrometrie derjenige Peptidabschnitt des Liganden identifiziert werden kann, der die Quervernetzung trägt. Eine entsprechende Adaption für den LHCII könnte sich mit LHC-Mutanten befassen, die ein singuläres Cystein nahe des N-Terminus tragen, z.B. S3Ch. Falls eine spezifische Vernetzung im Komplex nachgewiesen werden kann, ließe sich ein Bereich möglicher Wechselwirkungen eingrenzen. Auf diese Weise ist eine Aussage über die noch unbekanntene Lage des N-Terminus im Komplex denkbar.

Der Crosslinker von Cai et al. (2000) enthält am einen Ende eine Dithio-Gruppe zur Reaktion mit Cystein, sowie am anderen Ende eine Gruppierung, die nach Photoaktivierung in ein reaktives Nitren übergeht. Eine Adaption des Schemas auf den LHCII könnte folgendermaßen aussehen: Das Apoprotein einer LHC-Mutante mit singulärem Cystein nahe N-Terminus, z.B. S3Ch, wird mit dem fraglichen „Crosslinker“ versehen, rekonstituiert und als Monomer bzw. Trimer aufgereinigt. Die Quervernetzung wird durch Photoaktivierung ausgelöst. Anschließend wird der über eine Disulfidbrücke mit dem Cystein verbundene Crosslinker durch ein Reduktionsmittel wie β -Mercaptoethanol vom Cystein gelöst. Die entstandenen SH-Gruppen von Cystein und Crosslinker werden mit einem Biotin-Maleimid versehen, der intakte Komplex anschließend mit Trypsin verdaut. Dies sollte in einem noch intakt gefalteten Trimer lediglich 8 Aminosäuren des N-Terminus abspalten und damit das mit Biotin versehene Cystein abtrennen. Eine Bindung der Komplexe danach über das His₆-Motiv an eine Ni²⁺-Chelatsäule erlaubt das Abwaschen des abgetrennten N-Terminus. Die Elution der Proteine und eine Denaturierung folgen, ein zweiter Trypsinverdau zerlegt das Protein in Peptide. Das oder die Peptide, die über den Crosslinker das Biotin tragen können herausgefischt werden und werden einer massenspektroskopischen Bestimmung unterzogen. Sollte eine Auftrennung verschiedener Peptide (so die Biotin-tragenden Peptide von Cystein und Crosslinker) auch über eine Affinitätssäule, FPLC etc. effektiv stattfinden können, so würden einige Schritte wegfallen. Es müsste nur ein einziger Trypsinverdau durchgeführt werden, der direkt nach der Markierung mit Biotinmaleimid und Denaturierung der Komplexe stattfindet. Aus den resultierenden Peptiden werden die biotinylierten Peptide mittels Avidinsäule herausgefischt und nach der Elution über eine weitere Säule in Fraktionen getrennt. Falls die Quervernetzung an verschiedenen Punkten des stromalen LHCII stattgefunden hat, ist auf diese Weise die Chance größer, einzelne Peptide zu erhalten. Dass der Aminoterminus mehrere Stellungen einnimmt und somit die Crosslinker-Reaktion an verschiedenen Stellen eintritt, ist durchaus möglich.

4.1.5 Das Rekonstitutionsverhalten der LHC-Mutante S52Ch

Bei der Konstruktion der LHC-Mutanten mit singulärem Cystein wurde darauf geachtet, mit der Cysteingruppe nur eine möglichst geringe Veränderung in das Protein einzubringen. Das bedeutete bei den meisten Mutanten ein Austausch einer OH-Gruppe eines Serins gegen die SH-Gruppe eines Cysteins. Umso erstaunlicher ist der drastische Effekt dieses Austausches auf das Protein von S52Ch, das zwar Monomer- aber keine Trimer-Bildung zeigt. Das Cystein an Position 52 befindet sich kurz vor der ersten Transmembranhelix. Dieser Bereich ist für die räumliche Organisation eines Trimers vergleichsweise wichtig und sensibel. Hier stoßen die drei Monomere in der Mitte des Trimers aneinander. Diese Region vor dem ersten Membrandurchgang aus jedem Monomer umfasst oder begrenzt den Mittelpunkt eines trimeren Komplexes. In dem Strukturmodell nach Kühlbrandt et al. (1994) befindet sich die Position 52 quasi in einer Beugung, dessen Seite zu der Mitte eines Trimers gerichtet ist. Diese ergibt eine Biegung, deren Veränderung in ihrem Winkel einen verhältnismäßig drastischen Effekt auf das Zusammenpassen der drei Untereinheiten nehmen könnte. Wird dieser Winkel größer, erhalten die Komplexe an dieser Stelle eine breitere, aufgebeulte Form, die ein korrektes Aneinanderlagern der Monomere verhindert und die Symmetrie des Homotrimeres zunichte macht.

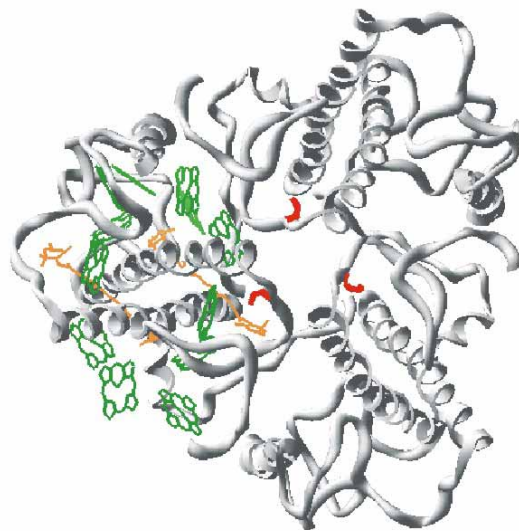


Abb. 4.6 Modell des LHCII mit gekennzeichnetem Serin an Position 52

Der Blick auf das Trimer erfolgt vom Stroma auf die Membran. Pigmente sind nur für ein Monomer dargestellt. Die Serine an Position 52 wurden rot eingezeichnet. Zur Erstellung der Bilder wurde „Swiss pdb viewer“ v3.51 benutzt.

Die LHC-Mutante D7PH11 nach Kosemund (1999) trägt ein zusätzliches Motiv aus 6 Histidinen zwischen Alanin⁵³ und Aspartat⁵⁴. Insertionsexperimente in Thylakoidmembranen zeigten mit D7PH11 das Auftauchen von Monomeren, nicht aber von Trimeren. Während diese LHC-Mutante den doch recht großen Einschub von 6 Histidinen besitzt, wurde in den LHC-Mutanten D54V und D54A (Standfuß, 2000) das Aspartat an Position 54 gegen Valin bzw. Alanin nur ausgetauscht. Der Wechsel des geladenen Aspartat gegen ein unpolares Valin, dessen Seitenkette einen ähnlichen Raum wie Aspartat einnimmt, lässt eine Trimerisierung noch zu, wenngleich die Trimere instabiler werden. Ein Austausch an dieser Stelle zu einem kleineren Alanin ergibt dagegen den Verlust der Trimerisierungsfähigkeit. Besteht in D7PH11 der voluminöse Einschub von 6 Histidinen, der außer einem zusätzlichen Volumen auch eine Verschiebung der Elemente des N-Terminus und des restlichen Proteins relativ zueinander mit sich bringen kann, so findet die Änderung in D54A auf einer anderen Ebene statt. Beide LHCII-Mutanten zeigen, dass der Bereich vor dem stromalen Ende der 1. Helix für die Trimerisierung sensibel ist.

Ein anderer Erklärungsansatz berücksichtigt die Eigenschaft von Cysteinen, Disulfidbrücken zu bilden. Durch die Aneinanderlagerung von Monomeren auf dem Weg der Trimer-Bildung werden die SH-Gruppen an Position 52 in starke räumliche Nähe gebracht. Eine Verbindung zu einer Disulfidbrücke ist bei entsprechend guter Zugänglichkeit ein denkbarer Schritt. Werden durch eine solche kovalente Bindung die zwei Monomere in eine Lage gebracht, die eine stabile Anlagerung eines dritten Monomeres verhindert, so ist die Bildung eines Trimeres nicht mehr möglich. Dieser Vorgang sollte durch die Zusetzung eines Reduktionsmittels durchbrochen werden, um dann die korrekte Zusammenlagerung zu einem Trimer möglich zu machen. Die Bildung von Trimeren erfolgt in der Methode auf der Ni²⁺Chelat-Säule. Hier ist der Einsatz eines Reduktionsmittels nur in Grenzen gestattet. Es besteht die Gefahr der unerwünschten Reduktion des zweiwertigen Nickels und damit der Zerstörung der immobilisierten Phase. Die Trimerisierungsmethode verwendet eine geringe Konzentration an β -Mercaptoethanol in der Rekonstitution, alle Wasch- und Elutionspuffer der Säule sind jedoch Reduktionsmittel-frei, um selbiges nicht in eine Markierung zu verschleppen. Um zu testen, ob das am Anfang dieses Absatzes beschriebene Erklärungsmodell greift, wäre folgendes zu empfehlen: Reduktionsmittel muss während der Trimerbildung anwesend sein, also im Elutionspuffer. Hier kann die Konzentration ruhig hoch gewählt werden, da die Intaktheit der Nickelphase in diesem Schritt nicht mehr von Belang ist.

Hinweise für Disulfidbrücken zwischen S52Ch-Proteinen gibt es durchaus. Eine sehr leichte Verschmierung der Monomerbande im Sucrosegradienten tauchte auf, auch Extrabanden in einem nativen Gel (Storf, 2001), die auf Disulfidbrücken hindeuten, doch ist ihre Konzentration im Vergleich zu der postulierten rigorosen Verhinderung der Trimerisierung erstaunlich niedrig. Der Einsatz von TCP im Sucrosegradienten veränderte das Bandenmuster nicht, jedoch ist für den Prozess der Trimerbildung dieser Zeitpunkt der Reduktionsmittelzugabe zu spät gewählt.

Wenig bekannt ist über die Mitte eines Trimeres, den Ort, der von den drei Monomeren eingegrenzt wird. Das Strukturbild nach Kühlbrandt et al. (1994) gibt keinen Aufschluss darüber. Möglich wäre das Vorhandensein eines assoziierten Elementes, wie ein Lipid. Dann könnte das Serin⁵² Teil eines Bindemotives sein. Als mögliche Bindestelle für das Lipid PG, das für eine *in vitro*-Trimerisierung notwendig ist, wird ein Bereich nahe des N-Terminus, das in der Einleitung erwähnte Trimerisierungsmotiv, diskutiert (Hobe et al., 1995). Es wäre durchaus denkbar, dass sich die N-Termini mit dem vermuteten Bindemotiv für PG Richtung Mitte eines Trimeres lagern und das Lipid dort seiner Trimer-stabilisierenden Funktion nachkommt.

Über eine mögliche Erklärung für die fehlende Trimerbildung von S52Ch kann hier nur gemutmaßt werden. Die Region um Serin an Position 52 ist in Lhcb1, sowie in Lhcb2 und Lhcb3, in höheren Pflanzen stark konserviert (Pichersky & Jansson, 1996). Das Ersetzen einer OH-Gruppe durch eine SH-Gruppe wird als vergleichsweise schonender Austausch angesehen, so dass keine großen Veränderungen in der Proteinstruktur erwartet wurden. Cystein ist in seiner Größe und seinen Eigenschaften diejenige Aminosäure, die Serin am ähnlichsten erscheint. Die Thiolgruppe ist etwas größer als eine Hydroxylgruppe sowie leichter polarisierbar.

Die Aminosäure Serin kommt vergleichsweise häufig in Helix-End-Strukturen vor (Kumar & Bansal, 1998), das Auftauchen von Cystein dagegen ist relativ gleichmäßig über eine Helix verteilt. Serin ist eine der wenigen Aminosäuren, die in der Lage ist, mit seiner Seitenkette eine Wasserstoffbrückenbindung mit einer Carbonylgruppe des Proteinrückgrates einzugehen. Dieser Umstand wird häufig in Zusammenhang mit der N-terminalen Beendigung einer Helix genannt, da durch diese Wasserstoffbrücke eine Carbonylgruppe, die sich noch innerhalb der Helix befindet und an deren Ende keinen Bindungspartner mehr hätte, nicht ohne Partner bleibt. Auch von Cystein wurden Wasserstoffbrücken zu einer Carbonylgruppe des Proteinrückgrates in Helices berichtet (Popot & Engelman, 2000). Die erste Transmembranhelix des LHCII wird in der Struktur nach Kühlbrandt et al. (1994) allerdings recht deutlich durch ein Prolin in Richtung N-Terminus begrenzt. Es erscheint unwahrscheinlich, dass der Austausch von Serin gegen Cystein eine Verlängerung der helicalen Struktur und damit eine Verschiebung der räumlichen Verhältnisse mit sich brächte. Im Strukturbild nach Kühlbrandt et al. (1994) ist die Hydroxylgruppe des Serins⁵² nicht in die Trimermitte gerichtet, sondern in das Innere des eigenen Monomeres. Danach käme der ursprüngliche Serinrest in Kontakt mit dem Tyrosin³⁵ und/oder dem Phenylalanin⁵⁸, zwei ebenfalls stark konservierten Aminosäuren. Es ist denkbar, dass der Sauerstoff des Serins auf die aromatischen Ringe der beiden Aminosäuren wirkt. Eine ähnliche Form der Wechselwirkung mit aromatischen Systemen wird auch von Cysteinen zur Stabilisierung innermolekularer Strukturen beschrieben (Viguera & Serrano, 1995). Es ist durchaus zu erwarten, dass das eingewechselte Cystein diese Aufgabe des Serins⁵² ausüben kann und

damit von dieser Sicht aus keine Turbulenzen in die LHCII-Struktur bringt. Es sei denn, dieser Bereich ist so sensibel, dass durch Cysteingröße und –Polarisierbarkeit geringe Ausdehnungs- und Lageänderungen in dieser Teilstruktur auftreten, die einen viel drastischeren Effekt als gewünscht haben. In diesem Zusammenhang sei auf den am Kapitelanfang erwähnten optimalen Winkel hingewiesen, den ein Monomer einhalten muss, um die Symmetrie eines Homotrimeres nicht zu zerstören.

4.2 Fluoreszenz-spektroskopische Betrachtung von LHCII mit angekoppeltem Farbstoff

Das spektroskopische Arbeiten mit einem Lichtsammelkomplex muss Rücksicht auf die Komplex-eigenen spektroskopischen Eigenschaften nehmen. In Kap. 3.4 wurde versucht, die vergleichsweise geringe Absorption und Fluoreszenz des LHCII innerhalb seiner „Grünlücke“ zwischen 500 und 600 nm auszunutzen. Verwendet wurden dazu vier Farbstoffe, deren Absorptions- und Emissions-Maxima in diesem Wellenlängenabschnitt liegen.

Der Bereich der Grünlücke erwies sich weniger geeignet als zunächst erhofft. Methoden wie eine Distanzbestimmung mittels einem Resonanz-Energie-Transfer (RET) zwischen Donor- und Akzeptorfarbstoffen oder die Fluoreszenzlöschung eines Fluorophores waren aufgrund der weitgehend verringerten bzw. so gut wie fehlenden Fluoreszenz Komplex-gekoppelter Farbstoffe nicht anwendbar. Für alle vier Farbstoffe galt dies Verhalten in der Nähe des N-Terminus (LHC-Mutante S3Ch). Das Vorliegen einer Fluoreszenzlöschung bei Kopplung an weitere Positionen des LHCII wurde nur mit einem Farbstoff, RM, untersucht.

Als Ursache der im intakten Komplex sehr starken Fluoreszenzlöschung der verwendeten Farbstoffe kommen zwei unterschiedliche Effekte in Frage. Zum Einen kann die Umgebung eines Farbstoffes einen starken Einfluss auf sein Emissionsverhalten ausüben, zum Anderen könnte ein Energietransfer von einem Farbstoff auf die Chlorophylle des LHCII stattfinden.

a) Energietransfer

Ein RET von RM (oder einem der anderen Farbstoffe) auf Chlorophyll ist durchaus denkbar. Betrachtet man beide Chromophore als ein Donor/Akzeptor-Paar, so ist das Kriterium, dass sich Emission des Donors (einer der vier Farbstoffe) sowie Absorption des Akzeptors (Chlorophylle des LHCII) überschneiden, in der gesamten Grünlücke erfüllt. Bei entsprechendem Abstand und günstiger Orientierung der Übergangs-Dipolmomente ist ein Transfer nicht ausgeschlossen. Die Absorption des LHCII in der Grünlücke ist zwar im Vergleich zu der der Maxima gering, dennoch nicht zu vernachlässigen. Betrachtet man einen einzelnen monomeren Komplex als eine chromophore Einheit, so zeigen dies Extinktionskoeffizienten um 50.000 bis $100.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in einem Minimum der Absorption zwischen

520 und 560 nm (vgl. auch Kap. 3.4.3). Sie liegen damit in der Größenordnung der Extinktionskoeffizienten der in Kap. 3.4 verwendeten Farbstoffe. Am Rande sei erwähnt, dass der LHCII auch bei der Anregungswellenlänge aller vier Farbstoffe absorbiert. Dies macht eine Trennung von LHC-Fluoreszenz nach Eigenanregung und nach Energietransfer um so schwieriger.

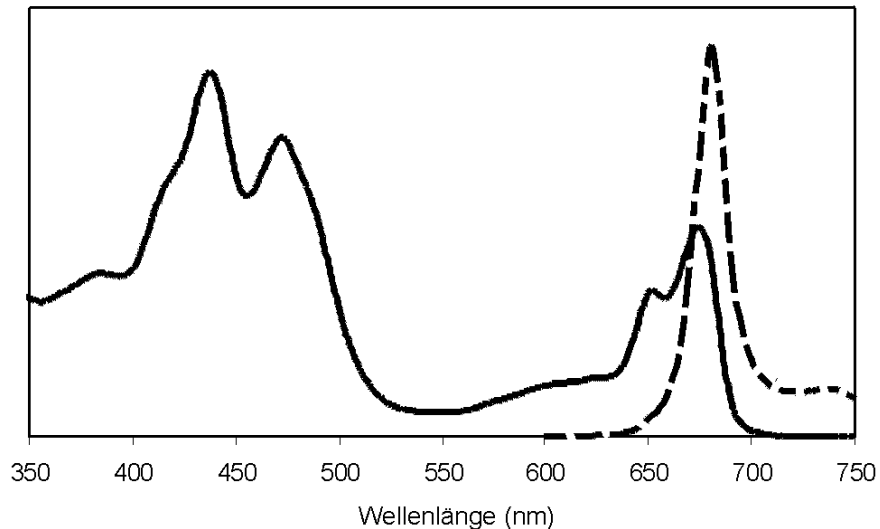


Abb. 4.7 Absorption und Fluoreszenz des LHCII

Spektren von Trimeren von S3Ch nach Aufreinigung über einen Sucrosedichtegradienten. durchgezogen: Absorptionsspektrum; gestrichelt: Emissionsspektrum nach Anregung bei 460 nm

Den LHCII als eine einzige chromophore Einheit anzunehmen ist nicht ganz richtig. Die Absorption des gesamten LHCII verteilt sich vielmehr auf etwa 12 Chlorophylle, von denen mehrere in RET-Reichweite liegen dürften. Ein an der Membranoberfläche des LHCII angekoppelter Farbstoff kommt in eine Entfernung zu Chlorophyllen des Komplexes, die in der Größenordnung für einen möglichen RET liegt. Parameter, die diese Wechselwirkung näher beschreiben wie die Quantenausbeute des Donors (Farbstoff) und ein R_0 für Farbstoff/Chlorophyll, wurden nicht näher bestimmt. Eine grobe Richtlinie für einen RET ist ein Abstand innerhalb 10-100 Å. Der für ein Donor/Akzeptor-Paar spezifische Wert R_0 beschreibt den Abstand, an dem der RET halbmaximal ist. Viele in der Literatur beschriebene Werte liegen zwischen 20 und 50 Å. In einer umfassenden Datenzusammenstellung von van der Meer et al. (1994) wird als höchster Wert ein R_0 von 68 Å für ein Donor/Akzeptor-Paar aufgeführt.

Für die 5 herausgegriffenen Positionen des LHCII, soweit sie in der Struktur nach Kühlbrandt et al. (1994) festgelegt wurden, lassen sich Abstände zu einzelnen Chlorophyllen bestimmen. Das Serin¹⁶⁰ etwa zeigt die größte Nähe zu den Pigmenten mit 7,3 Å zu Chl a1 und 9,7 Å zu Chl b1; weitere 7 Chlorophylle haben eine Distanz zwischen 18 und 25 Å. Serin⁵² liegt mit 11,2 Å am nächsten bei Chl a4; 5 weitere Chlorophylle liegen zwischen 17 und 26 Å. Serin¹⁰⁶

hat in der postulierten Struktur eine sehr periphere Lage, nächste Chlorophylle sind Chl a6 mit 19,7 Å, Chl a7 mit 20,5 Å und Chl b6 mit 21,5 Å; alle weiteren sind über 30 Å entfernt. Stimmt die im Modell vorgeschlagene Struktur des C-Terminus, so sind in einem Trimer die nächsten Pigment-Nachbarn des Valin²²⁹ nicht im eigenen Monomer zu suchen. Das Chl a7 eines benachbarten Komplexes zeigt nur 11 Å Distanz, nächste Chlorophylle des eigenen Monomeres wären Chl a3 mit 21,2 Å und Chl b3 mit 24,8 Å. Von allen 5 zur Mutation herangezogenen Positionen lässt sich nur für das Serin an Position 3 aufgrund der nicht ansatzweise bekannten Lage des Aminoterminus keine Abstandsberechnung durchführen. Diese Distanz-Werte beziehen sich alle auf das C-Atom des jeweiligen Serinrestes bzw. das tertiäre C-Atom des Aminosäurerestes aus Valin²²⁹ im nativen Protein und das Zentralatom Magnesium von Chlorophyll. Es muss bedacht werden, dass die Entfernung eines Farbstoffes, der an ein eingewechseltes singuläres Cystein gekoppelt ist, davon je nach Größe und Lage abweicht, höchstwahrscheinlich sich vergrößert. Insbesondere RM trägt zusätzlich einen kurzen Spacer zwischen reaktiver Gruppe und eigentlichem Farbstoff. Ein Rechenbeispiel: Mit der Transfereffizienz $E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6)$ liegt bei einem fiktiven R_0 von 50 Å ein Abstand $R = 2/3 R_0 = 33$ Å schon in einem Bereich mit über 90 % ET-Effizienz. Das entspräche einem Großteil der Chlorophylle in den meisten LHCII-Mutanten. Eine Verringerung von R_0 würde den Kreis der effizient erreichbaren Chlorophylle entsprechend verkleinern. Auf diese Weise wäre bei einem ausreichend hohen R_0 -Wert von RM mit Chl a und b des Komplexes die starke Fluoreszenzlöschung von RM als ein effizienter Transfer auf Chlorophyll erklärbar.

Nicht eingearbeitet in die vorliegenden Überlegungen wurde der Einfluss der gegenseitigen Orientierung von Farbstoff und Chlorophyll sowie der lokalen Umgebungsbeschaffenheiten, da über diese im Gegensatz zur Schätzung eines Abstandes keine konkreten Daten vorliegen.

Nach den oben aufgeführten Daten wäre die Position 106, sie liegt in der luminalen Schleife und konnte im Strukturmodell nur geschätzt werden, diejenige mit dem größten Abstand zu den Pigmenten des Komplexes. Dennoch ist in Kap. 3.4.4 keine große Abweichung in der Größenordnung der RM-Fluoreszenz-Löschung im Vergleich zu anderen LHC-Mutanten zu bemerken. Bei einem tatsächlichen RET muss dieser Abstand daher noch innerhalb der Grenzen für eine hohe Effektivität liegen.

Im Prinzip reicht eine hohe Energietransfereffizienz mit einem einzigen Chlorophyll, um die starke Fluoreszenzlöschung der Farbstoffe zu erklären. Eine Erreichbarkeit mehrerer Chlorophylle für einen RET vom Farbstoff auf Pigmente wird das Ergebnis nur noch verstärken, auch wenn für die zusätzlichen Chlorophylle eine geringere Transferrate gilt, als für das erstgenannte Chl. Aus diesem Grund ist die große Anzahl an Pigmenten pro Farbstoff im LHCII nur ein Vorteil für die Effizienz eines Transfers. Ganz anders sieht dies im umgekehrten Fall aus, wenn der Transfer von den Chlorophyllen auf einen Farbstoff erfolgen soll. Kommen hier zu einem ersten Chlorophyll mit sehr hoher Transfereffizienz weitere

Chlorophylle mit schlechterer Transferrate, so wird der ET von der Gesamtheit der Chlorophylle als Donor geringer als der ET vom ersten Chlorophyll alleine sein. Zusätzlich konkurriert die Übertragung Chl-Farbstoff mit dem Weg zwischen Chlorophyllen, was von Vorteil (die Energie geht zu einem Chlorophyll mit höherer Transferrate zum Farbstoff) oder Nachteil (die Energie wird bevorzugt zu Chlorophyllen mit schlechterer Transferrate für den Farbstoff gelenkt) sein kann.

Ein direkter Beweis für das Vorliegen eines RET wurde nicht gegeben. Punkte, die für einen RET sprechen sind die oben erwähnte hohe Anzahl an potentiellen Akzeptoren pro Donor, das Auftauchen der Fluoreszenzlöschung an verschiedenen Positionen im Komplex und die Höhe der Fluoreszenzlöschung. Einen weiteren wichtigen Hinweis liefert das Abtrennen des Farbstoffes vom intakten Komplex mittels einer Protease in Kap. 3.4.3.2. Damit wird ein RET unterbunden, ohne den Komplex zu zerstören. Alle vier Farbstoffe zeigten nach der Loslösung vom Komplex ihre Fluoreszenz wieder. Bedacht werden muss dabei allerdings, dass durch diese Behandlung die Komplex-Umgebung des Farbstoffes aufgehoben wird und ein Umgebungsbeitrag zur Fluoreszenzlöschung ebenfalls verschwindet. Einen Hinweis auf einen kleinen Umgebungsbeitrag gibt die Proteasebehandlung von freiem markiertem Protein; auch hier ist eine, wenn auch sehr viel kleinere, Zunahme der Farbstoff-Emission zu verzeichnen.

b) Umgebungseinfluss

Die Umgebung eines Farbstoffes kann einen Einfluss auf sein spektroskopisches Verhalten nehmen. So fluoresziert etwa der Farbstoff RM in den unpolaren Lösungsmitteln Propanol und Ethanol mehr als 10-mal stärker als in wässriger Umgebung. Hinzu kommt eine leichte hypsochrome Verschiebung des Fluoreszenzmaximums. RM ist ein Farbstoff, dessen Wasserlöslichkeit vom Hersteller als niedrig angegeben wird. In reinem Wasser löst er sich nur sehr langsam, aus einer Stammlösung in DMSO dagegen ist er gut in Wasser überführbar. Er trägt außer seinem Sulfonsäurerest und der delokalisierten positiven Ladung weite aromatische und aliphatische Bereiche mit hydrophobem Charakter. Es ist vorstellbar, dass der freie Farbstoff in Wasser teilweise Aggregate bildet, die bei Zugabe eines Detergens aufgelöst werden. Dies wäre eine logische Begründung für die Emissionszunahme nach Zuschuss von SDS oder LM (Kap. 3.4.5.1). Eine Aggregation und damit eine hohe räumliche Konzentrierung von Fluoreszenzfarbstoffen hat eine Fluoreszenzlöschung aufgrund von Reabsorptionsvorgängen zur Folge. Eine Vereinzelung durch Integration in Micellen hebt diese Prozesse auf, die Emission wird messbar.

Überträgt man die Daten der Fluoreszenzstärke in verschiedenen Lösungsmitteln auf das Fluoreszenzverhalten im markierten LHCII-Komplex, so müsste sich RM in einer sehr polaren Umgebung befinden und durch Denaturieren oder Trypsinverdau in eine hydrophobere Umgebung kommen. Letzteres ist vorstellbar, wenn sich RM in das Innere

einer Detergens-Micelle begibt, in das er vorher durch seine Lage im Komplex nicht gelangen konnte. Schon der bloße Farbstoff RM alleine, ohne Protein, erfährt bei SDS-Zugabe einen Emissionsanstieg (Kap. 3.4.5.1), demgegenüber steht eine allerdings eher etwas bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums. In der gleichen Größenordnung nimmt auch die RM-Fluoreszenz im intakten Komplex von S3Ch nach SDS-Zugabe zu (Kap. 3.4.3.3). Die Steigerung durch Denaturieren mittels Kochen oder Trypsinbehandlung ergibt davon noch einmal das 5-10-fache an Fluoreszenz. Ob eine Emissionssteigerung nach Detergenszugabe zu markierten Komplexen nun aufgrund von RM-SDS-Wechselwirkungen oder unabhängig davon von einer Auflösung des Komplexes herrührt, ist schwer zu sagen.

Die Bindung an den LHCII kann die Zugänglichkeit des Farbstoffes für größere Detergensmoleküle herabsetzen. Dass dies in gleichem Maße und an allen betrachteten Positionen auch für kleine Wassermoleküle gilt, ist unwahrscheinlich. Die Markierungsstellen liegen alle an der Membranoberfläche, der Peripherie des LHCII. Das Szenario, das sich aus dieser Überlegung ergibt, ist folgendes: Im intakten Komplex liegt RM in wässriger Umgebung vor, ohne direkten Detergenskontakt. Eine Denaturierung der Komplexe bringt RM in den möglicherweise vorher verhinderten Kontakt mit Detergensmolekülen. Es würde demnach einem Übergang aus wässriger Umgebung in Micellenumgebung entsprechen. Die tatsächliche Beobachtung widerspricht diesem einfachen Modell. Der Effekt auf die Fluoreszenz des freien RM vom Übergang aus Wasser in eine detergensehaltige Umgebung ist viel kleiner als der Effekt des in diesem Szenario postulierten Übergangs vom Komplex in eine Micelle, zu klein um beide in ihrem Prinzip gleichzusetzen.

Ist die starke Fluoreszenzlöschung von RM an einer einzelnen Position im LHCII der speziellen lokalen Umgebung zuzuschreiben – etwa der Anwesenheit bestimmter Aminosäuren – so wäre die Erwartung, dass andere Positionen diese Intensität der Löschung nicht übernehmen. Die Fluoreszenzlöschung findet zumindest in allen Trimeren der vier trimerbildenden LHC-Mutanten in ähnlicher Größenordnung statt. (Zu Überlegungen zu der Variation bzgl. der Monomere siehe Kap. 4.2.2). Schwankungen, die bei verschiedenen Positionen und auch zwischen Monomeren und Trimeren in der nur einmal durchgeführten Messung aus Kap. 3.4.4 auftreten, sollten vor einer genauen Aussage über die Quantität der Löschung noch einmal genauer untersucht und bestätigt werden. Sie werden aus diesem Grund hier nicht näher diskutiert. Für einen quantitativen Vergleich wäre insbesondere der exakte Markierungsgrad in den einzelnen Komplexen wichtig. Der Anteil an RM in den Komplexen gäbe zudem Auskunft über eine spezifische Hinderung durch den Farbstoff bei der Bildung von Monomeren und/oder Trimeren in bestimmten Farbstoff-LHC-Konstrukten. Ein anderer wichtiger Gesichtspunkt ist die Stabilität der Komplexe, messbar etwa als Stabilität bei thermischem Stress. Sie könnte Auskunft geben, ob die beobachteten Unterschiede in der Fluoreszenzlöschung wirklich auf spezielle Eigenschaften der einzelnen LHC-Mutanten zurückzuführen sind oder nur einen Spiegel für den Zerfallsgrad der Komplexe darstellen (s. auch Kap. 4.2.2).

4.2.1 Ausblicke

Eine Möglichkeit, eine genauere Aussage über das Stattfinden eines ET zu erhalten, wäre eine spektroskopische Betrachtung von Einzelmolekülen. Misst man nach Anregung im Farbstoffmaximum die Fluoreszenz von Farbstoff, z.B. RM, und Chlorophyll, so wäre interessant, das gegenseitige Verhalten zu beobachten. Wechseln sich die Fluoreszenz von Farbstoff und Chlorophyll in ihrer Intensität ab, oder verhalten sie sich unabhängig voneinander? Die Antwort gäbe einen Hinweis darauf, ob bei RM-Anregung die Chl-Fluoreszenz durch RET erhöht wird, oder ob RM ohne einen Einfluss für sich fluoresziert. Voraussetzung ist, dass der geringe Unterschied in der Chl-Fluoreszenz ohne und mit RM-Beitrag sich vom Rauschen der Messung unterscheiden lässt. Außerdem dürfen keine „Fallen“-artigen Zustände (trap states, s. Tietz et al., 2001) in der Chlorophyll-Population ihre Energie strahlungslos abgeben und damit aus der Beobachtung herausnehmen. Ein Ansatz, diese Probleme zu umgehen, wäre das selektive Bleichen der Chlorophylle mit Anregung oberhalb etwa 600 nm. Die Ausschaltung der Chlorophylle sollte bei Annahme eines RET die Farbstofffluoreszenz hochschnellen lassen. Ich stelle mir eine Art „hole-burning“-Studie vor, die selektiv einige oder alle Chlorophylle in einen angeregten Zustand bringt und so einen ET vom Farbstoff auf spezielle oder alle Chlorophylle verhindert. Ganz besonders interessant wird dieser Ansatz, wenn ein Farbstoff gefunden wird, der ein sehr kleines R_0 mit Chlorophyllen als Akzeptoren besitzt, vielleicht 10 Å. In diesem Fall kann der Farbstoff als Donor nur wenige oder nur ein Chlorophyll in seiner Nähe gut erreichen. Die Chlorophyllabsorption des LHCII in der Q_y -Region spaltet sich in bis zu 11 Banden auf (Nussberger et al., 1994). Möglicherweise können sie bestimmten Positionen und damit bestimmten Umgebungsbedingungen für einzelne Chlorophylle zugeordnet werden. Das selektive Ausschalten einer Chlorophyllpopulation, die vorher als Akzeptor für den Farbstoff fungierte, verhindert den postulierten ET und erhöht die Farbstofffluoreszenz. Da der Farbstoff an eine bestimmte Position im Komplex gebunden ist und durch sein niedriges R_0 nur eine Auswahl an Pigmenten beeinflussen kann, kann der Kreis der Chlorophylle, die zu einer bestimmten Absorptionsbande gehören, weiter eingeschränkt werden.

Die Einbringung und Beobachtung neuer Chromophore in den LHCII erfordert die Abgrenzbarkeit von den Komplex-eigenen Eigenschaften. Dazu eignet sich insbesondere die Absorption und Fluoreszenz oberhalb ~ 700 nm. LHCII-Farbstoff-Konstrukte, die den Farbstoff als Energieakzeptor und nicht als Donor benutzen, wurden bereits verwirklicht (Huschenbett, 1997; Wolf-Klein, 2001). Dass nur wenige Chlorophylle zur Emission beitragen und somit der Energietransfer im Komplex einer Richtung auf diese Chlorophylle unterliegen muss, haben Polarisationsmessungen am monomeren LHCII mittels Einzelmolekülspektroskopie gezeigt (Tietz et al., 2001). Um etwas über die Topologie der

Energieweiterleitung zu erfahren ist es sinnvoll, einen Farbstoff an verschiedenen Positionen zu plazieren und seine Effizienz als Akzeptor zu beobachten.

4.2.2 RM als Sensor für die Intaktheit von LHCII-Komplexen

Die Energieweiterleitung im Komplex war in allen LHC-Mutanten, die mit RM versehen rekonstituiert und trimerisiert wurden, im Trimer am besten. Dies konnte nach Anregung von Chl b aus der einwandfreien Chl a-Fluoreszenz abgelesen werden (Kap.3.4.4). Ein möglicherweise störender Einfluss des sperrigen RM auf die Faltung ließ sich in der Ausbeute (vergl. S106Ch) oder eventuell als ein RM-Fluoreszenz-Anstieg sehen, nicht aber als Verhinderung des Energieflusses im Trimer zum Chl a hin. Auch S106Ch, das doch eine eindeutige Verschlechterung der Trimerfaltung mit angebundenem RM gegenüber unmarkiertem Protein zeigte, hatte in der Qualität des Energietransfers keine Einbußen.

Die Monomere ließen demgegenüber alle eine kleine Schulter der Chl b-Fluoreszenz erkennen. Monomere sind im Allgemeinen instabiler als Trimere, so dass der sehr geringe Anteil an schon kaputten Komplexen nicht weiter Besorgnis erregend ist. Was aber zusätzlich auffällt ist die Tatsache, dass die Fluoreszenz von angebundenem RM in den Monomeren in der Regel etwas stärker hervortritt als in den Trimeren. Wo die Chl b-Fluoreszenz nach Chl b-Anregung noch als schwache Schulter ausfällt, ist die RM-Emission nach RM-Anregung schon wesentlich deutlicher zu sehen (siehe besonders S160Ch und S52Ch Monomere). Einschränkend muss an dieser Stelle gesagt werden, dass der tatsächliche Anteil an RM-markiertem Protein der einzelnen Komplextypen in den Einzelmessungen in Kap. 3.4.4 nicht bestimmt wurde. Eine Bestätigung, dass die verstärkte RM-Fluoreszenz in Monomeren nicht von einer höheren Konzentration an RM kommt, steht somit noch aus.

Begreift man die RM-Löschung als einen Energietransfer von RM auf Chlorophyll, so werden Unterschiede zwischen Monomeren und Trimeren klarer. Bei einer gestörten Weiterleitung im Monomer ist die Wahrscheinlichkeit für RM seine absorbierte Energie als Fluoreszenz abzugeben größer. Insofern scheint die RM-Fluoreszenz möglicherweise ein Maß für die Faltung des LHCII zu sein. Versuche, die dies berücksichtigen und eine zeitaufgelöste Faltung des LHCII anhand der zunehmenden Löschung eines Fluoreszenzfarbstoffes beobachten, werden zur Zeit durchgeführt. Das Emissionsmaximum von RM, und auch von den anderen verwendeten Farbstoffen, ist von der Chlorophyllfluoreszenz abgesetzt und überschneidet sich nicht mit ihr. Die Farbstofffluoreszenz scheint sehr sensibel für Veränderungen an der Intaktheit eines LHCII-Komplexes und kann damit gut als ein Sensor benutzt werden.

4.2.3 Gezielte Fluoreszenz-Löschung von RM

Die Wirksamkeit eines Fluoreszenzlöschers muss bei jedem neuen Farbstoff erst getestet werden. Iodid und Acrylamid sind zwar zwei häufig eingesetzte Fluoreszenzlöscher, ihre Eigenschaft zur Fluoreszenzlöschung lässt sich aber nicht verallgemeinern. Gerade bei Farbstoffen, die wie Rhodamin Red zur Familie der Phthaleine gehören, wurde schon die Unwirksamkeit von Acrylamid berichtet (Eftink et al. 1987). Im speziellen Fall waren dies Fluorescein und Eosin Y. Iodid im Vergleich dagegen zeigte bei beiden Farbstoffen Fluoreszenzlöschung. Insofern überrascht das Ergebnis der fehlenden Fluoreszenzlöschung von RM durch Acrylamid in Kap. 3.4.5.1 nicht.

Zur Löschung der Fluoreszenz muss der Löscher sehr dicht zum Fluorophor gelangen. Der Mechanismus erfordert den direkten Kontakt zwischen beiden Molekülen, so dass eine Kopplung zwischen den elektronischen Orbitalen beider Moleküle eintreten kann. Ein Abstand von bis zu 100 Å, wie er bei einem Resonanz-Energie-Transfer zwischen Donor und Akzeptor auftreten kann, ist dagegen wirkungslos. Daraus leitet sich ab, dass bei erfolgreicher Löschung einer Fluoreszenz durch ein Löscher-Molekül ein direktes Erreichen des Farbstoffes stattgefunden haben muss. Die Methode der Fluoreszenzlöschung ist daher eine andere Form der Zugänglichkeitsuntersuchung. Wird ein so geladenes Molekül wie ein Iodid-Ion zur Fluoreszenzlöschung eingesetzt, so heißt das in einer wässrigen Umgebung, dass der Farbstoff ins wässrige Milieu exponiert vorliegt. Bei RM in Wasser konnte auf diese Weise eine erfolgreiche Fluoreszenzlöschung gezeigt werden. Bei Zusatz von Detergentien scheint sich der Farbstoff RM an die Micellen an- oder einzulagern. Dies würde eine teilweise Abschirmung gegenüber einem Iodid erklären. SDS als ionisches Detergens trägt eine negativ geladene Sulfatgruppe, die zusätzlich eine Abstoßung auf das ebenfalls negative Iodid-Ion ausübt und eine Annäherung gänzlich verhindert. Eine ähnliche Beobachtung schildern Fischer & Georges (1998) für Rhodamin 6G.

Um eine Aussage über verborgene und exponierte Stellen in einem Protein zu treffen ist es sicher sinnvoll zur Markierung ein möglichst kleines Molekül zu wählen. RM ist ein vergleichsweise großer Farbstoff. Eine Faltung eines Proteins, das RM an einer im Komplex verborgenen, im Inneren liegenden Stelle tragen soll, ist wahrscheinlich sterisch nicht mehr möglich.

Werden neue Experimente zum Thema Strukturbestimmung mittels Fluoreszenz-Löschung am LHCII geplant, so ist der Idealfall der Einsatz eines (kleinen) Fluoreszenzfarbstoffes, dessen Anregung und Emission sich unabhängig von den Pigmenten des Komplexes abspielen. Da der hierfür geeignete Wellenlängenbereich sehr langwellig ist (über 700 nm für Absorption und Emission) und Farbstoffe, die in diesem Bereich absorbieren, in der Regel ein relativ ausgedehntes System an konjugierten Doppelbindungen besitzen, dürfte es schwer sein die Eigenschaft „klein“ mit dem genannten Wellenlängenbereich zu kombinieren.

4.3 Trimerisierung mit Hilfe von Cyclodextrin

Zusätzlich zu den Trimerisierungsmethoden nach Hobe (et al. 1994; 1995) und Rogl et al. (1998) wurde in dieser Arbeit eine weitere Form der Trimerisierung von LHCII angedacht und ermittelt. Sie enthält den Einsatz von Cyclodextrin, welches Detergens, ähnlich der Dialyse bei Hobe (1995), abreichert. LHCII-Monomere sollten auf diese Weise aus der Umgebung der Detergensmicellen hin zu einer Zusammenlagerung gebracht, eventuell auch zu einer Integration in Lipidvesikel gezwungen werden. Der entscheidende Schritt bei der Bildung der Trimere ist nicht ganz klar. Ob eine Aggregation aufgrund der Detergensverminderung stattfindet oder ob ein Übergang in eine lipidreiche Umgebung die Aneinanderlagerung von Monomeren begünstigt oder auch ein direkter, lokaler Einfluss der Lipide zur Stabilisierung greift, lässt sich so nicht sagen.

Ob, wie bei de Grip et al. (1998) postuliert, mit der Cyclodextrin-Methode tatsächlich Vesikel entstanden, war nicht Untersuchungsgegenstand. Es bildete sich im Sucrosegradienten eine sehr distinkte Bande mit schon makroskopisch sichtbaren Strukturen, letzteres widerspricht der Bildung einfacher Vesikel. In dieser Bande konzentrierte sich das eingesetzte Pigment, Protein und Komplexe und aus ihr konnten mittels Solubilisierung Trimere gewonnen werden. Eine Kontrolle ohne Cyclodextrinzusatz zeigte zusätzlich zu einer solchen Bande eine Verschmierung von Pigmenten, Proteinen und Komplexen über den gesamten oberen Gradienten. Diese Tatsache deutet an, dass das Cyclodextrin so effektiv lösende Detergentien entfernt, dass eine Aggregation stattfindet. Ob dabei ein Übergang von LHCII in eine Lipidphase eintritt oder nur eine Zusammenlagerung von Lipid- und Komplexstrukturen ist nicht bekannt.

Eine Oligomerisierung von isolierten nativen Monomeren nach Lipidgabe wurde von Rémy et al. (1984) beschrieben. Die Autoren zeigten einen eindeutigen kinetischen Vorteil von PG mit trans- Δ^3 -Hexadecensäure, aber auch Liposomen anderer Lipide wie z.B. Dipalmitoyl-PG ergaben, nach Schütteln mit Monomeren, Oligomere. Krupa et al. (1992) dagegen erreichte eine Erhöhung des Trimeranteils seiner LHCII-Präparation nur mit trans- Δ^3 -Hexadecensäure-PG. Es ist zu vermuten, dass die Unterschiede in der Lipidwirksamkeit zwischen beiden Veröffentlichungen durch verschiedene Methoden der LHCII-Aufarbeitung und Trimer-„Rekonstitution“ zustande kommen. Ein einfaches Mischen und Schütteln einer Monomersuspension aus rekombinantem, rekonstituiertem LHCII mit Lipid erreichte nach Hobe (1995) keine befriedigende Ausbeute an Trimeren.

Für eine Trimerisierung mit Hilfe von Cyclodextrin ist eine spezielle Veränderung des Proteins wie das Einfügen eines His₆-Motives nicht nötig. Die Methode ist schon in relativ kleinen Mengen analytisch anwendbar. Da sich eine sehr deutliche Bande mit sichtbaren Aggregaten absetzt, dürfte auch in kleineren Mengen eine nachträgliche Konzentrierung entfallen. Um schließlich Trimere über eine Gelelektrophorese nachzuweisen oder über eine

Saccharosedichtegradientenzentrifugation präparativ zu gewinnen, muss sich eine Solubilisierung der Aggregat-Bande anschließen. Die Ausbeute an Trimeren wurde nicht quantitativ bestimmt, dürfte aber nicht höher als bei den Methoden nach Hobe (et al. 1994; 1995) und Rogl et al. (1998) liegen. Der Zeitaufwand liegt zwischen beiden Methoden. Die Detergens-abreicherung mittels Cyclodextrin findet innerhalb einer halben Stunde statt, die meiste Zeit verbraucht die sich anschließende Aufreinigung der Vesikel/Aggregate mittels Sucrosegradient über Nacht.

4.4 Aufreinigung von gefaltetem LHCII mittels HIC

Die Anwendung der HIC in Zusammenhang mit dem LHCII ist ein in mehrerer Hinsicht vielversprechender Ansatz. Der LHCII als Membranprotein enthält viele hydrophobe Bereiche, die nach außen exponiert sind. Sie können mit dem hydrophoben Material einer HIC-Säule wechselwirken und je nach Bedingungen eine mehr oder weniger starke Retention bewirken. Dass es in der Tat möglich ist, intakte Monomere von einer HIC-Säule zu eluieren, wurde in Kap. 3.2.2 gezeigt. Nach der Fragestellung des Versuches wurde hier nur die Trennung von Komplexen und freiem Pigment betrachtet. Zusätzlich konnte aber ein Laufunterschied zwischen freiem, ungefaltetem Protein und Monomeren beobachtet werden. Wechselwirkungen mit der Säule können ein Protein auch instabilisieren, was einen Verlust an intaktem Material zur Folge hat. Diese Nebenwirkung wurde in Kap. 3.2.2 beobachtet. Der Anteil an freiem Protein war nach einem Säulenlauf größer als in der eingesetzten Rekonstitution. Mit einer Variation und Optimierung der Bedingungen ließe dieser Effekt sich eventuell reduzieren.

Die Versuchsbedingungen der HIC sind mit dieser Arbeit noch längst nicht ausgereizt. Neben Detergens- und Pufferbedingungen umfasst die Auswahl an HIC-Säulentypen mit unterschiedlichen hydrophoben Gruppen eine weite Bandbreite, so dass eine Optimierung und Anpassung an andere Bedingungen ausgetestet werden muss. Interessant ist das Potential, unterschiedliche Zustände eines gefalteten Proteins in seinem intakten Zustand auseinanderzuhalten. Ob bei einem Membranprotein wie dem LHCII geringe Veränderungen ausreichen, um eine Bindung über seine weiten hydrophoben Bereiche sichtbar zu beeinflussen, bleibt abzuwarten. Denkbar ist z.B. die Unterscheidung zwischen unphosphoryliertem und phosphoryliertem LHCII. Ein Bereich, der insbesondere die hydrophoben Transmembranbereiche betreffen könnte, wäre die Pigmentbindung. Vielleicht lassen sich über HIC-Säulen Komplexe unterschiedlichen Pigmentgehaltes trennen. Vorstellbar ist auch eine gegenüber einer Saccharosedichtegradientenzentrifugation stark verkürzte Aufreinigung von Monomeren und Trimeren, sofern der oligomere Zustand des LHCII während einer HIC erhalten bleiben kann. Zum Schluss dieser Aufzählung seien markierte und unmarkierte LHCII-Komplexe oder auch freie Proteine erwähnt, die unter Umständen ein leicht unterschiedliches Laufverhalten auf einer HIC-Säule zeigen und so voneinander getrennt werden können.

5 Zusammenfassung

Der LHCII (light-harvesting complex II) ist ein Membranprotein und der häufigste Lichtsammelkomplex in der Pflanze. Seine Struktur ist in weiten Teilen mit einer Auflösung von 3,4 Å bekannt, dennoch gibt es Bereiche, über deren Lage und Einbindung Unklarheit besteht. Der LHCII kann aus der Pflanze in monomerer und trimerer Form isoliert werden. Es ist zudem möglich, beide Zustände aus rekombinantem Protein zu rekonstituieren. Um Strukturunterschiede zwischen LHCII-Monomeren und -Trimeren zu bestimmen, wurden ortsspezifische Derivatisierungen des Proteins durchgeführt.

Dazu wurden zunächst verschiedene Mutationen am LHCII vorgenommen. Das einzige Cystein des maturen LHCII wurde in ein Serin umgewandelt. Von dieser LHCII-Mutante (C79S) ausgehend wurde an fünf Positionen ein Aminosäureaustausch zu einem singulären Cystein durchgeführt: in der Nähe von Amino- (S3Ch) und Carboxyterminus (V229Ch), in der stromalen (S160Ch) und luminalen (S106Ch) Schleifenregion und direkt vor der ersten Transmembranhelix (S52Ch). Das zuletzt genannte Protein ließ sich nur zu Monomeren, nicht aber zu Trimeren rekonstituieren, alle anderen Proteine bildeten sowohl Monomere als auch Trimere. Der singuläre Cysteinrest erlaubte eine ortsspezifische Markierung mit thiolreaktiven Fluoreszenzfarbstoffen. Alle Cystein-tragenden Proteine besaßen zusätzlich einen Hexahistidylrest, der für die Rekonstitution von trimeren Pigment-Protein-Komplexen *in vitro* vorteilhaft war.

Es wurde eine Methode etabliert, die Zugänglichkeit der singulären Cysteine in Monomeren und Trimeren für den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin Red-Maleimid (RM) zu vergleichen. Dabei ergab sich folgendes Bild:

- In drei Fällen ließen sich die Monomere besser markieren als Trimere derselben Proteine (S106Ch, S160Ch und V229Ch). Das bedeutet, zwischen monomerer und trimerer Form muss jeweils eine Veränderung für das singuläre Cystein eingetreten sein. Über die Natur dieser Veränderung werden verschiedene Vermutungen diskutiert.
- In der Nähe des Aminoterminus (S3Ch) war die Reaktion des RM sowohl in Monomeren als auch in Trimeren schlecht. Zwischen beiden Formen des LHCII trat kein signifikanter Unterschied auf. Damit passt das Ergebnis nicht unbedingt in das Bild eines hydrophilen N-Terminus, der ungeordnet und frei dem Medium exponiert ist. Die Größenordnung der Markierung liegt in etwa bei der der Trimere der anderen drei Proteine.
- Ein Vergleich zwischen verschiedenen LHC-Mutanten zeigte besonders unter Monomeren Unterschiede. Ein kleiner Teil der V229Ch-Monomere ließ sich sehr schnell und sehr gut markieren, der Rest der Monomere reagierte kaum oder nur noch

sehr langsam. Monomere von S106Ch und S160Ch mit singulären Cysteinen in den Schleifenregionen zeigten diese Aufspaltung in Populationen nicht. Die zuletzt genannten Proteine erreichten deshalb bei sehr langer Markierungsdauer die größten Ausbeuten. Die Trimere aller Proteine zeigten zumindest innerhalb der genauer betrachteten ersten 30 Minuten eine ähnliche Größenordnung der Markierungseffizienz.

- Eine vergleichsweise exponierte Stellung der Aminosäure 106 konnte mit den Zugänglichkeitsversuchen sowie mit einer starken Neigung des Cystein¹⁰⁶ zur Disulfidbrückenbildung zwischen gefalteten Komplexen bestätigt werden. Das Verhalten des Cystein¹⁶⁰ deutete dagegen auf eine Art Grube, die einen sterischen Ausschluss bei der Zugänglichkeit der Position schafft.

Mit den in dieser Arbeit geschilderten Versuchen wurde ein Versuchssystem angewendet, das sich auch auf weitere Zustände des LHCII ausweiten lässt.

Ein anderer Ansatzpunkt bestand in der fluoreszenzspektroskopischen Betrachtung von LHCII mit angekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff. Dazu wurde eine Markierung von LHCP mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt, deren Absorptions- und Emissionsmaxima zwischen 500 und 600 nm liegen und damit in der „Grünlücke“ des LHCII. An S3Ch wurde eine starke Fluoreszenzlöschung von vier Fluoreszenzfarbstoffen (FM, TM, BI und RM) im gefalteten Komplex gezeigt, mit dem Farbstoff RM zusätzlich auch bei den anderen vier LHCII-Mutanten nachgewiesen. Aufgrund der starken Löschung der Farbstoffe im intakten LHCII konnte ihre Fluoreszenz nicht für weitere Versuche, wie einer Distanzbestimmung zwischen Farbstoffen mittels RET oder der Zugänglichkeitsbestimmung der Farbstoffe mittels gezielter Fluoreszenzlöschung durch Iodid, verwendet werden.

Die Fluoreszenzlöschung wurde am Beispiel von RM genauer untersucht. Höchstwahrscheinlich resultiert sie aus einem sehr effizienten Energietransfer vom Farbstoff auf die Chlorophylle des LHCII. Mit dem deutlichen Unterschied zwischen der Fluoreszenzlöschung von RM im intakten Komplex und der ansteigenden Emission des Farbstoffes mit Denaturierung scheint RM möglicherweise einen guten Sensor für die Faltung der Komplexe zu bilden.

Des Weiteren wurde während dieser Arbeit eine neue Art der Trimerisierung von rekombinantem LHCII etabliert. Diese auf Cyclodextrin basierende Methode eignet sich besonders für einen Einsatz in analytischem Maßstab.

6 Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Idolylphosphat
BI	BODIPY 507/545 Iodacetamid
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
Chl a	Chlorophyll a
Chl b	Chlorophyll b
CIP	Calf intestinal phosphatase
dest.	destilliert
DMF	Dimethylformamid
ddNTP	Dideoxynucleosidtriphosphat
dNTP	Deoxynucleosidtriphosphat
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitro-benzoic acid)
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
ET	Energietransfer
FM	Fluorescein-Maleimid
HIC	Hydrophobic Interaction Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (z.T. auch „High Pressure Liquid Chromatography“ genannt)
IDA	iminodiacetic acid
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
LB	Luria-Bertani
LDS	Lithium-Dodecylsulfat
LHC	light-harvesting complex
LHCP	light-harvesting complex protein
LM	Lauryl-Maltosid (=Dodecyl- β -D-Maltosid)
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NTA	nitrilotriacetic acid
OD	Optische Dichte

OG	n-Octyl- β -D-glucopyranosid
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PG	Dipalmitoyl-Phosphatidylglyzerin
pLHCP	precursor light-harvesting complex protein
PNK	Polynucleotidkinase
PS	Photosystem
rel. Einh.	relative Einheiten
RET	Resonanz-Energie-Transfer
RM	Rhodamin-Maleimid
RT	Raumtemperatur
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RP-HPLC	reversed phase-HPLC
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-dodecylsulfate
SRP	signal recognition particle
TCP	Tri -(2 cyanoethyl-)phosphin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Tetramethylrhodamin-Maleimid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TX	Triton X 100
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
(v/v)	Volumenprozent (volume per volume)
(w/v)	Gewichtsprozent (weight per volume)

7 Anhang

7.1 Anhang: Oligonukleotide

Oligonukleotide:

HisSac+ sense

5'-CT CAC CAT CAC CAT CAC CAT GCG **AGC T**-3'

HisSac- antisense

5'-CGC ATG GTG ATG GTG ATG GTG **AGA GCT**-3'

SphSacI+ sense

5'-CGT AAA TGT GCT ACC ACC AAG AAA GTA GCG **AGC T**-3'

SphSacI- antisense

5'-CGC TAC TTT CTT GGT GGT AGC ACA TTT **ACG CAT G**-3'

Primer:

DS23+: sense

5'-ATT TGC TTT GTG AGC GG-3'

LHCP 757: antisense

5'-TGG ATC AAA GCT TCC ACC TGG GTA AAG TGG-3'

Paulsen: antisense, Mutageneseprimer

5'-GGG AAG ACA **GAT** CCC AAA GC-3'

S1: antisense

5'-GAT GGA GTT CTG AGG-3'

S2: sense

5'-CGG TGA CTA CGG TTG GG-3'

7.2 Anhang: Sequenz von D7f.3

unterstrichen: Transmembranhelices, kursiv: Primermotive, fett: Restriktionsschnittstellen

```

          0          10          20          30
        XhoI |          |          | DS23+> |
        CTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACA

40          50          60          70          80          90
|          |          |          |          | EcoRI |
ATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAATTCATTAAAGAGGAG

100         110         120         130         140         150
|          | SphI |          | SacI |          |
AAATTAAGGCATGCGTAAATCTGCTACCACCAAGAAAGTAGCGAGCTCTGGAAGCCCATGG
      METArgLysSerAlaThrThrLysLysValAlaSerSerGlySerProTrp

160         170         180         190         200         210
|          |          |          |          |          |
TACGGACCAGACCGTGTTAAGTACTTAGGCCATTCTCCGGTGAGTCTCCATCCTACTTG
TyrGlyProAspArgValLysTyrLeuGlyProPheSerGlyGluSerProSerTyrLeu

220         230         240         250         260         270
|          | S2> |          |          |          |
ACTGGAGAGTTCCCCGGTGACTACGGTTGGGACACTGCCGGACTCTCTGCTGACCCAGAG
ThrGlyGluPheProGlyAspTyrGlyTrpAspThrAlaGlyLeuSerAlaAspProGlu

280         290         300         310         320         330
|          |          |          |          |          |
ACATTCTCCAAGAACCGTGAGCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCTATGTTGGGTGCT
ThrPheSerLysAsnArgGluLeuGluValIleHisSerArgTrpAlaMETLeuGlyAla

340         350         360         370         380         390
|          |          |          |          |          |
TTGGGATGTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTTAAATTCGGCGAAGCTGTG
LeuGlyCysValPheProGluLeuLeuSerArgAsnGlyValLysPheGlyGluAlaVal

400         410         420         430         440         450
|          |          |          |          |          |
TGTTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTACTTGGGCAACCCA
TrpPheLysAlaGlySerGlnIlePheSerGluGlyGlyLeuAspTyrLeuGlyAsnPro

460         470         480         490         500         510
|          |          |          |          |          |
AGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCACTCAGGTTATCTTGATGGGA
SerLeuValHisAlaGlnSerIleLeuAlaIleTrpAlaThrGlnValIleLeuMETGly

520         530         540         550         560         570
|          | BstEII |          |          |          |
GCTGTGCAAGGGTTACCGTATTGCCGGTGGGCCTCTCGGTGAGGTGGTTGATCCACTTTAC
AlaValGluGlyTyrArgIleAlaGlyGlyProLeuGlyGluValValAspProLeuTyr

```

580 590 600 610 620 630
| |<LHCP757 | | | |
CCAGGTGGAAGCTTTGATCCATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCATTTCGCAGAATTG
ProGlyGlySerPheAspProLeuGlyLeuAlaAspAspProGluAlaPheAlaGluLeu

640 650 660 670 680 690
| | | | | |
AAGGTGAAGGAACTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTTGGATTCTTCGTT
LysValLysGluLeuLysAsnGlyArgLeuAlaMETPheSerMETPheGlyPhePheVal

700 710 720 730 740 750
| | | | | *BclI* | |
CAAGCTATTGTAAGTGGAAAGGGTCCTTTGGAGAACCTTGCT**TGATCAT**CCTTGCAGACCCA
GlnAlaIleValThrGlyLysGlyProLeuGluAsnLeuAlaAspHisLeuAlaAspPro

760 770 780 790 800 810
| | | | | |
GTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTCCCGAAAATAAACACTCTTA
ValAsnAsnAsnAlaTrpSerTyrAlaThrAsnPheValProGlyLys---

820 830 840 850 860 870
| | | | | |
TATTTATATGTTTTTGTGATAGTAATCTTCTTCCCAATTC AATGTGAATTATTATCATT A

880 890 900 910 920 930
| | | | | |
TCATTATCATGTGGGTATGCATAGGTTCACTAATAACAAGATGATGGATGCTTTTTTTTTTA

940 950 960 970 980 990
| | *PstI* | | | | |
CCAAATTTTGGG**CTGCAG**CCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCC

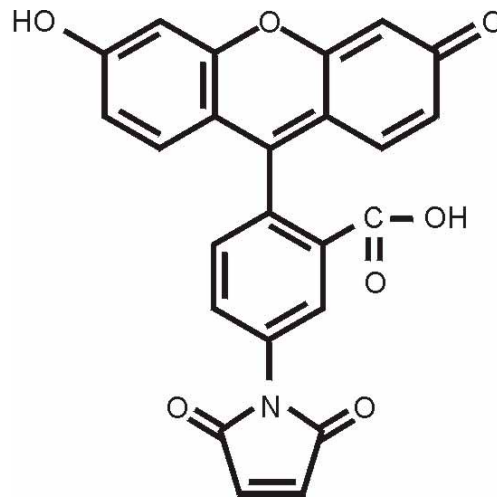
1000 1010 1020 1030 1040 1050
| | <S1 | | | | |
AGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTT CAGAACGCTCGGTTGCCCGCGGC GTT

1060 1070 1080 1090 1100 1110
| | | | | | |
TTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAA

1120 1130 1140 1150 1160 1170
| | | | | | |
TGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCAATGGCATCGTAAAGAAC

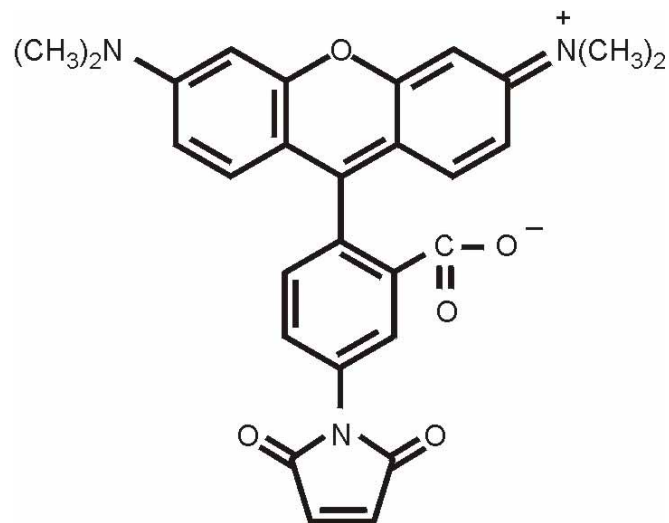
7.3 Anhang: Fluoreszenzfarbstoffe

Fluorescein-5-Maleimid



- von Pierce
- MW: 427
- Daten laut Hersteller:
 - Extinktion: 490 nm (Puffer pH 8) mit $\epsilon = 78.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
 - Emission: 515 nm
- empfohlene Stammlösung: DMF

Tetramethylrhodamine-5-Maleimid



- von Molecular Probes
- MW: 481,51
- Daten laut Hersteller:
 - Extinktion: 541 nm (Methanol) mit $\epsilon = 95.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$
 - Emission: 567 nm
- empfohlene Stammlösung: DMSO

7.4 Anhang: Überblick über alle Markierungschargen der Zugänglichkeitsuntersuchungen

In Abb. 7.1 werden alle letztendlich zu den Zugänglichkeitsuntersuchungen herangezogenen Markierungsreihen, geordnet nach LHC-Mutante und Monomer bzw. Trimer, zusammengefasst. Eine Markierungsdauer über 30 Minuten wurde aus den in Kap. 3.3.2.2 dargelegten Gründen zu keinem genaueren Vergleich der Proteine herangezogen, soll hier aber zur Übersicht dargestellt werden. Die verschiedenen Markierungschargen erstrecken sich über unterschiedliche Zeiträume, was eine Heterogenität in das Bild bringt. So wurde in M62 nur insgesamt 30 Minuten markiert, andere Chargen dagegen erstreckten sich über einen Zeitraum von 180 Minuten. Die in Kap. 3.3 betrachteten Einzelzeitwerte von 15 und 30 Minuten Markierungsdauer sind in allen Chargen vorhanden. Vereinzelt wurden Werte gestrichen, die nach den Korrekturen im negativen Bereich lagen, deren Proteinmenge im Coomassiegefärbten Gel eindeutig von anderen Proben einer Zeitreihe abwichen oder die im Gesamtvergleich in Abb. 7.1 völlig herausfielen. Das letzte Kriterium wurde auf V229Ch-Monomere der Markierungscharge M62 und S160Ch-Monomere der Charge M73 angewendet, da für diese Komplexe die restlichen Markierungsreihen eine starke Homogenität aufwiesen. Für andere LHC-Mutanten war die Streuung z.T. größer, so dass bei ihnen keine Markierungsreihe guten Gewissens herausgestrichen werden konnte.

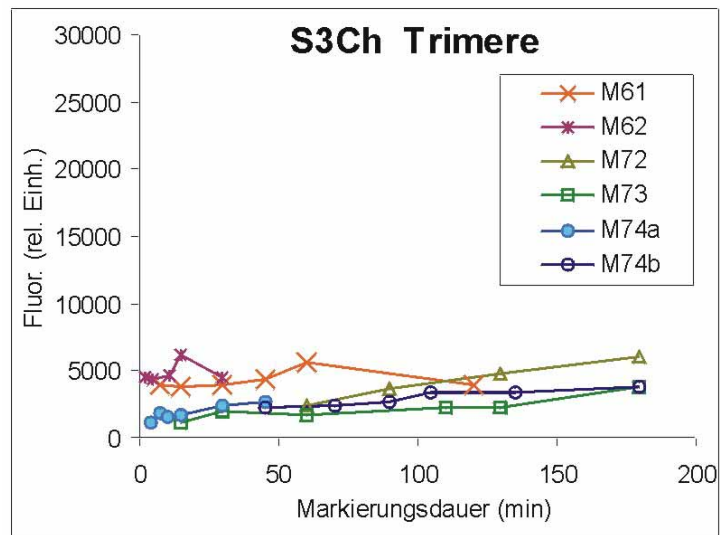
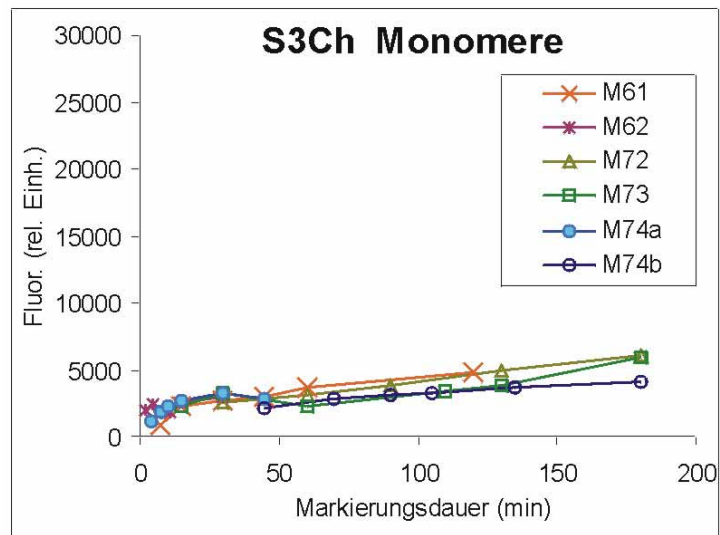
Abb. 7.1 Überblick über alle Markierungsreihen (folgende Seiten)

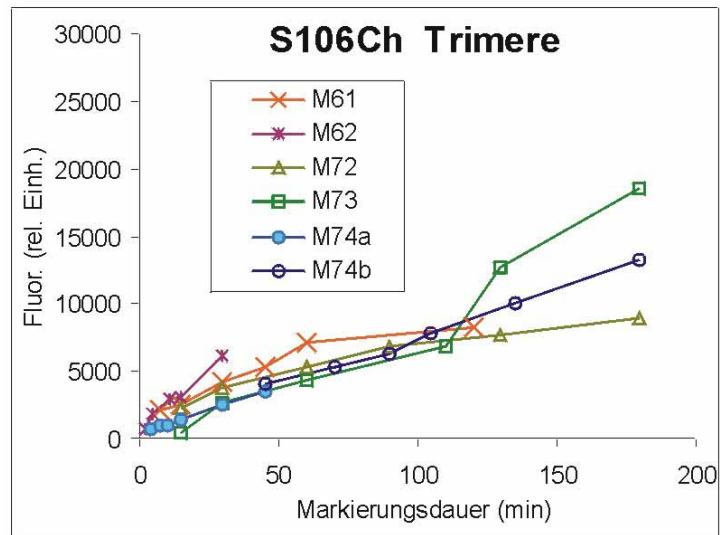
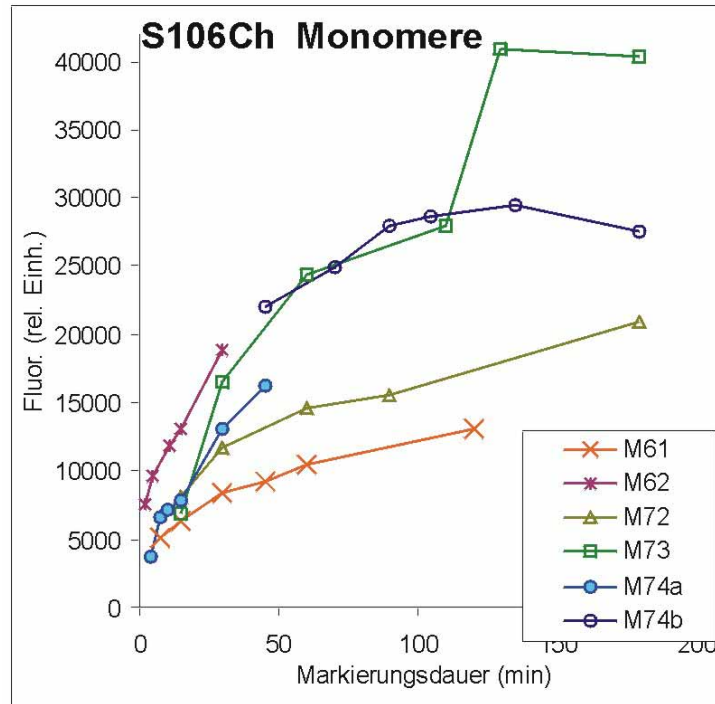
Monomere und Trimere aller 5 LHC-Mutanten wurden nach 2.2.4 trimerisiert und in Monomere und Trimere aufgetrennt. Die Markierung erfolgte nach 2.4.4 Die Werte sind nach mittels einem Fluoreszenzstandard und einer Proteinbestimmung korrigiert.

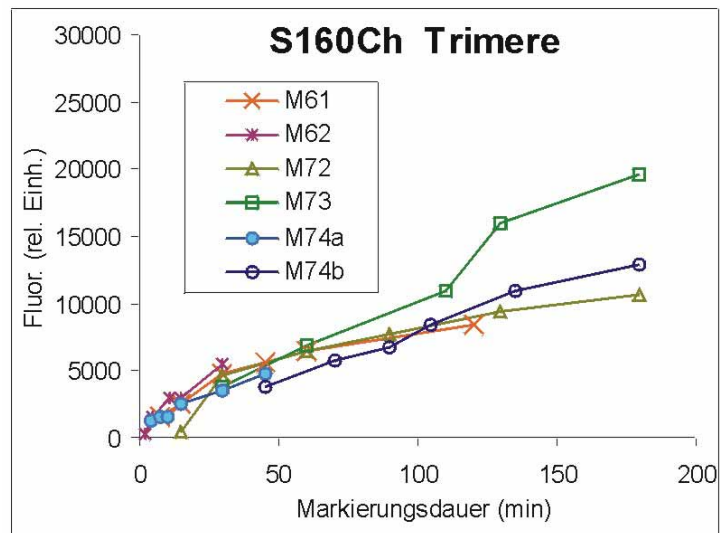
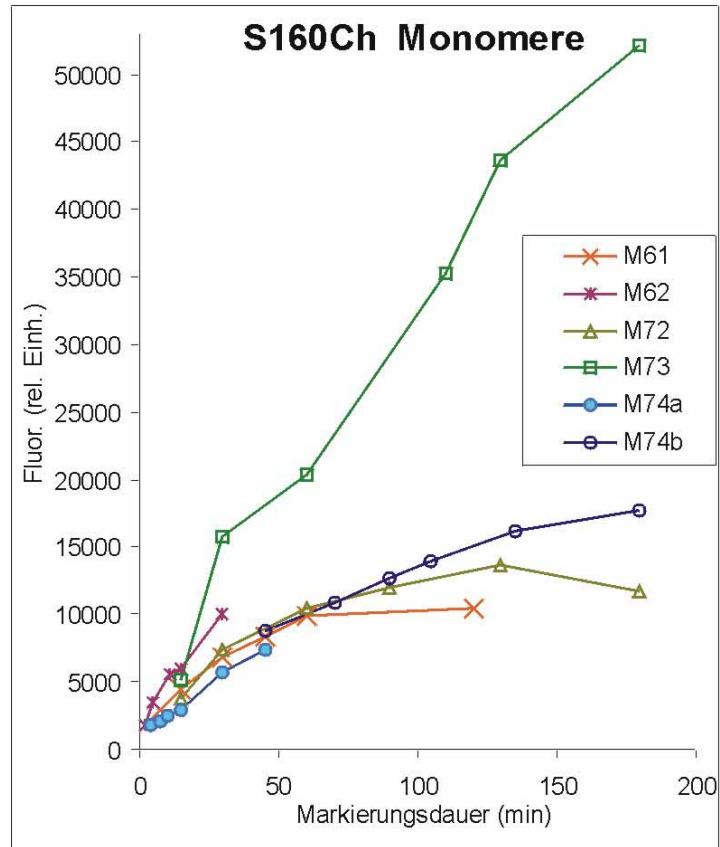
M61, M62: Markierungschargen mit 3000-fachem TCP- und 46-fachem RM-Überschuss.

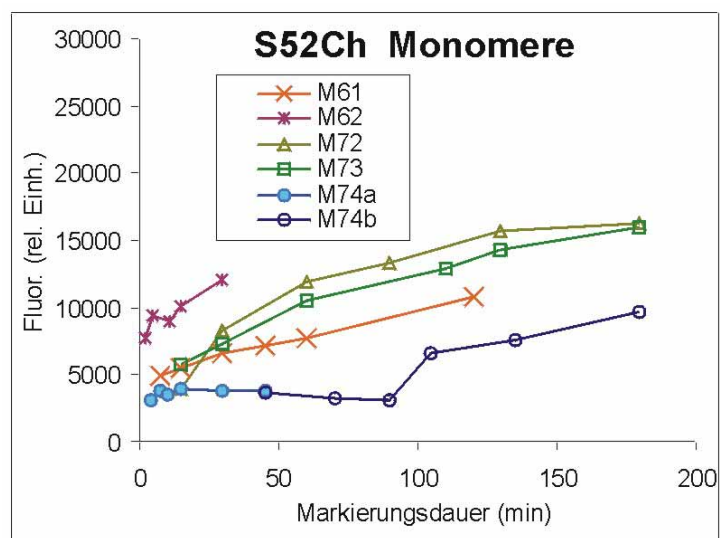
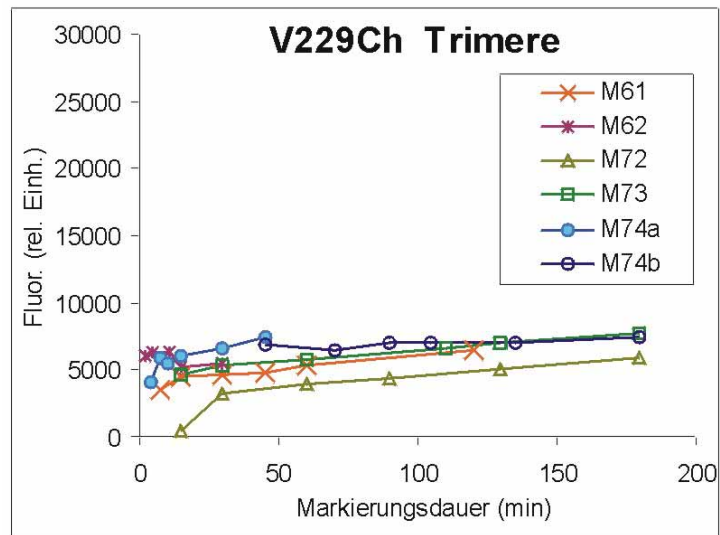
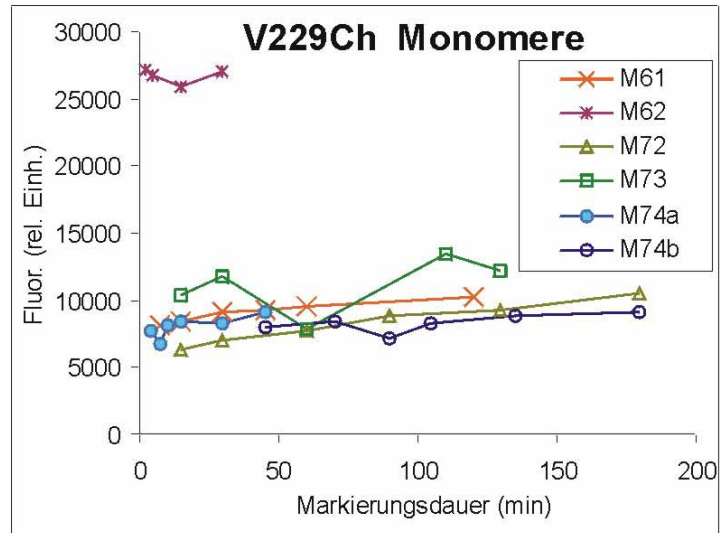
M72, M73, M74a, M74b: Markierungschargen mit 250-fachem TCP- und 23-fachem RM-Überschuss.

Ein zweiter Farbstoffzuschuss in gleicher Höhe der ersten Farbstoffgabe erfolgte bei M73 nach 110 Minuten und bei M74b nach 90 Minuten.









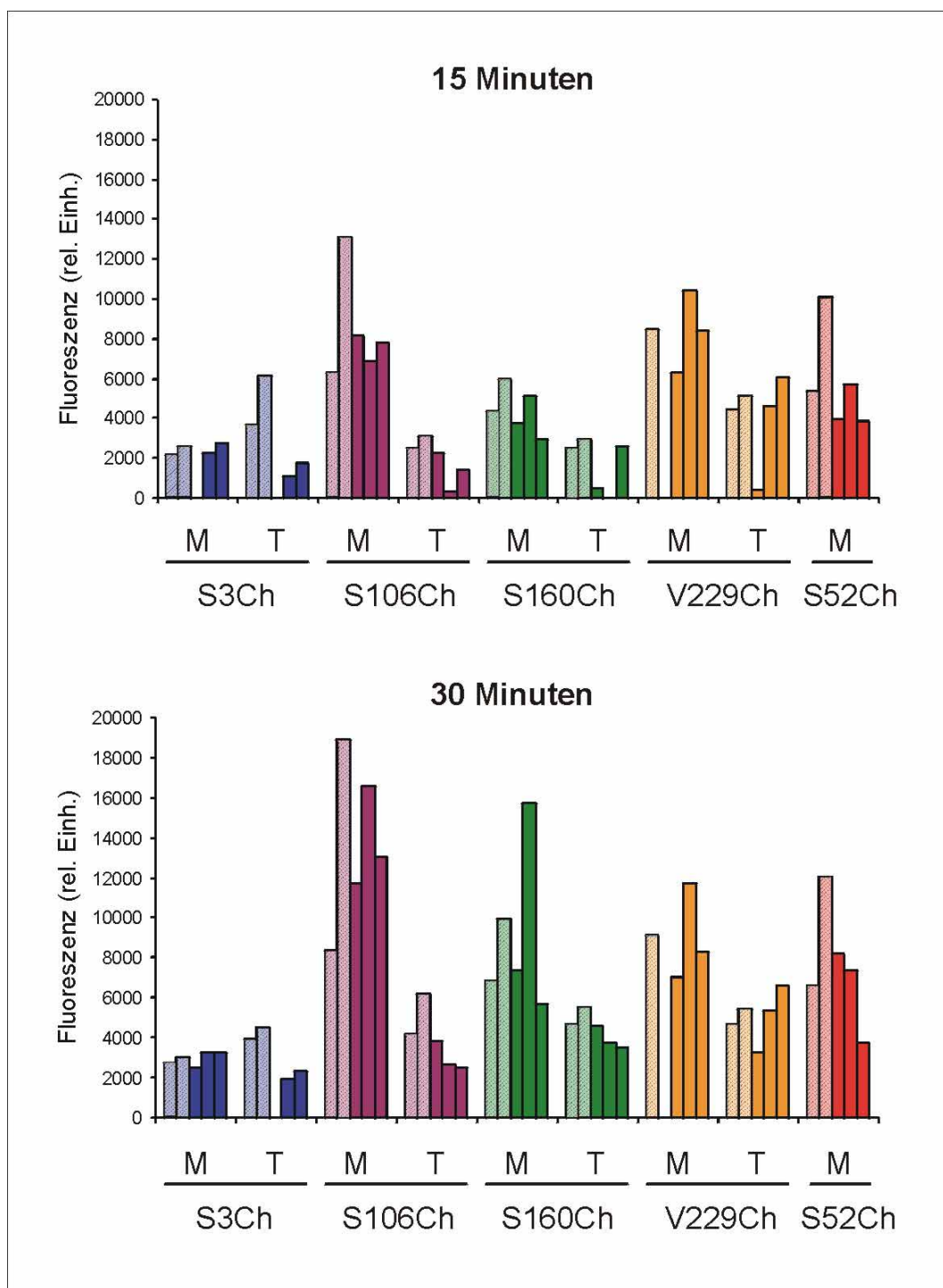


Abb. 7.2 Einzelwerte bei 15 und 30 Minuten Markierungsdauer

Die fünf LHC-Mutanten S3Ch, S106Ch, S160Ch, V229Ch und S52Ch wurden rekonstituiert, trimerisiert und in Monomere und Trimere aufgetrennt. Die Markierung der Komplexe geschah nach 2.4.4 mit einem 3000-fachen TCP- und 46-fachem RM-Überschuss (schraffiert), bzw. mit einem 250-fachen TCP- und 23-fachem RM-Überschuss (einfarbig). Es wurden jeweils die korrigierten Fluoreszenzwerte bei 15 und 30 Minuten herausgegriffen. M: Monomere; T: Trimere.

8 Literaturverzeichnis

Albertsson, P.-A. (2001) A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *Trends Plant Sci.* **6**, 349-354

Allen, J.F. (1992) How does protein phosphorylation regulate photosynthesis? *Trends Biochem. Sci.* **17**, 12-17

Allen, J.F. (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1098**, 275-335

Allen, J.F. & Forsberg, J. (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.* **6** (7), 317-326

Altenbach, C., Cai, K., Khorana, H.G., Hubbell, W.L. (1999) Structural features and light-dependent changes in the sequence 306-322 extending from helix VII to the palmitoylation sites in rhodopsin: a site-directed spin-labeling study. *Biochem.* **38**, 7931-7937

Altenbach, C., Marti, T., Khorana, H.G., Hubbell, W.L. (1990) Transmembrane protein structure: spin labeling of bacteriorhodopsin mutants. *Science* **248**, 1088-1092

Barber, J. & Kühlbrandt, W. (1999) Photosystem II. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 469-475

Boekema, E.J., Hankamer, B., Bald, D., Kruij, J., Nield, J., Boonstra, A.F., Barber, J., Rögner, M. (1995) Supramolecular structure of the photosystem II complex from green plants and cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 175-179

Boekema, E.J., van Roon, H., Calkoen, F., Bassi, R., Dekker, J.P. (1999) Multiple types of association of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Biochem.* **38** (8), 2233-2239

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

Butler, P.J.G. & Kühlbrandt, W. (1988) Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex from chloroplast membranes. *PNAS* **85**, 3797-3801

Cai, K., Klein-Seetharaman, J., Farrens, D., Zhang, C., Altenbach, C., Hubbell, W.L., Khorana, H.G. (1999) Single-cysteine substitution mutants at amino acid positions 306-321 in rhodopsin, the sequence between the cytoplasmic end of helix VII and the palmitoylation sites: sulfhydryl reactivity and transducin activation reveal a tertiary structure. *Biochem.* **38**, 7925-7930

Cai, K., Itho, Y., Khorana, H.G. (2001) Mapping of contact sites in complex formation between transducin and light-activated rhodopsin by covalent crosslinking: Use of a photoactivatable reagent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 4877-4882

Cammarata, K.V. & Schmidt, G.W. (1992) In vitro reconstitution of a light-harvesting gene product: deletion mutagenesis and analyses of pigment binding. *Biochemistry* **31**, 2779- 2789

Cashmore, A.R. (1984) Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a light-harvesting chlorophyll a/b-binding polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2960-2964

Chen, B. & Przybyla, A.E. (1994) An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *BioTechniques* **17**, 657-659

Chicz, R.M. & Regnier, F.E. (1990) High-Performance Liquid Chromatography: Effective Protein Purification by Various Chromatographic Modes. *Meth. Enzymol.* **182**, 392-421

de Grip, W.J., van Oostrum, J., Bovee-Geurts, P.H.M. (1998) Selective detergent-extraction from mixed detergent/lipid/protein micelles, using cyclodextrin inclusion compounds: a novel generic approach for the preparation of proteoliposomes. *Biochem. J.* **330**, 667-674

Corbalan-Garcia, S., Teruel, J.A., Gomez-Fernandez, J.C. (1993) Intramolecular distances within the Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum as estimated through fluorescence energy transfer between probes. *Eur. J. Biochem.* **217**, 737-744

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

Croce, R., Weiss, S., Bassi, R. (1999) Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex of higher plants. *J. Biol. Chem.* **274** (42), 29613-29623

Dekker, J.P., van Roon, H., Boekema, E.J. (1999) Heptameric association of light-harvesting complex II trimers in partially solubilized photosystem II membranes. *FEBS Lett.* **449**, 211-214

- Dilly-Hartwig, H., Allen, J.F., Paulsen, H., Race, H.L. (1998) Truncated recombinant light harvesting complex II proteins are substrates for a protein kinase associated with photosystem II core complexes. *FEBS Lett.* **435**, 101-104
- Dunham, T.D. & Farrens, D.L. (1999) Conformational changes in rhodopsin- movement of helix F detected by site-specific chemical labeling and fluorescence spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **274**, 1683-1690
- Edhofer, I. (1993) Insertion von chemisch markiertem pLHCP in isolierte Thylakoide. Diplomarbeit an der biologischen Fakultät der Lud.-Max.-Universität München
- Eftink, M.R. (1991) Fluorescence techniques for studying protein structure. *Meth. Biochem. Anal.* **35**, 127-205
- Eftink, M.R., Selva, T.J., Wasylewski, Z. (1987) Studies of the efficiency and mechanism of fluorescence quenching reactions using acrylamide and succinimide as quenchers. *Photochem. Photobiol.* **46**, 1, 23-30
- Eriksson, K.-O. (1989) Hydrophobic Interaction Chromatography. Aus : Protein Purification-Principles, High Resolution Methods and Applications (Ed. : Janson, J.-C., Rydén, L.)
- Fischer, M. & Georges, J. (1998) Limitations arising in the study of the fluorescence quenching of rhodamine 6G by iodides using cw-laser thermal lens spectrometry. *Spectrochimica Acta Part A* **54**, 101-110
- Fraser, C.M. (1989) Site-directed mutagenesis of β -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **264** (16), 9266-9270
- Galla, H.-J. (1988) Spektroskopische Methoden in der Biochemie. Thieme
- Gradinaru, C.C., Özdemir, S., Gülen, D., van Stokkum, I.H.M., van Grondelle, R., van Amerongen, H. (1998) The flow of excitation energy in LHCII monomers: implications for the structural model of the major plant antenna. *Biophys. J.* **75**, 3064-3077
- Green, B.R. & Pichersky, E. (1994) Hypothesis for the evolution of three-helix Chl *a/b* and Chl *a/c* light-harvesting antenna proteins from two-helix and four-helix ancestors. *Photosynth. Res.* **39**, 149-162

Hammarström, P., Persson, M., Freskgård, P.-O., Mårtensson, L.-G., Andersson, D., Jonsson, B.-H., Carlsson, U. (1999) Structural mapping of an aggregation nucleation site in a molten globule intermediate. *J. Biol. Chem.* **274** (46), 32897-32903

He, M., Wilde, A., Kaderbhai, M.A. (1989) A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. *Nucl. Acids Res.* **18**, 1660

Heinemann, B. (1999) Random mutations directed to transmembrane and loop domains of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein: impact on complex formation and pigment binding. Dissertation an der Universität Mainz. Shaker Verlag

Heinemann, B. & Paulsen, H. (1999) Random mutations directed to transmembrane and loop domains of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein: impact on pigment binding. *Biochem.* **38**, 14088-14093

Hobe, S. (1995) Trimerisierung des *in-vitro*-rekonstituierten Lichtsammelkomplexes höherer Pflanzen und spektroskopische Untersuchungen zur Pigmentorganisation. Wissenschaftsverlag Mainz, Aachen

Hobe, S., Förster, R., Klingler, J., Paulsen, H. (1995) N-proximal sequence motif in light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex, *Biochemistry* **34**, 10224-10228

Hobe, S., Niemeier, H., Bender, A., Paulsen, H. (2000) Carotenoid binding sites in LHCIIB: Relative affinities towards major xanthophylls of higher plants. *Eur. J. Biochem.* **267**, 616-624

Hobe, S., Prytulla, S., Kühlbrandt, W., Paulsen, H. (1994) Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *EMBO J.* **13**, 3423-3429

Hochuli, E., Döbeli, H., Schacher, A. (1987) New metal chelat adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatography* **411**, 177-184

Howorka, S., Sára, M., Wang, Y., Kuen, B., Sleytr, U.B., Lubitz, W., Bayley, H. (2000) Surface-accessible residues in the monomeric and assembled forms of a bacterial surface layer protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 37876-37886

Hruz, P.W., Mueckler, M.M. (1999) Cysteine scanning mutagenesis of transmembrane segment 7 of the GLUT1 Glucose transporter. *J. Biol.Chem.* **274** (51), 36176-36180

- Hu, L.A. & King, S. (1999) Identification of the amine-polyamine-choline transporter superfamily 'consensus amphipatic region' as the target for inactivation of the *Escherichia coli* GABA transporter GabP by thiol modification reagents. *Biochem. J.* **339**, 649-655
- Huschenbett, C. (1997) Lichtsammlerkomplex LHCII mit angekoppeltem Cyaninfarbstoff Cy5.5: Ein Minimalmodell für ein Photosystem. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Mainz
- Jackowski, G., Kacprzak, K., Jansson, S. (2001) Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex of photosystem II (LHCII). *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 340-345
- Jansson, S. (1994) The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1184**, 1-19
- Jansson, S. (1999) A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **4**, 236-240
- Jansson, S., Pichersky, E., Bassi, R., Green, B.R., Ikeuchi, M., Melis, A., Simpson, D.J., Spangfort, M., Staehelin, L.A., Thornber, J.P. (1992) A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll *a/b*-binding proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **10**, 242-253
- Javitch, J.A. (1998) Probing structure of neurotransmitter transporters by substituted-cysteine accessibility method. *Meth. Enzym.* **296**, 331-346
- Javitch, J.A., Li, X., Kaback, J., Karlin, A. (1994) A cysteine residue in the third membrane-spanning segment of the human D₂ dopamine receptor is exposed in the binding crevice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10355-10359
- Jones, S. & Thornton, J.M. (1995) Protein-protein interactions: a review of protein dimer structures. *Prog. Biophys. molec. Biol.* **63**, 31-65
- Kågedal, L. (1989) Immobilized metal ion affinity chromatography. Aus: Protein Purification-Principles, High Resolution Methods and Applications (Ed. : Janson, J.-C., Rydén, L.)
- Karlin, A. & Akabas, M.H. (1998) Substituted-cysteine accessibility method. *Meth. Enzym.* **293**, 123-145

- Kennedy, R.M. (1990) Hydrophobic Chromatography. *Meth. Enzymol.* **182**, 339-343
- Klein-Seetharaman, J., Hwa, J., Cai, K., Altenbach, C., Hubbell, W.L., Khorana, G.H. (1999) Single-cysteine substitution mutants at amino acids positions 55-75, the sequence connecting the cytoplasmic ends of helices I and II in rhodopsin: reactivity of the sulfhydryl groups and their derivatives identifies a tertiary structure that changes upon light-activation. *Biochem.* **38**, 7938-7944
- Kosemund, K. (1999) Die Biogenese von Chlorophyll-a/b-bindenden Lichtsammelkomplexen: Topographie des Apoproteins bei der Thylakoidinsertion. Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Mainz
- Kosemund, K., Geiger, I., Paulsen, H. (1999) Insertion of light-harvesting chlorophyll a/b protein into the thylakoid - Topographical studies. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1138-1145
- Krupa, Z., Williams, J.P., Khan, M.U., Huner, N.P.A. (1992) The role of acyl lipids in reconstitution of lipid-depleted light-harvesting complex II from cold-hardened and nonhardened rye. *Plant Physiol.* **100**, 931-938
- Kühlbrandt, W. (1994) Structure and function of the plant light-harvesting complex, LHC-II. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 519-528
- Kühlbrandt, W., Wang, D.N., Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* **367**, 614-621
- Kumar, S. & Bansal, M. (1998) Dissecting α -helices: position-specific analysis of α -helices in globular proteins. *Proteins: structure, function, and genetics* **31**, 460-476
- Kuttkat, A., Grimm, R., Paulsen, H. (1995) Light-harvesting chlorophyll-a/b-binding protein inserted into isolated thylakoids binds pigments and is assembled into trimeric light-harvesting complex. *Plant Physiol.* **109** (4), 1267-1276
- Kuttkat, A., Hartmann, A., Hobe, S., Paulsen, H. (1996) The C-terminal domain of light-harvesting chlorophyll-a/b-binding protein is involved in the stabilisation of trimeric light-harvesting complex. *Eur. J. Biochem.* **242**, 288-292
- Langen, R., Cai, K., Altenbach, C., Khorana, H.G., Hubbell, W.L. (1999) Structural features of the C-terminal Domain of bovine rhodopsin: a site-directed spin-labeling study. *Biochem.* **38**, 7918-7924

- Langen, R., Isas, J.M., Hubbell, W.L., Haigler, H.T. (1998) A transmembrane form of annexin XII detected by site-directed spin labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **95**, 14060-14065
- Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
- Li, M., Reddy, L.G., Bennet, R., Silva, N., Jones, L.R., Thomas, D.D. (1999) A fluorescence energy transfer method for analyzing protein oligomeric structure: application to phospholamban. *Biophys. J.* **76**, 2587-2599
- Li, X.-P., Björkman, O., Shih, C., Grossman, A.R., Rosenquist, M., Jansson, S., Niyogi, K.K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **403**, 391-395
- Lo, B. & Silverman, M. (1998) Cysteine scanning mutagenesis of the segment between putative transmembrane helices IV and V of the high affinity Na⁺/glucose cotransporter SGLT1. *J. Biol. Chem.* **273** (45), 29341-29351
- Lunde, C., Jensen, P.E., Haldrup, A., Knoetzel, J., Scheller, H.V. (2000) The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature* **408**, 613-615
- Mullet, J.E. & Arntzen, C.J. (1980) Simulation of grana stacking in a model membrane system. Mediation by a purified light-harvesting pigment-protein complex from chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta* **589**, 100-117
- Mullet, J.E. (1983) The amino acid sequence of the polypeptide segment which regulates membrane adhesion (grana stacking) in chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **258**, 9941-9948
- Murray, D.L. & Kohorn, B.D. (1991) Chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* homozygous for the CH-1 locus lack chlorophyll b, lack stable LHClI and have stacked thylakoids. *Plant Mol. Biol.* **16** (1), 71-79
- Nilsson, A., Stys, D., Drakenberg, T., Spangfort, M.D., Forsén, S., Allen, J.F. (1997) Phosphorylation controls the three-dimensional structure of plant light harvesting complex II. *J. Biol. Chem.* **272**, 18350-18357
- Nußberger, S., Dörr, K., Wang, D.N., Kühlbrandt, W. (1993) Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J. Mol. Biol.* **234**, 347-356

- Nussberger, S., Dekker, J.P., Kühlbrandt, W., van Bolhuis, B.M., van Grondelle, R., van Amerongen, H. (1994) Spectroscopic characterization of three different monomeric forms of the main chlorophyll a/b binding protein from chloroplast membranes. *Biochem.* **34**, 14755-14783
- Ottmann, K. (1999) Zeitaufgelöste Messungen zur Faltung des Chl a/b Lichtsammlerproteins: Xanthophyllvariation und Fluoreszenzfarbstoffmarkierung. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Mainz
- Palmer, M., Saweljew, P., Vulicevic, I., Valeva, A., Kehoe, M., Bhakdi, S. (1996) Membrane-penetrating domain of Streptolysin O identified by cysteine scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 26664-26667
- Paulsen, H. & Hobe, S. (1992) Pigment-binding properties of mutant light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **205**, 71-76
- Paulsen, H., Rümmler, U., Rüdiger, W. (1990) Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* **181**, 204-211
- Paulsen, H., Finkenzeller, B., Kühlein, N. (1993) Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **215**, 809-816
- Peter, G.F. & Thornber, J.P. (1991) Electrophoretic procedures for fractionation of photosystems I and II pigment-proteins of higher plants and for determination of their subunit composition. *Aus: Methods in plant biochemistry* (Ed.: Rogers, L.G.), Vol. **5**, 195-210
- Pichersky, E. & Jansson, S. (1996) The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding polypeptides and their genes in angiosperm and gymnosperm species. *Aus: Oxygenic photosynthesis: the light reactions* (Ed.: Ort, D.R., Yocum, C.F.) 507-521
- Plumley, F.G. & Schmidt, G.W. (1987) Reconstitution of chlorophyll *a/b* light-harvesting complexes: xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 146-150
- Popot, J.-L. & Engelman, D.M. (2000) Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 881-922
- Porath, J. (1992) Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification* **3**, 263-281

- Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **975**, 384-394
- Remelli, R., Varotto, C., Sandonà, D., Croce, R., Bassi, R. (1999) Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex. A mutation analysis of chromophore-binding residues. *J. Biol. Chem.* **274** (47), 33510-33521
- Rémy, R., Trémolières, A., Duval, J.C., Ambard-Bretteville, F., Dubacq, J.P. (1982) Study of the supramolecular organization of light-harvesting chlorophyll protein (LHCP). *FEBS Lett.* **137**, 271-275
- Rémy, R., Trémolières, A., Ambard-Bretteville, F. (1984) Formation of oligomeric light-harvesting chlorophyll *a/b* protein by interaction between its monomeric form and liposomes. *Photobiochem. Photobiophys.* **7**, 267-276
- Resek, J.F., Farrens, D., Khorana, H.G. (1994) structure and function in rhodopsin: covalent crosslinking of the rhodopsin (metarhodopsin II)-transducin complex – the rhodopsin cytoplasmic face links to the transducin α subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7643-7647
- Ridge, K.D., Zhang, C., Khorana, H.G. (1995) Mapping of the amino acids in the cytoplasmic loop connecting helices C and D in rhodopsin. Chemical reactivity in the dark state following single cysteine replacements. *Biochem.* **34**, 8804-8811
- Rogl, H. (2000) Struktur und Funktion des Lichtsammelkomplexes LHC-II der höheren Pflanzen. Dissertation an der Universität Frankfurt am Main, Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie
- Rogl, H., Kosemund, K., Kühlbrandt, W., Collinson, I. (1998) Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Lett.* **432**, 21-26
- Rogl, H. & Kühlbrandt, W. (1999) Mutant trimers of light-harvesting complex II exhibit altered pigment content and spectroscopic features. *Biochemistry* **38**, 16214-16222

- Shafer, D.E., Inman, J.K., Lees, A. (2000) Reaction of Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) with Maleimide and α -Haloacyl Groups: Anomalous Elution of TCEP by Gel Filtration. *Anal. Biochem.* **282**, 161-164
- Standfuß, J. (2000) Untersuchungen zur Stabilisierung des Trimers von rekombinantem Light Harvesting Complex II. Diplomarbeit am MPI für Biophysik Frankfurt am Main/ im Fachbereich Biologie der Universität Mainz
- Storf, S. (2001) Ortsspezifische Markierung hydrophiler Bereiche des rekombinanten Chlorophyll-a/b-Lichtsammlerkomplexes (LHCII): Unterschiede in Monomer und Trimer. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität Mainz
- Tang, X.-B., Kovacs, M., Sterling, D., Casey, J.R. (1999) Identification of the residues lining the translocation pore of human AE1, plasma membrane anion exchange protein. *J. Biol. Chem.* **274** (6), 3557-3564
- Tietz, C., Jelezko, F., Gerken, U, Schuler, S., Schubert, A., Rogl, H., Wrachtrup, J. (2001) Single molecule spectroscopy on the light-harvesting complex II of higher plants. *Biophys. J.* **81** (1), 556-562
- Trémolières, A. (1991) Lipid-protein interactions in relation to light energy distribution in photosynthetic membrane of eukaryotic organisms. Role of trans- Δ^3 -hexadecenoic acid-containing phosphatidylglycerol. *Trends Photochem. Photobiol.* **2**, 13-32
- van Amerongen, H. & van Grondelle, R. (2001) Understanding the energy transfer function of LHCII, the major light-harvesting complex of green plants. *J. Phys. Chem. B* **105**, 604-617
- van der Meer, B.W., Coker III, G., Chen, S.-Y.S. (1994) Resonance energy transfer. Theory and data. John Wiley & Sons
- Vasil'ev, S., Orth, P., Zouni, A., Owens, T.G., Bruce, D. (2001) Excited-state dynamics in photosystem II: insights from the x-ray crystal structure. *PNAS* **98**, 8602-8607
- Viguera, A.R. & Serrano, L. (1995) Side-chain interactions between sulfur-containing amino acids and phenylalanine in α -helices. *Biochem.* **34**, 8771-8779
- Voss, J. Salwinski, L., Kaback, H.R., Hubbell, W. (1995) A method for distance determination in proteins using a designed metal ion binding site and site-directed spin labeling: evaluation with T4 lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 12295-12299

- Wentworth, M., Ruban, A.V., Horton, P. (2000) Chlorophyll fluorescence quenching in isolated light harvesting complexes induced by zeaxanthin. *FEBS Lett.* **471**, 71-74
- Wolf-Klein, H. (2001) Biomimetisches Modell eines Photosystems aus dem pflanzlichen Photosyntheseapparat: Energietransfermessungen und Einzelmolekülspektroskopie an Fluoreszenzfarbstoff-markierten rekombinanten Lichtsammelkomplexen. Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Mainz
- Wollman, F.-A., Minai, L., Nechushtai, R. (1999) The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 21-85
- Yang, C., Kosemund, K., Cornet, C., Paulsen, H. (1999) Exchange of pigment-binding amino acids in light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. *Biochemistry* **38**, 16205-16213
- Yang, D.-H., Paulsen, H., Andersson, B. (2000) The N-terminal domain of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein complex (LHCII) is essential for its acclimative proteolysis. *FEBS Lett.* **466**, 385-388
- Zer, H., Vink, M., Keren, N., Dilly-Hartwig, H.G., Paulsen, H., Herrmann, R.G., Andersson, B., Ohad, I. (1999) Regulation of thylakoid protein phosphorylation at the substrate level: Reversible light-induced conformational changes expose the phosphorylation site of the light-harvesting complex II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8277-8282
- Zouni, A., Witt, H.-T., Kern, J., Fromme, P., Krauß, N., Saenger, W., Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3,8 Å resolution. *Nature* **409**, 739-743