

**Untersuchung der Struktur und Assemblierung des
Lichtsammelkomplexes II höherer Pflanzen mittels
elektronenparamagnetischer Resonanz (EPR)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades "Doktor der Naturwissenschaften"
am Fachbereich Biologie der
Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Christoph Dockter

geb. am 5. April 1978 in Neunkirchen/Saar

Mainz 2009

Tag der mündlichen Prüfung: 26.08.2009

Dekan:

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

für Anna

Inhaltsverzeichnis

I Allgemeine Einleitung	1
1 Die Photosynthese	1
2 Der Lichtsammelkomplex II	4
2.1 Charakterisierung des LHCII	4
2.2 Der rekombinante LHCII	9
2.3 Die Funktionen des LHCII	10
2.3.1 Phosphorylierung der N-terminalen Domäne und „state transitions“	10
2.3.2 Die energieabhängige nicht-photochemische Löschung der Anregungsenergie (qE) durch LHCII	11
2.4 Vergleich der Kristallstrukturen des LHCII aus Spinat und Erbse	13
3 EPR-Spektroskopie	14
4 Zielsetzung der Arbeit	18
II Kapitel	21
Kapitel I Herstellung und Charakterisierung von Cys-Mutanten des rekombinanten LHCII sowie Optimierung der Spinmarkierung mit Nitroxid-Markern.	23
1 Einleitung	23
2 Material und Methode	24
2.1 Geräte	24
2.2 Chemikalien	27
2.2.1 Lösungsmittel	27
2.2.2 Gase	27
2.2.3 Weitere Chemikalien	27
2.3 Längenstandards	28
2.3.1 DNA-Längenstandards	28
2.3.2 Protein-Längenstandards	29
2.4 Marker	29
2.4.1 EPR-Spinmarker	29
2.4.2 Fluoreszenzmarker	30
2.5 Bakterienstämme	32
2.5.1 JM101	32
2.5.2 XL1-Blue	32
2.6 Molekularbiologische Methoden zur Herstellung neuer <i>Lhcb1</i> -Klone	32
2.6.1 Klonierungsstrategien und Beschreibung hergestellter Mutanten	32
2.6.2 Ausgangsklone und pDS12-Vektor	34
2.6.3 Plasmid-Isolierung und DNA-Quantifizierung	35
2.6.4 Polymerase-Kettenreaktion	36
2.6.4.1 Durchführung der PCR	36

Inhaltsverzeichnis

2.6.4.1.1 Mutagenese-PCR mittels „Quikchange® II site-directed mutagenesis kit“	36
2.6.4.1.2 Identifikation positiver Klone mittels „dirty“-PCR	37
2.6.4.1.3 PCR zur Sequenzierung	38
2.6.4.2 PCR-Primer	39
2.6.4.2.1 Primer für die Mutagenese-PCR	39
2.6.4.2.2 Primer für „dirty“-PCR und Sequenzier-PCR	41
2.6.5 Restriktion von DNA	42
2.6.6 Agarose-Gelelektrophorese	42
2.6.6.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese	43
2.6.6.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese nach DNA-Restriktion	43
2.6.6.3 Rückgewinnung restringierter DNA aus Agarose-Gelen	43
2.6.7 Ligation	44
2.6.8 Transformation in <i>E. coli</i>	44
2.6.9 Dauerkulturen	45
2.6.10 Durchführung unterschiedlicher Mutagenese-Strategien	45
2.6.10.1 Punktspezifische Mutagenese mittels „Quikchange® II site-directed mutagenesis kit“	45
2.6.10.2 Herstellung von <i>Lhcb1</i> -Konstrukten durch Restriktion und Ligation vorhandener Klone	47
2.6.10.3 Herstellung von Klonen durch Insertions-PCR	48
2.7 Präparative biochemische Methoden	48
2.7.1 Isolierung von Pigmenten	48
2.7.1.1 Anzucht von <i>Pisum sativum</i>	49
2.7.1.2 Isolierung von Totalpigmentextrakt aus <i>Pisum sativum</i>	49
2.7.1.3 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes nach Porra <i>et al.</i> (1989)	50
2.7.1.4 Überprüfung der Pigmentzusammensetzung mittels analytischer HPLC	50
2.7.1.5 Butanol-Extraktion nach Martinson und Plumley (1995)	51
2.7.1.6 Aliquotieren und Aufbewahrung der Pigmente	51
2.7.2 Überexpression und Isolierung von LHCP aus <i>E. coli</i> als „inclusion bodies“	52
2.7.3 Photometrische Quantifizierung der Proteinkonzentration	53
2.7.4 Markierung von LHCP	53
2.7.4.1 Markierung von LHCP mit SH-reaktiven Spinmarkern	53
2.7.4.2 Markierung von LHCP mit SH-reaktiven Fluoreszenzmarkern	55
2.7.4.3 Fällung von Protein mit Aceton und Essigsäure	55
2.7.4.4 Fällung von PROXYL-markiertem Protein mit Trichloressigsäure	56
2.7.5 Detergenzwechsel-Rekonstitution	56
2.7.6 Immobilisierung und Trimerisierung des rekombinanten LHCII mittels des „His ₆ tag“/Ni ²⁺ -IDA-Sepharose®-Systems	57
2.7.7 Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	60
2.7.8 Aufkonzentrierung von LHCII	60
2.7.9 Konzentrationsbestimmung von LHCII nach Butler & Kühlbrandt (1988)	61

Inhaltsverzeichnis

2.8 Analytische Methoden	61
2.8.1 Gelelektrophorese	62
2.8.1.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)	62
2.8.1.2 Schwach-denaturierende Gelelektrophorese („grüne Gele“) nach Peter & Thornber (1991)	63
2.8.1.2.1 Umkristallisation von Deriphat nach H. Paulsen	64
2.8.1.3 Coomassie-Brilliant-Blaufärbung	65
2.8.1.4 Densitometrische Auswertung von PA-Gelen mittels Versa Do	65
2.8.2 Spektroskopie	65
2.8.2.1 Absorptionsspektroskopie	65
2.8.2.2 Fluoreszenzspektroskopie	66
2.8.2.3 Circular-Dichroismus (CD)-Spektroskopie	67
2.8.2.4 EPR-Spektroskopie	68
2.8.2.4.1 continuous wave-EPR (CW-EPR)	68
2.8.2.4.2 Puls-EPR	68
3 Ergebnisse	70
3.1 Einleitung	70
3.2 Herstellung neuer Klone mittels punktspezifischer Mutagenese	70
3.3 Herstellung neuer Klone des <i>Lhcb1</i> mittels Restriktion und Ligation am Beispiel der Mutante S59Ch	73
3.4 Biochemische und spektroskopische Charakterisierung neuer LHCII-Klone	74
3.4.1 Herstellung der rekombinanten Apoproteine	74
3.4.2 Rekonstitution der neuen Mutanten zu funktionalen Protein-Pigment-Komplexen	75
3.4.3 Rekonstitution und Trimerisierung neuer Mutanten mit C-terminalem „His ₆ tag“ zu funktionalen Protein-Pigment-Komplexen	77
3.5 Optimierung der Spinmarkierung des rekombinanten LHCII	80
3.5.1 Vergleich der Markierungsausbeuten bei Verwendung unterschiedlicher Spinmarker	80
3.5.2 Vergleich von TEMPO- und PROXYL-markiertem LHCII bezüglich Spinmarker-Stabilität und DEER-Abständen	83
4 Diskussion	86
4.1 Herstellung neuer <i>Lhcb1</i>-Klone mittels punktspezifischer Mutagenese	86
4.2 Herstellung von <i>Lhcb1</i>-Klonen durch Neukombination bereits existierender Klone	87
4.3 Beeinflussung der Struktur des rekombinanten LHCII durch SDSL	88
4.4 Optimierung des EPR-Signals durch Markierung des LHCP mit PROXYL	91
5 Schlussfolgerung	93

Inhaltsverzeichnis

Kapitel II Immobilisierung des rekombinanten LHCII mittels	95
Affinitätschromatographie: Bindungsverhalten sowie	
Experimente zur Herstellung heterogener LHCII-Trimere.	
1 Einleitung	95
2 Material und Methode	97
2.1 Molekularbiologische Herstellung von <i>Lhcb1</i>-Klonen mit N-terminale	97
„Strep tag“ und C-terminalem „His₆ tag“ mittels Restriktion und Ligation	
2.2 Präparative und analytische biochemische Methoden	100
2.2.1 Überexpression, Markierung und Rekonstitution von LHCP	100
2.2.2 Affinitätschromatographie	100
2.2.2.1 Immobilisierung des LHCII mittels „His ₆ tag“	100
2.2.2.1.1 „His ₆ tag“/Ni ²⁺ -NTA-Sepharose [®]	101
2.2.2.1.2 „His ₆ tag“/Ni ²⁺ -IDA-Sepharose [®] und „His ₆ tag“/Ni ²⁺ -IDA-Fractogel [®]	102
2.2.2.1.3 Immobilisierung des LHCII mittels „His ₆ tag“ nach Ultrazentrifugation	104
2.2.2.1.4 Einfluss von Ni ²⁺ -Ionen in der Proteinlösung auf die	104
Immobilisierung des „His ₆ tag“	
2.2.2.1.5 Einfluss von Detergentien auf die Immobilisierung des „His ₆ tag“	104
2.2.2.2 Immobilisierung des LHCII mittels „Strep tag“/Strep-Tactin-System	106
2.2.2.2.1 Immobilisierung und Trimerisierung von rekombinantem	108
LHCII mittels „Strep tag“	
2.2.2.2.2 Aufeinanderfolgende Immobilisierung von Klonen mit zwei	110
Affinitätsmarkern: Trimerisierung mittels C-terminalem „His ₆ tag“ und	
nachfolgende Bindung der Trimere mittels N-terminalem „Strep tag“	
2.2.2.2.3 Herstellung heterogen markierter Trimere des rekombinanten LHCII	110
3 Ergebnisse	111
3.1 Versuche zur Bindung des LHCII mittels C-terminalem „His₆ tag“	111
3.1.1 Trimerisierungs-Ausbeuten bei Verwendung unterschiedlicher	111
Säulenmaterialien	
3.1.2 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Bindung des LHCII an Ni-Säulen	113
3.1.2.1 Bindung des monomeren und trimeren LHCII nach Ultrazentrifugation	113
3.1.2.2 Einfluß von Ni ²⁺ -Ionen in der Proteinlösung auf die Bindung des	115
„His ₆ tag“ an Ni ²⁺ -IDA-Sepharose	
3.1.2.3 Einfluß verschiedener Detergentien in der Proteinlösung auf	116
die Bindung des „His ₆ tag“ an Ni ²⁺ -IDA-Sepharose	
3.2 Immobilisierung des rekombinanten LHCII mittels N-terminalem „Strep tag“	120
3.2.1 Molekularbiologische Konstruktion der <i>Lhcb1</i> -Klone stC79Sh und st106/160h	122
3.2.2 Biochemische Charakterisierung der LHCII-Mutanten stC79Sh und	123
st106/160h: Rekonstitution sowie Trimerisierung mittels C-terminalem	
„His ₆ tag“ oder mittels N-terminalem „Strep tag“	
3.2.3 Immobilisierung des trimeren LHCII mittels „Strep tag“/Strep-Tactin-System	127
3.2.4 Herstellung heterogen markierter LHCII-Trimere: Oligomerisierung auf	129
der Ni-Säule sowie Aufreinigung mittels „Strep tag“/Strep-Tactin-System	

Inhaltsverzeichnis

3.2.5 Herstellung heterogen spinmarkierter LHCII-Trimere zur Durchführung von DEER-Abstandsmessungen	133
4 Diskussion	136
4.1 Versuch der Herstellung heterogener LHCII-Trimere durch wiederholte Immobilisierung mittels „His ₆ tag“	136
4.2 Versuch der Herstellung heterogener LHCII-Trimere durch Immobilisierung mittels „Strep tag“	143
5 Schlussfolgerung	146
Kapitel III EPR-spektroskopische Untersuchung der Struktur des LHCII in Lösung.	147
1 Einleitung	147
2 Material und Methode	149
2.1 Präparation des spinmarkierten LHCII in stationärem Zustand für CW-EPR- und Puls-EPR-Messungen	149
2.2 Präparation des spinmarkierten LHCII für zeitaufgelöste Puls-EPR-Messungen	149
2.3 Simulation der theoretischen Abstandsverteilung in PROXYL-markierten LHCII-Mutanten	151
3 Ergebnisse	153
3.1 Puls-EPR-Experimente an LHCII-Proben in stationärem Zustand	153
3.1.1 Detektion lokaler Strukturinformation durch Messung der Wasserzugänglichkeit mittels ESEEM-EPR	153
3.1.1.1 Publikation I. Volkov et al. (2009) Pulsed EPR determination of water accessibility to spin-labeled amino acid residues in LHCIIb. Biophys. J., 96, 1124-1141.	154
3.1.1.2 Wasserzugänglichkeit ausgewählter Aminosäuren der N-terminalen Domäne im Vergleich zu membranständigen Aminosäuren des monomeren LHCII	195
3.1.1.3 Vergleich der N-terminalen Domäne des monomeren und trimeren LHCII mittels ESEEM-EPR	198
3.1.2 Detektion der Proteinstruktur mittels DEER-Abstandsmessungen	200
3.1.2.1 Intramolekulare Abstandsmessungen in kristallographisch erfassten Domänen des monomeren LHCII	201
3.1.2.2 Abstandsmessungen in kristallographisch erfassten Domänen des LHCII in Abhängigkeit der Mizellen-Zusammensetzung	204
3.1.2.3 DEER-spektroskopische Untersuchung der Konformation des N-Terminus in monomerem LHCII	207
3.1.2.4 DEER-spektroskopische Untersuchung der N-terminalen Domäne in trimerem LHCII	211

Inhaltsverzeichnis

3.2 Detektion von Membranproteinfaltung mittels Puls-EPR	216
3.2.1 Etablierung eines modifizierten Rekonstitutionsprotokolls für zeitaufgelöste EPR-Messungen	216
3.2.2 Änderung der Wasserzugänglichkeit während der Faltung des LHCII: zeitaufgelöste ESEEM-Spektroskopie	218
3.2.3 Publikation II. Dockter <i>et al.</i> Refolding of the integral membrane protein light-harvesting complex II monitored by pulse EPR. [<i>Submitted</i>]	221
4 Diskussion	246
4.1 Strukturaufklärung an rekombinantem LHCII in Lösung mittels Puls-EPR-Spektroskopie	246
4.2 Strukturdynamik der lumenalen Schleifenregion in rekombinantem LHCII	249
4.3 Lokalisierung der N-terminalen Domäne des LHCII in Detergenzlösung	254
4.4 Zeitaufgelöste Messung der LHCII-Faltung mittels Puls-EPR-Spektroskopie	256
5 Schlussfolgerungen	258
Kapitel IV Experimente zur Insertion nativer LHCII-Trimere in	259
artifizielle Vesikel aus Diblockcopolymeren.	
1 Einleitung	259
1.1 Amphiphile Diblockcopolymeren: Aufbau und spontane Selbstorganisation	259
1.2 Insertion von Membranproteinen in artifizielle Polymersomen	261
2 Material und Methode	263
2.1 Aufreinigung des trimeren LHCII aus Erbse durch sukzessive Fällung (nach Krupa <i>et al.</i> , 1987; modifiziert nach Rühle & Paulsen, 2004)	263
2.2 Synthese des amphiphilen Diblockcopolymeren Polybutadien-b-polyethylenoxid und spontane Selbstorganisation zu Vesikeln	264
2.3 Ansatz zur Insertion von nativen LHCII-Trimern in PB ₁₃₀ -b-PEO ₆₆ -COOK-Vesikel	265
2.4 Spektroskopische Charakterisierung des LHCII nach Insertionsversuch	266
2.5 Dynamische Lichtstreuung	267
2.6 Atomare Kraftmikroskopie zur Erstellung eines Höhenprofils von PB ₁₃₀ -b-PEO ₆₆ -COOK-Vesikeln	268
2.7 Fluoreszenz-Mikroskopie	268
2.8 Verdau von Insertionsansätzen mit der Protease Thermolysin	268
3 Ergebnisse	270
3.1 Isolierung nativer LHCII-Trimere aus Erbse durch sukzessive Fällung mit Salz	270
3.2 Photometrische Untersuchung zur Entfernung des Detergenz TX aus Insertionsansätzen durch die Behandlung mit „Bio Beads“	271
3.3 Spektroskopische Charakterisierung des LHCII nach Insertionsversuchen	273
3.4 Messung der Hitzestabilität des LHCII in PB-PEO-Vesikellösung mittels CD-Absorption	276
3.5 Dynamische Lichtstreuung	277

Inhaltsverzeichnis

3.6 Erstellung eines Höhenprofils von PB ₁₃₀ -b-PEO ₆₆ -COOK-Vesikeln mittels AFM	278
3.7 Charakterisierung der Partikel in gespreiteten Polymerschichten mittels Fluoreszenz-Mikroskopie	282
3.8 Verdau von Insertionsansätzen mit der Protease Thermolysin	283
4 Diskussion	285
4.1 Überprüfung der Ausgangsbedingungen für Insertionsversuche	285
4.2 Entfernung der Detergenzien aus den Insertionsansätzen	285
4.3 Stabile Einlagerung des LHCII in die hydrophile PEO-Schicht von Polymersomen unter Ausbildung von Protein-Aggregaten	286
5 Schlussfolgerung	288
III Zusammenfassung	289
IV Literaturverzeichnis	291
V Anhang	301
1 Sequenzen	301
1.1 Klon C3.2h (Kosemund, 1999)	301
1.2 Klone mit N-terminalem „Strep tag“	302
2 Abkürzungsverzeichnis	303
3 Erklärung	307

Inhaltsverzeichnis

I Allgemeine Einleitung

1 Die Photosynthese

Photoautotrophe Organismen wie Pflanzen, Algen und bestimmte Bakterien sind in der Lage Sonnenlicht zu absorbieren und in energiereichen chemischen Verbindungen zu speichern. Auf diese Weise entstehen durch photosynthetisch aktive Primärproduzenten jährlich etwa 100 Milliarden Tonnen an trockener Biomasse (Barber, 2009), welche wiederum als Energiequelle die Lebensgrundlage der heterotrophen Organismen darstellt. Die Nutzung der Sonnenenergie durch Photosynthese schafft somit die Basis für das Leben auf der Erde.

Allgemein kann heute die oxygene Photosynthese der Pflanzen, eukaryotischen Algen sowie Cyanobakterien, von der anoxygenen Photosynthese unterschieden werden, welche beispielsweise in Purpur- und grünen Schwefelbakterien stattfindet. Die Entstehung dieser lichtinduzierten Form der Energiegewinnung liegt bereits mehr als 3 Milliarden Jahre zurück. Ausgehend von einem gemeinsamen Vorläufer-Organismus entwickelten nachfolgende Generationen vermutlich zunächst die verschiedenen Formen der anoxygenen Photosynthese mit jeweils nur einem photosynthetisch aktiven Reaktionszentrum des Typ-I (Eisen-Schwefel-Typ) oder des Typ-II (Chinon-Typ) (Schubert *et al.*, 1998). Die Oxidationskraft solcher einzelnen Photosysteme ist ausreichend, um beispielsweise organische Säuren oder Schwefelwasserstoff zu oxidieren, nicht aber Wasser. Erst durch die Evolution der Cyanobakterien, bzw. deren Vorfahren, und die Kopplung zweier Photosysteme des Typ-I und Typ-II wurde die photolytische Spaltung des Wassers ermöglicht und somit die oxygene Photosynthese entwickelt. Der hierbei als „Nebenprodukt“ entstehende Sauerstoff reicherte sich in der Atmosphäre an und ermöglichte die Entwicklung einer effizienten Zellatmung, ein entscheidender Schritt zur Entstehung des höheren Lebens auf der Erde (Canfield *et al.*, 2006).

Die Hauptprozesse der oxygenen Photosynthese finden in höheren Pflanzen in den Chloroplasten der grünen Gewebe statt (Barber, 2009). Diese Zellorganellen werden von einer doppelten Hüllmembran umgeben. Die Matrix, das sogenannte Stroma, wird zudem von einem großflächigen Membransystem durchzogen, den Thylakoiden. Während die photosynthetische Assimilation des CO₂ im Stroma stattfindet (Dunkelreaktion), laufen die vorgeschalteten photochemischen Prozesse in der Thylakoidmembran ab (Lichtreaktion). Zur Durchführung einer effizienten photochemischen Reaktion besitzt die Thylakoidmembran morphologisch einen charakteristischen Aufbau (Abb. 1). Die sogenannten Granathylakoide sind durch eine Stapelung gegenüberliegender Membranschichten charakterisiert, Stromathylakoiden durchziehen die Matrix dagegen einzeln.

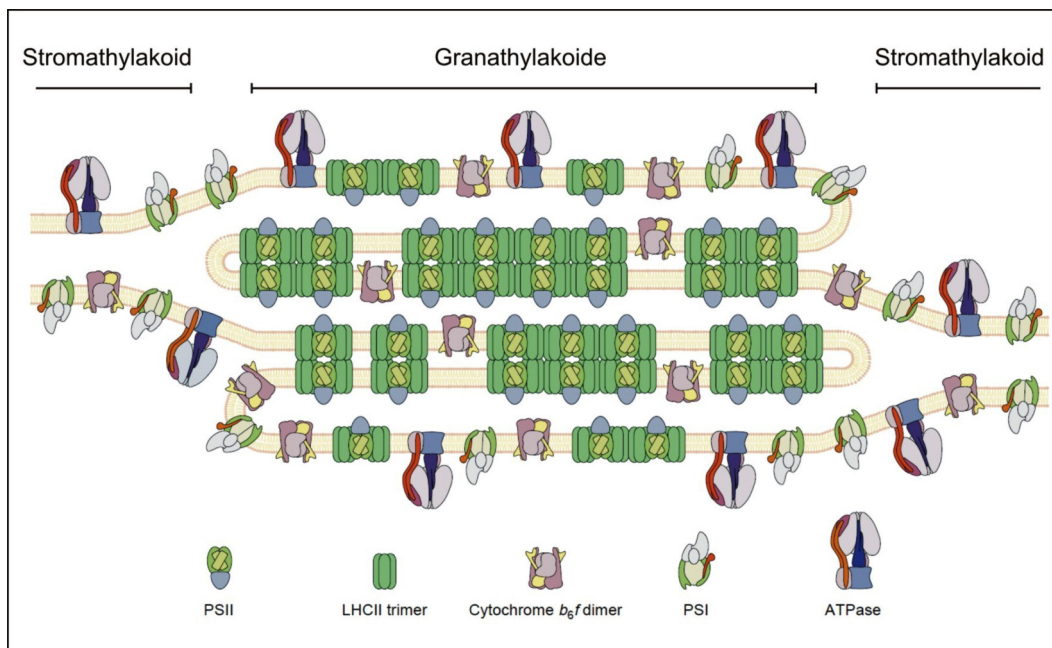


Abb. 1: Heterogene Verteilung der multimeren Hauptkomplexe der Photosynthese in der Thylakoidmembran. Photosystem (PS) II befindet sich mit Lichtsammelkomplexen (LHC; hier nur LHCII) bevorzugt innerhalb der Thylakoidgrana, PSI und ATPase dagegen nur in den äußeren Granaschichten und den Stromathylakoiden. Der Cytochrom b_6/f -Komplex ist homogen über das gesamte Membransystem verteilt (verändert nach Allen & Forsberg, 2001).

Auffällig ist die laterale Heterogenität der Anordnung der vier Hauptkomplexe des Photosyntheseapparates, an welchen die photochemischen Primärprozesse ablaufen. Während Photosystem II (PSII) mit seinen minoren und majoren Lichtsammelkomplexen („light harvesting complexes“, LHC) bevorzugt in den Kernbereichen der Granastapel liegt, befinden sich Photosystem I (PSI) und ATPase in den Stromathylakoiden sowie den äußeren Granaschichten. Im Gegensatz dazu ist der Cytochrom b_6/f -Komplex homogen über das gesamte Membransystem verteilt (Green & Dunford, 1996).

Ein Teil dieser multimeren Hauptkomplexe, nämlich die pigmentbindenden Proteinkomplexe des PSII und PSI, absorbieren mit hoher Effizienz eingestrahktes Sonnenlicht, die aufgenommene Energie wird in den Reaktionszentren der Photosysteme zur Ladungstrennung genutzt. Diese Überführung von Lichtenergie in elektrochemisches Potential findet jeweils in einem zentralen Chlorophyll (Chl)- Dimer der Reaktionszentren des PSII (P_{680}) und PSI (P_{700}) statt. Nach Anregung wird ein emittiertes Elektron des PSII über verschiedene Redox-Zentren zu PSI transportiert, wo eine erneute Anregung durch ein zweites Exciton erfolgt. Hierdurch wird ein ausreichendes Redox-Potential erreicht, um Nicotinamid-Adenindinucleotid-Phosphat ($NADP^+$) im Stroma zu reduzieren. Gleichzeitig wird die am PSII entstandene Elektronenlücke durch photolytische Spaltung von Wasser geschlossen, als Nebenprodukt entsteht

Sauerstoff. Der aus Wasserspaltung und Redox-Prozessen hervorgehende Protonengradient über die Thylakoidmembran treibt zudem eine ATPase zur Produktion von Adenosin-Triphosphat (ATP) an. Die entstandenen Reduktionsäquivalente werden wie das gebildete ATP im stromal ablaufenden Calvinzyklus zur Reduktion von anorganischem Kohlendioxid und somit zum Aufbau der pflanzlichen Zellsubstanz genutzt (Barber, 2009).

Eine Schlüsselrolle in der Photosynthese-Reaktion kommt dem PSII-Superkomplex zu. Innerhalb dieses zentralen Multiproteinkomplexes erfolgt zum einen in Form der lichtinduzierten Reduktion des Plastochinon die Überführung der Lichtenergie in ein elektrochemisches Potential, zum anderen findet hier die Spaltung des Wassers statt. Strukturell stellt der Superkomplex ein Dimer dar, welches aus je zwei Kernkomplexen mit jeweiligen minoren und majoren Lichtsammelkomplexen zusammengesetzt ist (Abb. 2; Boekema *et al.*, 1999; Dekker & Boekema, 2005).

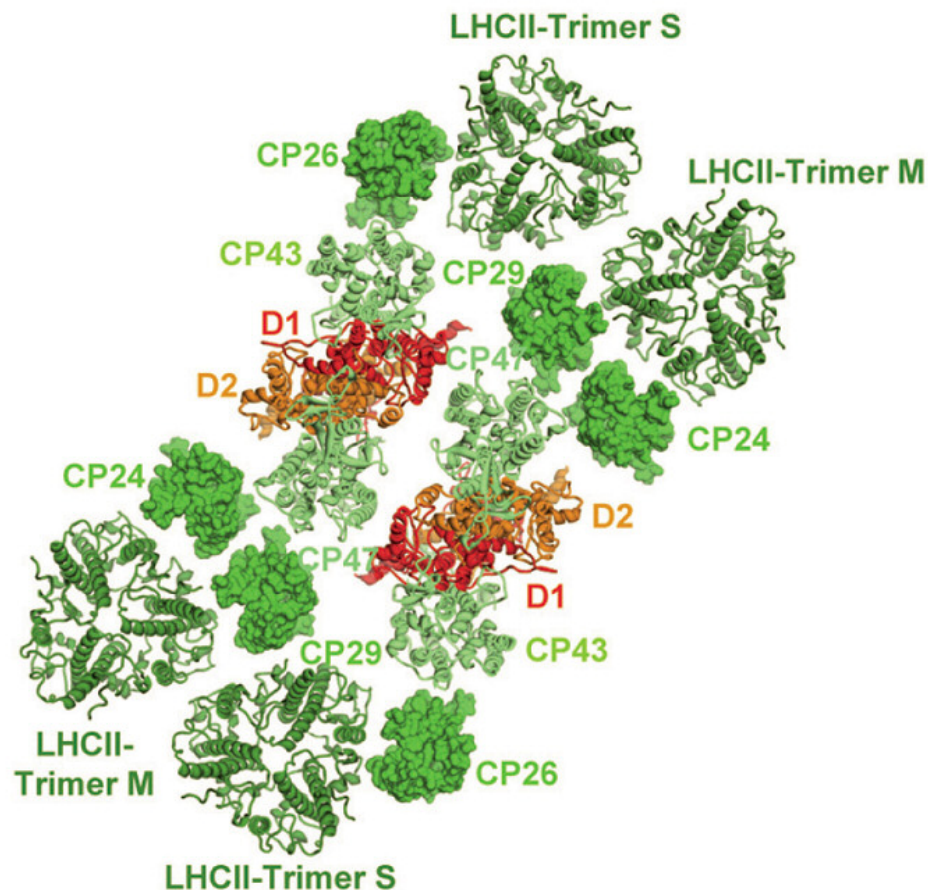


Abb. 2: Hypothetischer Aufbau des dimeren PSII-Superkomplexes höherer Pflanzen mit angelegerten LHCII-Trimeren nach Schmid (2008). Gezeigt ist der Kernkomplex (D1, D2, CP43, CP47), die minoren (CP24, CP26, CP29) sowie die majoren Lichtsammelkomplexen (LHCII; s für stark gebunden, m für moderat gebunden). Die Abbildung wurde mit dem Visualisierungsprogramm Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt und ist zusammengesetzt aus den Kristalldaten des dimeren PSII aus Cyanobakterien (PDB-Eintrag 2AXT) und den Kristalldaten des trimeren LHCII aus höheren Pflanzen (2BHW). Die Zusammensetzung basiert auf den Ergebnissen von elektronenmikroskopischen Einzelpartikel-Analysen (Dekker & Boekema, 2005).

Die Kernkomplexe selbst bestehen aus einer Vielzahl Untereinheiten, wobei das eigentliche Zentrum von den Untereinheiten D1 und D2 gebildet wird. In diesem Heterodimer befindet sich das Reaktionszentrum P_{680} mit dem zentralen Chl *a*-Dimer, sowie die Elektronenakzeptoren Phaeophytin und Plastochinon. Auf lumenaler Membranseite ist der Kernkomplex mit dem wasserspaltenden Komplex assoziiert. Weiterhin gehören dem Kernkomplex das Cytochrom *b*-559 an, die Kernantennenkomplexe aus den Chlorophyll-Bindungsproteinen (CP) 43 und CP47 sowie eine Vielzahl kleiner Proteine, deren Funktion noch nicht vollständig verstanden ist. Umgeben wird der Kern von weiteren Antennenkomplexen, die es ermöglichen, die Quantenausbeute der Photosynthese deutlich zu erhöhen. Neben den Kernantennen CP47 und CP43 wird zwischen den minoren Antennen CP24, CP26 und CP29, sowie den majoren Antennen, den Lichtsammelkomplexen II (LHCII), unterschieden. Letztere lagern sich als Trimere in der Peripherie des Superkomplexes an. Hierbei wurden in elektronenmikroskopischen Einzelpartikel-Analysen je dimerem Superkomplex bis zu 6 LHCII-Trimere erfasst, die je nach Bindestelle fest (LHCII-Trimer S), moderat (LHCII-Trimer M) oder locker (nicht gezeigt) assoziieren (Hankamer *et al.*, 1997; Boekema *et al.*, 1999; Schmid, 2008; Guskov *et al.*, 2009). Biochemische Analysen zeigen dagegen bis zu 8 LHCII-Trimere pro dimerem Superkomplex (Peter & Thornber, 1991). Wie viele Trimere pro Superkomplex *in vivo* wirklich binden können und inwiefern einzelnen Trimeren hierbei bestimmte physiologische Funktionen zukommen, ist noch ungewiss. Jedes einzelne assoziierte LHCII-Trimer ist jedenfalls durch die hohe Zahl von 42 gebundenen Chl-Molekülen in der Lage, die Antenne des PSII deutlich zu vergrößern. Da der majore Lichtsammelkomplex höherer Pflanzen das zentrale Thema der vorliegenden Dissertationsschrift darstellt, soll dieser Protein-Pigment-Komplex nachfolgend gesondert vorgestellt werden.

2 Der Lichtsammelkomplex II

2.1 Charakterisierung des LHCII

Der majore Lichtsammelkomplex des PSII macht ca. 30 % des Gesamtproteins der Thylakoidmembran aus und ist damit nicht nur der häufigste Lichtsammelkomplex in der Pflanze, sondern wahrscheinlich auch das häufigste Membranprotein der Erde. Pro Jahr werden geschätzte 10^9 t des Apoproteins produziert und mit den Pigmenten Chl *a*, Chl *b* und den verschiedenen Xanthophyllen zu funktionalen Lichtsammlern assembliert (Matile *et al.*, 1996). Als Protein-Pigment-Komplex bindet LHCII bis zu 50 % des in der Pflanze vorkommenden Chlorophylls (was einer lokalen Konzentration von 300 mM entspricht; Standfuss *et al.*, 2005) und kann so, wie der Name schon andeutet, als ef-

fektive Antenne fungieren, also Lichtenergie einfangen und zu einem Reaktionszentrum weiterleiten.

LHCII bildet zusammen mit den anderen LHC-Proteinen eine Gruppe kerncodierter Thylakoidproteine, deren Gene Teil einer Multi-Genfamilie sind. Diese Lhc-Super-Genfamilie umfasst in *Arabidopsis thaliana* mindestens 30 homologe Gene (Jansson, 1999) und zählt damit zu den größten und komplexesten Genfamilien höherer Pflanzen (Montane & Kloppstech, 2000), zu der unter anderem auch die „early light-inducible proteins“ (Elips) sowie das Protein PsbS gehören (Heddad & Adamska, 2002; Schmid, 2008). Da zahlreiche Produkte dieser kerncodierten Gene die Fähigkeit besitzen neben verschiedenen Carotinoiden und Chl *a* auch Chl *b* zu binden, werden sie als Chl *a/b*-bindende (CAB) Proteine bezeichnet (Green *et al.*, 1991). Der native LHCII höherer Pflanzen setzt sich aus mindestens drei verschiedenen Isoformen zusammen, den Produkten der kerncodierten Gene *Lhcb1*, *Lhcb2* und *Lhcb3*. Der Vergleich der Aminosäuresequenz des *Lhcb1* der beiden Arten *Pisum sativum* und *Arabidopsis thaliana* zeigt eine sehr hohe Identität von 91,8 % mit lediglich 2,6 % an nicht-konservativen Austauschungen, die vor allem zu Beginn der N-terminalen Domäne zu finden sind. Die Aminosäure-Sequenz von *Lhcb1* und *Lhcb2* ist in *Arabidopsis thaliana* zu 66,8 % identisch, der Vergleich aller drei Isoformen untereinander zeigt lediglich 56,6 % Identität. Die größten Unterschiede finden sich hierbei in den Sequenzen der N- und C-Termini sowie innerhalb der lumenalen Schleife (Standfuss & Kühlbrandt, 2004). Die Produkte aller drei Gene besitzen ähnliche Molekulargewichte zwischen 25 und 28 kDa (Jansson, 1994; Standfuss & Kühlbrandt, 2004). Hauptgenprodukte sind die Proteine *Lhcb1* und *Lhcb2*, die zusammen 90 % der Polypeptide des LHCII ausmachen. In seiner nativen Form tritt der LHCII vor allem als Trimerkomplex auf. Hierbei können die drei Isomere des LHCII sowohl Homotrimere als auch Heterotrimere ausbilden (Jansson, 1994; Jackowski *et al.*, 2001).

Die dreidimensionale Struktur des LHCII aus Erbse (*Pisum sativum*) konnte erstmals 1994 durch Kühlbrandt *et al.* mittels hochauflösender Elektronenkrystallographie an zweidimensionalen Kristallen mit einer Auflösung von 3,4 Å dargestellt werden. Dieses Strukturmodell umfasste die Entschlüsselung der Aminosäuren 26 bis 100 und 116 bis 224 (von insgesamt 232), was etwa 80 % der Gesamtstruktur entspricht. Damit zählt der LHCII zu den ersten Membranproteinen, deren Kristallstruktur hochaufgelöst dargestellt werden konnte (Booth & Curnow, 2006). Das Strukturmodell wurde 2004 durch Liu *et al.* auf die Aminosäuren 14 bis 232 (94 % der Struktur) des LHCII aus Spinat (*Spinacia oleracea*) erweitert, die Auflösung konnte auf 2,72 Å verbessert werden. Diese Röntgenstrukturanalyse stimmte größtenteils mit dem Kristallmodell von Kühlbrandt überein, bestimmte Domänen wie die lumenale Schleife (Aminosäuren 100-116) konnten jedoch deutlich genauer dargestellt werden. Im Jahr 2005 gelang es Standfuss *et al.* die Auflösung der Struktur des Erbsen-LHCII auf 2,5 Å zu steigern.

In diesem Modell, welches als Trimer in Abb. 3 in stromaler Aufsicht (A) sowie Seitenansicht (B) dargestellt ist, sind 96 % der Struktur des LHCII entschlüsselt.

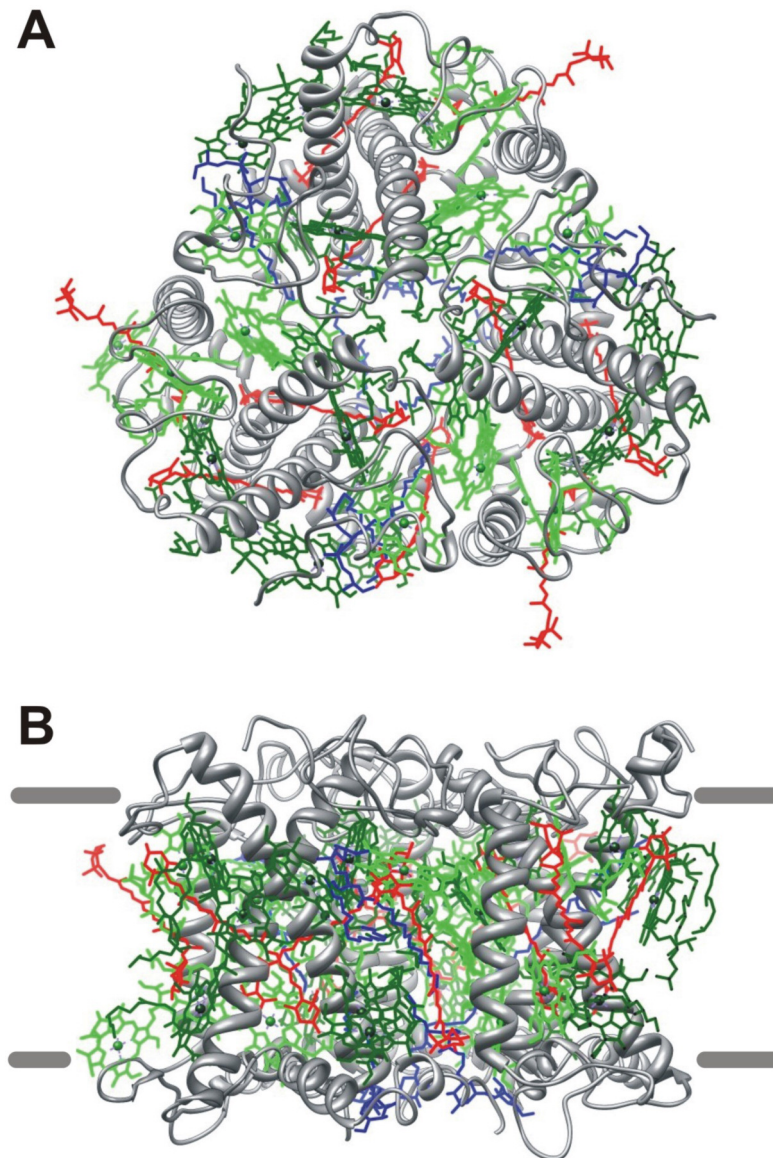


Abb. 3: Dreidimensionale Struktur des trimeren LHCII aus Erbse nach Standfuss *et al.* (2005; PDB-Eintrag 2BHW) bei einer Auflösung von 2,5 Å. **(A)** zeigt die Aufsicht auf das Trimer von der stromalen Seite, **(B)** die Seitenansicht (stromale Seite oben). Die Polypeptidkette ist grau dargestellt, gebundene Pigmente und Lipide farbig hervorgehoben. Chl *a* ist dunkelgrün, Chl *b* ist hellgrün, Carotinoide sind rot dargestellt, Lipide blau. Die Abgrenzung der Thylakoidmembran ist in **(B)** schematisch als graue Balken dargestellt. Die Abbildung wurde mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004).

Die Lage der ersten neun Aminosäuren der N-terminalen Domäne bleibt bis dato kristallographisch ungeklärt. Als Grund hierfür wird zum einen der heterogene Aufbau nativer Trimere aus den Genprodukten Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 mit jeweils variieren-

der N-terminaler Peptidsequenz diskutiert (Standfuss *et al.*, 2005), andererseits legen spektroskopische Versuche mittels elektronenparamagnetischer Resonanz (EPR) der eigenen Gruppe einen gewissen Grad an N-terminaler Strukturflexibilität nahe (Jeschke *et al.*, 2005).

Durch die sehr kompakte Struktur des trimeren Komplexes mit über 50 gebundenen Pigmenten kann LHCII seiner Funktion als effektiver Lichtsammler gerecht werden. Aufgrund der hohen Dichte an Cofaktoren ist die Erläuterung struktureller Einzelheiten anhand Abb. 3 aber wenig übersichtlich. Zur Wahrung der Übersicht ist daher ein einzelnes Monomer des trimeren Komplexes in Abb. 4 sowohl ohne Cofaktoren (A), als auch mit den Pigmenten Chl *a* (B), Chl *b* (C) sowie mit Carotinoiden und Lipiden (D) jeweils in der Seitenansicht dargestellt.

Wie Abb. 4 (A) illustriert, bildet die Polypeptidkette des LHCII insgesamt fünf α -Helices aus, die nach der neuen Nomenklatur von Standfuss *et al.* (2005) mit H1 bis H5 gekennzeichnet sind. Zu unterscheiden sind die drei transmembranen Helices H1, H3 und H4 von zwei kurzen amphipathischen Helices H2 und H5. Auffällig ist die Länge der beiden Transmembranhelices H1 und H4 (5,1 bzw. 4,3 nm), die durch ein symmetrisch angeordnetes Salzbrücken-Paar in einer superhelikalen Struktur stabilisiert werden. Der Neigungswinkel der beiden Helices zur Membranebene beträgt jeweils 32° . Als Bindeglied fungiert eine kürzere Transmembranhelix (H3; 3,1 nm), die leicht gebogen ist und im Winkel von 9° zur Membranebene steht (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Beide amphipathischen Helices sind über hydrophobe Aminosäuren in der Thylakoidmembran verankert, wobei Helix H5 in der Nähe des C-Terminus liegt. Helix H2 befindet sich innerhalb der lumenalen Schleife und fixiert diese in der Membran (Liu *et al.*, 2004). Der N-Terminus des LHCII ragt in das Chloroplasten-Stroma, der C-Terminus in das Lumen der Thylakoide.

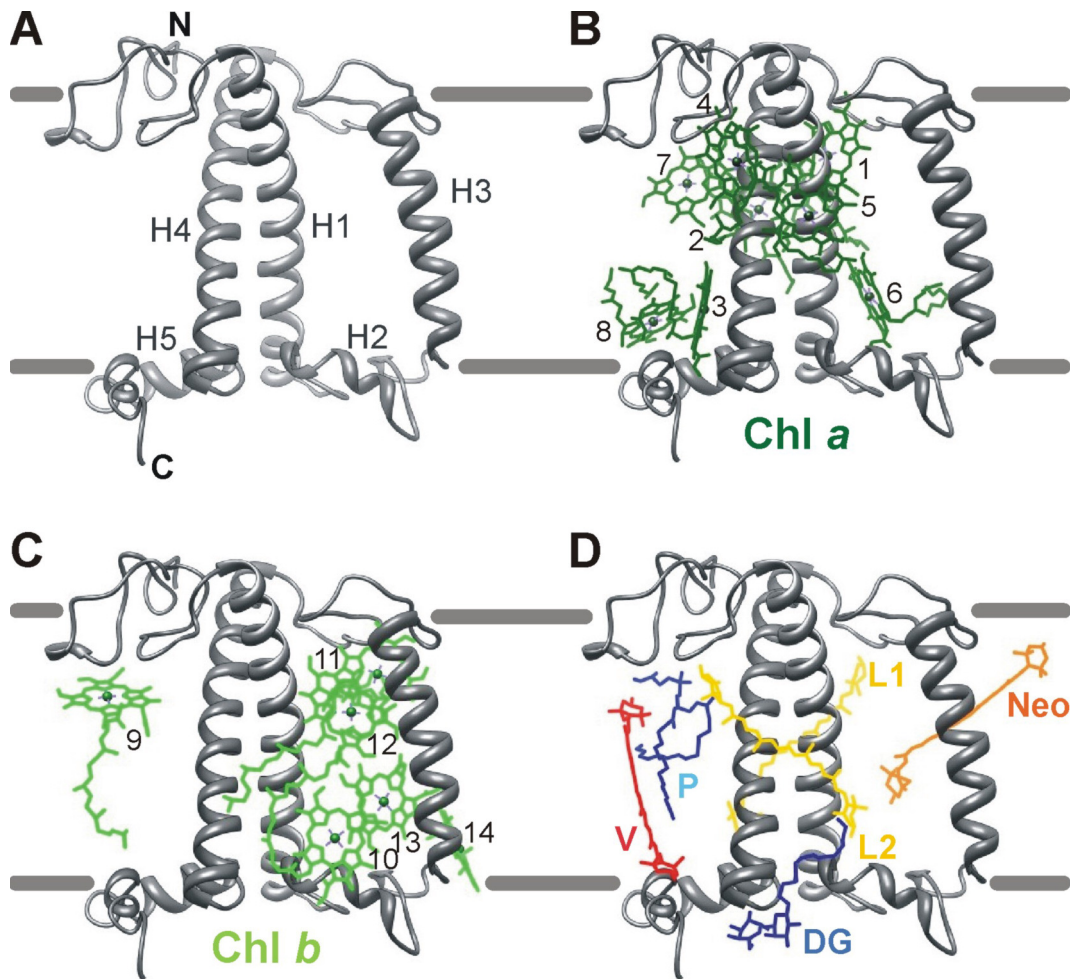


Abb. 4: Dreidimensionale Struktur eines LHCII-Monomers aus dem Trimer nach Standfuss *et al.* (2005) in der Seitenansicht (PDB-Eintrag 2BHW). Die Polypeptidkette ist grau dargestellt, die Abgrenzung der Thylakoidmembran schematisch als graue Balken (stromale Seite jeweils oben). (A) zeigt die Tertiärstruktur des Proteinrückgrates der kristallographisch erfassten Aminosäuren 10 bis 232, N ist der N-Terminus (stromale Seite), C der C-Terminus (lumenale Seite). Die 5 α -Helices sind mit H1 bis H5 gekennzeichnet. (B) zeigt die Lage der 8 gebundenen Chl *a*-Moleküle [Chl1 (1) bis Chl8 (8)], (C) die Lage der 6 gebundenen Chl *b*-Moleküle [Chl9 (9) bis Chl14 (14)], (D) die Lage der Carotinoide und Lipide. Chl *a* ist dunkelgrün dargestellt, Chl *b* hellgrün, Lutein gelb (L1 und L2), Violaxanthin (V) rot, Neoxanthin orange-farben (Neo), DG/DG dunkelblau (DG) und PG hellblau (P). Die Nomenklatur der α -Helices und der Cofaktoren erfolgte nach Standfuss *et al.* (2005). Die Abbildung wurde mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004).

Insgesamt bindet jedes LHCII-Monomer bis zu 20 Cofaktoren, bestehend aus Chl-Molekülen, Carotinoiden und Lipiden, die jeweils nicht-kovalent mit dem Peptid-Rückgrat assoziiert sind. Die 14 Chl-Moleküle des monomeren LHCII werden durch Koordination des zentralen Mg^{2+} -Atoms im Chlorin-Ring in der Regel an ein freies Elektronenpaar von Stickstoff oder Carbonyl-Sauerstoff gebunden. Die Liganden sind entweder geladene Aminosäurenreste, Carbonylgruppen des Aminosäure-Rückgrates oder auch gebundene Wassermoleküle bzw. das Lipid Dipalmitoyl-

Phosphatidylglycerin (PG). Die meisten dieser Chl-Bindestellen sind in der Lhc-Superfamilie stark konserviert (Standfuss *et al.*, 2005).

Wie in (B) dargestellt, binden die 8 Chl *a*-Moleküle eines Monomers vorwiegend um das Helixkreuz herum, der Großteil der entsprechenden Bindestellen findet sich innerhalb des Peptid-Rückgrates von Helices H1 und H4. Die sechs Chl *b*-Moleküle (Abb. 4 C) des monomeren LHCII liegen, mit Ausnahme des N-terminal gebundenen Chl9, im Zwischenraum des Helixkreuzes zu Transmembranhelix H3, die jeweiligen Bindestellen sind alle im Rückgrat von H3 zu finden. Außerdem können dem LHCII die Carotinoide Lutein (Lut), Violaxanthin (Vio) und Neoxanthin (Neo) im Verhältnis 2 zu 1 zu 0,5 zugeordnet werden, wobei Violaxanthin die geringste Bindungsaffinität besitzt und bei Aufreinigung leicht dissoziiert (Ruban *et al.*, 1999; Hobe *et al.*, 2000). Während die beiden Lutein-Bindestellen am Helixkreuz sitzen (Abb. 4 D), ragt Neoxanthin weit in die Peripherie des Komplexes. Violaxanthin bindet im Zwischenraum zweier Monomere des trimeren Komplexes.

Zudem assoziieren die zwei Lipide PG und Digalaktosyldiacylglycerin (DGDG) mit dem LHCII (Standfuss *et al.*, 2005). Während die Funktion der drei zentralen DGDG-Moleküle im Trimer noch ungewiss ist (Standfuss *et al.*, 2005), spielt das Lipid PG eine entscheidende Rolle in der Trimerisierung des LHCII. Nußberger *et al.* (1993) zeigten, dass PG zwischen den Monomeren als „molekularer Klebstoff“ fungiert und essentiell für die Ausbildung und Stabilität trimerer Komplexe ist. Sowohl der proteolytische Verdau der N-terminalen Domäne als auch der Verdau des Phospholipids mit einer Lipase resultierten in der Auflösung der trimeren Komplexe. Experimente von Hobe *et al.* (1995) konnten ein essentielles N-terminales Trimerisierungsmotiv mit der Sequenz WYGPDR definieren. Diese Sequenz beginnt mit den aromatischen Aminosäuren Trp 16 und Tyr 17 und reicht mindestens bis zur positivgeladenen Aminosäure Arg 21. Auch eine Beteiligung des C-Terminus an der Trimerstabilisierung wird angenommen. Der Austausch des unpolaren Trp 222 durch weniger hydrophobe Aminosäuren beeinträchtigt die Trimerbildung umso mehr, je polarer die eingesetzte Aminosäure ist (Kuttkat *et al.*, 1996). Eine Interaktion dieser Aminosäure mit der transmembranen Helix H3 des gegenüberliegenden Monomers im Trimer bzw. mit den Pigmenten Chl10 und Violaxanthin gilt als wahrscheinlich (Barros & Kühlbrandt, 2009).

2.2 Der rekombinante LHCII

LHCII gehört nicht nur zu den ersten kristallographisch erfassten Membranproteinen (Kühlbrandt *et al.*, 1994), sondern war auch eines der ersten Membranproteine, dessen Gen erfolgreich isoliert (Cashmore, 1984) und in *Escherichia coli* (*E. coli*) rekombinant überexprimiert werden konnte (Paulsen *et al.*, 1990). Zusätzlich besitzt das denaturierte Apoprotein die Fähigkeit, in Detergenzlösung bei Anwesenheit seiner Cofaktoren mit hoher Ausbeute zu funktionalen Protein-Pigment-Komplexen rückzufalten (Plumley & Schmidt, 1987; Paulsen *et al.*, 1990). Eine Möglichkeit der Rückfaltung besteht in ei-

nem raschen Wechsel des Detergenz. Hierbei wird Lithiumdodecylsulfat (LDS)-solubilisierter LHCII mit einer pigmenthaltigen n-Octyl- β -D-Glucopyranosid (OG)-Lösung verdünnt und das ionische LDS durch Fällung entfernt (Paulsen *et al.*, 1993). Die daraufhin stattfindende Faltung des LHCII kann mittels Fluoreszenz- oder CD-Spektroskopie *in vitro* verfolgt werden (Booth & Paulsen, 1996; Reinsberg *et al.*, 2000; Horn & Paulsen, 2002; Horn & Paulsen, 2004; Horn *et al.*, 2007). Entscheidender Vorteil des rekombinanten LHCII gegenüber nativen Komplexen ist die Möglichkeit die Primärstruktur nach Bedarf zu modifizieren. Durch punktspezifische Mutagenese des *Lhcb1*-Gens ist es möglich, Aminosäuren gezielt auszutauschen oder Aufreinigungsmarker an die Termini anzufügen. Wie später erläutert werden soll, stellt die Möglichkeit der punktspezifischen Mutagenese in Verbindung mit der kovalenten Spinmarkierung der Expressionsprodukte, das sogenannte „site-directed spin labeling“, die Grundlage der Untersuchung des LHCII mittels EPR-Spektroskopie dar.

2.3 Die Funktionen des LHCII

Dem LHCII fallen neben seiner Hauptfunktion als majorer Lichtsammeler der Pflanze wichtige Funktionen in der Regulierung der Photosynthese zu. Zum einen wird durch die Interaktion stromaler Proteindomänen zweier LHCII-Trimere, die in gegenüberliegende Thylakoidmembranen inseriert sind, die Ausbildung der Granastapel („grana stacking“) reguliert (Day *et al.*, 1984; Standfuss *et al.*, 2005). Zudem wird angenommen, dass LHCII an der nicht-photochemischen Löschung der Anregungsenergie („non photochemical quenching“, NPQ) beteiligt ist. Hierbei handelt es sich um einen essentiellen Schutzmechanismus, um den Kernkomplex des PSII vor Überanregung zu schützen und von der damit verbundenen Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und der photooxidativen Zerstörung zu bewahren. NPQ kann in mehrere Komponenten aufgeteilt werden (Müller *et al.*, 2001) von denen an dieser Stelle lediglich zwei vorgestellt werden sollen. Die schnellste und gleichzeitig wichtigste Komponente des NPQ ist die pH- bzw. energieabhängige Löschung der Anregungsenergie, welche als „qE“ bezeichnet wird. Bei diesem Schutzmechanismus wird überschüssige Anregungsenergie in Form von Wärme dissipiert. Weiterhin kann durch die Abwanderung des LHCII von PSII zu PSI die Antennengröße beider Photosysteme verändert und dadurch die Verteilung der Excitonenenergie auf die Photosysteme kontrolliert werden. Diese Form des NPQ wird als „qT“ bezeichnet, der Prozess der LHCII-Verlagerung als „state transitions“. Beide Mechanismen sollen im Folgenden näher erläutert werden.

2.3.1 Phosphorylierung der N-terminalen Domäne und „state transitions“

Höhere Pflanzen und Algen sind alternierenden Lichtverhältnissen ausgesetzt. Da die beiden Photosysteme in Reihe geschaltet sind, muss auch unter wechselnden Lichtbedingungen gewährleistet sein, dass die Anregungsenergie optimal auf beide Reaktionszentren verteilt wird. Wird PSII stärker angeregt als PSI, treten die Elektronen

schneller in den Plastochinon-Kreislauf ein, als sie an PSI abgegeben werden. Dieser Elektronenrückstau birgt die Gefahr der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wie beispielsweise Singulett-Sauerstoff. Dieser oxidiert bevorzugt die D1-Untereinheit des PSII, die Photosynthese-Leistung der Pflanze wird deutlich gesenkt (Takahashi & Murata, 2008). Diese photooxidative Zerstörung wird durch die Abwanderung des LHCII von PSII zu PSI verhindert, wo er an die Untereinheiten H, L und I binden kann (Zhang *et al.*, 2004). Dieser als „state transitions“ bezeichnete Vorgang ist reversibel und führt zu einer Verkleinerung der PSII-Antenne bei gleichzeitiger Vergrößerung der PSI-Antenne, *et vice versa*. Hierdurch wird die Anregungsenergie, den äußeren Faktoren entsprechend, optimal verteilt (Allen & Forsberg, 2001; in Bezug auf „state transitions“ spricht man von „state 1“, wenn LHCII mit PSII assoziiert ist, in „state 2“ ist LHCII mit PSI assoziiert). Die Regulation dieses Prozesses geschieht über den Anstieg des Plastohydrochinonspiegels und die damit einhergehende Aktivierung einer Kinase, welche LHCII in der N-terminalen Domäne phosphoryliert. Dieser Phosphorylierung folgen das Ablösen des LHCII und die Abwanderung zu PSI. Dieser Prozess geschieht im Zeitbereich von Sekunden bis Minuten und repräsentiert damit eine Kurzzeit-Anpassung des Photosynthese-Apparates (Kargul & Barber, 2008). Wechseln die Lichtbedingungen wieder, wird LHCII durch eine Phosphatase dephosphoryliert und wandert zurück zu PSII (Allen & Forsberg, 2001; Allen, 2003; Murata, 2009). Nilsson *et al.* (1997) konnten anhand LHCII-sequenzhomologer synthetischer Peptide nachweisen, dass der Phosphorylierung des N-Terminus eine Strukturänderung der Domäne des Modellpeptids folgt. Die dort detektierte Ausbildung einer kurzen Helix in Kombination mit einer β -Schleife im Bereich der Proline 15 und 19 konnte für LHCII bislang nicht nachgewiesen werden. Zer *et al.* (1999) und Ohad *et al.* (2001) zeigten zumindest eine lichtinduzierte Änderung der Zugänglichkeit des N-Terminus für die Protease Trypsin. Während im intakten LHCII-Monomer lediglich die ersten Aminosäuren des N-Terminus verdaut werden (Verringerung des Molekulargewichts auf 24 kDa, was ca. 10 Aminosäuren entspricht; Paulsen *et al.*, 1993), führt die Belichtung des LHCII zum Abbau der ersten 35 Aminosäuren der N-terminalen Domäne (Zer *et al.*, 1999). Ob im Zuge der „state transitions“ eine Konformationsänderung des LHCII eintritt und ob diese zur Dissoziation der trimeren Komplexe führt, ist bis heute nicht geklärt. Elektronenmikroskopische Einzelpartikel-Analyse nativer PSI-Präparationen unter „state 2“ Bedingungen durch Jensen *et al.* (2007) zeigten allerdings die Interaktion des trimeren LHCII mit PSI in *Arabidopsis thaliana*.

2.3.2 Die energieabhängige nicht-photochemische Löschung der Anregungsenergie (qE) durch LHCII

Die Komponente des NPQ mit der schnellsten Energieabgabe wird als „qE“ („energy-dependent quenching“) bezeichnet. Sie ist reversibel und wird über den lumenalen pH-Wert gesteuert, die Dissipation der Anregungsenergie erfolgt in Form von Wärme (Ba-

roli & Niyogi, 2000). Übersteigt die Absorption der Sonnenenergie die Kapazitäten der Pflanze zur CO₂-Fixierung, wird mehr Plastochinon am PSII reduziert, als am PSI verbraucht werden kann. Mit diesem Elektronenrückstau gehen eine Ansäuerung des Thylakoidlumens sowie die Gefahr der Entstehung von Singulett-Sauerstoff einher, welcher bevorzugt die D1-Unterheit des PSII oxidiert. Wie zuvor für den Prozess der „state transitions“ (qT) geschildert, verhindert auch der energieabhängige Schutzmechanismus qE des NPQ die Entstehung dieser Situation, allerdings in einer deutlich schnelleren Relaxationskinetik (Müller et al., 2001). LHCII scheint dabei eine tragende Rolle zu spielen (Andersson *et al.*, 2003), der genaue Mechanismus der schnellen nicht-photochemischen Löschung sowie die genaue Rolle des LHCII sind aber bisher unklar und werden kontrovers diskutiert.

Nach Pascal *et al.* (2005) und Ruban *et al.* (2007) ist in Folge des qE eine Konformationsänderung des LHCII vorstellbar, die mit einer Konfigurationsänderung des Pigments Neoxanthin einhergeht. Dieser hypothetischen Annahme zufolge, resultiert die Strukturänderung in einer Orientierungs- oder Distanzänderung der Pigmente des Chl *a*-Clusters aus Chl1, Chl2 und Chl7, was in der Energieabgabe auf Lutein L2 und Wärmedissipation resultiert. Auch das lumenal gelegene Chl *b*-Pärchen Chl10 und Chl13, welches durch seine ausgesprochen enge „sandwich“-Anordnung sowie durch seine Nähe zu Neoxanthin auffällt, könnte in qE eine Rolle spielen. Sowohl eine Konformationsänderung im Neoxanthin (Pascal *et al.*, 2005) als auch eine Strukturänderung der lumenalen Schleife in Abhängigkeit des lumenalen pH-Wertes (Liu *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2008) könnten die Distanz der Pigmente verändern und zu effektiver Wärmedissipation führen (Beddard & Porter, 1976).

Liu *et al.* (2004) favorisieren die direkte Einbeziehung des LHCII in den sogenannten Xanthophyllzyklus. Von dieser Schutzstrategie ist bekannt, dass sie durch den Abfall des lumenalen pH-Wertes unter Starklichtbedingungen aktiviert wird und zudem vollkommen reversibel ist. Hierbei wird eine lumenal lokalisierte Deepoxidase aktiviert, wodurch das Xanthophyll Violaxanthin über Antheraxanthin zu Zeaxanthin umgesetzt wird. Da Zeaxanthin mit 11 Doppelbindungen ein stärker delokalisiertes π -Elektronensystem als Violaxanthin besitzt, ist es in der Lage, die Anregungsenergie der benachbarten Chlorophylle direkt zu übernehmen und in Form von Wärme abzugeben (Jahns *et al.*, 2009). Da bei entsprechendem Überschuss Zeaxanthin mit LHCII assoziiert und wahrscheinlich in die Bindetasche des Violaxanthins bindet, vermuten Liu *et al.* (2004) den Austausch der Xanthophylle bei Lichtstress. Dieser Austausch soll gleichzeitig mit einer allosterischen Konformationsänderung der lumenalen Schleife bzw. der Helix H5 einhergehen, ausgelöst durch die Ansäuerung des Lumens. Die Änderung der Strukturen bewirkt, dass die gebundenen Chl14 (lumenale Schleife) oder Chl8 (Helix H5) so positioniert werden, dass ein Energietransfer auf Xanthophyll stattfindet und Wärme dissipiert werden kann.

Standfuss *et al.* (2005) präsentieren dagegen einen Löschmechanismus, der vollkommen ohne Konformationsänderung des LHCII auskommt. Ihrer Hypothese zufolge besitzt das unter Starklicht-Bedingungen gebildete Zeaxanthin die höhere Affinität zu der Violaxanthin-Bindestelle des LHCII. Wird bei einer Absenkung des lumenalen pH-Wertes Zeaxanthin gebildet, wird dieses bevorzugt an LHCII gebunden, kann die Anregungsenergie der benachbarten Chlorophylle direkt übernehmen und in Form von Wärme abgeben. Auch eine direkte Interaktion des LHCII mit dem Membranprotein PsbS wird diskutiert (Barros & Kühlbrandt, 2009). Dieses nah verwandte Lhc-Protein ist ebenfalls in der Lage, Zeaxanthin zu binden, zudem ist die Sensitivität des Proteins für eine Änderung des pH-Wertes bekannt (Bergantino *et al.*, 2003). Bei Abnahme des pH-Wertes dissoziiert der dimere PsbS-Komplex und interagiert in monomerer Form bevorzugt mit minoren und majoren LHC-Komplexen (Teardo *et al.*, 2007). Durch Wechselwirkung mit dem in die Peripherie ragenden Neoxanthin des LHCII könnte so die überschüssige Anregungsenergie von LHCII auf PsbS übertragen und effektiv als Wärme abgegeben werden (Barros *et al.*, 2009).

2.4 Vergleich der Kristallstrukturen des LHCII aus Spinat und Erbse

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins ist allgemein für dessen Funktion ausschlaggebend. Daher gehen, wie zuvor erläutert, verschiedene Arbeitsgruppen von Strukturänderungen des LHCII in Abhängigkeit seiner physiologischen Funktionen aus. Dies beinhaltet verschiedene Hypothesen zur energieabhängigen nicht-photochemischen Löschung und ebenso zur Veränderungen der N-terminalen Domäne durch Phosphorylierung im Zuge der „state transitions“. Insbesondere Strukturänderungen des membranständigen LHCII-Kernbereichs werden kontrovers diskutiert und konnten bisher nicht nachgewiesen werden. Der direkte Vergleich der beiden hochaufgelösten Kristallmodelle von Liu *et al.* (2004) aus Spinat und von Standfuss *et al.* (2005) aus Erbse zeigt im Kernbereich des LHCII keinerlei signifikanten Strukturänderungen. Dies betrifft sowohl die Anordnung des Peptidrückgrates als auch die Lage der Pigmente und das, obwohl beide Proteinproben aus wenig verwandten Arten stammen und andere Kristallformen besitzen, welche zusätzlich bei unterschiedlichen pH-Werten präpariert wurden (Barros *et al.*, 2009). Sowohl die geringe „root mean square (rms) deviation“ zwischen den Atomen des Peptidrückgrates beider Präparationen (max. 0,4 Å), als auch der kristallographische Temperaturfaktor (B-Faktor), welcher Aufschluss über die interne Flexibilität eines Proteins gibt, sprechen für die Hypothese eines rigiden LHCII-Kernbereichs. Andererseits zeigt der Vergleich beider Strukturen signifikante Unterschiede in der Distanz der Formylgruppe des Chl13 zum Tetrapyrrol des Chl10 im zuvor angesprochenen Chl *b*-Dimer Chl 10/13 (Pascal *et al.*, 2005) sowie in der Position des membranexponierten Iononringes des Neoxanthin (Ruban *et al.*, 2007). Außerdem besitzen verschiedene oberflächenexponierte Schleifenregionen wie N-terminale Domäne sowie stromale und lumenale Schleife lediglich moderate B-

Faktoren, was für einen höheren Grad an Flexibilität spricht (Barros & Kühlbrandt, 2009).

An diesem Punkt wird ein entscheidender Nachteil der Kristallographie deutlich. Flexible Strukturen innerhalb eines Proteins können nur detektiert werden, wenn zwei unterschiedlich funktionale, stationäre Zustände des Proteins als kristalline Probe erzeugt und kristallographisch festgehalten werden können. Proteindynamik, etwa die Änderung der Struktur in Abhängigkeit äußerer Faktoren oder auch während der Faltung eines Proteins, kann dagegen nicht detektiert werden. Dies ist zwar mittels hochauflösender Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie möglich, diese Methode scheitert aber oftmals an der Größe der zu untersuchenden Membranproteine. Eine alternative Methode hierzu stellt die eng verwandte EPR-Spektroskopie dar, die im Folgenden genauer vorgestellt werden soll.

3 EPR-Spektroskopie

Die elektronenparamagnetische Resonanz (EPR), auch bekannt als Elektronenspin Resonanz (ESR), beschreibt den Prozess der resonanten Absorption von Mikrowellenstrahlung durch paramagnetische (ungepaarte) Elektronen in Anwesenheit eines äußeren Magnetfeldes. Diese Form der Absorptionsspektroskopie wurde 1944 von Zavoisky auf Grundlage der Radartechnik entwickelt und findet als spektroskopische Methode breite Anwendung in chemischen, physikalischen, medizinischen und biologischen Disziplinen zur Strukturaufklärung von Feststoffen oder Molekülen in Lösung sowie in der Aufklärung dynamischer Prozesse. Grundlage der EPR-Spektroskopie ist die Elektron-Zeeman-Interaktion. Bringt man paramagnetische Elektronen mit einem Spin S (und eigenem permanenten magnetischen Moment) in ein externes Magnetfeld, so kommt es zur Aufspaltung der Energiezustände, die Spins richten sich parallel oder antiparallel aus. Diese Aufspaltung in zwei unterschiedlichen Energielevels wird als Elektron-Zeeman-Interaktion bezeichnet und ist proportional zur Stärke des äußeren Magnetfeldes B_0 (Abb. 5). Die Energiedifferenz zwischen beiden Zuständen ist:

$$\Delta E = E(m_S = +\frac{1}{2}) - E(m_S = -\frac{1}{2}) = h \cdot \nu = g_e \cdot \beta_e \cdot B_0$$

wobei $g_e = 2.0023$ dem g-Faktor des freien Elektron entspricht (dimensionslos), $\beta_e = 9,27400899 \cdot 10^{-24} \text{ J/T}$ dem Bohr'schen Magneton entspricht (Betrag des magnetischen Moments des Elektrons) und B_0 dem äußeren Magnetfeld entspricht.

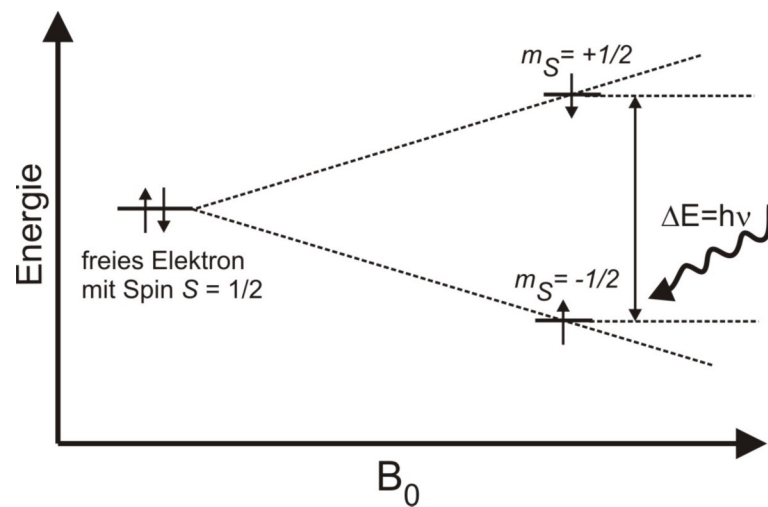


Abb. 5: Darstellung des Elektron-Zeeman-Effekts mit der Aufspaltung eines $S = 1/2$ - Systems eines freien, ungepaarten Elektrons in einem externen Magnetfeld B_0 . Durch die Absorption von Mikrowellen der Frequenz ν , deren Energie exakt der Energielücke zwischen beiden Zuständen entspricht, erfolgt der Übergang des Spins vom parallelen ($m_s = -1/2$) zum antiparallelen Zustand ($m_s = +1/2$).

Werden diese Elektronen mit elektromagnetischen Wellen einer Frequenz bestrahlt (Abb. 5), deren Energie exakt der Energielücke zwischen beiden Zuständen entspricht, so ist der Übergang des Spins vom parallelen zum antiparallelen Zustand möglich und die Resonanz-Bedingung ist erfüllt. Im Folgenden kann das angeregte Elektron durch Relaxation wieder in den energieärmeren, parallelen Zustand zurückfallen. Unterschieden wird hierbei zwischen der Spin-Gitter-Relaxation („ T_1 -Relaxation“ oder longitudinale Relaxation), beispielsweise verursacht durch Librationsbewegung, und der Spin-Spin-Relaxation („ T_2 -Relaxation“ oder transversale Relaxation), beispielsweise durch dipolare Wechselwirkung mit H_2O oder durch die Interaktion mit anderen Elektronenspins. Beide Prozesse finden gleichzeitig statt, die Dauer wird durch die Dynamik der Umgebung definiert. Der Spin ist danach erneut anregbar, was in Abhängigkeit zur Dauer der Relaxation in einem entsprechenden Absorptionsverhalten resultiert.

Im Allgemeinen liegt in EPR-Experimenten die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung im Mikrowellenbereich. Je nach eingestrahelter Mikrowellenfrequenz werden verschiedene Frequenzbereiche unterschieden, welche besonders häufig Anwendung finden und klassischerweise als „S-Band“ (2-4 GHz), „X-Band“ (8-12 GHz), „Q-Band“ (33-50 GHz) und „W-Band“ (80-110 GHz) bezeichnet werden. Hierbei gilt zu beachten, dass bei Anstieg der Frequenz die Stärke des Magnetfeldes zunehmen muss. Gleichzeitig wird hierbei die Empfindlichkeit des Systems erhöht, wodurch die erforderliche Spinkonzentration sinkt.

Wie aus obiger Gleichung hervorgeht, kann die Resonanz-Bedingung sowohl durch Änderung der eingestrahelten Frequenz ν als auch durch Änderung des angeleg-

ten Magnetfeldes B_0 erfüllt werden, was man sich in verschiedenen EPR-Techniken zunutze macht. In der sogenannten „continuous wave“ (CW)-EPR werden Spinproben kontinuierlich mit Mikrowellen einer konstanten Frequenz bestrahlt, gleichzeitig wird das externe Magnetfeld linear verändert bis die Resonanzbedingung erfüllt ist. Dies hat den Vorteil eines recht einfachen experimentellen Aufbaus mit vergleichsweise geringem technischen und finanziellen Aufwand. Nachteilig ist, dass im CW-Experiment alle Wechselwirkungen, also T_1 - und T_2 -Relaxation, gleichzeitig beobachtet werden, wodurch ermittelte Messdaten oftmals unübersichtlich werden. Im Gegensatz dazu werden in Puls-EPR-Experimenten bei konstantem externen Magnetfeld ein großer Bereich der Resonanzfrequenzen durch einen kurzen Mikrowellen-Puls großer Bandbreite (mehrere GHz) angeregt. Dies hat den Vorteil, dass einzelne Wechselwirkungen der Spins gezielt angeschaut werden können, es kann also zwischen der Spin-Gitter- und der Spin-Spin-Relaxation unterschieden werden. Andererseits ist hier der experimentelle Aufwand deutlich höher (Jeschke, 2006).

Anwendung findet die EPR-Spektroskopie unter anderem in der Strukturaufklärung von Makromolekülen. Dies ist sowohl in Feststoffen als auch in Lösung möglich, was, wie in Kapitel (Kap.) III einleitend genauer erläutert werden soll, zahlreiche Vorteile gegenüber anderen Methoden der Strukturaufklärung bringt. Grundlegende Voraussetzung zur Durchführung von EPR-Experimenten ist das Vorhandensein ungepaarter Elektronen wie beispielsweise in freien Radikalen oder Übergangsmetallen. Diese Voraussetzung ist für den Großteil an Proteinen nicht gegeben, eine Ausnahme bilden beispielsweise Enzymkomplexe mit Übergangsmetallen im katalytischen Zentrum. Abhilfe des Problems schafft die Mitte der 70er Jahren erstmals vorgestellte Methode zur Markierung rekombinanter Proteine mit paramagnetischen Spinmarkern (Berliner, 1976; Altenbach *et al.*, 1989). Durch die Entwicklung dieser sogenannten punktspezifischen Spinmarkierung („site-directed spin labeling“, SDSL) wurde dieser Nachteil durch die Möglichkeit einer selektiven Markierung ausgewählter Proteinbereiche zum Vorteil gewandelt. Durch eine schrittweise Vermessung eines komplexen Makromoleküls ergibt so letztendlich aus vielen Einzeldaten ein interpretierbares Gesamtbild. Die Weiterentwicklung von Mutagenese-Techniken in Kombination mit unterschiedlichen Markersystemen resultierte in effizienten Markierungsstrategien. Hierbei hat sich insbesondere die kovalente Bindung von Maleimid- oder Iodacetamid-Gruppen tragenden Nitroxid-Markern an selektiv eingeführte Cysteine (Cys) bewährt. Diese Methode konnte auch für den rekombinanten LHCII etabliert werden (Bender, 2004), verschiedene EPR-spektroskopische Versuchsreihen resultierten bereits in einer Vielzahl an Erkenntnissen bezüglich der Struktur des LHCII in Lösung (Bender, 2004; Seimetz, 2004; Dockter, 2005; Jeschke *et al.*, 2005; Hebel, 2007; Dietz, 2008; Müller, 2008).

Wie zuvor erwähnt, lässt sich die EPR-Spektroskopie grundsätzlich in CW- und Puls-EPR differenzieren. Das Potential ersterer Methode liegt unter anderem in der Aufklärung lokaler Strukturen einzeln spinmarkierter Proteindomänen. Hier seien bei-

spielsweise Methoden zur Bestimmung der Lösungsmittelzugänglichkeit und der Mobilität ausgewählter Domänen von Membranproteinen zu nennen, welche anhand der Membranproteine Rhodopsin und Bacteriorhodopsin verifiziert werden konnten (Farahbakhsh *et al.*, 1993; Steinhoff *et al.*, 1994). Auch Puls-EPR Experimente können Auskunft über die lokale Umgebung der Spinmarker geben. Hervorzuheben sei hier die „electron spin echo envelope modulation“ (ESEEM)- EPR, die es erlaubt den Abstand des Spinmarkers zu umliegenden Deuterium-Kernen im Umkreis von 3 bis 6 Å sehr genau vorherzusagen (Schweiger & Jeschke, 2001). Beide Methoden und ihre Anwendung zur lokalen Strukturbestimmung in Membranproteinen sollen in Kap. III genauer dargestellt werden. Mit Hilfe einer anderen Puls-EPR-Technik, der sogenannten „double electron-electron resonance“ (DEER)- Spektroskopie (Pannier *et al.*, 2000) lassen sich Abstände zwischen zwei Spinmarkern bestimmen. Die kovalente Einbringung zweier Spinmarker erlaubt die Messung von Abständen im Bereich von 1,5 bis 6 nm, unter idealen Bedingungen können sogar Distanzen von 8 nm detektiert werden (Jeschke & Polyhach, 2007). Diese leistungsstarke Methode ermöglicht Strukturbestimmung in unterschiedlich komplexen Materialien wie beispielsweise copolymeren Strukturen, Nanocompositen oder auch Membranproteinen (Jeschke *et al.*, 2005; Jeschke & Polyhach, 2007; Mao *et al.*, 2008; Altenbach *et al.*, 2008). Voraussetzung ist jeweils die Einbringung von zwei ungepaarten Elektronen. Das Prinzip der Methode ist in Abb. 6 vereinfacht anhand eines doppelt spinmarkierten LHCII-Monomers (markiert an stromaler und lumenaler Schleife) illustriert.

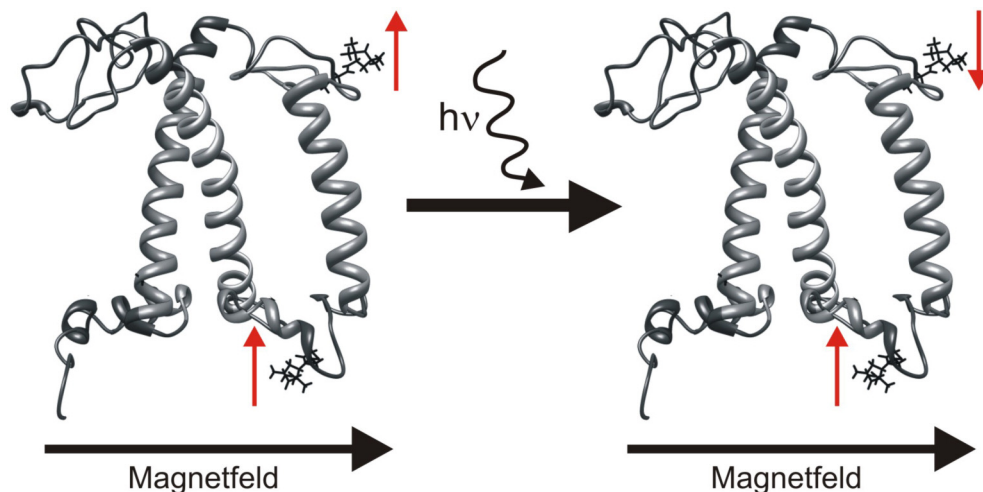


Abb. 6: Darstellung des Prinzips der DEER-EPR-Technik zur Messung der Distanz zwischen zwei Spinmarkern in LHCII (graues Peptidrückgrat; PDB-Eintrag 2BHW). Die ungepaarten Spins (rote Pfeile) der kovalent gebundenen PROXYL-Spinmarker (schwarz) richten sich im Magnetfeld parallel aus. Durch Anregung des Systems mit einem definierten Mikrowellenpuls ($h\nu$) kommt es zur Umkehr eines Spins (rechte Teilabbildung, oberer roter Pfeil). Die Änderung der magnetischen Umgebung des Spins hat direkten Einfluss auf den zweiten Spin. Diese Dipol-Dipol-Kopplung ist abhängig von der Distanz beider Spins zueinander, was die Ermittlung des Abstands möglich macht. Die Abbildung wurde mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004).

Innerhalb eines externen Magnetfeldes richten sich beide Spins (rote Pfeile) parallel aus (linke Bildhälfte). Die Anregung eines der beiden Spins mittels eines definierten Mikrowellenpulses ($h\nu$) resultiert in dessen Spinumkehr, was eine Änderung der magnetischen Umgebung des Spins beinhaltet. Dieses magnetische Feld hat direkten Einfluss auf den zweiten Spin, die Wechselwirkung zwischen den beiden magnetischen Dipolen (Dipol-Dipol-Kopplung) ist hierbei abhängig von der Entfernung der beiden Spins zueinander und resultiert in einem typischen Absorptionsverhalten. Auf diese Weise kann die Distanz zwischen beiden Spins durch Fourier-Transformation der Originaldaten mit anschließender Tikhonov-Regularisierung sehr genau bestimmt werden. Auf Membranproteine angewendet ermöglicht diese Methode in Kombination mit SDSL die Erstellung sehr genauer „Abstandskarten“ und damit die Vorhersage der Proteinstruktur und die Bestimmung von Proteindynamik. DEER-Experimente durch Jeschke *et al.* (2005) lieferten bereits eine Vielzahl an Erkenntnissen bezüglich der Struktur des LHCII in Lösung und verifizierten die Strukturflexibilität des nicht kristallisierbaren Abschnitts der N-terminalen Domäne mit zwei unterschiedlichen Aufenthaltswahrscheinlichkeiten über und seitlich des Komplexkernes. Da diese EPR-Technik und ihre Anwendung zur Aufklärung der Struktur des LHCII in Lösung den Kern dieser Dissertationsschrift darstellen, soll an dieser Stelle auf die weiteren Kapitel und die dort zu findenden Einführungen in einzelne Experimente verwiesen werden. Eine detaillierte Darstellung der DEER-Technik ist darüber hinaus der Publikation Jeschke & Polyhach (2007) zu entnehmen.

4 Zielsetzung der Arbeit

Die Hauptziele, die in diesem Projekt verfolgt wurden, waren zum einen die Entwicklung von EPR-messtechnischen Methoden zur Charakterisierung von Strukturen und Strukturveränderungen in Membranproteinen. Die Verifizierung der Techniken sollte in Versuchsreihen mit spinmarkiertem LHCII erfolgen und mit den bekannten Daten der hochaufgelösten Kristallstruktur verglichen werden. Zum anderen sollten es die verifizierten EPR-Techniken ermöglichen, die Struktur des monomeren und trimeren LHCII in Lösung zu studieren, kristallographisch nicht erfasste und potentiell flexible Domänen des LHCII zu erforschen sowie den Ablauf der Proteinfaltung während der spontanen LHCII-Selbstorganisation *in vitro* zu charakterisieren.

Um eine angemessene Anzahl an spinmarkierten LHCII-Proben effizient herstellen zu können, sollte in einem ersten Schritt die Methode der punktspezifischen Spinmarkierung des rekombinanten LHCII verbessert werden. Ziel war es eine moderne Methode der punktspezifischen Mutagenese mit etablierten Methoden der Gruppe (Bender, 2004) zu vergleichen und auf ihren Nutzen zur effizienten Herstellung von Cys-Einzel- und Doppelmутanten des LHCII zu testen. Weiterhin war von Interesse zu

testen, ob einer Markierung des LHCII mit dem Spinmarker TEMPO (Bender, 2004) nicht die Markierung mit dem chemisch stabileren Spinmarker PROXYL vorzuziehen ist (Kapitel I).

In einem zweiten Schritt sollten die Probleme der biochemischen Präparation heterogen spinmarkierter Trimere des LHCII (Seimetz, 2004; Dockter, 2005) erneut aufgegriffen und detailliert untersucht werden. Hierfür waren insbesondere Experimente zur grundsätzlichen Verbesserung der Immobilisierung trimerer Komplexe des LHCII mittels des C-terminalen „His₆ tag“ auf unterschiedlichen Ni²⁺-Affinitätssäulen unumgänglich, aber auch der Versuch der Etablierung einer alternativer Präparationstechnik mittels schrittweiser Immobilisierung über unterschiedliche Bindemotive war von Interesse (Kapitel II).

Spinmarkierte Proben des LHCII in Detergenzlösung sollten letztlich mit verschiedenen EPR-Monitoren spektroskopisch analysiert werden. Hierbei stand zum einen die Etablierung verschiedener Puls-EPR-Methoden zur Detektion lokaler Strukturen in Membranproteinen im Vordergrund. Durch Vergleich solcher gepulsten Messungen mit etablierten CW-EPR-Techniken an kristallographisch aufgelösten Domänen des LHCII sollten die neuen Methoden zunächst verifiziert werden, um dann im folgenden Schritt die kristallographisch nicht erfasste N-terminale Domäne sowie die Proteindynamik des LHCII während der Assemblierung studieren zu können. Zum anderen sollte, dem gleichen Schema folgend, der kristallographisch erfasste Kernbereich des LHCII mittels DEER-EPR durch Erstellung einer „Abstandskarte“ für LHCII in Lösung bestätigt werden. Hierauf aufbauende Messungen der Diplomanden A. Müller und C. Dietz sollten sich vor allem auf die Strukturaufklärung der N-terminalen Domäne in monomerem und trimerem LHCII sowie auf der Untersuchung der Konformation der luminalen Schleife des LHCII konzentrieren. In einem finalen Experiment war schließlich geplant, die Faltung des LHCII *in vitro* durch Detektion der zeitaufgelösten Änderung von Abständen zwischen selektiv markierten Domänen mittels DEER-EPR zu verfolgen und mit zeitaufgelösten Experimenten zur Pigment-Bindung zu vergleichen (Kapitel III).

In einem Nebenexperiment sollte zudem getestet werden, ob es möglich ist native LHCII-Trimere nach Standard-Methode in artifizielle Blockcopolymer-Vesikel zu inserieren und ob sich dies positiv auf die Stabilität der Protein-Pigment-Komplexe auswirkt (Kapitel IV).

II Kapitel

Kapitel I S. 23

Herstellung und Charakterisierung von Cys-Mutanten des rekombinanten LHCII sowie Optimierung der Spinmarkierung mit Nitroxid-Markern.

Kapitel II S. 95

Immobilisierung des rekombinanten LHCII mittels Affinitätschromatographie: Bindungsverhalten sowie Experimente zur Herstellung heterogener LHCII-Trimere.

Kapitel III S. 147

EPR-spektroskopische Untersuchung der Struktur des LHCII in Lösung.

Kapitel IV S. 259

Experimente zur Insertion nativer LHCII-Trimere in artifizielle Vesikel aus Diblockcopolymeren.

Kapitel I

Herstellung und Charakterisierung von Cys-Mutanten des rekombinanten LHCII sowie Optimierung der Spinmarkierung mit Nitroxid-Markern.

1 Einleitung

Eine grundlegende Voraussetzung zur Vermessung des LHCII mittels EPR-Spektroskopie ist die Einführung ungepaarter Elektronen. Eine bewährte Möglichkeit ist die kovalente Bindung von paramagnetischen Nitroxid-Markern an die Aminosäure Cys, welche zuvor molekularbiologisch an die gewünschte Position eingefügt wurde (SDSL; Altenbach *et al.*, 1989). Die punktspezifische Mutagenese des *Lhcb1*-Gens ist seit Anfang der 90er Jahre etabliert (Paulsen & Kuttkat, 1993). Die damals verwendete Technik nach Kunkel *et al.* (1987) wurde 2001 in der Arbeit von C. Huschenbett durch die effektivere Methode nach Chen & Przybyla (1994) ersetzt und resultierte in mehreren Cys-Einzelmutanten des rekombinanten LHCII. Nach gleicher Methode, sowie durch Neukombination vorhandener Mutanten mittels Restriktion und Ligation, wurden durch Bender (2004) weitere Cys-Mutanten des LHCII produziert.

Aufbauend auf einem Markierungsprotokoll für Iodacetamidgruppen-tragende Marker (Huschenbett, 2001), konnten diese Cys-Mutanten mit dem Nitroxid TEMPO punktspezifisch spinmarkiert werden (Bender, 2004). EPR-spektroskopische Untersuchungen des TEMPO-markierten LHCII resultierten in zahlreichen Erkenntnissen bezüglich der Struktur des LHCII in Lösung (Bender, 2004; Seimetz, 2004; Dockter, 2005; Jeschke *et al.*, 2005). Versuche zur Stabilität des Pyridin-Derivats TEMPO zeigten aber, dass dieser Spinmarker durch Reduktionsmittel wie Tris-(2-carboxyethyl)phosphin, 1,4-Dithiotreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol (β -Me) leicht zum diamagnetischen Hydroxylamin reduziert werden kann (Burmeister Getz *et al.*, 1999). Die Folge war oftmals eine Verringerung des EPR-Signals in spinmarkierten LHCII-Proben (Dockter, 2005).

Ziele dieses Projektes waren neben der Weiterentwicklung von EPR-messtechnischen Methoden die Aufklärung der LHCII-Struktur in Lösung mittels unterschiedlicher EPR-Monitore. In Anbetracht der großen Anzahl der hierfür benötigten spinmarkierten LHCII-Mutanten, war es von Interesse die etablierte Technik zur punktspezifischen Spinmarkierung des LHCII auf ihre Effizienz zu prüfen. Daher sollte zum einen eine moderne Mutagenese-Methode mit der etablierten Technik von Chen & Przybyla (1994) verglichen werden und zum anderen die Markierung des LHCII mit dem chemisch stabileren Spinmarker PROXYL (Kroll, 1999) getestet und auf Vorteile gegenüber einer Markierung mit TEMPO untersucht werden.

2 Material und Methode

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen Materialien und Methoden sind als allgemein zu betrachten und auf die gesamte Dissertation anwendbar. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit sind spezifische Versuchsbeschreibungen in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt.

2.1 Geräte

Absorptions-Spektrometer

UV-2101 PC	Shimadzu Corporation, Japan
V-550	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
Mikrotiterplattenphotometer „SPEKTRA-Max-PLUS“	Molecular Devices, USA
Eppendorf Biophotometer	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf

Autoklav

Varioklav Typ 500 H+P	Labortechnik GmbH, München
-----------------------	----------------------------

CD-Spektropolarimeter

J-810-S	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
Pelletier-Element: Modell CDF-426S/426L	
Software: Spectra Manager, Version 1.6	

Drehrad

Kulturenrad Typ Rotator	Bachofer GmbH, Reutlingen
-------------------------	---------------------------

EPR-Spektroskopie

Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten	
Spektrometer:	
Elexsys EX 580 (Mainz/Zürich)	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
Resonator (Zürich):	
dielektrischer Puls-ENDOR-Resonator (EN4118X-MD-4)	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
Resonator (Mainz):	
Flexline split-ring Resonator (ER4118X_MS3)	Molecular Specialties, USA

Temperierung: Oxford Instruments, UK
 Oxford CF935 Cryostat
 Oxford ITC4 temperature controller

Software: DeerAnalysis2006: www.mpip-mainz.mpg.de/~jeschke/distance.html

Fluoreszenz-Spektrometer

Fluoromax-2 ISA SPEX/ Jobin Yvon, Grasbrunn
 Kühlung: Ministat Compatible Control Huber Kältemaschinenbau
 Software: Datamax Software Version 2.24

Gelelektrophorese

Gelgießsystem Midget-Systems, Pharmacia LKB, Schweden
 Spannungsquelle Bio-Rad Power-Pac 3000, USA
 Kühlung: Haake G, Haake D1, Modell Fisons Firma Haake Messtechnik GmbH, Karlsruhe
 Gelrockner: 2003 Slab Gel Dryer LKB Bromma

Geldokumentation

VersaDoc™ Imaging System 3000 (Versa Doc) Bio-Rad, München
 Software: Quantity One

HPLC, analytisch

Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
 Gradientenmischer: LG-1580-04 Quaternary Gradient Unit
 Pumpe: Pu-1580 Intelligent Pump
 Detektor: Diode Array Detector MD-1515
 Säule: Chromolith SpeedROD RP-18e
 Software: Jasco-PDA, BROWIN, Version 1.5

Inkubationsschüttler

Certomat H/B, Braun Biotech International, Melsungen

Kamera

Canon Powershot A710IS Canon Deutschland GmbH, Krefeld

Magnetrührer

Heidolph MR 3001 K8 Heidolph Elektro, Kelheim
 IKAMAG KMO2 basic IKA, Labortechnik Staufen

Mixer

Heavy Duty Blendor

Blender Waring, USA

PCR-Cycler

Primus 25 Legal PCR System Modell 5524

MWG-Biotech, Ebersberg

Whatman Biometra T Gradient

Biometra, Göttingen

pH-Meter

INOLab pH Level 2

WTW GmbH, Weilheim

Reinstwasseranlage

Optilab-Standard

MembraPure, Lörzweiler

Rotationsverdampfer

Heidolph VV 2000

Heidolph Elektro, Kelheim

Scanner

Epson Perfection V700Photo

Epson Deutschland GmbH,
Meerbusch**Sterilbank**

Laminar Flow

SLEE Semiconductor Technik
GmbH, Mainz**Ultraschallbad**

SONOREX Super

Bandelin, Berlin

Vortexer

IKA MS2 Minishaker

IKA, Labortechnik Staufen

Waagen

BP 2100S

Sartorius AG, Göttingen

Analytik A200S

Sartorius AG, Göttingen

Wärmeschrank

Memmert

Memmert, Schwalbach

Wasserkocher

HB4 basic

IKA, Labortechnik Staufen

Wasserbad

Thermomix MM

H/B, Braun Biotech International,
Melsungen

Zellaufschluss-Pressen

French Pressure Cell Press

SLM Aminco, SLM Instruments, Inc.

Zentrifugen

Beckmann:

Beckmann Instruments, München

Optima XL-100K (Rotoren SW 40Ti, SW 41Ti, SW 60Ti, SW61Ti)

Optima XL-90K (Rotoren SW 40Ti, SW 41Ti, SW 60Ti, SW61Ti)

Optima XL-80K (Rotoren SW 40Ti, SW 41Ti, SW 60Ti, SW61Ti)

Avanti J-26XP

J2HS (Rotoren JLA-10500, JA-20)

Hettich:

Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Mikro 22 (Rotor 1195-L)

Mikro 22R (Rotor 1195)

Rotina 38R (Rotoren 1792 und 1789-L)

Mikroliter 2020

2.2 Chemikalien**2.2.1 Lösungsmittel**

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungsmittel stammen von den Firmen Merck (Darmstadt), Riedel de Hën (Hannover) und Carl Roth (Karlsruhe). Aceton wurde einmal bei Normaldruck destilliert, um die Reinheit zu erhöhen. Benutztes Aceton wurde zum Teil rezykliert und nach zweimaliger Destillation erneut eingesetzt. Diethylether wurde unter Zugabe von KOH zwei Stunden unter Rückfluss zur Beseitigung von Peroxiden aufgeköcht und anschließend destilliert.

2.2.2 Gase

Stickstoff 5.0 wurde von der Firma AirLiquide (Düsseldorf) bezogen und sowohl zum Eintrocknen von Pigmenten als auch zum Umspülen der Detektoren des CD-Spektrometers verwendet.

2.2.3 Weitere Chemikalien

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

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Alfa Aesar, USA

Avanti Polar-Lipids, USA

Biomol, Hamburg

Bio-Rad, USA

Boehringer, Mannheim

Macherey-Nagel, Düren

MobiTec, Göttingen
 New England BioLabs Inc., Schwalbach
 PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
 Serva, Heidelberg
 Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.3 Längenstandards

2.3.1 DNA-Längenstandards

Als DNA-Längenstandards wurden 100 Basenpaar (bp)- und 1 Kilo-Basenpaar (kb)-DNA-Leitern von New England Biolabs (NEB, Bad Schwalbach) und die 1 kb- DNA-Leiter von Fermentas verwendet, welche in Abb. 1.2.1 mit Größenangaben abgebildet sind. Die angegebenen DNA-Massen beziehen sich jeweils auf eine aufgetragene DNA-Masse von 0,5 µg.

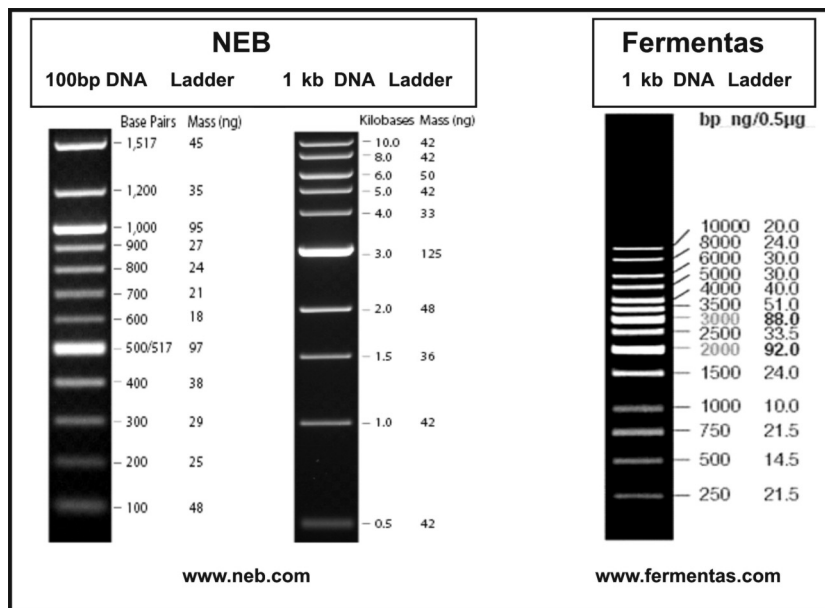


Abb. 1.2.1: DNA-Längenstandards von NEB und Fermentas.

2.3.2 Protein-Längenstandards

SDS7-Marker wurde von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen und vor Gebrauch 2 min bei 100 °C denaturiert. Die Zusammensetzung des Proteinmix ist in Tab. 1.2.1 mit Angabe der molekularen Proteinmasse dargestellt.

Tab. 1.2.1: Proteinmix in SDS7-Marker mit Angabe der molekularen Proteinmasse.

Molekulare Masse	Protein
67,0 kDa (Kilo-Dalton)	Albumin, Rind
45,0 kDa	Albumin, Ei
36,0 kDa	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Kaninchen
29,0 kDa	Carboanhydrase, Rind
24,0 kDa	Trypsinogen, Rind Pankreas
20,1 kDa	Trypsin-Inhibitor, Soja-Bohne
14,2 kDa	α -Lactalbumin, Rind Milch

2.4 Marker

2.4.1 EPR-Spinmarker

A) 4-(2-Iodoacetamido)-TEMPO, free radical

4-(2-Iodoacetamido)-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy, free radical

TEMPO-IA

Beschreibung:

Quelle: Aldrich

Formel: $C_{11}H_{20}IN_2O_2$

Molekulargewicht: 339,19 g/mol

Löslich in: Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF), Wasser, Ethanol
lichtempfindlich

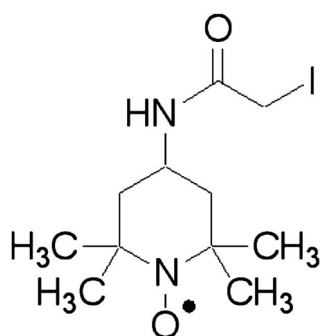


Abb. 1.2.2: Strukturformel von TEMPO-IA

B) 3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL, free radical

3-(2-Iodoacetamido)-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy, free radical
PROXYL-IA

Beschreibung:

Quelle: Aldrich

Formel: $C_{10}H_{18}IN_2O_2$

Molekulargewicht: 325,17 g/mol

Löslich in: DMSO, DMF, Wasser, Ethanol

lichtempfindlich

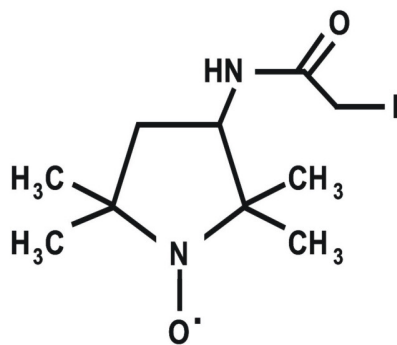


Abb. 1.2.3: Strukturformel von PROXYL-IA

2.4.2 Fluoreszenzmarker**A) BODIPY® 507/545 IA**

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

BODIPY-IA

Beschreibung:

Quelle: Invitrogen

Formel: $C_{15}H_{17}BF_2IN_3O$

Molekulargewicht: 431,03 g/mol

max. Absorption (Methanol): 508 nm

max. Emission (Methanol): 543 nm

mol. Extinktionskoeffizient: 69000 [$cm^{-1} \times M^{-1}$]

lichtempfindlich

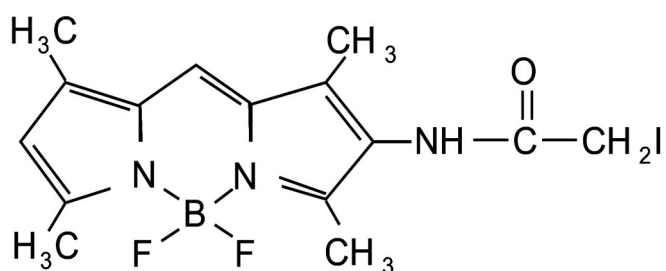


Abb. 1.2.4: Strukturformel von BODIPY-IA

B) DY731-Maleimide

DY731-Mal

DY731

Beschreibung:

Quelle: DYOMICS (USA)

Formel: $C_{44}H_{53}N_4O_{10}S_2Na$

Molekulargewicht: 885,04 g/mol

max. Absorption (Ethanol): 736 nm

max. Emission (Ethanol): 759 nm

molarer Extinktionskoeffizient: 225000 [$cm^{-1} \times M^{-1}$]

Löslich in: Wasser, Methanol, DMF, DMSO

lichtempfindlich

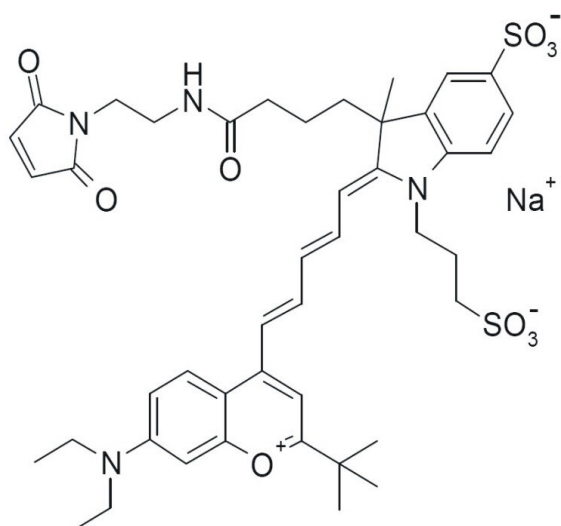


Abb. 1.2.5: Strukturformel von DY731-Mal

2.5 Bakterienstämme

2.5.1 JM101

Chemokompetente Bakterienzellen des *E. coli*- Expressionsstammes JM101 wurden von NEB (Bad Schwalbach) bezogen. Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen und der Test der Transformationseffizienz erfolgten nach Standard-Protokoll wie beschrieben in Müller (2008).

2.5.2 XL1-Blue

Superkompetente Bakterienzellen des *E. coli*- Stammes XL1-Blue wurden von der Firma Stratagene (La Jolla, USA) bezogen. Es wurden chemokompetente Zellen verwendet, die Bestandteil des „Quikchange® II site-directed mutagenesis kit“ (Stratagene) waren. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert und waren nach Auftauen auf Eis gebrauchsfertig.

2.6 Molekularbiologische Methoden zur Herstellung neuer *Lhcb1*-Klone

2.6.1 Klonierungsstrategien und Beschreibung hergestellter Mutanten

In der vorliegenden Dissertation, sowie in den Diplomarbeiten Hebel (2007), Plunger (2007), Dietz (2008) und Müller (2008), wurden eine Vielzahl neuer Klone des *Lhcb1* hergestellt, welche in Tab. 1.2.2 zusammengefasst sind. Zur Herstellung wurden verschiedene Mutagenese-Strategien angewendet, insbesondere die punktspezifische Mutagenese (PSM) mittels „Quikchange® II site-directed mutagenesis kit“ der Firma Stratagene (2.6.10.1). Hierbei wurde vorzugsweise die Aminosäuren Serin (Ser) oder Valin (Val) gegen Cys ausgetauscht. Umgekehrt wurde durch Müller (2008) die Mutante C79Sh durch Austausch des nativen Cys 79 gegen Ser produziert. Dieser Cys-freie Klon diente als Matrize zur Herstellung von Cys-Einzel- und Cys-Doppelmutanten des LHCII mit C-terminalem „His₆ tag“ (Hexahistidyl-Rest). Zuvor entstanden Klone mit C-terminalem „His₆ tag“ [S59Ch (Kap. I), V196Ch (Hebel, 2007)] bzw. Klone mit N-terminalem „Strep tag II®“ (kurz „Strep tag“) sowie C-terminalem „His₆ tag“ (stC79Sh, st106/160h; Kap. II) durch Restriktion und Ligation (R+L; 2.6.10.2) bereits vorhandener Klone. Als dritte Mutagenese-Methode wurde die Insertions-PCR mit phosphorylierten Überhangprimern (I-PCR, 2.6.10.3) zur Herstellung eines Klons mit C-terminalem „His₁₂ tag“ [S3Chh (Plunger)] gewählt.

Die Benennung der Klone ist folgendermaßen zu verstehen. In Mutante S59C wurde das Ser an Position 59 durch Cys ersetzt, im entsprechenden Ausgangsklon C79S war das einzige native Cys an Position 79 bereits durch Ser ersetzt worden (Huschenbett, 2001). Somit sitzt das einzig vorhandene Cys des Klons S59C an Position 59. Die Cys-Doppelmutante S59C/V90C entspricht S59C und besitzt zusätzlich an Po-

sition 90 ein zweites Cys (im Austausch gegen Val). Die Mutante S59Ch entspricht ebenfalls der Mutante S59C, trägt aber zusätzlich einen C-terminalen „His₆ tag“. Die doppelt affinitätsmarkierten Klone stC79Sh und st106/160h tragen neben dem C-terminalen „His₆ tag“ noch einen N-terminalen „Strep tag“ (Kap. II). Alle von Müller (2008) hergestellten „P“-Klone besitzen den Aminosäureaustausch Threonin (Thr) 5 zu Glutaminsäure (Glu).

Tab. 1.2.2: Übersicht aller während der Dissertation hergestellten *Lhcb1*-Klone (auch der Diplomanden Hebel, 2007; Plunger, 2007; Dietz, 2008; Müller, 2008) mit Angabe des Herstellers, einer Kurzbeschreibung des Klons und der Mutagenese-Strategie mit Ausgangsklon. PSM steht für punktspezifische Mutagenese, R+L für Restriktion und Ligation, I-PCR für Insertions-PCR, S für Serin, V für Valin, C für Cystein, T für Threonin, A für Alanin, K für Lysin, F für Phenylalanin, E für Glutaminsäure, P für Phosphorylierungs-Imitation, h und hc sowie h₆ für C-terminalen „His₆ tag“, hh für C-terminalen „His₁₂ tag“, Strep und S2 für N-terminalen „Strep tag“, Be für Bender, Die für Dietz, Dil für Dilly-Hartwig, Doc für Dockter, Hu für Huschenbett, Ko für Kosemund, La für Lauterbach und Mü für Müller. Zahlen bezeichnen Aminosäurepositionen im Apoprotein. Ausnahme bilden die von Kosemund (1999) bzw. Dilly-Hartwig (1995) hergestellten Klone C3.2h und D7f.3, hier beziehen sich Buchstaben und Zahlen der Klone auf Herstellernamen und Klonierungsschritte.

Hersteller	Klon	Beschreibung	Strategie, Ausgangsklon (Hersteller)
Dockter	S59C	S59C, C79S	PSM, C79S (Hu)
	S59Ch	S59C, C79S, h ₆	R+L, S59C (Doc), C3.2h (Ko)
	V90C	C79S, V90C	PSM, C79S (Hu)
	S123C	C79S, S123C	PSM, C79S (Hu)
	V196C	C79S, V196C	PSM, C79S (Hu)
	S59C/V90C	S59C, C79S, V90C	PSM, V90C (Doc)
	V90C/S123C	C79S, V90C, S123C	PSM, V90C (Doc)
	V90C/V196C	C79S, V90C, V196C	PSM, V90C (Doc)
	S123C/V196C	C79S, S123C, V196C	PSM, V196C (Doc)
	stC79Sh	Strep, C79S, h ₆	R+L, D7f.3-S2 (La), C79Sh (Mü)
	st106/160h	Strep, C79S, S106C, S160C, h ₆	R+L, D7f.3-S2 (La), S106/160Ch (Be)
Plunger	S3Chh	S3C, C79S, h ₁₂	I-PCR, S3Ch (Hu)
Hebel	V196Ch	C79S, V196C, h ₆	R+L, S3Ch (Hu), V196C (Doc)
Müller	C79Sh	C79S, h ₆	PSM, C3.2h (Ko)
	P3	S3C, T5E, C79S, h ₆	PSM, S3Ch (Hu)
	P14	T5E, S14C, C79S, h ₆	PSM, S14Ch (Mü)
	P29	T5E, S29C, C79S, h ₆	PSM, S29Ch (Mü)
	P3/14	S3C, T5E, S14C, C79S, h ₆	PSM, S3C/S14Ch (Mü)
	P3/29	S3C, T5E, S29C, C79S, h ₆	PSM, S3C/S29Ch (Mü)
	P3/59	S3C, T5E, S59C, C79S, h ₆	PSM, S3C/S59Ch (Mü)
	P14/29	T5E, S14C, S29C, C79S, h ₆	PSM, S14C/S29Ch (Mü)
	P29/59	T5E, S29S, S59C, C79S, h ₆	PSM, S29C/S59Ch (Mü)
	A4Ch	A4C, C79S, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)
	K7Ch	K7C, C79S, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)
V9Ch	V9C, C79S, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)	

	A10Ch	A10C, C79S, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)
	S11Ch	S11C, C79C, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)
	S12Ch	S12C, C79S, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)
	S14Ch	S14C, C79S, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)
	V22Ch	V22C, C79S, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)
	S29Ch	S29C, C79C, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)
	S34Ch	S34C, C79S, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)
	F40Ch	F40C, C79S, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)
	A49Ch	A49C, C79S, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)
	S3C/S14Ch	S3C, S14C, C79S, h ₆	PSM, S3Ch (Hu)
	S3C/S29Ch	S3C, S29C, C79S, h ₆	PSM, S3Ch (Hu)
	S3C/S59Ch	S3C, S59C, C79S, h ₆	PSM, S3Ch (Hu)
	S14C/S29Ch	S14C, S29C, C79S, h ₆	PSM, S29Ch (Mü)
	S29C/S59Ch	S29C, S59C, C79S, h ₆	PSM, S59Ch (Doc)
Dietz	V90Ch	C79S, V90C, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)
	S106Chc	C79S, S106C, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)
	S123Ch	C79S, S123C, h ₆	PSM, C79Sh (Mü)
	V90C/S106Ch	C79S, V90C, S106C, h ₆	PSM, V90Ch (Die)
	V90C/S123Ch	C79S, V90C, S123C, h ₆	PSM, S123Ch (Die)

2.6.2 Ausgangsklone und pDS12-Vektor

Die zur Herstellung neuer *Lhcb1*-Klone verwendeten Ausgangsklone sind jeweils in Tab. 1.2.2 aufgelistet. Allen Ausgangs- und neu produzierten Klonen ist gemein, dass sie Abkömmlinge des muren *Lhcb1*-Gens (*lhcb1*2*, AB80; Cashmore, 1984) aus Erbse (*Pisum sativum*) sind und in die multiple Klonierungsstelle des Expressionsvektors pDS12-RBSII (Bujard *et al.*, 1987) inseriert vorliegen. Die Größe des Konstrukts pDS12-RBS II und *Lhcb1* beträgt 4241 Nukleotide (Nt), das Plasmid ist in Abb. 1.2.6 dargestellt und beschrieben.

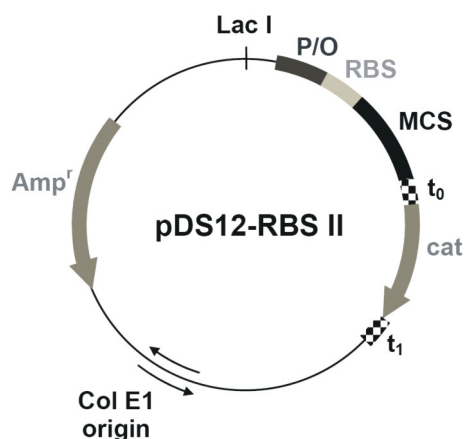


Abb. 1.2.6: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pDS12-RBSII. Col E1 origin bezeichnet den Replikationsursprung, Amp^r das β-Lactamase-Gen für die Ampicillinresistenz, Lac I das Lac-Repressor-Gen, P den T5-Promotor P_{N25}, O den *E. coli*- Lac-Operator, RBS die Ribosomen-Bindestelle, MCS die „multiple cloning site“ (multiple Klonierungsstelle), t₀ und t₁ die Terminatoren und cat das Gen für Chloramphenicol-Acetyltransferase für Chloramphenicol-Resistenz. Abbildung verändert nach Heinemann (1999).

2.6.3 Plasmid-Isolierung und DNA-Quantifizierung

Im Zuge der Herstellung verschiedener *Lhcb1*-Klone wurden zunächst Plasmid-Isolierungen der entsprechenden Ausgangsklone (Tab. 1.2.2) durchgeführt. Hierzu wurden Bakterienzellen des Stammes *E. coli* JM101 aus -80 °C- Dauerkulturen über Nacht auf Luria-Bertani (LB)-Ampicillin (Amp)-Platten (16 h, 37 °C) vereinzelt, eine einzelne Kolonie gepickt und über Nacht in 15 ml Amp-haltigem (100 mg/l) LB-Flüssigmedium angezogen. Die gewünschte Plasmid-DNA wurde aus der Kultur mit Hilfe des „peqGOLD plasmid miniprep kit I“ (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen) nach Anweisung des Herstellers auf Silica-Säulen gebunden, mehrmals gewaschen und mit 70 µl warmem (50 °C), sterilem Aqua dest. in zwei Durchgängen (je 50 und 20 µl) eluiert.

Die Quantifizierung der gelösten Plasmid-DNA erfolgte auf einem analytischen Agarose-Gel (2.6.6.1) oder photometrisch durch Messung der UV-Absorption der aromatischen Ringe der Nucleobasen bei 260 nm im Biophotometer. Zur Abschätzung der Reinheit der DNA-Lösung, bezogen auf RNA- und Protein-Kontamination, wurden zudem die Absorptionsmaxima bei 280 nm sowie, als Referenzwert, die Absorption bei 320 nm bestimmt. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde wie folgt errechnet:

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

Über den erhaltenen Quotienten E_{260}/E_{280} wurde die Reinheit der Nucleinsäure-Lösung abgeschätzt. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen Wert von 1,8, eine reine RNA-Lösung einen Wert von 2,0. Bei einer Verunreinigung der Lösung mit Proteinen liegt der Wert deutlich niedriger.

Material:

LB-Amp Platten:	1 % Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	1 % NaCl (pH 7,5)
	1,5 % Agar
	100 µg/ml Amp
LB-Flüssigmedium:	1 % Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	1 % NaCl (pH 7,5)
	100 µg/ml Amp
	„peqGOLD plasmid miniprep kit I“ (PEQLAB Biotechnologie, Erlangen)
	steriles Aqua dest.

2.6.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) wurde 1987 von Mullis & Faloona zur Amplifikation von DNA *in vitro* entwickelt. Nach Hitze-Denaturierung des zu vervielfältigen Doppelstranges bei 95 °C erfolgt im zweiten Schritt das Anlagern der DNA-Primer („Annealing“) bei Temperaturen zwischen 50 und 70 °C, abhängig der entsprechenden Primer-Schmelztemperatur und der gewünschten Stringenz. Im dritten Schritt, der sogenannten Elongation, synthetisieren spezielle DNA-Polymerasen meist bei 72 °C ausgehend von den Primern in 5'-3'- Richtung einen neuen DNA-Einzelstrang, welcher komplementär zur Matrize ist. So entstehen aus einem Matrizen-Doppelstrang zwei neue Doppelstränge, aus jeweils einem Matrizen- und einen neu synthetisierten Strang. Die Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen erlaubt die Wiederholung dieses Zyklus ohne eine Beeinträchtigung der Enzyme durch Denaturierung. In 16-35 Zyklen wird die Matrizen-DNA innerhalb kurzer Zeit und unter geringem Aufwand exponentiell vervielfältigt und kann, meist nach Aufreinigung, weiterverwendet werden. Neben der Mutagenese-PCR zur Herstellung neuer Mutanten wurden zur Charakterisierung der Klone eine „dirty“-PCR oder eine Sequenzier-PCR durchgeführt.

2.6.4.1 Durchführung der PCR

2.6.4.1.1 Mutagenese-PCR mittels „Quikchange® II site-directed mutagenesis kit“

In der Mutagenese-PCR dienten die aus *E. coli* JM101 Zellen isolierten pDS12-RBSII-Vektoren verschiedener *Lhcb1*-Klone als Matrize. Die PCR wurde nach Angaben des Herstellers Stratagene durchgeführt, die in Tab. 1.2.3 aufgelisteten Materialien wurden auf Eis gemischt.

Tab. 1.2.3: Ansatz zur Durchführung der Mutagenese-PCR nach Stratagene.

Material	Menge/Konz.
Reaktions-Puffer	1x
Plasmid	50 ng
Mutagenese-Primer sense	125 ng
Mutagenese-Primer antisense	125 ng
<i>Pfu Ultra</i> HF DNA Polymerase	2,5 U
dNTP-Mix Stratagene	1 µl
dH ₂ O steril	ad 50 µl

Die Mutagenese-PCR wurde wie in Tab. 1.2.4 beschrieben durchgeführt.

Tab. 1.2.4: PCR-Programm zur Durchführung der Mutagenese-PCR nach Stratagene.

Zyklen	Temperatur	Dauer	Beschreibung
-	110 °C	-	Deckel vorheizen
1x	95 °C	30 s	Aktivierung
16x	95 °C	30 s	Denaturierung
	55 °C	1 min	Annealing
	68 °C	5 min	Amplifikation
-	4 °C	∞	DNA-Lagerung

Material:

Plasmid-DNA pDS12-RBSII mit *Lhcb1*

“Quikchange® II site-directed mutagenesis kit” (Stratagene)

2.6.4.1.2 Identifikation positiver Klone mittels „dirty“-PCR

Als schnelle Methode zur Identifikation positiver Klone wurde die „dirty“-PCR mit Bakterienkolonien durchgeführt. Die Bezeichnung „dirty“ bezieht sich hierbei auf das (aus Gründen der Zeitersparnis) bewusst unsaubere Arbeiten unter Verwendung von Bakterienzellen als Matrize (anstatt aufgereinigter Plasmid-DNA).

Die Charakterisierung der neuen Klone geschah jeweils durch eine Wahl von Primern, die beidseitig oder innerhalb des zu untersuchenden DNA-Fragments binden, und soll in Kap. II (3.2.1) anhand eines Beispiels genauer beschrieben werden. Zur Durchführung wurde von Amp-haltigen LB- Festmedien jeweils eine vereinzelt Bakterienkolonie mit einer sterilen Spitze gepickt, in 10 µl sterilem dH₂O suspendiert und mit den in Tab. 1.2.5 aufgeführten Materialien auf Eis gemischt.

Tab. 1.2.5: Ansatz zur Durchführung einer „dirty“-PCR.

Material	Menge/Konz.
Puffer <i>Pwo</i>	1x
Bakterien-Suspension	1 µl
Triton X-100 (TX)	0,1 %
sense Primer	100 ng
antisense Primer	100 ng
<i>Pwo</i> Polymerase	2,5 U
dNTPs	je 0,2 mmol/l
dH ₂ O steril	ad 50 µl

Die „dirty“-PCR wurde wie in Tab. 1.2.6 beschrieben durchgeführt.

Tab. 1.2.6: PCR-Programm zur Durchführung einer „dirty“-PCR.

Zyklen	Temperatur	Dauer	Beschreibung
-	110 °C	-	Deckel vorheizen
1x	95 °C	5 min	Aktivierung
35x	95 °C	1 min	Denaturierung
	52 °C	1 min	Annealing
	72 °C	90 s	Amplifikation
1x	72 °C	7 min	Amplifikation
-	4 °C	∞	DNA-Lagerung

Die aus der „dirty“-PCR hervorgegangenen DNA-Amplifikate wurden auf einem analytischen 0,8%igen Agarose-Gel (2.6.6.1) auf ihre Länge geprüft und nach Ethidiumbromid-Färbung in der Versa Doc mit der Software „Quantity One“ dokumentiert.

2.6.4.1.3 PCR zur Sequenzierung

Die genaue Überprüfung hergestellter Klone erfolgte durch Sequenzierung des veränderten Plasmid-Abschnitts. Hierfür wurde eine Sequenzier-PCR mit dem „BigDye Terminator 3.1 System“ (Applied Biosystems, USA) nach Vorgaben der Firma GENterprise (Mainz) durchgeführt. In diesem System, welches auf der Kettenabbruch-Methode von Sanger *et al.* (1977) basiert, werden neben 2'-Desoxynukleotiden (dNTP) auch mit Fluorophoren beladene Didesoxynukleotide in den neu synthetisierten Strang eingebaut, was einen Abbruch der Amplifikation bewirkt. Statistisch gesehen entstehen bei einer ausreichenden Anzahl von Amplifikations-Zyklen Kettenabbruch-Fragmente jeder Länge, welche am Strang-Ende jeweils mit einem basenspezifischen Fluorophor markiert und somit nachweisbar sind. Die Durchführung der Sequenzier-PCR ist in Tab. 1.2.7 dargestellt, verwendete Sequenzier-Primer sind in Tab. 1.2.12 zusammengefasst.

Tab. 1.2.7: Ansatz zur Durchführung einer Sequenzier-PCR.

Material	Menge/Konz.
BigDye-Puffer 3.1	1x
Plasmid	300 ng
Sequenzier- Primer	100 ng
BigDyeMix 3.1	2 µl
dH ₂ O	ad 10 µl

Die Sequenzier-PCR wurde wie in Tab. 1.2.8 beschrieben durchgeführt.

Tab. 1.2.8: PCR-Programm zur Durchführung der Sequenzier-PCR.

Zyklen	Temperatur	Dauer	Beschreibung
-	110 °C	-	Deckel vorheizen
1x	96 °C	5 min	Denaturierung
30x	96 °C	5 min	Denaturierung
	60 °C	4 min	Annealing & Amplifikation
-	4 °C	∞	DNA-Lagerung

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GENterprise (Mainz), die uneditierten Daten wurden mit Hilfe der Software „Chromas“ (Version 1.45; Chromas, Australien) ausgewertet und mit der kostenlosen Software Lalign (www.ch.embnet.org) auf Sequenzidentität geprüft.

Material:

„BigDye Terminator 3.1 System“ (Applied Biosystems, USA)

2.6.4.2 PCR-Primer

2.6.4.2.1 Primer für die Mutagenese-PCR

Primer, die in punktspezifischen Mutagenesen eingesetzt wurden, sind ausführlich in den folgenden Tab. 1.2.9, 10 und 11 beschrieben. Das Primer-Design folgte den Angaben des „Quikchange[®] kit“- Herstellers Stratagene.

Tab. 1.2.9: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Mutagenese-Primer. Die im Vergleich zur wildtypischen *Lhcb1*-Sequenz veränderten Codons sind unterstrichen.

Name	Sequenz	Länge	Beschreibung
LHCII-S59C fw	5'-GCT GAC CCA GAG ACA TTC <u>TGC</u> AAG AAC CGT GAG C-3'	34 Nt	Austausch S59C
LHCII-S59C-rv	5'-G CTC ACG GTT CTT <u>GCA</u> GAA TGT CTC TGG GTC AGC-3'		
Lhcb1 V90C Stra fw	5'-C CCA GAG CTT TTG TCT CGC AAC GGT <u>TGT</u> AAA TTC GGC GAA GC-3'	42 Nt	Austausch V90C
Lhcb1 V90C Stra rv	5'-GC TTC GCC GAA TTT <u>ACA</u> ACC GTT GCG AGA CAA AAG CTC TGG G-3'		
LHCII-S123C fw	5'-CCA AGC TTG GTC CAT GCT CAA <u>TGC</u> ATC CTT GCC ATA TGG GCC-3'	42 Nt	Austausch S123C
LHCII-S123C rv	5'-GGC CCA TAT GGC AAG GAT <u>GCA</u> TTG AGC ATG GAC CAA GCT TGG-3'		
LHCII V196C Stra fw	5'-CC ATG TTC TCA ATG TTT GGA TTC TTC TGT CAA GCT ATT GTA ACT GG-3'	46 Nt	Austausch V196C
LHCII V196C Stra rv	5'-CC AGT TAC AAT AGC TTG <u>ACA</u> GAA GAA TCC AAA CAT TGA GAA CAT GG-3'		

Tab. 1.2.10: Übersicht über die von Dietz (2008) verwendeten Mutagenese-Primer. Die im Vergleich zur wildtypischen *Lhcb1*-Sequenz veränderten Codons sind unterstrichen.

Name	Sequenz	Länge	Beschreibung
LHCII-S106C fw	5'-GGA TCT CAA ATC TTT <u>TGT</u> GAG GGT GGA CTT GAT TAC TTG GG-3'	41 Nt	Austausch S106C
LHCII-S106C rv	5'-CC CAA GTA ATC AAG TCC ACC CTC <u>ACA</u> AAA GAT TTG AGA TCC-3'		

Tab. 1.2.11: Übersicht über die von Müller (2008) verwendeten Mutagenese-Primer. Die im Vergleich zur wildtypischen *Lhcb1*-Sequenz veränderten Codons sind unterstrichen.

Name	Sequenz	Länge	Beschreibung
LHCII-S3C/T5E-fw	5'-GC ATG CGT AAA <u>TGT</u> GCT <u>GAG</u> ACC AAG AAA GTA GCG AGC -3'	38 Nt	Austausch T5E in Mutanten mit Austausch S3C
LHCII-S3C/T5E-rvcompl	5'-GCT CGC TAC TTT CTT GGT <u>CTC</u> AGC <u>ACA</u> TTT ACG CAT GC-3'		
LHCII-A4Cfw	5' – GC ATG CGT AAA TCT <u>TGT</u> ACC ACC AAG AAA GTA GCG AGC TCT GG – 3'	43 Nt	Austausch A4C
LHCII-A4Crv	5' – CC AGA GCT CGC TAC TTT CTT GGT GGT <u>ACA</u> AGA TTT ACG CAT GC – 3'		
LHCII-T5E-fw	5'-GC ATG CGT AAA TCT GCT <u>GAG</u> ACC AAG AAA GTA GCG AGC -3'	38 Nt	Austausch T5E
LHCII-T5E-rvcompl	5'-GCT CGC TAC TTT CTT GGT <u>CTC</u> AGC AGA TTT ACG CAT GC-3'		
LHCII-K7Cfw	5' – GC ATG CGT AAA TCT GCT ACC ACC <u>TGT</u> AAA GTA GCG AGC TCT GG– 3'	43 Nt	Austausch K7C
LHCII-K7Crv	5' – CC AGA GCT CGC TAC TTT <u>ACA</u> GGT GGT AGC AGA TTT ACG CAT GC – 3'		
LHCII-V9Cfw	5' – GCT ACC ACC AAG AAA <u>TGT</u> GCG AGC TCT GGA AGC CCA TGG – 3'	39 Nt	Austausch V9C
LHCII-V9Crv	5' – CCA TGG GCT TCC AGA GCT CGC <u>ACA</u> TTT CTT GGT GGT AGC – 3'		
LHCII-A10Cfw	5' – GCT ACC ACC AAG AAA GTA <u>TGC</u> AGC TCT GGA AGC CCA TGG – 3'	39 Nt	Austausch A10C
LHCII-A10Crv	5' – CCA TGG GCT TCC AGA GCT <u>GCA</u> TAC TTT CTT GGT GGT AGC – 3'		
LHCII-S11Cfw	5' – CC ACC AAG AAA GTA GCG <u>TGC</u> TCT GGA AGC CC – 3'	31 Nt	Austausch S11C
LHCII-S11Crv	5' – GG GCT TCC AGA <u>GCA</u> CGC TAC TTT CTT GGT GG – 3'		
LHCII-S12Cfw	5' – CC ACC AAG AAA GTA GCG AGC <u>TGT</u> GGA AGC CCA TGG – 3'	35 Nt	Austausch S12C
LHCII-S12Crv	5' – CCA TGG GCT TCC <u>ACA</u> GCT CGC TAC TTT CTT GGT GG – 3'		
LHCII-S14Cfw	5' – GCG AGC TCT GGA <u>TGC</u> CCA TGG TAC GGA CCA GAC CG – 3'	35 Nt	Austausch S14C
LHCII-S14Crvcompl	5' – CG GTC TGG TCC GTA CCA TGG <u>GCA</u> TCC AGA GCT CGC – 3'		

LHCII-V22Cfw	5' – GC CCA TGG TAC GGA CCA GAC CGT TGT AAG TAC TTA GGC CC – 3'	40 Nt	Austausch V22C
LHCII-V22Crv	5' – GG GCC TAA GTA CTT <u>ACA</u> ACG GTC TGG TCC GTA CCA TGG GC – 3'		
LHCII-S29Cfw	5' - C CGT GTT AAG TAC TTA GGC CCA TTC TGC <u>GGT</u> GAG TCT CCA TCC -3'	43 Nt	Austausch S29C
LHCII-S29C- rvcompl	5'- GGA TGG AGA CTC ACC <u>GCA</u> GAA TGG GCC TAA GTA CTT AAC ACG G-3'		
LHCII-S34Cfw	5' – CC GGT GAG TCT CCA <u>TGC</u> TAC TTG ACT GGA GAG TTC CCC – 3'	38 Nt	Austausch S34C
LHCII-S34Crv	5' – GGG GAA CTC TCC AGT CAA GTA <u>GCA</u> TGG AGA CTC ACC GG – 3'		
LHCII-F40Cfw	5' – CC TAC TTG ACT GGA GAG <u>TGC</u> CCC GGT GAC TAC GG – 3'	34 Nt	Austausch F40C
LHCII-F40Crv	5' – CC GTA GTC ACC GGG <u>GCA</u> CTC TCC AGT CAA GTA GG – 3'		
LHCII-A49Cfw	5' – C GGT TGG GAC ACT <u>TGC</u> GGA CTC TCT GCT GAC CC – 3'	33 Nt	Austausch A49C
LHCII-A49Crv	5' – GG GTC AGC AGA GAG TCC <u>GCA</u> AGT GTC CCA ACC G – 3'		
LHCII-S59Cfw	5' – GCT GAC CCA GAG ACA TTC <u>TGC</u> AAG AAC CGT GAG C – 3'	34 Nt	Austausch S59C
LHCII-S59Crv	5' – G CTC ACG GTT CTT <u>GCA</u> GAA TGT CTC TGG GTC AGC – 3'		
LHCII-C79Sfw	5' – GG GCT ATG TTG GGT GCT TTG GGA TCT GTC TTC CCA GAG C – 3'	39 Nt	Austausch C79S
LHCII- C79Srvcompl	5' – G CTC TGG GAA GAC <u>AGA</u> TCC CAA AGC ACC CAA CAT AGC CC – 3'		

2.6.4.2.1 Primer für „dirty“-PCR und Sequenzier-PCR

Primer, die in der „dirty“- bzw. Sequenzier-PCR verwendet wurden, sind in Tab. 1.2.12 beschrieben und aufgelistet.

Tab. 1.2.12: Übersicht über die verwendeten Primer in der "dirty"-bzw. Sequenzier-PCR.

Name	Sequenz	Länge	Beschreibung
Ds23 (+)	5'-ATT TGC TTT GTG AGC GG-3'	17 Nt	Sequenzier-Primer „upstream“ der MCS im pDS12-Vektor
Ds178 (-)	5'-GGA GTT CTG AGG TCA TTA CTG G-3'	22 Nt	Sequenzier-Primer ca. 40 bp „downstream“ der <i>Pst</i> I-Schnittstelle in der MCS des pDS12-Vektors
Seq 105 (-)	5'-CC ATC ATC TTG TAT TAG TGA ACC - 3'	23 Nt	Sequenzier-Primer für pDS12-RBSII- <i>Lhcb1</i>
Strep (+)	5'-TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGT GCA-3'	30 Nt	zum Einfügen eines „Strep tag“ in eine <i>Nsi</i> I-Schnittstelle
C-hisan (-)	5'-CCG GGT TAA TGG TGA TGG TGA TGG TGT TTT-3'	30 Nt	C-terminaler Primer für <i>Xma</i> I-Stelle, führt P-G-K-(His) ₆ -TAA ein

2.6.5 Restriktion von DNA

Der Verdau von methylierter Template-DNA und die Herstellung verschiedener Klone des *Lhcb1* mittels Restriktion und Ligation erfolgte durch den Einsatz von Restriktionsenzymen, welche per Definition pro eingesetzter Enzym-Unit 1 µg DNA unter optimalen Bedingungen innerhalb einer Stunde schneiden. Eingesetzte Restriktionsenzyme mit ihren wichtigsten Eigenschaften sind in Tab. 1.2.13 aufgelistet.

Tab. 1.2.13: Verwendete Restriktionsenzyme. Die Restriktionsenzyme werden von NEB (New England Biolabs, Bad Schwalbach), bezogen und bei -20 °C gelagert. Da sie in glycerinhaltigem Puffer geliefert werden, müssen sie vor der Verwendung nicht aufgetaut werden. Alle verwendeten Enzyme produzieren „sticky ends“, wie am Sequenzmotiv erkennbar.

Enzym	Sequenzmotiv	Puffer/Aktivität	Temperatur	Hitze-Inaktivierung
<i>SacI</i>	5'-GAGCT↓C-3'	NEB1+BSA/ 100 % NEB2+BSA/ 50 % NEB4+BSA/ 100 %	37 °C	65 °C, 20 min
<i>PstI</i>	5'-CTGCA↓G-3'	NEB3+BSA/ 100 % NEB2+BSA/ 75 %	37 °C	80 °C, 20 min
<i>BstEII</i>	5'-G↓GTNACC-3'	NEB3+BSA/ 100 % NEB4+BSA/ 75 %	60 °C	Nicht möglich
<i>DpnI</i>	5'-GA ^{CH₃} ↓TC-3'	NEB4 Stratagene-QC-Puffer	37 °C	80 °C, 20 min

Die Durchführung der einzelnen Restriktionen ist zur Wahrung der Übersicht in Kap. I (2.6.10.2) sowie in Kap. II (2.1) beschrieben.

2.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Ladung der Phosphatgruppen sind Nukleinsäuren einheitlich negativ geladen und können zur Analyse, Quantifizierung oder Aufreinigung in einem elektrischen Feld in geeigneten Trägermaterialien ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Als Trägermaterial kam in der vorliegenden Arbeit Agarose, ein vernetztes Galactose-Polymer, zum Einsatz. Die Anfärbung erfolgte mit Ethidiumbromid. Dieser aromatische Farbstoff interkaliert aufgrund seiner planaren Struktur mit den Heterozyklen der DNA-Basen und kann mit UV-Licht der Wellenlängen 245-366 nm angeregt werden. Angefärbte Gele wurden mit dem „VersaDoc™ Imaging System“ fotografiert und mittels „Quantity One“ Software ausgewertet.

Material:

Agarose

TAE-Puffer:

40 mmol/l Tris/Acetat (pH 8,0)

2 mmol/l Ethylendiamintetraacetat

DNA-Auftragspuffer (10x):	50 mmol/l Tris/HCl (pH 8,0) 10 mmol/l EDTA 0,025 % Bromphenolblau 0,025 % Xylencyanol 50 % Glycerin
Ethidiumbromid-Lösung	0,5 µg/ml
DNA-Marker (NEB, USA) "E.Z.N.A. gel extraction kit" (PEQLAB) steriles Aqua dest.	

2.6.6.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von PCR-Produkten und restringierter DNA erfolgte auf 0,8%igen Agarose-Mini-Gelen, die sich zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Größen von 0,5 bis 10 kb eignen. Hierzu wurde 0,8 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und zu je 10 ml auf Glasplatten (7,5 x 5,5 cm), versehen mit Probenkämmen, polymerisiert. Die DNA wurde mit Auftragspuffer versetzt (1x Endkonzentration), auf das fertige Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 70 mV (nach Einlaufen der Probe auf 150 mV erhöht) aufgetrennt. Nach Inkubation in einer Ethidiumbromid-Lösung wurde die DNA in UV-Licht sichtbar gemacht und die Fragmente anhand der seitlich aufgetragenen 100 bp bzw. 1 kb DNA-Längenstandards (Kap. I, 2.3.1) zugeordnet und fotografiert.

2.6.6.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese nach DNA-Restriktion

Die präparative Trennung restringierter DNA erfolgte in 1%igen Agarose-Gelen (1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer). Die DNA wurde mit Auftragspuffer versetzt (1x Endkonzentration), auf das Gel aufgetragen und bei einer Spannung von 70 mV (nach Einlaufen der Probe auf 150 mV erhöht) in die einzelnen Fragmente aufgetrennt. Nach Inkubation in einer Ethidiumbromid-Lösung wurde die DNA in UV-Licht sichtbar gemacht, die Fragmente anhand der seitlich aufgetragenen 100 bp bzw. 1 kb DNA-Längenstandards (Kap. I, 2.3.1) zugeordnet und die gewünschten Banden mit einem Skalpell herausgeschnitten.

2.6.6.3 Rückgewinnung restringierter DNA aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von restringierter Plasmid-DNA aus Agarose-Gel-Stücken erfolgte unter Verwendung des „E.Z.N.A. gel extraction kit“ (PEQLAB) gemäß den Angaben des Herstellers. Hierzu wurden die Gelstücke mit dem erforderlichen Volumen an „Binde-Puffer“ versetzt, die Agarose durch 7 minütige Hitze-Inkubation bei 60 °C gelöst, die DNA auf Silica-Säulen gebunden, gewaschen und mit 70 µl warmen (50 °C), sterilem Aqua dest. in zwei Durchgängen (je 50 und 20 µl) eluiert. Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgte wie zuvor (Kap. I, 2.6.3) beschrieben.

2.6.7 Ligation

Durch Einsatz ATP-abhängiger DNA-Ligasen ist es möglich eine Phosphodiester-Bindung zwischen dem freien 5'-Phosphat-Ende und dem 3'-Hydroxyl-Ende zweier Oligonukleotide auszubilden. Vektorenfragmente, welche zuvor mit identischen Restriktionsenzymen geschnitten wurden, können so neu kombiniert werden.

Hierzu wurden in einem 20 µl Ligationsansatz 100 ng Gesamt-DNA eingesetzt. Um eine optimale Ligationsausbeute zu erreichen, wurde das kürzere Insert in einem 4fach stöchiometrischen Überschuss zum längeren Vektor eingesetzt *. Die Ligation erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers („rapid ligation kit“, Fermentas) durch Verwendung von 1 µl Ligase in 1x Ligase-Puffer bei Raumtemperatur (30 min).

*Berechnung des 4fachen Insert-Überschusses nach folgender Formel:

$$\text{Insert-DNA [ng]} = (4 \times \text{Vektor-DNA [ng]} \times \text{Länge Insert [bp]}) / \text{Länge Vektor [bp]}$$

Material:

“rapid ligation kit” (Fermentas)

2.6.8 Transformation in *E. coli*

Die Transformation mutierter Plasmid-DNA erfolgte in chemisch-kompetente *E. coli*-Bakterien des superkompetenten Stammes XL1-Blue (hier A) oder des Expressionsstammes JM101 (hier B). Hierzu wurde je ein 50 µl Aliquot der Bakterienzellsuspension auf Eis aufgetaut und direkt mit 1 µl PCR-Produkt (A) oder 50 ng Vektor-DNA (B) in einem 14 ml Falcon „round bottom tube“ (auf Eis) gemischt. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min auf Eis wurde die Suspension für 45 s (A) oder 1 min (B) auf 42 °C im Wasserbad erhitzt, um erneut auf Eis (2 min) abgekühlt zu werden. Nach Zugabe von 450 µl NZY⁺-Flüssigmedium (A, 37 °C) oder 440 µl LB-Flüssigmedium (B, 37 °C) wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C phänotypisiert und zur Selektion auf Amp-haltigem LB-Festmedium ausplattiert (100-150 µl). Nach einer Inkubationsdauer von 16 h bei 37 °C, wurde eine Kolonie in LB-Amp Flüssigmedium überführt (14 h, 37 °C, 180 min⁻¹) und am darauffolgenden Tag die amplifizierte Plasmid-DNA isoliert (Kap. I, 2.6.3) und sequenziert (Kap. I, 2.6.4.1.3). Ein Aliquot der Flüssigkultur von JM101-Zellen wurde zudem zur Herstellung einer Dauerkultur verwendet (Kap. I, 2.6.9).

Material:

NZY ⁺ -Flüssigmedium:	22,45 g/l NZCYM BrothEZ Mix 12,5 mmol/l MgSO ₄ 3,6 g/l D-Glucose
LB-Flüssigmedium:	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl (pH 7,5)

LB-Amp-Festmedium:	1 % Trypton
	0,5 % Hefeextrakt
	1 % NaCl (pH 7,5)
	1,5 % Agar
	100 µg/ml Amp

2.6.9 Dauerkulturen

Neue Klone des LHCII wurden sowohl in Form von lyophilisierter Plasmid-DNA als auch in Form von *E. coli* JM101-Dauerkulturen bei -80 °C gelagert. Hierzu wurde, wie in Corbet (2004) beschrieben, 1 ml Bakterien-Flüssigkultur mit Glycerin (zu 16,67 %) versetzt. Nach Bender (2004) sollte die Glycerinkonzentration allerdings höher liegen (64 %).

2.6.10 Durchführung unterschiedlicher Mutagenese-Strategien

2.6.10.1 Punktspezifische Mutagenese mittels „Quikchange® II site-directed mutagenesis kit“

Zur Wahrung der Übersicht soll der allgemeine Ablauf der punktspezifischen Mutagenese mittels „Quikchange® II site-directed mutagenesis kit“ der Firma Stratagene anhand Abb. 1.2.7 beschrieben werden. Die Durchführung einzelner Methoden wurde bereits zuvor beschrieben. Im Allgemeinen sei darauf hingewiesen, dass unmethylierte Plasmide dam-negativer *E. coli*-Stämme (z.B. JM110 oder SCS110) für die Verwendung in der Mutagenese-PCR ungeeignet sind, da sie nicht durch die Restriktionsendonuklease *DpnI* verdaut werden und somit in der Transformation stören.

Nach Isolierung eines methylierten Matrizen-Plasmids (Kap. I, 2.6.3) aus entsprechenden Bakterienstämmen werden in der Mutagenese-PCR (Abb. 1.2.7 A; Kap. I, 2.6.4.1.1) komplementäre Mutagenese-Primer (Kap. I, 2.6.4.2.1), welche bei einer Länge von ca. 30- 50 bp den gewünschten Basenaustausch mittig tragen, eingesetzt. Nach abgeschlossener linearer Amplifikation wird die methylierte Matrizen-DNA durch die Restriktionsendonuklease *DpnI* vielfach geschnitten (Kap. I, 2.6.5), während das unmethylierte PCR-Produkt (Abb. 1.2.7 B, roter Doppelring, genicktes Plasmid) durch *DpnI* nicht verdaut wird. Nach Überprüfung des Amplifikations-Erfolgs mittels analytischem Agarose-Gel (Kap. I, 2.6.6.1), werden 50 µl superkompetente Zellen des *E. coli* Stammes XL1-Blue mit lediglich 1 µl des verdauten PCR-Produkt transformiert (Abb. 1.2.7 C; Kap. I, 2.6.8). Hierbei ist zu beachten, dass es neben einer Plasmid-Amplifikation (Abb. 1.2.7 D), zudem zur Ligation der genickten DNA kommt.

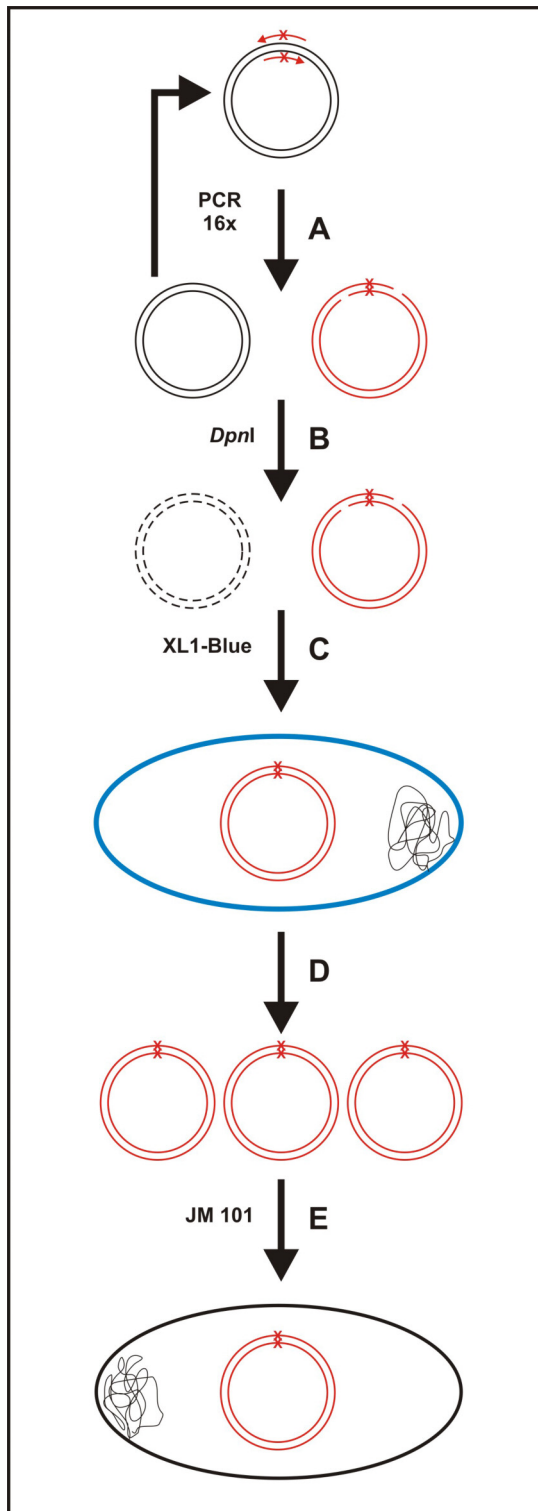


Abb. 1.2.7.: Schema zur Herstellung von Cys-Mutanten des *Lhcb1* durch punktuelle Mutagenese mittels „Quikchange® II site-directed mutagenesis kit“ (Stratagene). In der Mutagenese-PCR (**A**) dient ein methylierter Vektor (schwarzer Ring) als Matrize, das komplementäre Primer-Pärchen (rote Pfeile) besitzt den gewünschten Basenaustausch (rotes Kreuz). Die methylierte Matrizen-DNA wird im Gegensatz zum PCR-Produkt (genicktes Plasmid mit Mutation, roter Ring) durch *DpnI* verdaut (**B**). Nach Transformation von *E. coli* XL1-Blue-Zellen (blaue Ellipse) mit dem PCR-Produkt (**C**) wird die genickte DNA ligiert. Nach Amplifikation und Isolierung des mutierten Plasmids (**D**) erfolgt die Transformation in den Expressionstamm *E. coli* JM101 (**E**, schwarze Ellipse) mit nachfolgender Sequenzierung und Proteinüberexpression.

Nach Isolierung des mutierten Plasmids (Abb. 1.2.7 D) werden Bakterienzellen des gewünschten Expressionsstammes, in diesem Fall chemokompetente *E. coli* JM101, transformiert (Abb. 1.2.7 E; Kap. I, 2.6.8). Hierbei sollte erwähnt werden, dass die Kompetenz der JM101-Zellen deutlich unter der der superkompetenten XL1-Blue-Zellen liegt. Die geringere Kompetenz wird in der zweiten Transformation allerdings durch den Einsatz größerer DNA-Mengen nach vorheriger Plasmid-Amplifikation wettgemacht. Letztlich wird eine vereinzelte Kolonie der JM101 Zellen über Nacht amplifiziert, das Plasmid isoliert und das *Lcb1*-Gen sequenziert (Kap. I, 2.6.4.1.3 und 2.6.4.2.2). Hierbei reicht in der Regel eine einzelne Sequenzierung mit dem Sequenzier-

Primer Seq 105 (-) aus, um den Mutagenese-Erfolg zu prüfen. Zudem wird von jeder neuen Mutante eine -80 °C Dauerkultur (Kap. I, 2.6.9) und eine Plasmid-Mini-Präparation (Kap. I, 2.6.3) angelegt.

2.6.10.2 Herstellung von *Lhcb1*-Konstrukten durch Restriktion und Ligation vorhandener Klone

Die Herstellung von „His₆ tag“-Klonen durch Restriktion und Ligation bereits vorhandener *Lhcb1*-Klone soll im Folgenden am Beispiel der Mutante S59Ch beschrieben werden (Abb. 1.2.8). Hierzu wurden die Cys-Einzelmutante S59C (Kap. I) und die „His₆ tag“-Mutante C3.2h (Kosemund, 1999) jeweils mit den Restriktionsendonucleasen *SacI* und *BstEII* geschnitten (Kap. I, 2.6.5), durch präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (Kap. I, 2.6.6.2) und zu einer Cys-Einzelmutante mit C-terminalem „His₆ tag“ ligiert (Kap. I, 2.6.7).

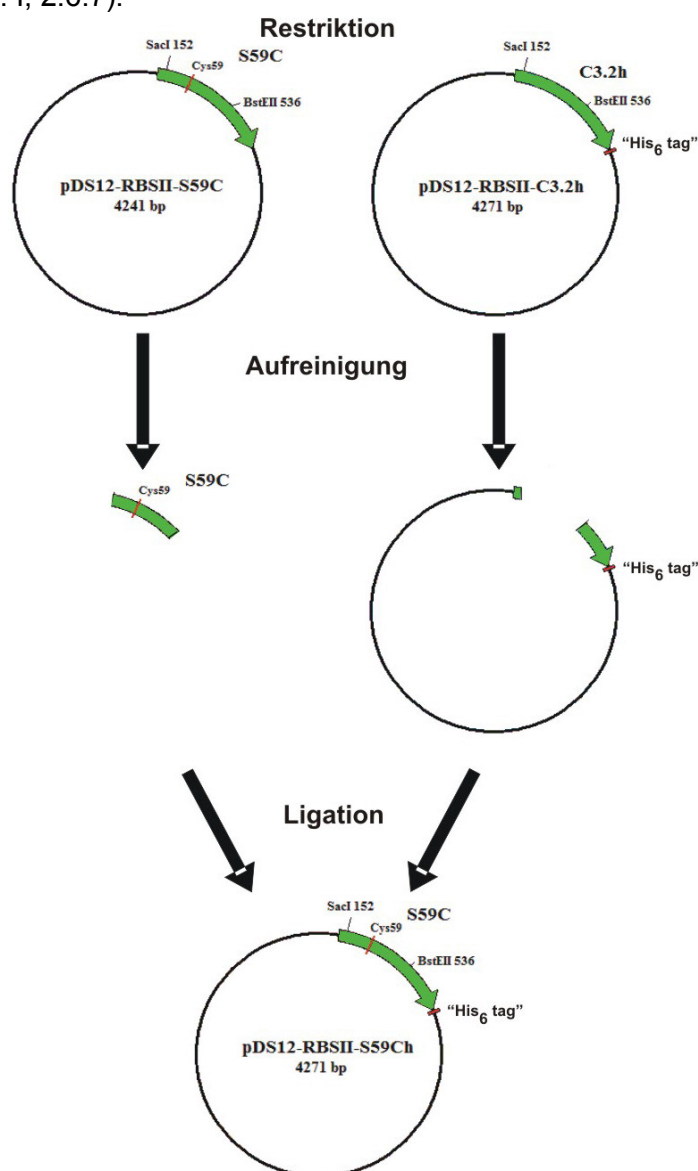


Abb. 1.2.8: Schematische Darstellung zur Konstruktion der Cys-Einzelmutante S59Ch mit C-terminalem „His₆ tag“ aus der Cys-Einzelmutante S59C und „His₆ tag“-Mutante C3.2h. Sowohl S59C als auch C3.2h wurden mit den Restriktionsendonucleasen *SacI* und *BstEII* geschnitten und über ein Agarose-Gel aufgereinigt. Im Anschluss wurden das Cys-tragende kurze Fragment von S59C und das „His₆ tag“ tragende lange Fragment von C3.2h zum Expressionsvektor pDS12-RBSII-S59Ch ligiert, in *E. coli* JM101 transformiert sowie sequenziert.

Hierbei waren die Enzyme so gewählt, dass von der Cys-Mutante S59C ein ca. 380 bp kurzes Cys-tragendes Fragment, von der „His₆ tag“ Mutante C3.2h ein ca. 3880 bp langes (Cys-freies) Fragment mit C-terminalem „His₆ tag“ isoliert werden konnte. Die Restriktion der isolierten Plasmid-DNA erfolgte jeweils als Doppelverdau unter Verwendung des NEB-Puffers NEB4 bei 37 °C (Tab. 1.2.14). Da die Aktivität des Enzyms *BstEII* unter den gewählten Puffer-Bedingungen nicht optimal war, wurde die eingesetzte Enzym-Menge verdoppelt, die Restriktionszeit betrug 3 h.

Tab. 1.2.14: Restriktionsansatz zur Herstellung des Klons S59Ch.

Material	Volumen/Menge
Puffer NEB4	1x
Plasmid-DNA	5 µg
BSA	1x
<i>SacI</i>	15 U
<i>BstEII</i>	30 U
dH ₂ O	ad 50 µl

Eine Denaturierung der Restriktionsendonuclease *BstEII* durch Hitzeinkubation war nicht möglich. Stattdessen wurden die DNA-Fragmente direkt mittels präparativem Agarosegel isoliert (Kap. I, 2.6.6.2). Die aufgereinigten DNA-Fragmente (Kap. I, 2.6.6.3) wurden ligiert (Kap. I, 2.6.7), in JM101-Zellen transformiert (Kap. I, 2.6.8) und nach Amplifikation sequenziert (Kap. I, 2.6.4.1.3). Zudem wurde eine –80 °C Dauerkultur (Kap. I, 2.6.9) und eine Plasmid-Mini-Präparation (Kap. I, 2.6.3) angelegt.

2.6.10.3 Herstellung von Klonen durch Insertions-PCR

Auf die Herstellung von Klonen durch Insertions-PCR soll in der vorliegenden Dissertation nicht näher eingegangen werden, dies ist ausführlich in der Diplomarbeit Plunger (2007) dokumentiert und wird außerdem Gegenstand der Dissertationsschrift von C. Dietz (unveröffentlichte Ergebnisse) sein.

2.7 Präparative biochemische Methoden

2.7.1 Isolierung von Pigmenten

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Rekonstitutionen verschiedener Lhcb1-Mutanten wurden Pigmente aus Erbse (*Pisum sativum*) in größerer Menge im Dunkeln und unter ständiger Kühlung isoliert und eingetrocknet. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C in inerter Atmosphäre unter Stickstoff.

2.7.1.1 Anzucht von *Pisum sativum*

Die Anzucht von *Pisum sativum* erfolgte nach Standard-Protokoll. Dazu wurden zunächst Samen in Wasser unter ausreichend Luftzufuhr über Nacht eingequollen und am darauffolgenden Tag in feuchtem Vermiculit ausgesät. In den folgenden 13 Tagen wuchsen die Pflanzen unter Langtagbedingungen bei einer Temperatur von 20 °C unter ausreichender Bewässerung im Klimaraum.

Material:

Pisum sativum var. Lisa

Vermiculit (Härte 4, Firma Klein Dämmstoffe, Zellertal)

2.7.1.2 Isolierung von Totalpigmentextrakt aus *Pisum sativum*

Nach 13 Tagen Anzucht wurden die oberen Erbsenblätter ohne Stiel geerntet und mit einer Schere zerkleinert. Die erhaltene Blattmasse (1 kg) wurde mit 1,5 l gekühltem Aufschlusspuffer im Mixer (Waring Blender) weiter zerkleinert, durch drei Lagen Baumwollgaze filtriert und in 500 ml Zentrifugenbecher aufgeteilt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 10000 Umdrehungen pro min (Upm) in einer Beckmann Kühlzentrifuge (Rotor JLA-10500) wurde der Überstand verworfen und das erhaltene grüne Pellet in insgesamt 500 ml Aceton resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4 °C, 10000 Upm) wurde der acetonische Überstand, der den Totalpigmentextrakt enthält, gesammelt, in einen Scheidetrichter überführt und mit frisch destilliertem peroxidfreiem Diethylether (150 ml) überschichtet. Die so behandelten Pigmente wurden mehrmals vorsichtig ausgeschüttelt und mit Wasser gewaschen. Hierbei gingen die Pigmente in die Etherphase über. Nach Phasentrennung wurde jeweils die annähernd farblose wässrige Phase verworfen. Außerdem wurde durch Zugabe von 5 mol/l NaCl (10-20 ml) die Polarität der wässrigen Phase erhöht, um eine bessere Trennung zu erreichen. Die Etherphase wurde letztendlich zur Abtrennung des Restwassers in einer Schliffflasche über Nacht bei -20 °C eingefroren und die Wasserkristalle am darauffolgenden Morgen in einem vorgekühlten Glasfilterhalter mit Filterpapier abgetrennt. Die Pigmente in Ether wurden im Rotationsverdampfer eingetrocknet, mit Stickstoff überschichtet und bei -20 °C gelagert. Zudem wurde ein Aliquot zur Bestimmung des Chlorophyllgehalts in Aceton gelöst (Kap. I, 2.7.1.3) und mittels HPLC die Pigmentzusammensetzung geprüft (Kap. I, 2.7.1.4).

Material:

Pisum sativum Blattmaterial

Aufschlusspuffer:

1 mol/l Tris (pH 7,8)

1 mmol/l DTT

330 mmol/l Sorbitol

100 % Aceton

Aqua dest.

Diethylether (destilliert)

5 mol/l NaCl

Stickstoff 5.0

2.7.1.3 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes nach Porra *et al.* (1989)

Die Bestimmung der Chlorophyllkonzentration erfolgte nach Porra *et al.* (1989) in 80 % Aceton bei den Wellenlängen 750 nm, 663,6 nm und 646,6 nm. Nach Abzug des Korrekturwertes bei 750 nm wurden die Chl *a*- und Chl *b*- Konzentrationen wie folgt berechnet:

$$\text{Chl } a = 12,25 \times A_{663,6} - 2,55 \times A_{646,6} = [\mu\text{g/ml}] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{Chl } b = 20,31 \times A_{646,6} - 4,91 \times A_{663,6} = [\mu\text{g/ml}] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.7.1.4 Überprüfung der Pigmentzusammensetzung mittels analytischer HPLC

Die „reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)“ diente in diesem Ansatz der Auftrennung eines Pigmentgemisches zur Charakterisierung des Totalextrakts und zur Überprüfung der Pigmentstöchiometrie verschiedener LHCII-Klone nach Butanolextraktion (Kap. I, 2.7.1.5). Hierbei werden die einzelnen Pigmente nach Hydrophobizität in einem Acetongradienten getrennt und bei Elution die Absorptionsintensitäten bei einer Wellenlänge von 440 nm gemessen. Die entsprechenden Pigmentkonzentrationen der Probe können durch Integration der ermittelten „peak“-Flächen errechnet werden. Hierzu wurde die HPLC durch zwei Leerläufe mit 80 % Aceton äquilibriert und die Probenschleife vor Probenauftrag dreimal mit 100 % Aceton gespült. Die zu untersuchende Probe wurde in geringer Konzentration in 80 % Aceton gelöst und luftblasenfrei auf die Säule aufgetragen (20 µl).

Material:

100 % Aceton (filtriert und entgast)

Wasser reinst (entgast und mit 0,2 mM Hepes oder Tris/HCl pH 7,0 gepuffert)

Pigmentextrakte in 80 % Aceton

Programm: „ChromolithA“, Dauer: 6,5 min

Tab. 1.2.15: Programmierter Gradient (Fluss: 1 ml/min). (A) ist Aceton, (B) ist Wasser reinst (entgast und mit 0,2 mM HEPES oder Tris/HCl pH 7,0 gepuffert).

A [%]	B [%]	t [min]	Δt [min]
70	30	0	0
100	0	3	3
100	0	3,5	0,5
70	30	4	0,5
70	30	6,5	2,5

2.7.1.5 Butanol-Extraktion nach Martinson & Plumley (1995)

Um Pigmentstöchiometrien gefalteter Pigment-Protein-Komplexe zu bestimmen, wurden 50 µl LHCII-Lösung mit 33 µl sec-Butanol und 16,5 µl NaCl versetzt, durch Vortexen gemischt, für 2 min bei 4 °C (12000 Upm, Hettich Tischzentrifuge) zentrifugiert und die grüne Butanolphase in ein abgewogenes Reaktionsgefäß pipettiert. Die Überreste wurden auf gleiche Weise nachextrahiert, die Butanolphasen vereinigt und das Butanolvolumen berechnet. Hierfür wurde die Butanolphase gewogen und durch die Dichte des Butanols (0,81 g/ml) dividiert. Letztlich wurde der Butanolextrakt mit einem zweifachen Volumen an gepuffertem 70 % Aceton gemischt und mit Hilfe der analytische HPLC (Kap. I, 2.7.1.4) untersucht. Hierbei gilt zu beachten, dass ein Gemisch aus 1 ml sec-Butanol und 2 ml 70 % Aceton ein Endvolumen von 2,9 ml besitzt. Daher muss das berechnete Gesamtvolumen aus der quantitativen Pigmentextraktion demnach noch mit dem Umrechnungsfaktor 0,967 (2,9/3) multipliziert werden.

Material:

100 % sec-Butanol
5 mol/l NaCl
70 % gepuffertes Aceton

2.7.1.6 Aliquotieren und Aufbewahrung der Pigmente

Nach Analyse der Pigmentzusammensetzung mittels HPLC und Bestimmung der Chlorophyllkonzentration wurde isolierter Totalpigmentextrakt in 100 % Aceton gelöst, aliquotiert, unter Stickstoff getrocknet und bei -20 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Material:

Totalextrakt
100 % Aceton
Stickstoff 5.0

2.7.2 Überexpression und Isolierung von LHCP aus *E. coli* als „inclusion bodies“

Das Apoprotein (LHCP) diverser LHCII-Mutanten wurde in Bakterien des *E. coli* – Stammes JM101 überexprimiert und als „inclusion bodies“ (IBs) im Cytoplasma der Bakterien angehäuft. Wie zuvor beschrieben, enthalten die verwendeten Transformanten das Expressionsplasmid pDS12-RBSII mit genetisch verändertem *Lhcb1*-Gen, welches unter Kontrolle des Lac-Operators steht und dessen Transkription durch den Induktor IPTG (Isopropylthiogalaktosid) aktiviert wird.

Zur Herstellung größerer Mengen von IBs der jeweiligen Mutanten wurde auf das Anziehen einer Vorkultur (Docker, 2005) verzichtet. Stattdessen wurde eine vereinzelte Kolonie von einer Agarplatte gepickt, direkt in 1000 ml Amp-haltige LB-Flüssigkultur gegeben und über Nacht (12-14 h) bei 37 °C im Schüttler bei 180 Upm inkubiert. Nach deutlicher Eintrübung des Mediums wurde Isopropyl- β -thiogalaktosid (IPTG, zu 1 mmol/l) hinzugefügt um die Produktion des LHCP induzieren. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 37 °C im Schüttler bei 180 Upm wurde der Kulturansatz für 5 min bei 8000 Upm und 4 °C (Beckmann, Rotor JLA-10500) abzentrifugiert und das erhaltene Pellet in 30 ml Lysis-Puffer resuspendiert.

Das Aufbrechen der Bakterienzellen erfolgte in zwei Durchgängen in der „french press“. Das erhaltene Lysat wurde bei 4 °C und 8000 Upm für 5 min zentrifugiert (Beckmann, Rotor JA 20) und das Pellet in 20 ml Detergentien-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4 °C, 8000 Upm) wurde das annähernd weiße Pellet in 20 ml Triton-Puffer resuspendiert und über Nacht im Kühlraum gedreht. Am nächsten Morgen wurde dieser Arbeitsschritt wiederholt und nach erneuter Zentrifugation das Pellet in 20 ml Tris-Puffer resuspendiert. Nach einer letzten Zentrifugation wurde das Proteinpellet in 5 ml Tris-Puffer resuspendiert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration am Mikrotiterplatten-Photometer (Kap. I, 2.7.3) bei –20 °C aufbewahrt.

Material:

LB-Amp-Festmedium:	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl (pH 7,5) 1,5 % Agar 100 μ g/ml Amp
LB-Flüssigmedium:	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1 % NaCl (pH 7,5) 100 μ g/ml Amp
IPTG (1 mol/l)	

Lysis-Puffer:	0,8 mg/ml DTT 4 µg/ml DNaseI
Detergentien-Puffer:	200 mmol/l NaCl 1 % Desoxycholsäure (w/v) 1 % Nonidet P40 (w/v) 20 mmol/l Tris/HCl (pH 7,5) 2 mmol/l EDTA 10 mmol/l β-Me
Triton-Puffer:	0,5 % Triton X-100 (TX) (w/v) 1 mmol/l Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 20 mmol/l Tris/HCl (pH 7,5)
Tris-Puffer:	50 mmol/l Tris/HCl (pH 8,0) 1 mmol/l EDTA

2.7.3 Photometrische Quantifizierung der Proteinkonzentration

Die Eigenschaft aromatischer Aminosäuren UV-Licht der Wellenlänge von 280 nm zu absorbieren, kann man sich zur Proteinquantifizierung zunutze machen. Da für den LHCP bereits eine Eichgerade zur Quantifizierung besteht (Hobe, 1995), muss nur die Absorption der Proteinlösung bei 280 nm bestimmt werden. Hierzu wurden aus der Proteinsuspension dreimal 10 µl entnommen und jeweils in 990 µl A₂₈₀-Puffer für 2 min gekocht und nach Abkühlung die Absorption bei 280 nm gemessen. Als Referenz dienten 10 µl des entsprechenden Protein-Puffers, welcher vor Messung ebenfalls in 990 µl A₂₈₀-Puffer für 2 min gekocht wurde.

Für die Messung des LHCP in A₂₈₀-Puffer gilt:

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

Material:

A ₂₈₀ -Puffer:	10 mmol/l Tris (pH 6,8) 2 % Natriumdodecylsulfat (SDS) 1 mmol/l β-Me
---------------------------	--

2.7.4 Markierung von LHCP

2.7.4.1 Markierung von LHCP mit SH-reaktiven Spinmarkern

LHCII ist als diamagnetisches Makromolekül ohne ungepaartes Elektron nicht für EPR-Messungen zugänglich. Eine Möglichkeit, ungepaarte Elektronen in Proteine einzufüh-

ren, ist die kovalente Bindung von SH-reaktiven Nitroxid-Spinmarkern, wie dem in dieser Arbeit verwendeten PROXYL-IA (Abb. 1.2.3) bzw. dem früher verwendeten TEMPO-IA (Abb. 1.2.2; Bender, 2004; Dockter, 2005), an die Sulfhydryl-Gruppe des Cys.

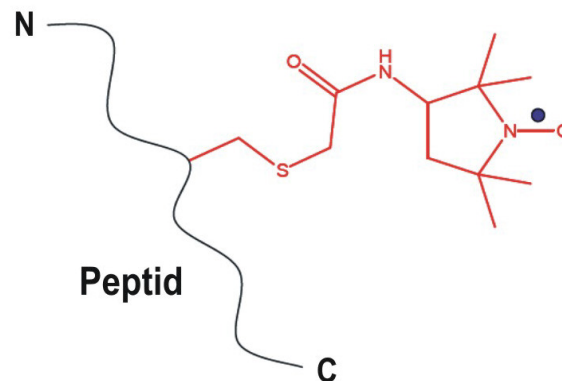


Abb. 1.2.9: Bindung von PROXYL-IA (rot) an die Sulfhydryl-Gruppe eines Cys eines Peptids (schwarz). Das ungepaarte Elektron des Nitroxidmarkers ist als blauer Punkt dargestellt. Abbildung verändert nach Volkov (2008).

Bei dieser S_N2 - Reaktion bindet der Spinmarker über die Acetamidgruppe unter der Abspaltung von Iodwasserstoff an die Sulfhydryl-Gruppe des Cys unter Ausbildung eines Thioethers (Abb. 1.2.9). Die Reaktion mit Thiolen ist sehr spezifisch, andere Aminosäuren sind nicht betroffen. Ein Nachteil ist, dass Standard-Reduktionsmittel wie DTT oder β -Me, die vor Markierung eingesetzt werden müssen, um Disulfidbrücken zwischen zwei Cys aufzubrechen, ebenfalls Sulfhydryl-Gruppen enthalten. Da diese Reduktionsmittel außerdem in mehrfach molarem Überschuss zu dem Spinmarker eingesetzt werden, besteht hier die Gefahr, dass statt Protein das Reduktionsmittel markiert wird und so die Proteinmarkierungseffizienz sinkt. Um diese „Nebenreaktion“ zu vermeiden, wurde zur Proteinmarkierung das Thiol-freie Reduktionsmittel TCP eingesetzt (Dockter, 2005). Dazu wurden zunächst 1 mg Apoprotein in 0,5 % LDS gelöst, mit 20 mmol/l Natriumphosphat-Puffer versetzt und mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt. Nach 2 minütigem Kochen bei 100 °C im Wasserbad wurde der Ansatz bei Raumtemperatur abgekühlt und mit dem Reduktionsmittel TCP (2 mmol/l Endkonzentration) reduziert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C auf dem Drehrad wurde die Lösung mit einem 20fach molaren Überschuss der Spinmarker (gelöst in DMSO) versetzt und über Nacht bei 37 °C im Drehrad inkubiert. Überschüssiger Spinmarker wurde am darauf folgenden Tag durch Proteinfällung (Kap. I, 2.7.4.3 und 2.7.4.4) und darauf folgenden Waschrufen entfernt. Die zur Bestimmung der Markierungseffizienz eingesetzten Spinmarker-Überschüsse sind im Ergebnisteil beschrieben.

Material:

LHCP

10 % LDS

100 mmol/l Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,0)

100 mmol/l TCP-Stammlösung in DMF

10 mg/ml PROXYL-IA bzw. TEMPO-IA in DMSO

2.7.4.2 Markierung von LHCP mit SH-reaktiven Fluoreszenzmarkern

Die Markierung von LHCP mit dem Fluoreszenzfarbstoffen BODIPY-IA bzw. DY731-Mal wurde analog zum Protokoll der Spinmarkierung (Kap. I, 2.7.4.1) durchgeführt. Diese Markierungen erfolgten in Zusammenhang mit Experimenten zur Bestimmung der Markierungseffizienz verschiedener Spinmarker (BODIPY-IA, Kap. I), zur Herstellung von heterogenen Trimeren (DY731-Mal, Kap. II) und zur Messung der LHCII-Faltungskinetik (DY731-Mal, Kap. III).

Material:

LHCP

10 % LDS

100 mmol/l Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,0)

100 mmol/l TCP-Stammlösung in DMF

10 mmol/l BODIPY-IA bzw. DY731-Maleimide in DMSO

2.7.4.3 Fällung von Protein mit Aceton und Essigsäure

Im Anschluss an durchgeführte Markierungsreaktionen mit Spinmarkern oder Fluoreszenzmarkern wurde das Protein durch Zugabe von 1/10 Endvolumen an 100 mmol/l Essigsäure und dem 2,3fachen Volumen an 100 % Aceton ausgefällt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis konnte das ausgefallene Protein bei 4 °C und 14000 Upm abzentrifugiert werden (Hettich Kühlzentrifuge). Das pelletierte Protein wurde anschließend mindestens viermal mit eiskaltem Ethanol (70 %) und einmal mit 100 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknen bei Raumtemperatur (max. 5 min) wurde das jeweils deutlich gefärbte Protein in 2x Solubilisierungspuffer gelöst und quantifiziert (Kap. I, 2.7.3). Die Lagerung des markierten Proteins erfolgte bei -20 °C im Dunkeln.

Material:

LHCP

100 mmol/l Essigsäure

100 % Aceton p.A.

100 % Ethanol p.A.

70 % Ethanol

2x Solubilisierungspuffer:	200 mmol/l Tris /HCl (pH 9,0)
	10 mmol/l ϵ -Aminocaprinsäure
	2 mmol/l Benzamidin
	25 % (w/v) Saccharose
	4 % LDS

2.7.4.4 Fällung von PROXYL-markiertem Protein mit Trichloressigsäure

Alternativ zu der vorher beschriebenen Fällung des LHCP mit Aceton und Essigsäure (Kap. I, 2.7.4.3), kann PROXYL-markiertes Protein auch mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt werden. Dies bietet den Vorteil, dass sich spinmarkiertes Protein nach Fällung und Waschen besser löst bzw. auch in hohen Proteinkonzentrationen löslich ist. Hierzu wurde der Markierungslösung bei Raumtemperatur 1/3 Endvolumen 15 % TCA (Endkonzentration 5 %) hinzugefügt und nach 10 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur für 5 min bei 12000 x g (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort entfernt und das Protein-Pellet in eiskaltem Aqua dest. (1 ml auf 1 mg Protein) resuspendiert. Der Fällungsschritt ist als kritisch anzusehen, da die Säure auf Dauer den Nitroxidmarker PROXYL zum Hydroxylamin reduziert. Das resuspendierte Pellet wird erneut zentrifugiert und gewaschen (je 0,2 ml Aqua dest. auf 1 mg Protein), insgesamt fünfmal. Letztendlich wird das pelletierte Protein im gewünschten Puffer gelöst. Die hier beschriebene Methode wurde vorwiegend in Experimenten zur Faltungskinetik des LHCII eingesetzt und ist nicht zur Fällung des TEMPO-markierten Lhcb1 geeignet (sofortige Reduzierung zum Hydroxylamin; Kroll, 1999).

Material:

LHCP

15 % TCA

Aqua dest.

2.7.5 Detergenzwechsel-Rekonstitution

Als Besonderheit lässt sich das Membranprotein LHCII *in vitro* aus Apoprotein, Pigment und Lipid bzw. Detergenz zu funktionalen Pigment-Protein-Komplexen rekonstituieren. Die dabei gebildeten Komplexe sind mit ihren nativen Vorbildern praktisch identisch (Paulsen *et al.*, 1990; Paulsen *et al.*, 1993; Rühle & Paulsen 2004). Vorteil von rekonstituierbaren Proteinen ist die Möglichkeit durch punktspezifische Mutagenese die Peptidsequenz nach Wunsch ändern zu können und beispielsweise eingeführte Cys kovalent mit Spinmarkern zu markieren. Das spinmarkierte Apoprotein kann dann in die native Konformation rückgefaltet werden und ist für die EPR-Spektroskopie zugänglich.

Bei der Detergenzwechsel-Rekonstitution wird LHCP-Apoprotein zunächst in 2 % LDS gelöst, um es dann mit Totalpigmentextrakt (in Ethanol) zu mischen. Daraufhin wird Octyl- β -D-glucopyranosid (OG) als nicht-ionisches Detergenz hinzugegeben und

Dodecylsulfat als Kaliumsalz ausgefällt. Durch Entzug des ionischen Detergenz Dodecylsulfat werden die hydrophoben Domänen des Apoproteins „gezwungen“ in eine neue Umgebung, in diesem Fall die OG-Mizellen, zu wechseln. Es wird angenommen, dass bei diesem Prozess, initiiert und kontrolliert durch Bindung der Pigmente, die Faltung des Proteins stattfindet.

Je nach Versuchsansatz wurde hierfür entweder markiertes (in 2xSolubilisierungspuffer) oder unmarkiertes Apoprotein (in Tris-Puffer) eingesetzt. Im Folgenden soll eine Rekonstitution mit 120 µg unmarkiertem LHCP beschrieben werden. Es gilt zu beachten, dass die verwendeten Pigmente zügig und stets auf Eis und im Dunkeln verarbeitet werden. Hierzu wurden 120 µg LHCP in 150 µl 2 x Solubilisierungspuffer und 150 µl Aqua dest. gelöst und 2 min im Wasserbad bei 100 °C gekocht. Nach Abkühlung der Probe bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 4,3 µl frisch angesetztem β-Me (1 mol/l) und die Zugabe des Pigments. Der hierfür verwendete Totalpigmentextrakt (3fach molarer Chl-Überschuss über Protein) wurde zuvor in 1/10 Volumen (w/v) eiskaltem Ethanol (p.A.) gelöst (Ultraschallbad) und unter kräftigem Mischen der Proteinlösung hinzugefügt. Nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde dem Gemisch 43 µl 10 % OG hinzugefügt, erneut gut gemischt und wieder 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 43 µl 2 mol/l KCl wurde erneut ordentlich gemischt, 10 min auf Eis inkubiert, um schließlich das ausgefallene Kaliumdodecylsulfat (KDS) durch Zentrifugation (2x) zu pelletieren (4 °C, 12000 Upm, 5 min). Der Überstand mit den rekonstituierten Komplexen wurde abgehoben und direkt weiterverarbeitet. Die (kurzzeitige) Aufbewahrung des rekonstituierten Proteins erfolgte auf Eis im Dunkeln.

Material:

2xSolubilisierungspuffer:	200 mmol/l Tris/HCl (pH 9,0)
	10 mmol/l ε-Aminocaprinsäure
	2 mmol/l Benzamidin
	25 % (w/v) Saccharose
	4 % LDS

β-Me (1 mol/l)

Ethanol (p.A.)

Totalpigmentextrakt

10 % OG

2 mol/l KCl

2.7.6 Immobilisierung und Trimerisierung des rekombinanten LHCI1 mittels des „His₆ tag“/Ni²⁺-IDA-Sepharose®-Systems

Der Hexahistidyl-Marker („His₆ tag“) ist ein gebräuchliches Aminosäuresequenz-Motiv in Proteinen, welches sich zur Durchführung der Affinitätschromatographie eignet und molekularbiologisch an den N- oder C-Terminus von rekombinanten Proteinen inseriert

wird. Die Sequenz des „His₆ tag“ ist mit sechs Aminosäuren recht kurz und bei pH 8,0 ungeladen, so dass die Proteinfaltung bzw. die Konformation des Proteins in der Regel nicht beeinflusst werden. Ein Protein mit „His₆ tag“ kann über die Histidine an Ni²⁺ komplex gebunden werden, welches wiederum, wie in Kap. II genauer beschrieben, an verschiedene Formen der Sepharose komplex gebunden werden kann. Ein Beispiel hierfür ist die in Abb. 1.2.10 dargestellte Ni²⁺-IDA-Sepharose® der Firma GE Healthcare (Schweden). Hier werden Nickel-Ionen über drei der sechs Koordinationsstellen mit Iminodiessigsäure (Iminodiacetic acid, IDA) komplexiert, es verbleiben also drei Koordinationsstellen zur Bindung des „His₆ tag“.

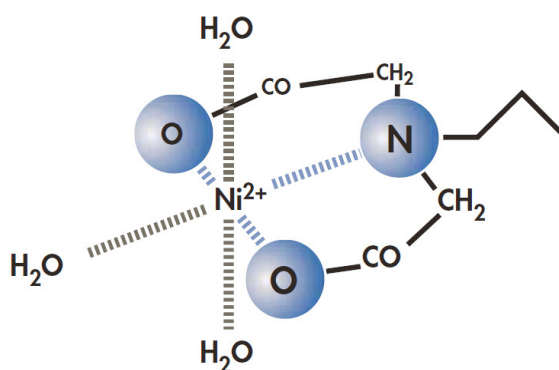


Abb. 1.2.10: Darstellung der Ni²⁺-IDA-Interaktion der IDA-Sepharose und freie Koordinationsstellen zur Bindung des „His₆ tag“ (nach Qiagen, Hilden 2003).

Wie schon 1998 durch Rogl *et al.* gezeigt wurde, ist es möglich denaturierten LHCP an der Ni²⁺-Säule (Ni-Säule) zu immobilisieren und rückzufalten. Auch die Bindung bereits rekonstituierter LHCII-Komplexe wurde erfolgreich bewiesen und ist beispielsweise in Rühle & Paulsen (2004) beschrieben. Hierbei kommt es zudem jeweils zur Trimerisierung der Komplexe, die im Anschluss durch Zugabe eines Überschusses an Imidazol, welches mit dem gebundenen Protein um die Koordinationsstellen konkurriert, eluiert werden können.

Zur Trimerisierung von rekonstituiertem LHCII wurden zunächst Chromatographiesäulen von Hand vorbereitet. Hierzu wurde pro 1 mg Protein max. 1 ml Sepharose [Endvolumen, ohne Ethanol; von nun an als ein Säulenvolumen (SV) bezeichnet] in den Säulen sedimentiert und mit zwei SV 0,3 mol/l NiCl₂-Lösung beladen. Überschüssiges Nickel wurde mittels drei SV 50 mmol/l Tris/HCl-Puffer entfernt, einhergehend mit einem charakteristischen Farbumschlag der Sepharose von grün zu blau. Die Nickel-beladene Sepharose wurde daraufhin mit zwei SV kaltem (4 °C) OG-Puffer äquilibriert und mit rekonstituierten LHCII-Komplexen beladen. Nach Durchlaufen der Protein-haltigen Lösung und einer Inkubationszeit von max. 30 min (hierbei wurde daraufgeachtet, dass die Säule nicht trocken lief), wurde die dunkelgrün gefärbte Säule mit drei SV OG-Puffer und zwei SV TX-Puffer gewaschen. Zu Ende dieser

Waschschritte war der Durchfluss in der Regel klar und die Säule im oberen Bereich tief grün gefärbt. Die Elution der Komplexe erfolgte durch Zugabe mehrerer Volumina des Imidazol-haltigen Eluat-Puffers. Grünliche Fraktionen des Eluats wurden aufgefangen und weiterverwendet. Die Regenerierung der Sepharose erfolgte durch Waschen mit 2 ml SDS/Imidazol und 2 ml EDTA. Zusätzlich wurde die Sepharose mit ausreichend entgastem Aqua reinst gespült und schließlich in 20 % Ethanol kühl (4 °C) gelagert. Mit dem „His₆ tag“/Ni²⁺-IDA-Sepharose-System kompatible Reagenzien sind mit einsetzbaren Höchstkonzentrationen in Tab. 1.2.16 aufgelistet (GE-Heathcare, Schweden).

Tab. 1.2.16: Auszug der mit dem „His₆ tag“/Ni²⁺-IDA-Sepharose-System kompatiblen Reagenzien und der einsetzbaren Höchstkonzentrationen (GE-Heathcare, Schweden).

Reagenz	Konzentration
Reduktionsmittel	
DTT	5 mmol/l
β-Me	20 mmol/l
TCP	5 mmol/l
Detergentien	
Nicht-ionische Detergentien (TX, Tween 20)	2 %
Cholat (anionisch)	2 %
CHAPS (zwitterionisch)	1 %
Andere	
EDTA	1 mmol/l
Ethanol	20 %
Glycerol	50 %
Imidazol	500 mmol/l
Harnstoff	8 mol/l
GndHCl	6 mol/l
Tris, HEPES, MOPS (pH 7,4)	100 mmol/l

Material:

Sepharose

Chelating Sepharose Fast Flow,
GE Healthcare, Schweden

Aqua reinst

0,3 mol/l NiCl₂

50 mmol/l Tris/HCl (pH 7,5)

2 % SDS/0,4 mol/l Imidazol

0,1 mol/l EDTA

20 % Ethanol

OG-Puffer:	1 % OG (w/v) 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 9,0) 12,5 % Saccharose
TX-Puffer:	0,05 % TX (v/v) 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 7,5) 0,1 mg/ml PG
Eluat-Puffer mit Imidazol:	0,05 % TX (v/v) 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 7,5) 0,1 mg/ml PG 0,3 mol/l Imidazol

2.7.7 Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Um rekombinante Lichtsammelkomplexe nach Detergenzwechsel-Rekonstitution oder Trimerisierung von ungefaltetem Protein und freiem Pigment zu trennen, wurden die Protein-Pigment-Komplexe mit Hilfe der Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation (UZ) aufgereinigt. Zur Herstellung der Saccharose-Dichtegradienten wurde eine Gradientenlösung gemischt, in Gradientenröhrchen gefüllt und bei -20 °C eingefroren. Durch langsames Auftauen bei 4 °C entsteht im Röhrchen ein linearer Saccharose-Gradient mit der höchsten Saccharosekonzentration am Röhrchenboden. Von solchen aufgetauten Gradienten wurde die oberste Schicht entfernt und vorsichtig das zu trennende Gemisch aufgetragen. Die beladenen Röhrchen wurden genau austariert und bei 4 °C für 16 Stunden bei 37000 (SW 40/41Ti) bzw. 54000 Upm (SW 60Ti) unter Vakuum zentrifugiert. Am folgenden Tag konnten die getrennten Komplexe mittels einer Spritze aus den Gradienten gesaugt und analysiert werden.

Material:

Gradientenlösung:	0,3 mol/l (SW 40/41Ti) bzw. 0,6 mol/l (SW 60Ti) Saccharose 5 mmol/l Tricine (pH 7,8) 0,1 % n-Dodecyl- β -D-Maltosid (LM) bzw. 0,05 % TX
-------------------	---

2.7.8 Aufkonzentrierung von LHCII

Um EPR-Spektren mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis messen zu können, ist es notwendig LHCII-Proben auf Konzentrationen von 300 μ mol/l LHCII aufzukonzentrieren. Durch die Abnahme des Rauschens werden sowohl die Unsicherheiten der Tikhonov-Regularisierung verringert, als auch die Messzeiten am EPR-Spektrometer verkürzt.

Deshalb wurden spinmarkierte LHCII-Proben nach UZ-Aufreinigung (Kap. I, 2.7.7) in „Amicon Ultra MW 30“ Zentrifugalfiltereinheiten aufkonzentriert. Diese Filtereinheiten enthalten eine Polycarbonatmembran, welche Proteine bis zu einer Größe von 30 kDa passieren lässt. Rekombinanter LHCII in Detergenzmizellen hat eine Masse von über 50 kDa und kann daher, im Gegensatz zum Lösungsmittel, die Membran nicht passieren. Zur Aufkonzentrierung wurden bis zu 4 ml der rekonstituierten LHCII-Monomere nach UZ in einem „Amicon Ultra MW 30“-Röhrchen bei 4 °C und 5000 Upm zentrifugiert (Hettich Kühlzentrifuge). Die Zentrifugation wurde alle 15 min unterbrochen, abzentrifugierte klare Pufferlösung entfernt und die aufkonzentrierte tiefgrüne LHCII-Lösung durch Vortexen von der Membran gelöst. Bei einem Endvolumen von 50 µl wurde der Vorgang abgebrochen und ein Aliquot der aufkonzentrierten LHCII-Probe gemäß Butler & Kühlbrandt (1988) im Mikrotiterplatten-Photometer quantifiziert (Kap. I, 2.7.9).

Material:

Amicon Ultra MW-30

Millipore, Cork Irland

2.7.9 Konzentrationsbestimmung von LHCII nach Butler & Kühlbrandt (1988)

Die Konzentration von LHCII-Monomeren und -Trimeren kann mittels eines von Butler & Kühlbrandt (1988) bestimmten molaren Extinktionskoeffizienten photometrisch bei einer Wellenlänge von 670 nm ermittelt werden. Dazu wurden drei Aliquots (5 µl) aufkonzentrierter LHCII-Proben mit 495 µl Saccharose-Gradientenlösung (Kap. I, 2.7.7) verdünnt und photometrisch quantifiziert.

Hierfür gilt:

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

Nach dem Gesetz von *Lambert-Beer* folgt daraus für eine 1 cm Küvette (Lottspeich, 1998):

$$c_{\text{LHCII}} = E_{\text{LHCII}} / \epsilon_{\text{LHCII}} [\text{mol/l}] \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

(E = gemessene Absorption; ε = molarer Extinktionskoeffizient; c = Konzentration in mol/l)

2.8 Analytische Methoden

Die in diesem Abschnitt beschriebenen analytischen Methoden dienen zum einen der Qualitätskontrolle des rekombinanten LHCII (Kap. I-III) und des nativen LHCII (Kap. IV), sowie der Analyse der Struktur des rekombinanten LHCII mittels EPR-Spektroskopie (Kap. I-III).

2.8.1 Gelelektrophorese

2.8.1.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteingemischen. Die Proteine werden hierbei allein anhand ihrer Größe aufgetrennt. Die Auftrennung wird erreicht, indem man die Proteine in einem elektrischen Feld mit einem Elektrodenpuffer durch eine Gelmatrix wandern lässt. Diese Gelmatrix entsteht durch eine Radikalkettenpolymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid, wobei Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalbildner und N,N,N,N-tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator dienen. Um zu verhindern, dass die Eigenladung der Proteine Einfluss auf deren Wanderungstrecke ausübt, wird ein ionisches Detergenz (SDS) eingesetzt, welches die Eigenladung der Proteine überlagert. Hierbei ist zu beachten, dass eine Proportionalität zwischen der Anzahl geladener SDS-Moleküle und der Proteinmasse besteht (ca. 1,4 g SDS/1 g Protein). Nach der Behandlung mit SDS sind alle Proteine gleichmäßig negativ geladen, so dass eine Auftrennung nach der Proteingröße gewährleistet ist.

Um schärfere Proteinbanden zu erhalten, wird in den meisten Fällen eine diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. Das bedeutet, dass dem Trenn-Gel noch ein Sammel-Gel vorgeschaltet wird, welches gleiche Ausgangsbedingungen für alle in der Probe enthaltenen Proteine schaffen soll. Bei dem Sammel-Gel handelt es sich um ein weitporiges Gel, bei dem die Proteingröße keinen Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit hat. Hier wird ein starker elektrischer Feldgradient aufgebaut, der dafür sorgt, dass auf alle Proteine die gleiche beschleunigende Kraft ausgeübt wird. Das Ergebnis ist ein „Zusammenschieben“ der Proben, so dass alle Proteine vom gleichen Startpunkt aus getrennt werden können.

Herstellung der PA-Gele

In der vorliegenden Arbeit wurden 0,75 mm dicke Gele mit 4,5%igem Sammel-Gel und 10%igen oder 15%igen Trenn-Gelen verwendet. Nach Aufbau einer Gießkammer, die 10 Gele gleichzeitig fasst, wurden die Lösungen für Sammel- und Trenn-Gel gemischt (Tab. 1.2.17) und, um Luftblasen im Gel zu vermeiden, mittels Wasserstrahlpumpe entgast. Nach Zugabe von APS und TEMED in die Trenn-Gel-Lösung wurde die Gießkammer rasch zu etwa $\frac{3}{4}$ der Gesamthöhe befüllt. Damit sich beim Polymerisieren des Trenn-Gels ein gerader Rand bildet, wurde jedes Gel mit 400 μ l Wasser überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Wasser mit Filterpapier gründlich entfernt, die Sammel-Gel-Lösung ebenfalls mit APS und TEMED versetzt und rasch auf das Trenn-Gel gegossen. Außerdem wurde in jedes Gel ein Kamm gesteckt, damit sich beim Polymerisieren entsprechende Probenaschen bilden. Nach einer Polymerisationsdauer von ca. einer Stunde wurden die Kämmen entfernt und die fertigen Gele in angefeuchteter

Cellophanfolie bei 4 °C gelagert. Unter diesen Bedingungen betrug die Haltbarkeit ca. 2 Wochen.

Tab. 1.2.17: Zusammensetzung der Acrylamidlösungen zur Herstellung von 10 Gelen.

Stammlösungen	Trenn-Gel 10 %	Trenn-Gel 15 %	Sammel-Gel 4,5 %
30 % Acrylamid/ 1 % Bisacrylamid	18 ml	27,4 ml	6 ml
1 M Tris/HCl (pH 8,8)	22,6 ml	22,6 ml	-----
1 M Tris/HCl (pH 6,8)	-----	-----	5,2 ml
80 % Glycerin	3,4 ml	3,4 ml	5 ml
Aqua dest.	11,2 ml	1,8 ml	23,4 ml
APS 10 %	400 µl	400 µl	200 µl
TEMED	26 µl	26 µl	20 µl

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben mit ¼ Volumen Sparmix versetzt und 2 min bei 100 °C gekocht. Danach wurden Proben mit Proteinmengen von 2 bis 3 µg in die Geltaschen geladen. Um später die genauen Molekularmassen der aufgetrennten Proteine bestimmen zu können, wurde zudem eine Tasche mit 3 µl SDS7-Laufmarker (Kap. I, 2.3.2) beladen. Zum Sammeln des Proteins wurde die Elektrophorese mit einer Spannung von 70 Volt gestartet, diese wurde dann, sobald die Probe das Trenngel erreicht hatte, auf 150 bis 200 Volt erhöht. Als Laufpuffer wurde SDS-Puffer verwendet.

Material:

Midget-Gelkammersystem

Glas- und Aluminiumoxidplatten

Spacer, Kämme

SDS-Laufpuffer:

25 mmol/l Tris

192 mmol/l Glycin

0,1 % (v/v) SDS;

0,5 mmol/l EDTA

Sparmix (4x):

4 % SDS

1,4 mol/l β-Me

24 % Glycerin

100 mmol/l Tris (pH 7,0)

20 mmol/l Bromphenolblau

2.8.1.2 Schwach-denaturierende Gelelektrophorese („grüne Gele“) nach Peter & Thornber (1991)

Unter schonenden Bedingungen eignet sich die Gelelektrophorese zur Isolierung und Auftrennung von intakten Protein-Pigment-Komplexen. Im Unterschied zur denaturie-

renden SDS-PAGE enthielten die „grünen Gele“ nur 10 % Polyacrylamid, zudem wurde die Spannung reduziert, die Laufkammer gekühlt. Auf ein Aufkochen der Proben mit denaturierendem Sparmix wurde verzichtet. Die Elektrophorese wurde entweder mit LDS-Laufpuffer oder mit Deriphat-Puffer durchgeführt, wie in einzelnen Experimenten angegeben.

Zur Durchführung wurde zu den rekonstituierten Komplexen ohne weitere Vorbehandlung etwa 1/5 Volumen an 80%igem Glycerin zur Erhöhung der Dichte zugegeben. Zur Schonung der Komplexe wurde die Elektrophoresekammer abgedunkelt, auf 4 °C gekühlt und eine Spannung von 40 V angelegt, bis die Proben vollständig in das Sammel-Gel eingelaufen waren. Bei Erreichen des Trenn-Gels wurde die Spannung auf 80 bis 100 V erhöht.

Material:

Glycerin 80 %

Deriphat-Puffer:	0,15 % Deriphat
	48 mmol/l Glycin
	12mmol/l Tris

LDS-Laufpuffer:	25 mmol/l Tris
	192 mmol/l Glycin
	0,1 % LDS
	0,5 mmol/l EDTA

2.8.1.2.1 Umkristallisation von Deriphat nach H. Paulsen

Da Deriphat als Feststoff der Firma Henkel nicht länger zur Verfügung steht, war es notwendig flüssiges „Deriphat 160C“ in der schwach denaturierenden Gelelektrophorese einzusetzen. Da aber sowohl die Konzentration als auch die Natur des Lösungsmittels unbekannt war, war eine Aufreinigung des Deriphat durch Umkristallisation unumgänglich. Hierzu wurde flüssiges „Deriphat 160 C“ eingetrocknet, zunächst durch Abkühlung auf -20 °C mit anschließender Gefriertrocknung. Da dies allerdings zu dauerhaften Schäden an der Vakuumkammer des Lyophilisators führte, wurde in Folgeansätzen zunächst der Großteil des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer im warmen Wasserbad verdampft. Getrocknetes „Deriphat 160C“ wurde daraufhin in 1-Propanol aufgeschlämmt und sehr vorsichtig auf der Heizplatte im Abzug aufgeköcht (Brandgefahr). Durch langsames Abkühlen bis auf -20 °C wurde das Deriphat kristallisiert und der Bodensatz filtriert. Das Filtrat wurde zunächst am Rotationsverdampfer und darauf folgend im Lyophilisator eingetrocknet und bei Raumtemperatur gelagert.

Material:

1-Propanol

2.8.1.3 Coomassie-Brilliant-Blaufärbung

Sowohl denaturierende als auch schwach denaturierende Gele können nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt werden, um einzelne Proteinbanden sichtbar zu machen. Dieser Triphenylmethanfarbstoff, der Komplexe mit Proteinen bildet, bindet unspezifisch an kationische, unpolare und hydrophobe Bereiche der Proteine. Zur Anfärbung der Proteinbanden wurden die Gele 20 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und danach für 20 min im ersten Entfärber, welcher Essigsäure und Ethanol zur Fixierung der Proteine und Entfernung des überschüssigen Farbstoffs enthält, inkubiert. Anschließend wurden die Gele so lange in einem zweiten Entfärber geschwenkt bis die Gele mit Ausnahme der Proteinbanden vollständig entfärbt sind. Nach Abwaschen des Entfärbers mit Aqua dest. wurde das Gel fotografiert und in Einmachfolie auf dem Geltrockner getrocknet.

Material:

Coomassie-Lösung (100 ml):	175 mg Coomassie Brilliant Blue (Serva, Heidelberg) 50 ml Ethanol 7 ml Essigsäure 43 ml Aqua dest.
Entfärber 1:	20 % Ethanol 7 % Essigsäure
Entfärber 2:	10 % Essigsäure

2.8.1.4 Densitometrische Auswertung von PA-Gelen mittels Versa Doc

Die densitometrische Auswertung von PA-Gelen in Lhcb1-Nachmarkierungsversuchen (Kap. I und Kap. II) erfolgte nach Auftrennung der fluoreszenzmarkierten Proteine in einem 15%igen SDS-Gel mittels Versa Doc. Dazu wurde BODIPY durch Licht der Wellenlänge 510 nm für 60 Sekunden belichtet und mit geöffneter Blende (Blende 3,5) die Fluoreszenzemission bei 543 nm fotografiert. DY731 wurde dagegen im UV-Bereich angeregt und die Fluoreszenz-Emission bei 759 nm fotografiert. Im zweiten Schritt wurde die Intensität der Proteinbanden nach Coomassie-Färbung (Kap. I, 2.8.1.3) bestimmt und dann mit der Software „Quantity One“ (BioRad) analysiert.

2.8.2 Spektroskopie

2.8.2.1 Absorptionsspektroskopie

Mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie konnten in der vorliegenden Arbeit die Konzentrationen von Pigmenten und Protein in verschiedenen Arbeitsschritten ermittelt werden. Wie in Kap. I (2.7.1.3) beschrieben, wurde vor Durchführung der Rekonstitution mittels

Absorptionsspektroskopie die Konzentration des Chlorophylls im Totalpigmentextrakt nach Porra *et al.* (1989) geprüft. Auch die Bestimmung der LHCP-Konzentration erfolgte durch Absorptionmessungen. Diese wurden, wie in Kap. I, 2.7.3 beschrieben, durch Messung der Proteinabsorption bei 280 nm ermittelt. Die Proteinkonzentration des gefalteten LHCII nach Rekonstitution wurde dagegen nach Butler & Kühlbrandt (1988) (Kap. I, 2.7.9) durch Messung der Absorption bei 670 nm bestimmt.

2.8.2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht es, die Energieleitung innerhalb einer Anordnung von Chromophoren zu verfolgen. Sowohl in rekonstituiertem als auch in nativem LHCII können so Rückschlüsse gezogen werden, ob die Pigment-Protein-Komplexe korrekt gefaltet und intakt sind. Diese Eigenschaft des LHCII nutzend, wurden Emissionsspektren von rekombinanten LHCII-Monomeren und -Trimeren nach UZ-Aufreinigung aufgenommen (Kap. I-III) sowie von nativen LHCII-Trimeren in Insertionsversuchen (Kap. IV). Hierzu wurde die eingestellte Probe durch blaues Licht der konstanten Wellenlänge 470 nm über den Monochromator angeregt und über einen Emissionsbereich von 600 bis 800 nm vermessen. Sind die Komplexe intakt, übertragen das angeregte Chl *b* und die Carotinoide die Anregungsenergie vollständig auf Chl *a*. Da sich die Komplexe aber nicht wie *in vivo* in der Thylakoidmembran befinden, sondern in Detergenz-Mischmizellen, kann die Anregungsenergie nicht photochemisch genutzt werden und wird als Fluoreszenzlicht von Chl *a* bei einer Wellenlänge von 680 nm emittiert. Ist der Energietransfer dagegen aufgrund unvollständiger Faltung oder Zerstörung der Komplexe gestört, kann Chl *b* die Energie nicht auf Chl *a* übertragen und fluoresziert bei der charakteristischen Wellenlänge von 653 nm. Weiterhin können ungebundene Chl bei unzureichender Aufreinigung oder Zerfall der Komplexe aggregieren. Unter den gewählten Messbedingungen (Raumtemperatur) emittiert ungebundenes Chl *a* bei ca. 675 nm.

Alle Messungen von Fluoreszenz-Emissionsspektren fanden in Lösung in einer 5 mm dicken Küvette bei Raumtemperatur statt. Bei hohen Probenkonzentrationen wurde stets die „front face“-Apparatur eingesetzt.

Messparameter:

Anregung:	470 nm
Detektion:	600–800 nm
Slit:	3/3
Lamp Level:	2
Signal:	S/R
Integrationszeit:	0,1 s

2.8.2.3 Circular-Dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die Circular-Dichroismus (CD) -Spektroskopie ist eine Methode, die unter anderem zur Analyse von Proteinsekundärstrukturen oder zur Untersuchung der Faltung und Entfaltung von Proteinen eingesetzt wird. Sie beruht auf der Eigenschaft von optisch aktiven, chiralen Molekülen, links- und rechtszirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren. Dazu wird in einem Monochromator linear polarisiertes Licht erzeugt, welches dann durch einen photoelastischen Modulator unter dem Einfluss eines hochfrequenten elektrischen Wechselfeldes in links- und rechtszirkular polarisiertes Licht umgewandelt wird. Nach Durchdringen der Probe wird die Intensität der links- bzw. rechtszirkular polarisierten Komponente der austretenden Welle durch einen mit dem Modulator synchron geschalteten Detektor gemessen und die mit rechtsdrehendem Licht gemessene Absorption von der mit linksdrehendem Licht gemessenen Absorption subtrahiert. Im Prinzip stellen CD-Spektren also Differenzspektren dar. Diese gemessene Differenz $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ wird als sogenannte Elliptizität θ angegeben (Lottspeich, 1998). Es gilt:

$$\theta(\lambda) = \text{const.} (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \times c \times d \text{ [degree cm}^2\text{/dmol]}$$

Eine weitere Anwendung der CD-Spektroskopie findet sich in der Untersuchung der Kopplung von chromophoren Gruppen in Biomolekülen durch Messungen im sichtbaren und im nahen Infrarotspektralbereich. Hierbei kann eine enge elektronische Kopplung, wie sie z.B. zwischen den an den LHCII gebundenen Chlorophyllen und Carotinoiden besteht, zu einer Anhebung oder Absenkung von elektronischen Niveaus führen, welche im CD-Spektrum als deutliche positiv/negativ Bandenpaare sichtbar werden. Liegen die Chlorophyllmoleküle hierbei in enger Nachbarschaft zueinander, können sich ihre π -Elektronenwolken gegenseitig beeinflussen und es kann durch Energietransfer entweder zu einer Signalverstärkung oder zu einem Aufspalten der Banden („excitonic split“) kommen. Solch eine Signalverstärkung kann man bei der engen Kopplung zweier LHCII-Moleküle beobachten, das Aufspalten der Banden bei enger Kopplung benachbarter Chlorophyllmoleküle, so dass CD-Spektren im sichtbaren Bereich des Lichtes Aussagen über Chlorophyllbindung und den Abstand der Chlorophylle zueinander im LHCII zulassen.

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben handelte es sich zum einen um aufgereinigte LHCII-Monomere und -Trimere verschiedener Mutanten (Kap. I-III), sowie um native Trimere in Insertionsversuchen (Kap. IV), die auf ihre Intaktheit und ihren Oligomerisierungsgrad geprüft wurden. Hierzu wurden die Proben in Quarzküvetten bei folgenden Parametern CD-spektroskopisch untersucht:

Messparameter:

Wellenlängenbereich:	400-750 nm
Data Pitch:	1 nm
Response:	2 s
Bandwidth:	4 nm
Accumulation:	1
Sensitivity:	Standard
Scanning Speed:	100 nm/min

2.8.2.4 EPR-Spektroskopie

Alle in dieser Arbeit gemessenen EPR-Spektren des rekombinanten LHCII wurden an PROXYL-markierten Proben durchgeführt. Lediglich in der Versuchsreihe zum Vergleich der Markierungseffizienz und chemischen Stabilität verschiedener Spinmarker wurde LHCII mit dem Marker TEMPO spinmarkiert (Kap. I). Die Herstellung einzelner spinmarkierter LHCII-Proben wurde nach unterschiedlichen Protokollen durchgeführt und ist jeweils in Material und Methode oder im Ergebnisteil der einzelnen Kapitel beschrieben.

2.8.2.4.1 continuous wave-EPR (CW-EPR)

Die CW-EPR-Messungen zur Messung der Zugänglichkeit einzelner Proteindomänen („CW progressive power saturation measurements“) wurden von Dr. Aleksei Volkov am Max-Planck-Institut für Polymerforschung (Mainz) durchgeführt. Eine genaue Beschreibung der Methode und der verwendeten Materialien findet sich in Kap. III (3.1.1.1) der vorliegenden Dissertation.

2.8.2.4.2 Puls-EPR

Die Vier-Puls DEER-Messung der heterogenen Trimere aus den Proteinen st106/160h und C3.2h (Kap. II) sowie der Proben der Diplomanden A. Müller (2008) und C. Dietz (2008) wurden von Prof. Dr. Gunnar Jeschke an der Eidgenössischen Hochschule in Zürich (Schweiz) an einem Elexsys EX 580 EPR-Spektrometer mit einem dielektrischen Puls-ENDOR-Resonator EN4118X-MD-4 (Bruker, Rheinstetten) durchgeführt. Der Resonator war auf $Q \sim 100$ überkoppelt.

Alle übrigen Vier-Puls DEER-Messungen wurden von Dr. Aleksei Volkov am Max-Planck-Institut für Polymerforschung (Mainz) an einem Elexsys EX 580 EPR-Spektrometer mit einem Flexline Split-Ring Resonator ER 4118X_MS3 (Bruker, Rheinstetten) durchgeführt. Der Resonator war auf $Q \sim 100$ überkoppelt.

Alle Puls-Messungen wurden bei 50 K durchgeführt, die Kühlung geschah durch den Eisatz flüssigen Heliums (Oxford CF935 Cryostat, Oxford ITC4 Temperatur-Kontrolleinheit). Echodetektierete feldabgetastete EPR-Spektren wurden mit der Hahn-Echo-Pulssequenz $\pi/2-\tau-\pi-\tau$ -echo (Schweiger & Jeschke, 2001) mit 15mT Feld-

Abtastung vermessen. Die Zwischenpuls-Verzögerung τ war 200 ns lang bei einer Pulslänge von 16 ns für den $\pi/2$ -Puls und von 32 ns für den π -Puls. Die Integrationsfensterbreite lag bei 200 ns.

Vier-Puls DEER-Abstandsmessungen wurden bei X-Band-Frequenzen mit einer $\pi/2(\nu_{\text{observer}})-\tau_1-\pi(\nu_{\text{observer}})-t'-\pi(\nu_{\text{pump}})-(\tau_1 + \tau_2 - t')-\pi(\nu_{\text{observer}})-t_2$ -*echo* Pulssequenz mit einem [(+x)-(-x)] Phasenzklus, angelegt an den $\pi/2$ -Puls, durchgeführt. Die Zeit t' wurde in Stufen von 8 ns schrittweise erhöht, die Zeit $\tau_1 = 200$ ns wurde konstant gehalten. τ_2 variierte zwischen 0,8 μs und 2,5 μs (in Abhängigkeit des T_2 -Relaxationsverhalten und der Abstandslänge). Die dipolare Evolutionszeit wurde definiert als $t = t' - \tau_1$, die Datenanalyse wurde bei $t > 0$ ns durchgeführt. Die Pumpfrequenz (ν_{pump}) war auf das Zentrum der Resonator-Senke eingestellt und stimmte mit dem Maximum des Nitroxid-EPR-Spektrums überein, die Beobachterfrequenz (ν_{observer}) lag 65 MHz höher und stimmte mit dem Niedrig-Feld-Maximum des Nitroxid-EPR-Spektrums überein. Der Beobachterpuls für den $\pi/2$ -Puls und den π -Puls war jeweils 32 ns lang, der Pumpimpuls (π) war 12 ns (Volkov) bzw. 20 ns (Jeschke) lang. Die Breite des Integrationsfensters lag bei 32 ns. Die Protonenmodulation geschah durch Überlagerung von 8 unterschiedlichen τ_1 -Werten, angefangen bei $\tau_1 = 200$ ns mit einer schrittweisen Erhöhung um je 8 ns. Die Messdauer eines DEER-Experimentes lag zwischen 8 und 12 Stunden. Die Datenauswertung der DEER-Experimente erfolgte jeweils durch Prof. Dr. Gunnar Jeschke oder durch Dr. Aleksei Volkov mittels der von Gunnar Jeschke geschriebenen Software „DeerAnalysis2006“, welche freizugänglich ist unter <http://www.mpip-mainz.mpg.de/~jeschke/distance.html>.

Methode und Durchführung der Drei-Puls ESEEM-EPR-Experimente sind in Kap. III (3.1.1.1) der vorliegenden Dissertationsschrift genau beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Einleitung

Grundvoraussetzung zur Durchführung von EPR-Experimenten an rekombinantem LHCII war die gerichtete, effiziente und dauerhaft stabile Markierung der Pigment-Protein-Komplexe mit paramagnetischen Spinmarkern. Ziel der Experimente des vorliegenden Kapitels war daher nicht nur eine Optimierung der Spinmarkierung an sich, sondern auch die möglichst effiziente Herstellung einer Vielzahl neuer *Lhcb1*-Cys-Klone durch Mutagenese des *Lhcb1*-Gens. Zur Optimierung der Wirtschaftlichkeit solcher Mutagenesen bei gleichzeitiger Minimierung des Arbeitsaufwandes wurde daher eine moderne Mutagenese-Technik basierend auf einer einzelnen PCR-Reaktion getestet und mit bewährten Methoden verglichen (Kap. I, 3.2). Hierbei entstandene Mutanten des *Lhcb1* wurden überexprimiert, rückgefaltet und sowohl biochemisch als auch spektroskopisch analysiert und charakterisiert (Kap. I, 3.4). Zur Verbesserung der Markierungsausbeute und zur Optimierung der Spinzahl in Protein-Pigment-Komplexen wurde zudem die Verwendung eines alternativen Spinmarkers getestet (Kap. I, 3.5).

3.2 Herstellung neuer Klone mittels punktspezifischer Mutagenese

Zur Herstellung neuer *Lhcb1*-Klone wurden unterschiedliche Strategien angewendet. Hierbei kamen sowohl altbewährte Techniken, wie die später beschriebene Restriktion und Ligation bereits vorhandener Klone, als auch moderne Techniken, wie die im Folgenden beschriebene punktspezifische Mutagenese mittels „Quikchange[®] II site-directed mutagenesis kit“ (Stratagene) zum Einsatz. Die von Plunger (2007) verwendete Insertions-PCR, soll in dieser Arbeit nicht genauer behandelt werden.

Die bis dato gebräuchliche Technik zur Herstellung neuer *Lhcb1*-Cys-Klone war die punktspezifischer Mutagenese nach Chen & Przybyla (1994), welche auf zwei aufeinanderfolgenden PCR-Schritten sowie einer Kombination von Restriktion und Ligation basiert (Hörnemann, 2005). Ein Vorteil dieser Methode war zum einem die Verwendung kurzer kostengünstiger Mutagenese-Primer sowie das Vorhandensein einer vielfach bewährten und durchsichtigen Methodenbeschreibung. Nachteil hingegen war ein verhältnismäßig großer Arbeitsaufwand, bedingt durch zeitaufwändige PCR-Reaktionen, Restriktionen, gefolgt von entsprechenden Aufreinigungsschritten mit teils hohen DNA-Verlusten, sowie geringen Ligations- und Transformationsausbeuten. Hinzu kamen oftmals hohe Kosten durch das „screening“ mehrerer Kolonien mittels Sequenzierung. Aus diesen Gründen sollte das „Quikchange[®] II site-directed mutagenesis kit“

der Firma Stratagene, welches einen deutlich geringeren Zeitaufwand durch Einsparung zahlreicher Arbeitsschritte verspricht, getestet werden. Nachteilig zu bewerten sind hierbei allerdings hohe Anschaffungskosten sowie fehlende Angaben zu Puffer-Rezepten, die ein Nachkochen der Methode mit eigenen Materialien verhindern soll. Das allgemeine Prinzip der punktspezifischen Mutagenese nach Stratagene ist in Material und Methode dieses Kapitels unter 2.6.10.1 genau dargestellt und soll folgend am Beispiel der Herstellung der Mutanten S59C und S59C/V90C demonstriert werden.

Nach Durchführung der Mutagenese-PCR, wurden die Matrizen-Plasmide der jeweiligen PCR-Ansätze zunächst mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* verdaut und mittels Agarose-Gel (Abb. 1.3.1) auf Erfolg der Amplifikation geprüft. Beide PCR-Produkte besitzen die erwartete Größe von ca. 4,3 kb und weisen, obwohl hier lediglich ein Fünftel des PCR-Volumens aufgetragen wurde, eine deutliche DNA-Bande auf, was auf eine erfolgreiche Amplifikation schließen lässt.

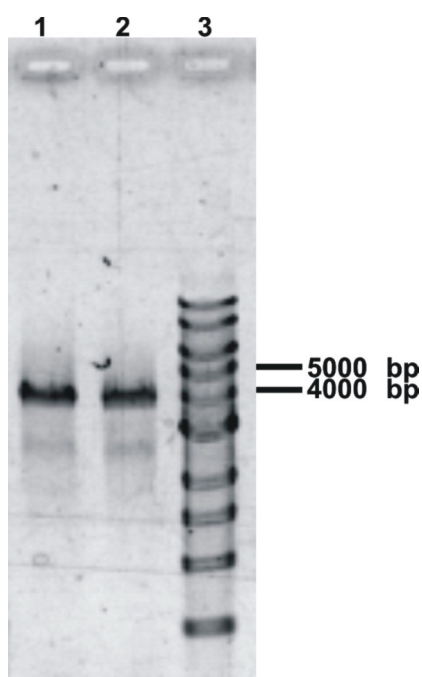


Abb. 1.3.1: Agarose-Gel (0,8 %) zur Untersuchung der Mutagenese-PCR nach *DpnI*-Verdau. Auf Spur 1 wurde 10 μ l des PCR-Produktes des Mutagenese-Ansatzes S59C, auf Spur 2 10 μ l des Mutagenese-Ansatzes S59C/V90C und auf Spur 3 5 μ l der 1 kb DNA-Leiter als Marker aufgetragen.

Dass es sich bei den jeweiligen Banden um die Matrizen-DNA handelt, kann dagegen ausgeschlossen werden. Das unverdaute Matrizen-Plasmid (in diesem Fall lediglich 10 ng DNA) wäre auf dem Gel zum einen kaum sichtbar gewesen und zum anderen, falls wirklich unverdaut, durch die „super-coil“ Struktur des Plasmids weniger weit gewandert als das „genickte“ PCR-Produkt.

Nach erfolgreicher PCR-Amplifikation wurden im weiteren Protokollverlauf 50 μ l superkompetente Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-Blue mit lediglich 1 μ l des verdauten PCR-Produkts transformiert. Dies führte in 98 % der durchgeführten punktspezifischen Mutagenesen (Tab. 1.2.2) zu hohen Ausbeuten von bis zu mehreren tausend Kolonien pro LB-Amp-Festmedium (nicht gezeigt). Nach Isolierung der mutierten Plasmid-DNA aus XL1-Blue-Zellen wurden Bakterienzellen des chemokompetenten Expressionsstammes JM101 transformiert, was ebenfalls zu guten Transformationsausbeuten führte. Von allen durchgeführten Mutagenesen wurde letztlich eine vereinzelte Kolonie der JM101-Zellen über Nacht vermehrt, das Plasmid isoliert und das *Lhcb1*-Gen sequenziert. In der Regel reichte eine einzelne Sequenzierung mit dem Sequenzier-Primer Seq 105 (-) aus, um den erfolgreichen Aminosäureaustausch zu bestätigen. Zudem wurde von

jeder neuen Mutante eine $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Dauerkultur angelegt und das isolierte Plasmid lyophilisiert eingefroren.

Um die Wirtschaftlichkeit der punktspezifischen Mutagenese weiter zu erhöhen, wurde die Mutagenese der Mutante V90C/S123C zum einen, wie zuvor beschrieben, mit dem „Quikchange® II site-directed mutagenesis kit“ (Stratagene) durchgeführt, zum anderen mit entsprechenden, in der Arbeitsgruppe vorrätigen Enzymen und Lösungen nachgekocht. Überlegung war hierbei die verhältnismäßig hohen Materialkosten des Mutagenese-„kit“ einzusparen. Alle hierfür verwendeten Produkte waren vorher in anderen Versuchsansätzen für funktionstüchtig befunden worden.

Das Ergebnis dieser *DpnI*-verdauten PCR-Ansätze in Abb.1.3.2 zeigt, dass die Amplifikation mit dem Mutagenese-„kit“ (Spur 2), wie zuvor gezeigt (Abb. 1.3.1), hervorragend funktioniert. Wieder ist eine deutliche DNA-Bande mit der erwarteten Größe von ca. 4,3 kb vorhanden. Die Intensität ist im Vergleich zu Abb. 1.3.1 geringer, jedoch wurde in diesem Gel nur die Hälfte an PCR-Produkt aufgetragen. Neben der Plasmid-Bande ist zudem noch eine diffuse Bande einer Größe unter 100 bp zu sehen, wobei es sich vermutlich um die überschüssigen Mutagenese-Primer handelt. Diese waren zuvor (Abb. 1.3.1) nicht mehr sichtbar, da sie durch die längere Laufzeit das Gel bereits verlassen hatten.

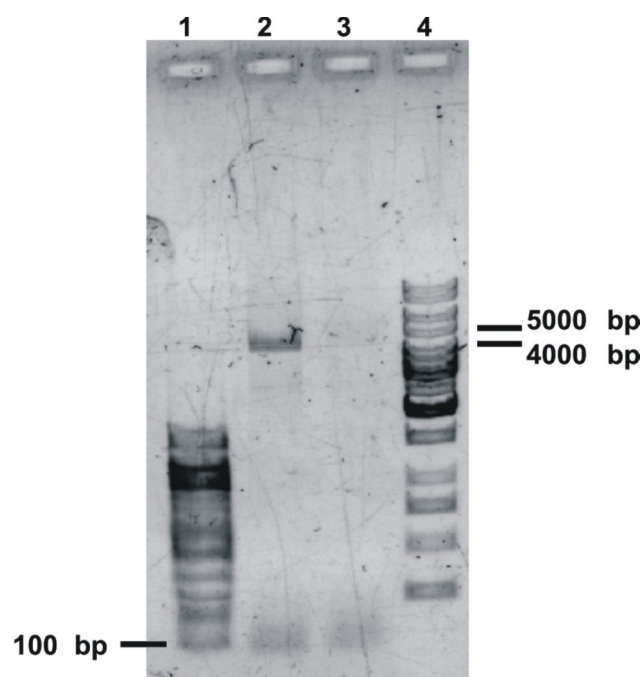


Abb. 1.3.2: Agarose-Gel (0,8 %) zur Untersuchung verschiedener Ansätze der Mutagenese-PCR V90C/S123C nach *DpnI*-Verdau. Auf Spur 1 wurde 5 μl der 100 bp DNA-Leiter als Marker aufgetragen, auf Spur 2 5 μl des Produktes nach PCR mit dem „Quikchange kit“, auf Spur 3 5 μl des Produktes nach PCR mit entsprechenden Lösungen aus dem Labor und auf Spur 3 5 μl des 1 kb DNA-Leiter (Fermentas) als Marker.

Auch in Spur 3, dem nachgekochten PCR-Ansatz, sind die Mutagenese-Primer als diffuse Bande zu sehen, das erwartete PCR-Produkt bei 4,3 kb ist hingegen nicht existent. Auch eine Wiederholung des

Versuchs führte zu keinem positiven Ergebnis, weshalb bei allen nachfolgenden Mutagenesen auf das Mutagenese-„kit“ der Firma Stratagene zurückgegriffen wurde.

3.3 Herstellung neuer Klone des *Lhcb1* mittels Restriktion und Ligation am Beispiel der Mutante S59Ch

Eine altbewährte Technik zur Herstellung neuer *Lhcb1*-Mutanten ist die Neukombination bereits vorhandener Klone mittels Restriktion, Aufreinigung und Ligation (Kap. I, 2.6.10.2). Wie in Tab. 1.2.2 zusammengefasst, wurden mittels Restriktion und Ligation die Klone S59Ch (Kap. I), stC79Sh und st106/160h (Kap. II) und V196Ch (Hebel, 2007) hergestellt. Im Fall der Mutante S59Ch wurden die Ausgangsklone S59C und C3.2h (siehe auch Abb. 1.2.8) mit den Restriktionsendonukleasen *SacI* und *BstEII* verdaut und, wie in Abb. 1.3.3 dargestellt, mittels Agarose-Gel analysiert. Wie erwartet wurde sowohl das Konstrukt S59C (Spur 2) als auch C3.2h (Spur 3) sauber in zwei Fragmente von ca. 380 und 3900 bp geschnitten.

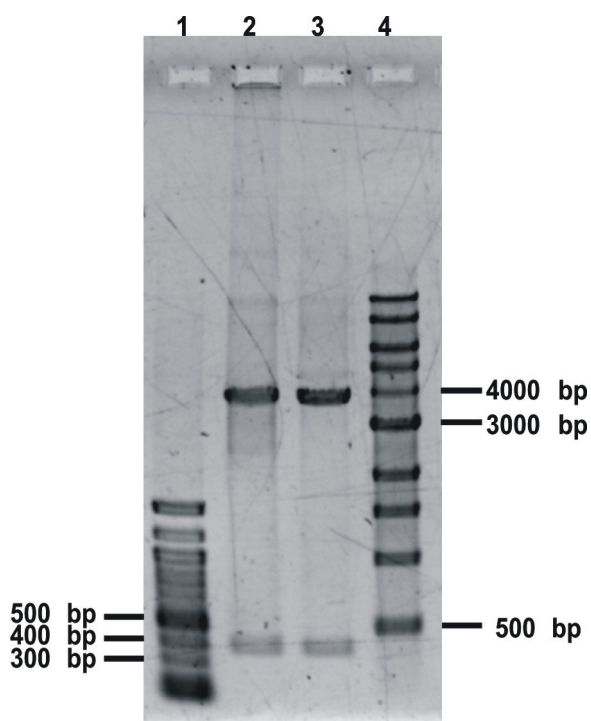


Abb. 1.3.3: Restriktion der Vektoren S59C (Spur 2) und C3.2h (Spur 3) zur Herstellung der *Lhcb1*-Mutante S59Ch. Die Vektoren wurden mit den Restriktionsendonukleasen *SacI* und *BstEII* geschnitten und auf einem 0,8 % Agarose-Gel aufgetrennt. In Spur 1 wurden 5 μ l 100 bp Leiter aufgetragen, auf Spur 2 2 μ l S59C, auf Spur 3 2 μ l C3.2h und auf Spur 4 5 μ l 1 kb Leiter.

Der restliche Restriktionsansatz wurde mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, das kurze Fragment von S59C sowie das lange Fragment von C3.2h aus dem Agarose-Gel isoliert und zum Vektor S59Ch ligiert. Nach Transformation in Zellen des *E. coli* Expressions-

Stammes JM101, wurden von lediglich vier gewachsenen Kolonien zwei sequenziert. Eine vorgeschaltete „dirty“-PCR zur Identifizierung positiver Klone und zur Einsparung von Sequenzierkosten (Kap. I, 2.6.4.1.2), war in dieser Versuchsreihe wenig sinnvoll, da die Unterscheidung des ungeschnittenen bzw. religierten C3.2h-Vektors von korrekt-ligiertem S59Ch-Vektor mittels vorhandener Primer nicht möglich war. Beide Kolonien wurden positiv auf eine erfolgreiche Ligation sequenziert und enthielten sowohl den C-terminalen „His₆ tag“ als auch den Einzelaustausch des Ser 59 zu Cys. Nach Anlegen einer Dauerkultur wurde die neuen Mutante überexprimiert, das Produkt aufgereinigt und charakterisiert (Kap. I, 3.4).

3.4 Biochemische und spektroskopische Charakterisierung neuer LHCII-Klone

3.4.1 Herstellung der rekombinanten Apoproteine

Rekombinantes Apoprotein neuer Klone des LHCII wurde durch Überexpression des mutierten *Lhcb1*-Gens im *E. coli* Expressionstamm JM101 nach Induktion mit IPTG produziert. Hierzu wurden Zellen der entsprechenden Dauerkulturen zunächst auf LB-Amp-Festmedium vereinzelt, um mit einer Einzelkolonie eine Flüssigkultur zu inokulieren. Im Gegensatz zu vorherigen Versuchsvorschriften wurde darauf verzichtet eine geringvolumige Flüssigvorkultur anzuziehen. Stattdessen wurde am Vorabend der Überexpression eine Kolonie gepickt und die Hauptkultur direkt angeimpft. Dies brachte neben der Einsparung eines Arbeitsschrittes hohe Erträge an rekombinantem Apoprotein. Die Ausbeuten lagen je nach Klon bei bis zu 250 mg aufgereinigtem Apoprotein pro Liter Flüssigkultur.

Nach standardisierter Aufreinigung der IBs wurden der Grad der Aufreinigung und die molekulare Masse der neuen Mutanten mittels SDS-PAGE ermittelt. Abb. 1.3.4 zeigt das Ergebnis eines solchen Gels, hier wurde eine Auswahl der neu produzierten Mutanten im Vergleich zu Apoprotein mit nativer *Lhcb1*-Sequenz (D7f.3) aufgetragen. Alle neuen Klone verhielten sich identisch zu D7f.3 und liefen auf Höhe eines Polypeptids von ca. 25 kDa. Neben dieser dominanten Bande zeigen alle Proben, wenn überhaupt, lediglich eine vernachlässigbar geringe Verschmutzung mit Fremdprotein.

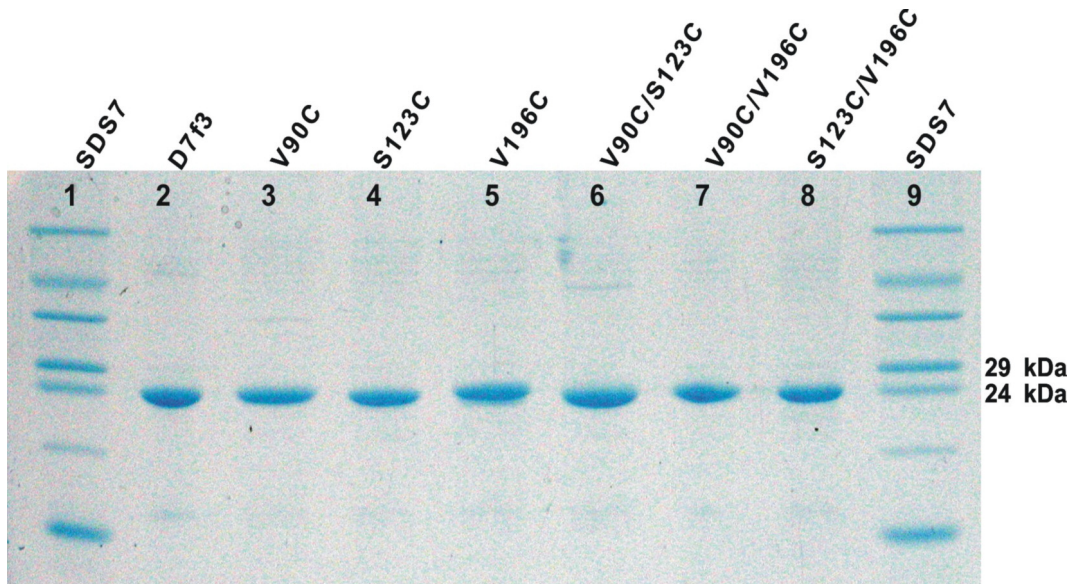


Abb. 1.3.4: Denaturierende SDS-PAGE (15%iges Gel) zur Überprüfung der Aufreinigung und der molekularen Masse der IBs verschiedener *Lhcb1*-Klone nach Coomassie-Blau Anfärbung. In Spur 1 und 9 wurden jeweils 3 μ l SDS7-Marker aufgetragen, auf Spur 2 2 μ g IBs des Apoproteins D7f.3 mit nativer Aminosäure-Sequenz, auf den Spuren 3 bis 8 je 2 μ g IBs verschiedener neuer Mutanten.

Auch die beiden nicht dargestellten neuen Klone (S59C, S59C/V90C) verhielten sich wildtypisch, die Mutante S59Ch mit C-terminalem „His₆ tag“ besaß eine Masse von ca. 27 kDa (vergleichbar mit der Mutante C3.2 mit nativer Aminosäure-Sequenz und C-terminalem „His₆ tag“), die beiden doppelt affinitätsmarkierten Klone stC79Sh und st106/160h von ca. 28 kDa (Daten nicht gezeigt).

3.4.2 Rekonstitution der neuen Mutanten zu funktionalen Protein-Pigment-Komplexen

Zur Überprüfung der Funktionalität der neuen Mutanten wurde Apoprotein aller neuen Klone durch Zugabe von Pigment-Totalextrakt mit anschließendem Wechsel des Detergenz zu Protein-Pigment-Komplexen rekonstituiert und mittels UZ aufgereinigt. Die durch Hebel (2007), Plunger (2007), Dietz (2008) und Müller (2008) hergestellten Klone wurden in den jeweiligen Diplomarbeiten beschrieben und charakterisiert. Das Ergebnis von Rekonstitution und Aufreinigung verschiedener neuer Klone ist in Abb. 1.3.5 dargestellt. Alle neuen Mutanten verhielten sich sowohl bei Rekonstitution als auch Aufreinigung unauffällig und bildeten im Gradienten (A) jeweils eine deutliche grüne Bande (*).

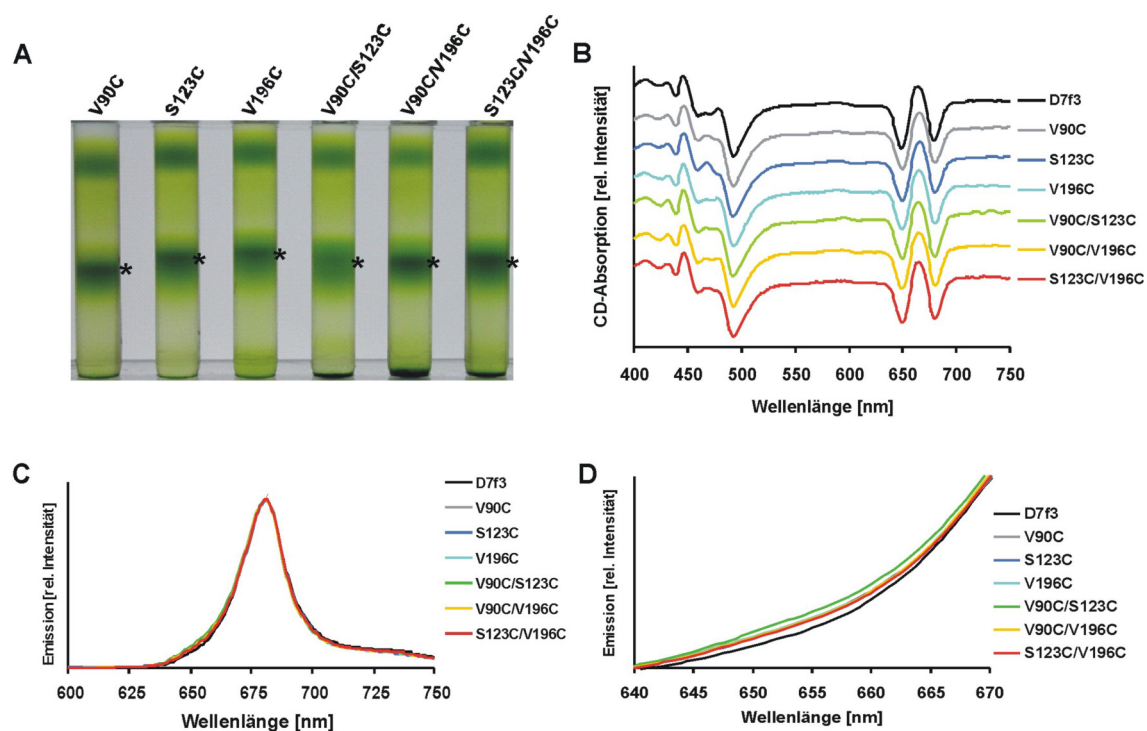


Abb. 1.3.5: Charakterisierung verschiedener neuer LHCII-Mutanten nach Detergenzwechsel-Rekonstitution. (A) Ergebnis der Aufreinigung mittels UZ. Die in (A) markierten Komplex-Banden (*) wurden sowohl CD-spektroskopisch (B) als auch Fluoreszenz-spektroskopisch (C und D) untersucht. (D) stellt einen vergrößerten Ausschnitt der Fluoreszenz-Spektren von (C) zur Verdeutlichung der Chl *b*-Emission dar. CD-Spektren (B) sind zur besseren Übersichtlichkeit gestaffelt dargestellt.

Die spektroskopische Untersuchung zeigte, dass es sich bei den jeweiligen Banden um voll funktionstüchtige monomere LHCII-Komplexe handelt. Sowohl in der CD-Absorption (B) als auch in der Fluoreszenz-Emission (C und D) verhielten sich alle neuen Klone dem Wildtyp (WT) entsprechend. Die CD-Absorption resultierte bei allen Mutanten in den typischen Minima bei 491, 650 und 678 nm des monomeren LHCII (B) (Hobe, 1994). Auch der Energietransfer von Chl *b* zu Chl *a* war bei allen Mutanten weitestgehend vollständig. Nach Anregung des Chl *b* bei 470 nm, zeigt sich vor allem die Fluoreszenz-Emission des Chl *a* bei 680 nm (C). Nichtfunktionale Komplexe sowie freies Chl *b* zeigen nach Anregung eine Emission bei 653 nm (Rühle & Paulsen, 2004). Ob es sich bei der vergleichsweise schwachen Chl *b*-Emission der neuen Mutanten, insbesondere bei der Probe 90/123 (D, grüne Linie), um einen sehr geringen Anteil an ungebundenen Chl *b* oder an schlecht gefalteten Komplex handelt, kann hier nicht gesagt werden. Festzuhalten bleibt das der Anteil vernachlässigbar klein ist.

Die Fähigkeit zur Rekonstitution der neuen Mutanten konnte zudem durch die schwach denaturierende LDS-PAGE bestätigt werden und soll in Abb. 1.3.6 beispielhaft anhand der beiden Mutanten S123C und V196C verdeutlicht werden. Wie dort erkennbar ist, bilden beide Klone eine deutlich grüne Bande rückgefalteter Protein-Pigment-Komplexe. Im Vergleich zu D7f.3 ist die Intensität der Banden leicht schwächer. Vergleicht man das Verhältnis Apoprotein zu gefaltetem Komplex nach Coomassie-Färbung (B), so fällt auf, dass beide Mutanten etwas geringere Faltungs-Ausbeuten besitzen als D7f.3 mit wildtypischer Peptidsequenz. Während D7f.3 zu geschätzten 60 % gefaltet vorliegt, ist die Ausbeute bei S123C ca. 50 %, bei V196C ca. 40 %.

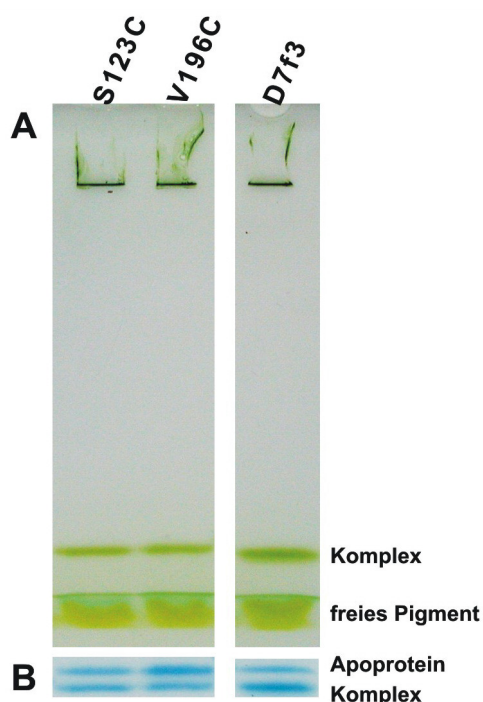


Abb. 1.3.6: Schwach denaturierende LDS-PAGE (10%iges Gel) zur Charakterisierung neuer LHCII-Klone nach Detergenzwechsel-Rekonstitution. (A) zeigt zwei zusammengefügte Ausschnitte des Gels vor Anfärbung, (B) nach Coomassie-Blau-Anfärbung. Von links nach rechts sind jeweils 12 µl der Rekonstitution der LHCIIb-Klone S123C und V196C, sowie des muren LHCII (D7f3) aufgetragen.

Alle anderen hergestellten Mutanten waren ebenfalls rekonstituierbar und bildeten stabile Protein-Pigment-Komplexe mit vergleichbaren Faltungs-Ausbeuten zwischen 40 und 60 % (Daten nicht gezeigt). Auch wenn die Faltungsausbeuten mancher Mutanten hinter denen des WT zurückblieben, sei darauf hingewiesen, dass die besagten Faltungsausbeuten anhand von schwach denaturierenden Gelen bestimmt wurden, instabile bezie-

beuten anhand von schwach denaturierenden Gelen bestimmt wurden, instabile bezie-

ungsweise in ihrer Konformation gestörte Komplexe wären auf dem Gel zerfallen (Mick, 2004). Da zudem die zuvor dargestellten spektroskopischen Methoden äußerst sensibel auf Veränderungen in der Pigmentanordnung und -komposition reagieren, konnte davon ausgegangen werden, dass die jeweiligen Aminosäureaustausche die Struktur und Funktionalität der Komplexe nicht beeinträchtigten und sie somit für EPR-spektroskopische Versuche geeignet sind.

3.4.3 Rekonstitution und Trimerisierung neuer Mutanten mit C-terminalem „His₆ tag“ zu funktionalen Protein-Pigment-Komplexen

Zur effizienten Herstellung trimerer EPR-Proben des spinmarkierten LHCII wurden zahlreiche Lhcb1-Klone C-terminal mit einem „His₆ tag“ zur Trimerisierung mittels Ni-Säule versehen. Dies geschah entweder durch Restriktion und Ligation bereits vorhandener Klone bzw. durch Einfügen von Cys in den Cys-freien Klon C79Sh mit C-terminalem „His₆ tag“ (Müller, 2008) oder dessen Derivate (Tab. 1.2.2). Das Oligomerisierungsverhalten der durch Hebel (2007), Plunger (2007), Dietz (2008) und Müller (2008) hergestellten Klone ist in den jeweiligen Arbeiten beschrieben. Als Exempel soll hier die bis dato unbeschriebene Mutante S59Ch mit dem Klon C3.2h verglichen werden (Abb. 1.3.7).

Wie zuvor Mutante S59C, zeigte auch die „His₆ tag“-Mutante S59Ch keinerlei Auffälligkeiten bei der Rekonstitution zu monomerem Protein-Pigment-Komplex (Daten nicht gezeigt), die spektroskopische Analyse der Monomere lieferte wildtypische Ergebnisse. Auch die Trimerisierung auf der Ni-Säule zeigte keinerlei Abweichungen zu der wildtypischen Mutante mit C-terminalem „His₆ tag“ (C3.2h). Wie in Abb. 1.3.7 zu sehen ist, zeigt S59Ch nach UZ die gleiche Auftrennung in trimere Komplexe (*) und monomere Komplexe (oberhalb der Trimere). Lediglich die Laufweiten im Gradient (präparationsbedingt) sowie die Intensität der Monomerbanden unterscheiden sich, wobei letzter Punkt nicht weiter quantifiziert wurde, da in anderen C3.2h-Präparationen ähnlich hohe Trimerisierungsausbeuten erzielt worden waren (Kap. II).

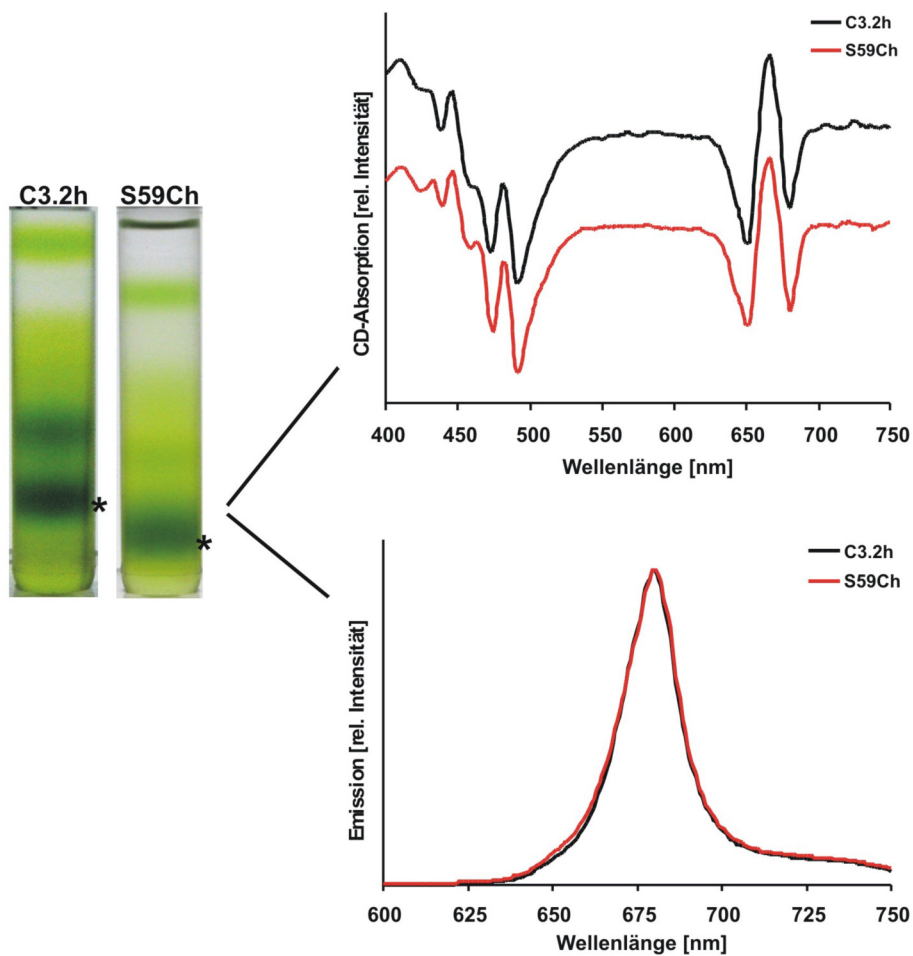


Abb. 1.3.7: Spektroskopische Charakterisierung der mittels Restriktion und Ligation hergestellten LHCII-Mutante S59Ch nach Detergenzwechsel-Rekonstitution, Trimerisierung und Aufreinigung via UZ (linke Bildhälfte) im Vergleich zur Mutante C3.2h mit C-terminalem „His₆ tag“. Die im Saccharose-Gradienten markierten Komplex-Banden (*) wurden sowohl CD-spektroskopisch (rechte Bildhälfte, oben) als auch Fluoreszenz-spektroskopisch (rechte Bildhälfte, unten) untersucht.

Dass es sich bei der markierten Bande (*) um trimere LHCII handelt, wird durch die CD-Spektren belegt. Hier zeigte die trimere Mutante S59Ch genau wie C3.2h zusätzlich bei 473 nm ein negatives Minimum (Rühle & Paulsen, 2004). Auch der Energie-transfer von Chl *b* zu Chl *a* war in trimere Komplexen vollständig. Wie für monomere Komplexe schon berichtet (Kap. I, 3.4.2), resultierte die Anregung des Chl *b* in einer Fluoreszenz-Emission des Chl *a* bei 680 nm, ein sicheres Indiz für funktionale LHCII-Komplexe.

Neben solchen unproblematischen Aminosäure-Austauschen fielen in den Diplomarbeiten von Hebel (2007; Mutante V196Ch), Dietz (2008; S106Chc und deren Derivate) und Müller (2008; Mutanten S29Ch, F40Ch und A49Ch, sowie deren Derivate) mehrere Mutanten mit geringeren Trimerisierungsausbeuten auf. Zudem zeigten unmarkierte Trimere der Mutante S123Ch (und deren Derivate) deutliche Abweichungen

in ihrer CD-Absorption. Im Unterschied zu trimerem LHCII mit wildtypischer Proteinsequenz und C-terminalem „His₆ tag“ (C3.2h, Abb. 1.3.7) ähnelte bei S123Ch das CD-Differenzspektrum mehr dem der Mutanten E107V bzw. D111V mit deutlich negativem Minimum bei 473 nm (Yang *et al.*, 2008). Durch Markierung mit Spinmarkern wurde der Effekt vollständig aufgehoben, die PROXYL-markierten Trimere des S123Ch waren spektroskopisch identisch zu C3.2h.

Weiterhin wurde insbesondere bei unmarkierten N-terminalen Cys-Doppelmutanten (Müller, 2008) die Oligomerisierung durch Ausbildung von Disulfid-Brücken negativ beeinträchtigt, konnte aber durch den Einsatz von Reduktionsmittel oder durch Markierung der Cys mit Spinmarkern aufgehoben werden. Die Oligomerisierung von „His₆ tag“-freien Mutanten, beispielsweise durch Trimerisierung in Liposomen (Boggasch, 2006), sowie vieler Cys-Doppelmutanten, wurde nicht getestet. Zur Wahrung der Übersicht sind alle während der Dissertation produzierten LHCII-Klone mit Rekonstitutions- und Trimerisierungsverhalten in Tab. 1.3.1 zusammengefasst.

Tab. 1.3.1: Übersicht aller während der Dissertation produzierten LHCII-Klone (auch der Diplomanden Hebel, 2007; Plunger, 2007; Dietz, 2008; Müller, 2008) und deren Rekonstitutions- und Trimerisierungsverhalten. +++ bedeutet wildtypische Rekonstitution und Trimerisierung, ++ zufriedenstellende Trimerisierung, + schwache Trimerisierung, --- keine Trimerisierung, n.g. „nicht getestet“. Mit (*) gekennzeichnete Proben zeigen spektroskopische Abweichungen.

Hersteller	Klon	Rekonstitution	Trimerisierung unmarkiert	Trimerisierung PROXYL-markiert
Dockter	S59C	+++	n.g.	n.g.
	S59Ch	+++	+++	+++
	V90C	+++	n.g.	n.g.
	S123C	+++	n.g.	n.g.
	V196C	+++	n.g.	n.g.
	S59C/V90C	+++	n.g.	n.g.
	V90C/S123C	+++	n.g.	n.g.
	V90C/V196C	+++	n.g.	n.g.
	S123C/V196C	+++	n.g.	n.g.
	stC79Sh	+++	+++	+++
	st106/160h	+++	+++	+++
Plunger	S3Chh	+++	+++	+++
Hebel	V196Ch	+++	+++	+
Müller	C79Sh	+++	+++	+++
	P3	+++	+++	+++
	P14	+++	+++	+++
	P29	+++	+++	+
	P3/14	+++	+++	+++
	P3/29	+++	+	+
	P3/59	+++	+	+
	P14/29	+++	+	n.g.
	P29/59	+++	+	+
	A4Ch	+++	+++	+++

Hersteller	Klon	Rekonstitution	Trimerisierung unmarkiert	Trimerisierung PROXYL-markiert
Müller	K7Ch	+++	+++	+++
	V9Ch	+++	+++	+++
	A10Ch	+++	+++	+++
	S11Ch	+++	+++	+++
	S12Ch	+++	+++	+++
	S14Ch	+++	+++	+++
	V22Ch	+++	+++	+++
	S29Ch	+++	+	+
	S34Ch	+++	+++	+++
	F40Ch	+++	---	---
	A49Ch	+++	---	---
	S3C/S14Ch	+++	+++	+++
	S3C/S29Ch	+++	+	+
	S3C/S59Ch	+++	+++	+++
	S14C/S29Ch	+++	+	n.g.
S29C/S59Ch	+++	+	+	
Dietz	V90Ch	+++	+++	+++
	S106Chc	+++	++	+
	S123Ch	+++	+++ *	+++
	V90C/S106Ch	+++	++	n.g.
	V90C/S123Ch	+++	++	n.g.

3.5 Optimierung der Spinmarkierung des rekombinanten LHCII

3.5.1 Vergleich der Markierungsausbeuten bei Verwendung unterschiedlicher Spinmarker

Wie in Kapitel III genauer beschrieben, war es zur Durchführung von zeitabhängigen EPR-Faltungsexperimenten äußerst vorteilhaft, den chemisch wenig stabilen Spinmarker TEMPO durch das stabilere Pyrrolderivat PROXYL (Kroll, 1999) zu ersetzen. Konsequenterweise wurden daher Nachmarkierungsversuche zum Test der Markierungseffizienz analog zu früheren Versuchen mit TEMPO (Bender, 2004; Dockter, 2005) wiederholt und zudem die chemische Stabilität der Nitroxid-Marker geprüft. Hierzu wurde Apoprotein der Cys-Einzelmutante V196C nach Standard-Rezept mit TEMPO-IA bzw. PROXYL-IA markiert (Abb. 1.3.8). In jeweils drei Ansätzen wurden die Spinmarker in 10fach, 20fach bzw. 50fach molarem Überschuss zu Protein eingesetzt. Nach Inkubation wurde überschüssiger Marker durch Fällung und Waschen des Proteins quantitativ entfernt. Zur Überprüfung der Markierungsausbeute wurde das spinmarkierte Apoprotein mit dem Fluoreszenzmarker BODIPY-IA (50fach molarer Überschuss zu Protein), welcher ebenfalls spezifisch und mit sehr hoher Ausbeute an Sulfhydryle bindet (Huschenbett, 2001), nachmarkiert. Als positive bzw. negative Referenz wurden ein Aliquot von V196C bzw. des Cys-Null-Klons C79S nur mit BODIPY-IA markiert. Die BODIPY-Fluoreszenz (Abb. 1.3.8, C) der jeweiligen Markierungsansätze wurde im denaturierenden Gel densitometrisch ausgewertet (Abb. 1.3.8, B), bezogen auf die jeweils aufgetragene Proteinmenge (Coomassie-Anfärbung, Abb. 1.3.8, D). Die BODIPY-

Emission zeigt deutlich, dass die Positiv-Kontrolle (V196C-BODIPY, Spur 8) die intensivste Emission aufweist, sie wurde gemäß Huschenbett auf einen Markierungsgrad von 100 % gesetzt. Der Cys-Null-Klon C79S (Spur 7) dagegen zeigt bei gleicher Behandlung keine fluoreszierende Bande (0 % Markierung), womit frühere Ergebnisse (Bender, 2004; Dockter, 2005) bestätigt wurden. Vergleicht man die Ansätze der PROXYL-Markierung bzw. der TEMPO-Markierung untereinander, so fällt auf, dass mit steigendem Einsatz an jeweiligem Spinmarker die BODIPY-Emission schwächer wird. Bei Einsatz eines jeweils 50fachen Spinmarker-Überschusses ist praktisch keine BODIPY-Markierung mehr erkennbar (2,2 % im TEMPO-Ansatz bzw. 1,9 % im PROXYL-Ansatz). Bei direktem Vergleich der beiden Spinmarker (Abb. 1.3.8, B) ist ersichtlich, dass die BODIPY-Fluoreszenz in den PROXYL-Ansätzen stets niedriger ist als in den TEMPO-Ansätzen.

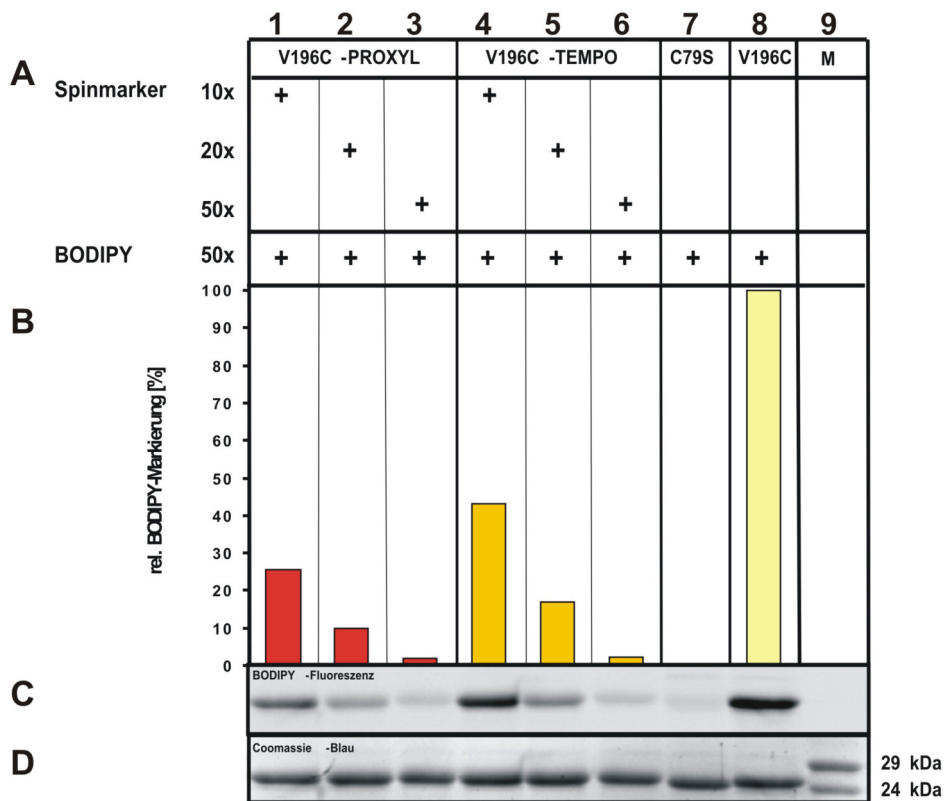


Abb. 1.3.8: Versuch zur Markierungseffizienz verschiedener Spinmarker an LHCP in Abhängigkeit der eingesetzten Spinmarker-Konzentration. Es wurden auf Bahn 1–6, sowie Bahn 8 je 2 µg der Cys-Einzelmutante V196C aufgetragen, auf Bahn 7 2 µg des Cys-Null-Klon C79S, auf Bahn 9 3 µl SDS7 Marker. (A) Zur Markierung des Apoproteins wurden auf Bahn 1, 2, 3 jeweils ein 10fach, 20fach bzw. 50fach molarer Überschuss der Spinmarker PROXYL-IA eingesetzt, auf Bahn 4, 5 und 6 entsprechende Überschüsse des Spinmarker TEMPO-IA. Nach Inkubation, Fällung und Aufreinigung der Ansätze folgte bei den Proben der Bahnen 1-8 noch eine Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff BODIPY-IA (50fach molarer Überschuss). (B) Densitometrische Auswertung der Fluoreszenz und Berechnung der relativen BODIPY-Markierungseffizienz bezogen auf die Fluoreszenz-Intensität der Positiv-Kontrolle ohne vorherige Spinmarkierung (Bahn 8). (C) Aufnahme der BODIPY-Fluoreszenz einzelner Banden in der SDS-PAGE. (D) Aufnahme der Coomassie-Blau-Färbung des gleichen Gels.

Geht man davon aus (Bender, 2004; Dockter, 2005), dass in BODIPY-Nachmarkierungsversuchen eine Markierungseffizienz des Fluoreszenz-Farbstoffes von 10 % umgekehrt eine Markierungseffizienz des Spinmarkers von 90 % bedeutet, so ergeben sich die in Tab. 1.3.2 zusammengefassten Markierungsausbeuten der Cys-Einzelmutante V196C.

Tab. 1.3.2: Markierungseffizienzen der Cys-Einzelmutante V196C für verschiedene Nitroxid-Marker (TEMPO-IA und PROXYL-IA) in Abhängigkeit des eingesetzten molaren Spinmarker-Überschuss.

molarer Überschuss	10x	20x	50x
TEMPO	57 %	83 %	97,8 %
PROXYL	74,5 %	90,1 %	98,1 %

Bei 10fach molarem Überschuss an TEMPO liegen die Markierungseffizienzen für V196C mit lediglich 57 % deutlich niedriger als die für die Mutante S3Ch gemessenen Werte von 87,4 % (Dockter, 2005). Das gleiche gilt für den Einsatz eines 20fach molaren Überschuss, hier zeigt V196C 83 % Markierung, S3Ch jedoch 93,7 % (Dockter, 2005). Umgekehrt übertrifft die Markierungsausbeute des V196C die von S3Ch bei einem 50fach molaren Überschuss (97,8 % zu 93,9 %). Im Unterschied zum Spinmarker TEMPO wurden mit PROXYL durchweg höhere Markierungseffizienzen erzielt. So waren schon bei Einsatz eines 10fach molaren Überschusses ca. 75 % des V196C-Apoproteins markiert, bei einem 20fachen Überschuss bereits 90 % und bei einem 50fachen Überschuss rund 98 %. Daraus schlussfolgernd wurde LHCP fortan mit einem 20fach molaren Überschuss an PROXYL markiert, da dies die beste Relation zwischen Markierungseffizienz und Verbrauch an teurem Spinmarker darstellte.

Wie schon zuvor für den Austausch der Aminosäuren beschrieben, wurde durch die Markierung mit PROXYL die Faltung der verschiedenen Mutanten zu funktionalen Pigment-Protein-Komplexen nicht beeinträchtigt. Sowohl die in der Arbeitsgruppe bereits vorhandenen Mutanten, als auch neu hergestellte Klone rekonstituierten problemlos und zeigten nach Aufreinigung CD- und Fluoreszenzdaten identisch zu unmarkierten Proben (Abb. 1.3.5). Auch die Trimerisierung der Komplexe (sofern dies möglich war, vgl. Tab. 1.3.1) führte in der Regel zu unauffälligen Ergebnissen. Ausnahme blieben die Mutanten 29, 40, 49, 106 (bzw. deren Derivate), sowie Position 196. Während bei ersteren der Effekt auf der Mutagenese an sich beruht, entstehen bei Mutante 196 erst durch die Spinmarkierung Probleme in der Trimerisierung (Hebel, 2007). Weiterhin zeigte sich, dass umgekehrt durch die Spinmarkierung die Trimerisierungsprobleme in manchen unmarkierter Doppelmутanten, bedingt durch die Verhinderung von Disulfid-Brücken, eliminiert wurden (Müller, 2008).

3.5.2 Vergleich von TEMPO- und PROXYL-markiertem LHCII bezüglich Spinmarker-Stabilität und DEER-Abständen

Wie schon angesprochen wurde, ist das Vorhandensein ungepaarter Elektronen in der Messprobe eine grundlegende Voraussetzung zur Anwendung der EPR-Spektroskopie. Daher stellt die Reduktion eingeführter paramagnetischer Nitroxid-Marker ein Problem in der Herstellung intakter EPR-Proben dar. Das Redoxpotential vieler Reduktionsmittel, wie zum Beispiel der Ascorbinsäure (Galla, 1988) oder DTT (Burmeister Getz *et al.*, 1999), ist ausreichend, um bestimmte Nitroxid-Spinmarker wie das in der Diplomarbeit (Docker, 2005) verwendete TEMPO zum Hydroxylamin zu reduzieren. Durch diese Reduktion wird der Marker diamagnetisch und absorbiert keine Mikrowellen mehr. Andere Spinmarker wie das in das vorgestellte Pyrrolderivat PROXYL zeigen eine deutlich höhere chemische Stabilität gegenüber reduzierenden Reagenzien und werden selbst im deutlich sauren Milieu nur langsam in die reduzierte Form überführt (Kroll, 1999). Da während der Rekonstitution des LHCII Reduktionsmittel wie DTT oder β -Me zur Gewährleistung der Faltung unabdingbar sind, muss davon ausgegangen werden, dass bei Benutzung von TEMPO-Spinmarkern auch bei hohen Markierungseffizienzen stets ein Teil des Signals durch Reduktion verloren geht. Zudem erforderten die Experimente zur EPR-Faltungskinetik eine Fällung des LHCP nach Spinmarkierung mit 5%iger TCA, da dies zu einer drastischen Erhöhung der Protein-Löslichkeit führte (ein Phänomen, welches nur bei spinmarkiertem Apoprotein auftrat). Literaturangaben sagen unter solchen Versuchsbedingungen für TEMPO-Spinmarker eine starke Reduktion voraus, für PROXYL dagegen nicht (Kroll, 1999). Um diese Angaben zu prüfen, wurde Apoprotein der Doppelmutante S106C/S160Ch mit einem 20fach molaren Überschuss an TEMPO bzw. PROXYL markiert, mit Aceton/ Essigsäure gefällt, gewaschen und auf gleiche Protein-Konzentrationen eingestellt. Nach einer Inkubationsdauer von 40 min bei Raumtemperatur in 5%iger TCA wurde von beiden Ansätzen das in Abb. 1.3.9 gezeigte EPR-ESE Spektrum gemessen, welches als eine Art Mikrowellen-Absorptionspektrum direkten Aufschluss über die Anzahl an Nitroxid-Radikalen (Spinzahl) in der Probe gibt. Wie deutlich erkennbar ist, absorbiert die PROXYL-Probe bei gleicher Proteinkonzentration deutlich mehr Mikrowellen, was in einem höheren zentralen Peak bei 332 mT resultiert.

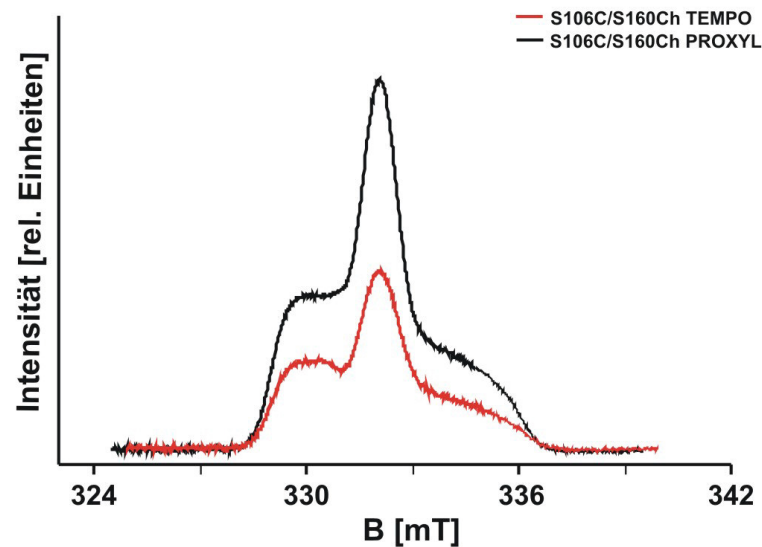


Abb. 1.3.9: EPR-ESE Spektren zum Vergleich der chemischen Stabilität unterschiedlicher, kovalent gebundener Nitroxid-Spinmarker bei gleicher Proteinkonzentration. Beide Proben wurden 40 min bei Raumtemperatur in TCA (5 %) inkubiert. Die schwarze Linie stellt Apoprotein der Mutante S106C/S160Ch -PROXYL dar, die rote S106C/S160Ch-TEMPO.

Auch wenn hierbei beachtet werden muss, dass die Markierungseffizienz des PROXYL-Markers gegenüber der TEMPO-Markierung höher liegt (Kap. I, 3.5.1), kann dies nicht der alleinige Grund für die annähernd doppelt so starke Absorption der PROXYL-Probe sein. Wendet man die zuvor anhand von Einzelmutanten gemachten Daten auf Doppelmutanten an, sollte der Unterschied in der Markierungseffizienz maximal bei ca. 15 % liegen (TEMPO ca. 66 % Doppelmarkierung, PROXYL ca. 80 % Doppelmarkierung) und nicht, wie hier ermittelt, bei ca. 50 %.

Apoprotein derselben Markierungs-Charge, aber ohne TCA-Behandlung, wurde zudem rekonstituiert und mittels UZ aufgereinigt. Die isolierten Monomere wurden auf gleiche Konzentrationen eingestellt, nach Zugabe von Glycerin als Frostschutz in flüssigem Stickstoff eingefroren und EPR-DEER vermessen (Abb. 1.3.10). Wie anhand der zuvor ermittelten Daten vermutet (Nachmarkierungsversuche und ESE-EPR), ist die gemessene Modulationstiefe der TEMPO-markierten Monomere S106C/S160Ch (Abb. 1.3.10 A, rote Linie) deutlich geringer als die der PROXYL-markierten Monomere (B, schwarze Linie).

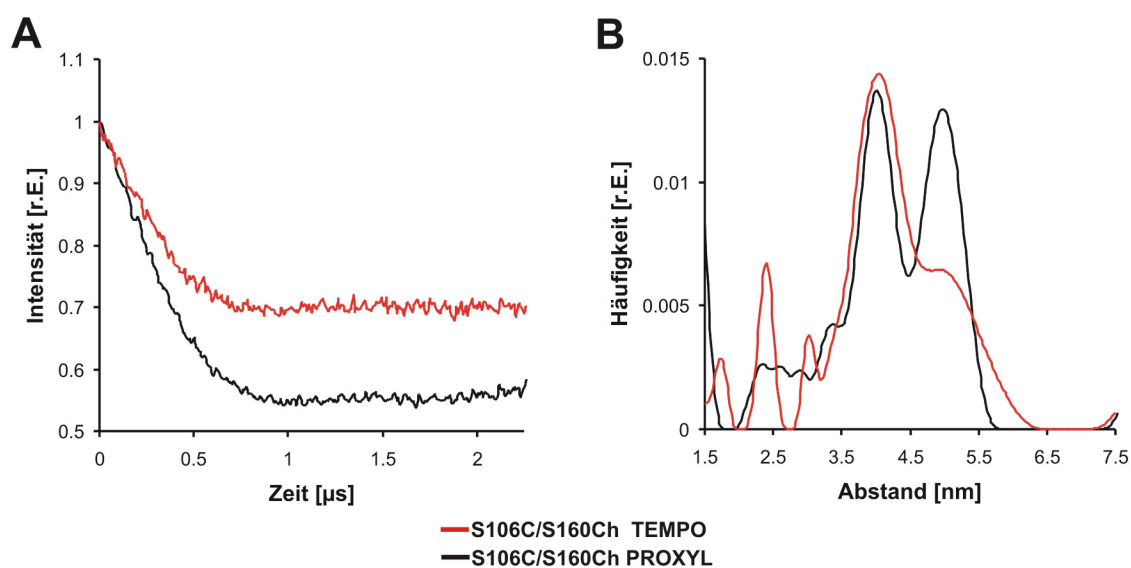


Abb. 1.3.10: Ermittlung der intramolekularen Spinabstände mittels DEER. Vergleich von monomeren LHCII-Komplexen der Mutante S106C/S160Ch, markiert mit TEMPO (rote Linien) bzw. PROXYL (schwarze Linien). **(A)** zeigt die Hintergrund-korrigierten Primär-Daten, **(B)** die aus den Primär-Daten mittels Tikhonov-Regularisierung errechneten Spin-Spin-Abstände, dargestellt als Abstandsverteilung. Für beide Proben wurden die gleichen Prozessierungsparameter verwendet. Zeitnullpunkt 130 ns, Start der Hintergrundkorrektur bei 640 ns, Regulierungsparameter $\alpha=10$.

In den ermittelten Abstandsverteilungen (B) fällt auf, dass die gemessenen Abstände in beiden Markierungsansätzen einander ähnlich sind. Insgesamt ist die Verteilung der Abstände der LHCII-Probe mit den größeren TEMPO-Markern etwas breiter und resultiert in einem Maximum bei ca. 4 nm sowie einem großen Anteil von Abständen zwischen 4,5 und 6,5 nm. Die PROXYL-Probe dagegen zeigt zwei Maxima bei ca. 4 und 5 nm und ist insgesamt weniger breit verteilt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass EPR-Messungen mit PROXYL-markierten Proteinen zum einen mindestens genauso genaue Messdaten liefern wie entsprechende Messungen mit TEMPO-markiertem LHCII, zum anderen kostbare EPR-Messzeit durch Erhöhung der Spinzahl minimiert wird. Daher wurde in allen folgenden EPR-Experimenten (Kap. II und III) PROXYL-markierter LHCII verwendet.

4 Diskussion

4.1 Herstellung neuer *Lhcb1*-Klone mittels punktspezifischer Mutagenese

Wie in der allgemeinen Einleitung und in der Einleitung zu Kapitel III ausführlich dargelegt, besitzt die EPR-Spektroskopie gegenüber anderen Methoden zahlreiche Vorteile in ihrer Anwendbarkeit zur Aufklärung von Proteinstrukturen und zur Entschlüsselung der Strukturodynamik von Proteinen. Wie bei anderen Methoden sollte auch hier nicht unberücksichtigt bleiben, dass die Durchführung von SDSL-Studien durch Produktion vieler einzelner, spinmarkierter Mutanten des zu untersuchenden Proteins einen verhältnismäßig hohen Arbeitsaufwand (und damit auch finanziellen Aufwand) darstellt. Neben der Verbesserung der Spin-Signalintensität durch eine effizientere Protein-Markierung, war auch die Verringerung des Arbeitsaufwandes in der Herstellung neuer Cys-Mutanten des LHCII Ziel der Untersuchungen dieses Kapitels.

Wie in den Ergebnissen zur Mutagenese gezeigt werden konnte, funktioniert die Produktion neuer Cys-Klone durch Verwendung des Stratagene Mutagenese-„kit“ optimal und stellt eine deutliche Verbesserung dar. Nachteile gegenüber altbewährter Methoden sind die etwas höheren Anschaffungskosten für die längeren Mutagenese-Primer, sowie die Kosten für das Mutagenese-„kit“ an sich. Hauptvorteil bleibt der deutlich geringere Arbeitsaufwand mit hoher Reproduzierbarkeit einzelner Arbeitsschritte. Wie Müller (2008) zeigen konnte, war es ohne übermäßigen Aufwand möglich bei Vorhandensein der Primer bis zu 10 neue Cys-Einzelmutanten binnen 7 Arbeitstagen, angefangen bei der Mutagenese, über zweifache Transformation und Sequenzierung bis zum aufgereinigten und charakterisierten Genprodukt, herzustellen. Durch die gute Reproduzierbarkeit und die stets hohen Ausbeuten an XL1-Blue-Transformanten musste zudem, ohne vorherige Prüfung mittels „dirty“-PCR, in 98 % der Fälle jeweils nur eine vereinzelte Kolonie sequenziert werden, eine weitere Zeit- und Kostenersparnis. Der Versuch die Reaktion mit entsprechenden Chemikalien und Enzymen der Arbeitsgruppe zu imitieren, schlug fehl, obwohl alle eingesetzten Produkte zuvor getestet und für funktionstüchtig befunden waren. Vergleichbare Experimente der Arbeitsgruppe Hansson (Carlsberg Research Center, Kopenhagen, Dänemark; mündliche Mitteilung) zeigten aber, dass das Nachkochen möglich ist und bei Verwendung der superkompetenten XL1-Blue-Zellen eine ausreichend hohe Anzahl an Bakterien transformiert wird. Hierbei sei darauf hingewiesen, dass der Einzel-Erwerb von dNTPs, der Enzyme *Pfu* Polymerase und *DpnI* sowie der superkompetenten Bakterienzellen aus finanzieller Sicht kaum einen Vorteil bringt. Sinnvoller scheint hier, die Verwendung halber Volumina der einzelnen Reaktanden im PCR-Ansatz. Da in der Transformation lediglich 1 μ l

des verdauten PCR-Produktes benötigt wird, scheint dieser Schritt im Volumen überdimensioniert. Entsprechende Experimente mit PCR-Ansätzen von lediglich 25 µl Volumen, welche vorbeugend Mineralöl überschichtet sind (Verdunstungsschutz), sind derzeit Gegenstand der Untersuchungen der Dissertation von C. Dietz.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Umstellung der Mutagenese auf die moderne Methode erhebliche Vorteile bietet. Das erbrachte Ergebnis, also die effiziente Herstellung neuer Cys-Mutanten des *Lhcb1*-Gens mit vergleichsweise wenig Arbeitsaufwand, rechtfertigt die höheren Grundkosten der Methode. Berücksichtigt man alle durchzuführenden Arbeitsschritte, liegen die Kosten durch Einsparung von Arbeitszeit und Sequenzierungen, insbesondere bei Verwendung geringerer Volumina, deutlich unter dem finanziellen Aufwand früherer Methoden. Hinsichtlich zukünftiger SDSL-Studien gilt dies insbesondere, wenn vor Mutagenese-Start ein möglichst vollständiges Versuchs-Konzept, wie z.B. der N-terminale „Cys-Walk“ (Müller 2008) existiert und eine Großzahl der Mutanten synchron produziert werden kann.

4.2 Herstellung von *Lhcb1*-Klonen durch Neukombination bereits existierender Klone

Zurzeit stehen der eigenen Arbeitsgruppe eine große Anzahl an Cys-Mutanten des LHCII für Markierungsexperimente mit Iodacetamid- oder Maleimidmarkern zur Verfügung. Für kommende EPR-Abstandsstudien werden weitere Mutanten produziert werden müssen, beispielsweise durch Neukombination bereits vorhandener Klone.

Eine einfache Möglichkeit hierfür ist die Restriktion zweier Mutanten, die jeweils eine der gewünschten Mutationen tragen, mit anschließender Ligation der isolierten Schnittprodukte. Anwendung fand diese Methode in der Produktion der einfach affinitätsmarkierten Klone V196Ch (Hebel, 2007) und S59Ch (Kap. I), sowie der doppelt affinitätsmarkierten Klone stC79Sh und st106/160h (Kap. II). Wie beschrieben, waren alle 4 Mutagenesen erfolgreich, jedoch (je nach Reproduzierbarkeit einzelner Arbeitsschritte) meist langwierig. Während die Restriktion meist problemlos funktionierte, waren sowohl die Wiedergewinnung der geschnittenen DNA, als auch die Ligation mit darauffolgender Transformation in JM101 oftmals schlecht reproduzierbar. So mussten beispielsweise oft hohe DNA-Verluste in den Aufreinigungsschritten, sowie geringe Transformationserfolge in *E. coli* JM101 trotz guter Kompetenz (3×10^5 Kolonie-bildende Einheiten pro µg DNA) in Kauf genommen werden. Eine Überprüfung des Ligationserfolgs solcher Kolonien erwies sich zudem als schwierig, da sich die Matrizen nur minimal von den Ligationenprodukten unterschieden. Meist konnte nur ein „screening“ mittels Sequenzierung Gewissheit bringen. In Anbetracht der aufgetretenen Probleme ist, falls möglich, die punktspezifische Mutagenese effizienter und der Mutagenese mittels Restriktion und Ligation vorzuziehen. Zu diesem Zweck wurden zwei affinitätsmarkierte Klone produziert, die kein Cys tragen [C79Sh mit C-terminalem „His₆ tag“ (Müller, 2008) und stC79Sh mit N-terminalem „Strep tag“ und C-terminalem „His₆ tag“ (Kap. II)]

und sich als Matrizen zur effizienten Herstellung neuer affinitätsmarkierter Cys-Klone eignen. Zur Produktion neuer Doppelmutanten können analog bereits vorhandene Einzelmutanten in der PCR als Matrize dienen.

4.3 Beeinflussung der Struktur des rekombinanten LHCII durch SDSL

Die Charakterisierung der überexprimierten und rückgefalteten Genprodukte neu produzierter Klone des *Lhcb1* entspricht größtenteils den Ergebnissen früherer Studien der Arbeitsgruppe Paulsen. Alle neu produzierten Mutanten zeigen hohe Expressionsausbeuten, die Aufreinigung nach Standard-Methode funktioniert einwandfrei (Hobe, 1995). Die Vereinfachung des Protokolls zur Überexpression führt zur leichten Steigerung der Protein-Ausbeute bei Einsparung von Arbeitszeit. Alle von Hebel (2007), Plunger (2007), Dietz (2008), Müller (2008) sowie die in dieser Arbeit produzierten Klone ließen sich problemlos durch Wechsel des Detergenz zu funktionalen Protein-Pigment-Komplexen rückfalten (Paulsen *et al.*, 1993). Schonend aufgereinigte Proben zeigten stets spektroskopische Eigenschaften identisch zu denen des nativen LHCII-Monomers (Rühle & Paulsen, 2004). Weder die recht konservativen Austausch der Aminosäuren Ser oder Val gegen Cys, noch die Einführung des „His₆ tag“ an den C-Terminus (Rogl *et al.*, 1998) beeinflussten die Fähigkeit zur Rückfaltung oder die Stabilität der rekombinanten Protein-Monomere signifikant. Einzige Ausnahme ist der Austausch des Val 196 in Helix H4. Rekonstituierte Monomere dieser Mutante zerfallen im Acrylamid-Gel unter schwach denaturierenden Bedingungen etwas stärker als rekombinante Pigment-Protein-Komplexe mit nativer Peptidsequenz. Diese Abweichung wurde als wenig kritisch angesehen. Mick (2004) konnte zeigen, dass bestimmte Aminosäuren-Austausche in der lumenalen Schleife des LHCII die Stabilität der Komplexe ernsthaft beeinflussen. Solche Mutanten besitzen nach schonender Aufreinigung im Deriphat-Gel Faltungsausbeuten identisch zu Komplexen mit nativer Peptidsequenz, in der deutlich stringenteren schwach denaturierenden LDS-PAGE zerfallen sie dagegen. Auch wenn der Anteil gefalteter Komplexe der Mutante V196Ch im LDS-Gel im Vergleich zum Wildtyp niedriger ist, so bildet ein großer Teil des Proteins stabile Komplexe. Wurde die gleiche Probe dagegen schonend mittels UZ aufgereinigt, war die Faltungsausbeute identisch zu der der anderen Mutanten. Ob die verminderte Stabilität nach Austausch der Position 196 in Zusammenhang mit der Bindung des Chl3 an Glutamin (Gln) 197 steht, kann nicht ausgeschlossen werden. Yang *et al.* (1999) konnten zeigen, dass der Austausch des Chl-bindenden Gln 197 gegen Glu oder Ser zum Verlust der Bindestelle führt. Rekonstituierte Mutanten wiesen entsprechend veränderte Pigmentstöchiometrien mit geringerem Chl-Anteil auf und waren zudem thermisch instabiler. Entsprechende Untersuchungen an rekonstituierten Monomeren der Mutante V196Ch durch Hebel (2007) zeigten wildtypische Absorptions-, CD- und Fluoreszenzspektren der aufgereinigten Monomere, sowohl mit als auch ohne Spinmarkierung. Auch die Stöchiometrie der gebundenen Pigmente (Chl *a/b*: 1,32) entsprach annä-

hernd den Literaturwerten für den nativen Komplex (Chl *a/b*: 1,4; Dainese & Bassi, 1991) bzw. denen des rekombinanten LHCII (Chl *a/b*: 1,1±0,2; Paulsen *et al.*, 1990). Die Betrachtung der Kristallstruktur des nativen LHCII unterstützt die Annahme, dass der Austausch bzw. die Bindung des Spinmarkers an Position 196 nicht automatisch den Verlust des Chl3 bedeutet. Auch wenn die Mutation direkt neben der Bindestelle liegt, so ist Position 196 durch die α -helikale Sekundärstruktur in ihrer Ausrichtung um ca. 90° versetzt zur Chl-Bindestelle, was die Beeinflussung der Chl-Bindung deutlich reduzieren müsste.

Neben den konservativen Aminosäuren-Austauschen des Ser bzw. Val gegen Cys, wurden auch weniger konservative Austausche getestet. Aus zahlreichen SDSL-Studien ist bekannt, dass auch weniger konservative Austausche die Struktur oder Funktionalität des mutierten Proteins nicht zwangsläufig beeinflussen. Weder der Austausch von Val, Gln bzw. Leucin (Leu) gegen Cys im Protein F-Actin (Scoville *et al.*, 2009), noch der Austausch von Phenylalanin (Phe), Lysin (Lys), Alanin (Ala), Isoleucin (Ile) oder Thr in Arrestin (Hanson *et al.*, 2007) bereiteten Probleme. Sogar ein „Cys-Walk“ von Transmembranhelix 1 zu Transmembranhelix 2 des Rhodopsin mit nicht-konservativen Austauschen von His, Tyrosin (Tyr), Prolin (Pro), Arginin (Arg) oder Asparagin (Asp) blieb ohne Folgen für Struktur oder Funktionalität des Proteins (Altenbach *et al.*, 2001). Auch in LHCII beeinflussen die wenig-konservativen Austausche des Thr 5 gegen Glu oder des Phe 40 gegen Cys nicht die Fähigkeit der Proteine monomere Pigment-Protein-Komplexe zu bilden. Die spektroskopische Untersuchung zeigte keinerlei Abweichungen (Müller, 2008).

Lediglich das Trimerisierungsverhalten letzterer Mutante (F40Ch) ist, genau wie das der Klone S29Ch, A49Ch, S106Chc, S123Ch und V196Ch, bzw. deren Derivate (sofern getestet), abweichend vom affinitätsmarkierten LHCII mit wildtypischer Proteinsequenz. Wie in Müller (2008) diskutiert, scheint der Grund für die etwas geringeren (S29Ch) bzw. deutlich geringeren Trimerisierungsausbeuten (F40Ch und A49Ch), welche zudem mit einer verminderten Trimerstabilität einhergehen, eher unabhängig von der Art des Austausches (konservativ bzw. wenig-konservativ) zu sein. Vielmehr führt die Einführung des Cys an sich, entweder indirekt durch eine Änderung der Tertiärstruktur im N-Terminus oder direkt durch Störung der Lipid-Bindung, zu einem Verlust des Phospholipids PG, welches für die Ausbildung von Trimeren essentiell ist (Nussberger *et al.*, 1993). Im Falle der Mutante S29Ch könnte die Chl *b*-Bindestelle Tyr 24 das Problem darstellen. Die Entfernung der C α -Atome beider Seitengruppen beträgt lediglich 0,7 nm. Zudem liegt Position 29 inmitten einer kurzen Schleifenstruktur, deren Konformation durch Bindung des PROXYL erheblich beeinflusst werden kann. Dadurch könnte Chl9 an der Bindung an Tyr 24 gehindert werden. Da PG (0,9 nm) bzw. Chl9 (0,4 nm) dieser Bindestelle sehr nahe kommen, könnte die Bindung bzw. Lage des PG so weit beeinflusst werden, dass die Trimerisierung verhindert wird. Wie in Müller (2008) diskutiert, könnte zudem die Ausbildung von inter-monomeren Kontakten durch

die N-terminale Domäne bei der Trimerisierung verhindert werden (Hobe, 1995). Ähnliche Konformationsänderungen, einhergehend mit dem Verlust der Trimerisierbarkeit, sind in den N-terminalen Schleifen-Positionen 40 und 49 denkbar. Abgesehen vom Verlust der Trimerisierbarkeit durch den Aminosäureaustausch an sich, zeigen neueste Berechnungen von PROXYL-Rotameren basierend auf den Strukturdaten von Standfuss *et al.* (2005) durch Dr. Y. Polyhach (AG Jeschke, ETH Zürich, Schweiz), dass PROXYL-markierte Proben der Mutanten 40 und 49 (sowie 52) durch gegenseitige sterische Behinderungen der PROXYL-Marker vermutlich nicht in der Lage sind, stabile Trimere auszubilden.

Der Grund für das untypische Trimerisierungsverhalten von Mutanten der Position 106 konnte bisher nicht geklärt werden. Insbesondere die geringen Trimerisierungsausbeuten, sowie das Auftreten atypischer CD-Trimer-Spektren nach Markierung mit Fluoreszenz-Farbstoffen (Wiegand, 2008), nicht aber nach Markierung mit den deutlich kleineren Spinmarkern, waren hier auffällig. Ähnlich abweichende CD-Spektren zeigten Trimere der Mutante 123, bzw. deren Derivate, welche im Zuge von Untersuchungen zu Konformationsänderungen der lumenalen Schleife durch Dietz (2008) durchgeführt wurden. Solche Proben entsprachen in ihrem CD-Absorptionsverhalten eher den Mutanten E107V bzw. D111V mit deutlich negativem Minimum bei 473 nm (Yang *et al.*, 2008) oder Neoxanthin-freien Trimeren des LHCII (Hobe *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu Position 106 trat in Mutanten der Position 123 diese auffällige Änderung lediglich bei unmarkierten Trimeren auf, spinmarkierte Proben zeigten das typische Trimerspektrum des C3.2h. Hierbei zeigten beide Proben wildtypische Pigmentstöchiometrien mit normalem Neoxanthingehalt. Inwiefern solche Änderungen der CD-Absorption ein Indiz für mögliche Strukturänderungen innerhalb der lumenalen Schleife des LHCII sein können (Yang *et al.*, 2008), ist derzeit Gegenstand der Untersuchungen der Dissertation von C. Dietz und soll in Kapitel III kurz diskutiert werden.

Die Trimerisierungsprobleme der spinmarkierten Mutante V196Ch (Hebel, 2007) werden bei Betrachtung der Kristallstruktur (Standfuss *et al.*, 2005) verständlich. Wie zuvor geschildert, übt der eigentliche Austausch der Aminosäure lediglich minimalen Einfluss auf die Stabilität der Komplexe aus. Auch die Trimerisierbarkeit unmarkierter Komplexe ist unauffällig. Die Spinmarkierung dagegen senkt die Ausbeute an stabilen Trimeren drastisch. Während der Spinmarker in monomerem LHCII ausreichend Platz zwischen Ch3, Ch4 und Ch12 besitzt und in die Peripherie des Proteins zeigt, wird das Raumangebot durch die Assemblierung des gegenüberliegenden Monomers im Trimer durch dessen Chlorophylle, sowie durch die Bindung des Lipids DGDG, deutlich minimiert. Berechnungen zur Simulation von PROXYL-Rotameren durch Dr. Y. Polyhach bestätigen diese Annahme. In der Simulation treten für viele Rotamere des PROXYL an Monomer A insbesondere sterische Probleme mit dem Phytyl-Schwanz des Ch12 (Monomer A) und dem Lipid DGDG (Monomer A) sowie mit Ch15 und DGDG des Monomer C auf. Die Besetzung dieser DGDG-Bindestellen mit dem nativem Lipid

in rekombinantem LHCII ist bis dato nicht geklärt, prinzipiell jedoch nicht auszuschließen. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen bestätigen einen nicht unerheblichen Anteil des nativen Lipids in den Totalpigmentextrakten, die in der Rekonstitution eingesetzt werden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass auch im Fall der Position 196 durch das Vorhandensein des Markers direkt oder indirekt die Bindung des Phospholipids PG gestört wird, welches für die Trimerisierung essentiell ist (Hobe, 1995). Alle verbleibenden Mutanten zeigen ein unauffälliges Trimerisierungsverhalten oder wurden bisher nicht auf ihr Trimerisierungsverhalten getestet [die Trimerisierung von Cys-Doppelmutanten macht erst seit Bestehen des Protokolls zur Herstellung heterogener Trimere (Kap. II) Sinn].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch das Vorhandensein zahlreicher Cofaktoren die Anzahl mutierbarer Positionen im LHCII gegenüber anderen Proteinen, wie beispielsweise dem Rhodopsin mit lediglich einem Cofaktor, deutlich eingeschränkt ist. Zukünftige Mutationen sollten aber nicht wie bisher auf eher konservative Aminosäureaustausche beschränkt bleiben, vielmehr sollte die Lage der Aminosäure Hauptaugenmerk zur Wahl der Mutationsposition sein. Zu vermeiden sind insbesondere die Mutationen von Chl-Bindestellen bzw. solche Positionen, in denen der Spinmarker die Chl-Bindung sterisch behindert. In trimeren Komplexen sollte zudem darauf geachtet werden, dass die Spinmarker sich nicht gegenseitig sterisch behindern. Zu bevorzugen sind zudem Aminosäure-Positionen die in die Peripherie des Proteins deuten (Altenbach *et al.*, 2008). Hierbei ist allerdings zwischen Monomer und Trimer zu unterscheiden, wie das Beispiel V196Ch deutlich macht. Mit Hilfe der durch die AG Jeschke durchgeführten Rotamersimulationen, lassen sich in Zukunft noch vor Mutagenese-Beginn potenzielle Mutationspositionen vorhersagen und die durch die Spinmarkierung verbundenen Risiken bezüglich der Faltbarkeit und Trimerisierbarkeit gut berechnen. Die Bindung der zahlreichen Cofaktoren sollte hierbei weniger als Nachteil angesehen werden. Durch einfache Überprüfung der spektroskopischen Eigenschaften, der Pigmentstöchiometrie, des Oligomerisierungsgrades oder der Stabilität gegenüber Hitze oder Chemikalien können neue LHCII-Mutanten hinreichend charakterisiert werden, um die Beeinflussung der Struktur durch SDSL, auch bei wenig konservativen Austauschen, ausschließen zu können.

4.4 Optimierung des EPR-Signals durch Markierung des LHCP mit PROXYL

Ein weiteres Anliegen dieser Versuchsreihe vor Beginn der eigentlichen EPR-Messungen war die Optimierung der Spinmarkierung des rekombinanten LHCII. Wie durch Jeschke & Polyhach (2007) spezifiziert werden konnte, liegt die optimale Probenkonzentration zur Messung von Spin-Spin-Abständen von etwa 4 nm im X-Band bei ca. 2 mmol/l. LHCII-Konzentrationen aufgereinigter Komplexe liegen nach Verdünnung mit Glycerin in der Regel lediglich zwischen 0,2 und 0,6 mmol/l Protein. Hinzu kommt,

dass bei Verwendung des Spinmarkers TEMPO ein Anteil des Spinsignals durch Reduktion verloren geht (Dockter, 2005), was zu einer Verlängerung der erforderlichen EPR-Messzeit und zu einer Abnahme der Messgenauigkeit führt (Jeschke & Polyhach, 2007). Durch den Austausch des Spinmarkers TEMPO gegen das Pyrrolderivat PROXYL konnte dieses Problem minimiert werden. In Nachmarkierungsversuchen konnte bewiesen werden, dass die Markierungseffizienz des LHCII durch Verwendung des PROXYL leicht gesteigert werden konnte. Ausschlaggebend für die deutliche Verbesserung des Spinsignals in aufgereinigten und aufkonzentrierten LHCII-Proben scheint aber die höhere chemische Stabilität des PROXYL im Vergleich zu TEMPO zu sein. Schon frühere Versuche zeigten, dass TEMPO bei Verwendung der Reduktionsmittel DTT oder β -Me effizient zum diamagnetischen Hydroxylamin reduziert wird (Dockter, 2005). Das Pyrrolderivat PROXYL zeigte dagegen eine deutlich gesteigerte Toleranz gegen Reduktion (Kroll, 1999). Ein einfacher Test durch Inkubation des TEMPO- bzw. PROXYL-markierten LHCP in TCA bestätigte dieses Ergebnis. In diesem Zusammenhang sollte aber erwähnt werden, dass eine zeitabhängige Reduktionsreihe von Spinmarker-Stammlösungen mit gleichen Ausgangskonzentrationen repräsentativer gewesen wäre. Zahlreiche EPR-Versuche mit PROXYL-markierten Proben bestätigten jedoch im Durchschnitt eine deutlich bessere Signalintensität gegenüber TEMPO-markierten Proben.

Ein weiterer positiver Effekt der PROXYL-Markierung zeigt sich in DEER-Abstandsmessungen. Die Verbesserung der Signalintensität an sich führt schon zur Verbesserung der erhaltenen Abstandsdaten bei gleichzeitiger Verkürzung der Messzeit. Durch Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses in DEER-Proben wird das „ill-posed problem“ der Tikhonov-Regularisierung minimiert und damit die erhaltene Abstandsinformation genauer. Im Falle des PROXYL kommt hinzu, dass der Pyrrol-Ring im Vergleich zum Pyridin-Ring des TEMPO, eine geringere interne Dynamik aufweist, bedingt durch die geringeren Unterschiede in möglichen Konformeren. Dies führt zusätzlich zu einer verbesserten Auswertbarkeit der Primärdaten und letztendlich zu genaueren Abstandsinformationen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Spinmarker TEMPO nicht weiter verwendet. Stattdessen wurden alle folgenden EPR-Experimente an PROXYL-markiertem LHCII durchgeführt (Kap. II und III).

5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in den Vorversuchen optimale Ausgangsbedingungen geschaffen werden konnten, um eine umfassende EPR-Messreihe an rekombinantem LHCII durchzuführen. Durch die Etablierung einer modernen Mutagenese-Technik und durch Optimierung der Spinmarkierung konnten insbesondere mit Hilfe der Diplomanden C. Dietz und A. Müller eine große Anzahl neuer, funktionaler LHCII-Mutanten für EPR-Experimente produziert werden (Kap. III). Bevor die entsprechenden EPR-Ergebnisse dargestellt und interpretiert werden sollen, soll im folgenden Kapitel zunächst das Problem der Herstellung heterogen spinmarkierter LHCII-Trimere (Seimetz, 2004; Dockter, 2005; Plunger, 2007) erneut aufgegriffen werden.

Kapitel II

Immobilisierung des rekombinanten LHCII mittels Affinitätschromatographie: Bindungsverhalten sowie Experimente zur Herstellung heterogener LHCII-Trimere.

1 Einleitung

Eine wichtige Voraussetzung zur Weiterentwicklung und Übertragung der EPR-DEER-Messmethodik auf Membranproteine ist das Vorhandensein von hochaufgelösten Kristallstrukturen auf atomarer Ebene. Nur so können Änderungen in der Messmethodik und daraus resultierende Primärdaten richtig interpretiert werden. Diese Voraussetzung ist für den LHCII seit mehreren Jahren gegeben (Kühlbrandt *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2004; Standfuss *et al.*, 2005), was ihn zum idealen Untersuchungsobjekt für DEER-EPR macht.

Bisherige DEER-Abstandsmessungen lieferten bereits eine Vielzahl neuer Informationen bezüglich der LHCII-Struktur in Lösung (Bender, 2004; Jeschke *et al.*, 2005) und wurden entweder an trimerisierten Cys-Einzelmutanten wie beispielsweise der Mutante S160Ch (Abb. 2.1.1 A, rechts) oder an monomeren Cys-Doppelmutanten (beispielsweise S106C/S160Ch, Abb. 2.1.1 A, links) des rekombinanten LHCII durchgeführt. Letztere Messungen stellten sich als die eleganteren heraus, da mit ihnen intramolekulare Abstandsverteilungen (also innerhalb eines Monomers) gemessen, sowie deren Änderung in Abhängigkeit von äußeren Faktoren verfolgt werden konnten. Problematisch war hierbei der direkte Vergleich mit den bekannten Daten der Kristallstruktur, da diese lediglich von trimerem LHCII existieren. Bisher gemessene Abstände in monomeren Cys-Doppelmutanten zeigten zwar eine dynamische Lage des N-Terminus gegenüber der Struktur im kristallinen Trimer (Jeschke *et al.*, 2005), dabei blieb aber unklar, ob dies eine Folge des Übergangs vom Kristall in Lösung oder vom Trimer zum Monomer darstellte.

Um solche Sachverhalte zu prüfen, ist es von großem Interesse, Spin-Spin-Kopplungen des trimeren LHCII in Lösung zu messen und mit den Kristalldaten zu vergleichen. Versucht man allerdings die intramolekularen Abstände des monomeren Komplexes in homogenen markierten Trimeren zu messen (Abb. 2.1.1 B), treten durch das Vorhandensein von insgesamt 6 Spinmarkern eine Vielzahl von möglichen Abständen auf, die in den meisten Cys-Doppelmutanten in einer breiten Abstandverteilung resultieren.

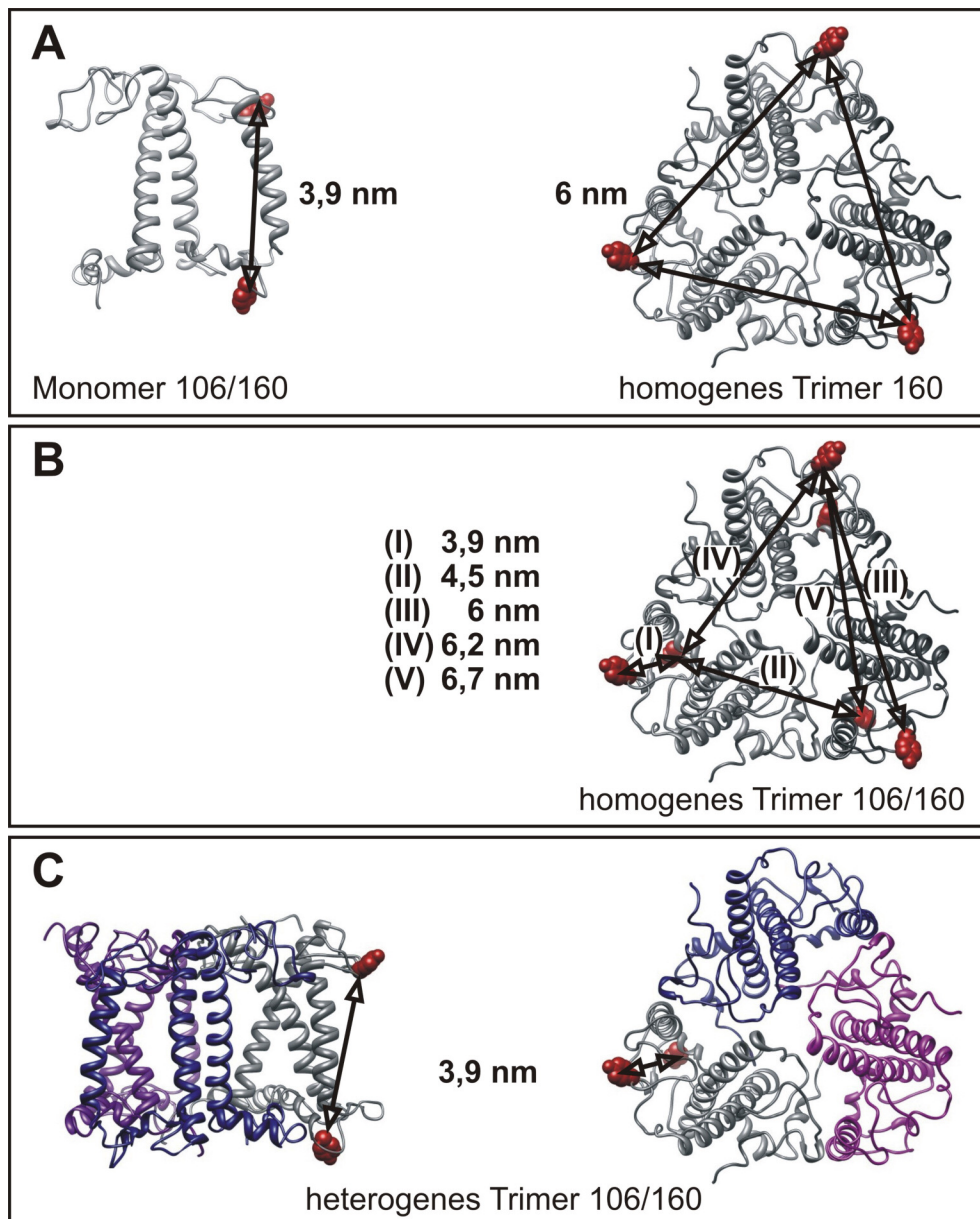


Abb. 2.1.1: Mögliche EPR-DEER Proben zur Messung von Spin-Spin-Kopplungen in monomeren und trimerem LHCII am Beispiel der Cys-Doppelmutante S106C/S160Ch (106/160) und der Cys-Einzelmutante S160Ch (160). Die angegebenen Abstände beziehen sich auf $C\alpha$ -Abstände innerhalb der LHCII-Kristallstruktur (PDB-Eintrag 2BHW). Schaubild (A) zeigt durchführbare Abstandsmessungen in doppelt markierten Monomeren (links) und in einfach markierten Trimeren (rechts). Schaubild (B) verdeutlicht das Problem der Überlappung mehrerer Spin-Spin-Abstände innerhalb eines homogen markierten Trimers aus Cys-Doppelmutanten. Zur besseren Übersichtlichkeit ist jeder mögliche Abstand nur einmal statt dreimal gezeigt. In Schaubild (C) ist ein heterogenes Trimer dargestellt, bestehend aus einem doppelt markierten Monomer (grau) sowie zwei unmarkierten Monomeren (farbig). Hier ist die intramolekulare DEER-Messung möglich. Die Abbildung wurde mit Chimera erstellt (Pettersen et al., 2004).

Solche Messungen sind nur mit Mutanten möglich, in welchen die intramolekularen Abstände des Monomers im Trimer deutlich unterschiedlich zu allen intermolekularen Abstandskombinationen sind. Die resultierende bimodale Verteilung könnte nach Messung der entsprechenden trimeren Cys-Einzelmutanten Hintergrund-korrigiert werden. Versuche zu solchen Messungen sind derzeit in Bearbeitung (Trimere V90C/S106Ch, C. Dietz), stellen aber aufgrund der zeitaufwändigen Korrekturmessungen eher einen Kompromiss dar (Abb. 2.1.1B; von fünf möglichen Abständen müssen vier korrigiert werden).

Eine elegante Lösung des Problems überlappender Abstände in homogen markierten LHCII-Trimeren bieten Abstandsmessungen in heterogen spinmarkierten Trimeren (Abb. 2.1.1 C). Solche Trimere setzen sich aus einem doppelt spinmarkierten und zwei unmarkierten LHCII-Monomeren zusammen. Zahlreiche Vorversuche zeigten allerdings, dass die Herstellung solcher Proben äußerst schwierig ist (Seimetz, 2004; Dockter, 2005; Plunger, 2007). Allen bis dato durchgeführten Versuchen war gemein, dass sie auf der Immobilisierung von trimerisiertem LHCII auf Ni²⁺-IDA-Säulen aufbauten. Die hierbei erzielten Ergebnisse waren oftmals widersprüchlich oder schlecht reproduzierbar. Hauptproblem war stets die geringe Bindungsausbeute von aufgereinigten LHCII-Trimeren an die Affinitätssäule durch eine Verhinderung der Bindung des C-terminalen Histidyl-Restes. Ziel dieser Versuchsreihe war es daher, das Bindungsverhalten des trimeren LHCII an unterschiedlichen Affinitätssäulen unter variierenden Bedingungen zu untersuchen und soweit zu optimieren, dass die Herstellung heterogen markierter LHCII-Trimere zur Durchführung von EPR-DEER Abstandsmessungen möglich ist.

2 Material und Methode

Allgemein gebräuchliche Materialien und Methoden wurden bereits in Kapitel I beschrieben und sind durch entsprechende Verweise gekennzeichnet. Im Folgenden sollen lediglich speziellen Methoden, die im Zusammenhang mit der Immobilisierung des LHCII auf Affinitätssäulen stehen, vorgestellt werden.

2.1 Molekularbiologische Herstellung von *Lhcb1*-Klonen mit N-terminalem „Strep tag“ und C-terminalem „His₆ tag“ mittels Restriktion und Ligation

Die Herstellung doppelt affinitätsmarkierter Klone des *Lhcb1* („stLhcb1h“-Klone) erfolgte mittels Restriktion und Ligation bereits vorhandener Mutanten. Solche Klone besitzen neben einem N-terminalen „Strep tag“ zusätzlich einen C-terminalen „His₆ tag“ und wurden stC79Sh („Strep tag“-C79S-„His₆ tag“, Kontroll-Protein ohne Markierungsanker) und st106/160h („Strep tag“-S106C/S160C-„His₆ tag“) benannt. Der Herstellungspro-

zess ist am Beispiel des stC79Sh in Abb. 2.2.1 schematisch dargestellt. Hierzu wurden die Plasmide der „Strep tag“-Mutante D7f.3-S2 (R. Lauterbach, unveröffentlicht) sowie die der „His₆ tag“-Mutanten C79Sh (Müller, 2008) bzw. S106C/S160Ch (Bender, 2004) jeweils mit *SacI* und *PstI* restringiert, die entstandenen Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese getrennt und zu Klonen mit zwei Affinitätsmarkern ligiert.

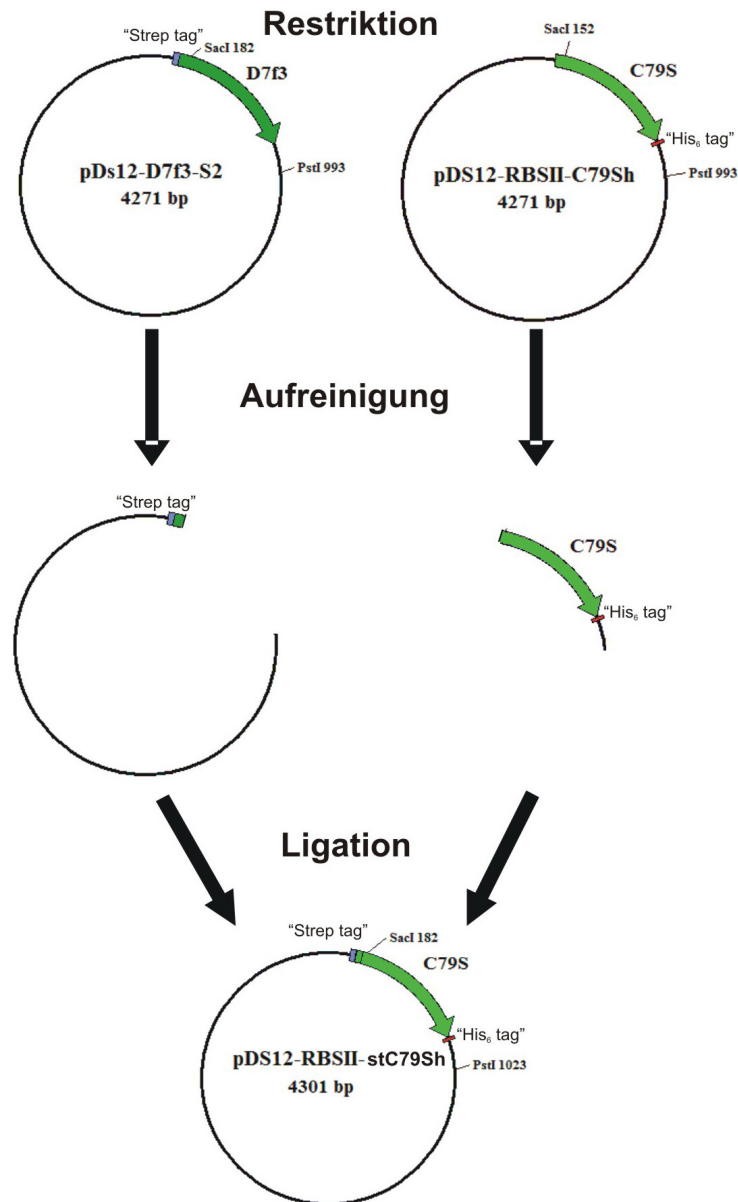


Abb. 2.2.1: Schematische Darstellung der Konstruktion von *Lhcb1*-Klonen mit N-terminalem „Strep tag“ und C-terminalem „His₆ tag“ am Beispiel der Mutante stC79Sh. Plasmide des Klons C79Sh mit C-terminalem „His₆ tag“ (Müller, 2008) und des Klons D7f.3-S2 mit N-terminalem „Strep tag“ (Lauterbach, unveröffentlicht) wurden mit *SacI* und *PstI* restringiert und die Fragmente mittels Agarose-Gel getrennt. Im Anschluss wurden das „His₆ tag“-tragende kurze Fragment von C79Sh und das „Strep tag“-tragende lange Fragment von D7f.3-S2 zu dem Expressionsvektor pDS12-RBSII-stC79Sh ligiert.

Die Auswahl der Klone hatte verschiedene Hintergründe. Bei der Cys-Doppelmutante 106/160 handelt es sich um eine der bestuntersuchten Mutanten der AG Paulsen, bezogen auf EPR-DEER Messungen. Daher lag es nahe, heterogene Trimere des Klones st106/160h mit den vorliegenden DEER-Daten der monomeren Doppelmutante 106/160 zu vergleichen. Der Klon stC79Sh dagegen wurde als Ausgangsklon zur Herstellung weiterer doppelt affinitätsmarkierter Cys-Klone mittels punktspezifischer Mutagenese produziert.

Zur Herstellung der neuen Klone wurde isolierte Plasmid-DNA (Kap. I, 2.6.3) der Klone S106C/S160Ch bzw. C79Sh und D7f.3-S2 mit den in Tab. 1.2.13 vorgestellten Restriktionsenzymen *SacI* und *PstI*, wie in Abb. 2.2.1 dargestellt, verdaut. Die Enzyme waren so gewählt, dass bei den „His₆ tag“-Klonen (C79Sh, S106C/S160Ch) neben einem ca. 3400 bp langen „Abfall“-Fragment, ein 829 bp kurzes Fragment entsteht, welches einen Teil der Sequenz des *Lhcb1* inklusive C-terminalem „His₆ tag“ enthält, nicht aber den N-Terminus. Bei der „Strep tag“-Mutante D7f.3-S2 dagegen war neben dem 829 bp kurzen „Abfall“-Fragment, ein 3430 bp langes Fragment zu erwarten, welches nur die Sequenz des N-Terminus inklusive „Strep tag“ besitzt. Die Restriktion der isolierten Plasmid-DNA einzelner Klone erfolgte jeweils als Doppelverdau unter Verwendung des Puffers NEB2 bei 37 °C wie in Tab. 2.2.1 beschrieben. Da die Aktivität beider Enzyme in dem gewählten Puffer nicht optimal ist, wurde die eingesetzte Enzym-Menge verdoppelt und die Restriktionszeit auf 3 h erhöht.

Tab. 2.2.1: Restriktionsansatz zur Herstellung von Klonen mit zwei Affinitätsmarkern. Als Plasmid-DNA wurden pDS12-RBSII-Vektoren der Klone S106C/S160Ch (Bender 2004), C79Sh (Müller 2008), sowie D7f.3-S2 (R. Lauterbach, unveröffentlicht) eingesetzt.

Material	Volumen/Menge
Puffer NEB2	1x
Plasmid-DNA	5 µg
BSA	1x
<i>SacI</i>	40 U
<i>PstI</i>	40 U
dH ₂ O	ad 50 µl

Die Denaturierung der Restriktionsendonukleasen erfolgte durch Hitzeinkubation (20 min) bei 65 °C im Wasserbad, die Isolierung der gewünschten DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese, wie zuvor in Kap. I (2.6.6.2) beschrieben.

Die Ligation wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt (Rapid Ligation Kit, Fermentas), analog zu Ligationen in Kap. I (2.6.7). In diesem Fall wurde das „His₆-tag“-codierende kurze DNA-Fragment (829 bp) des Vektors der Mutante C79Sh (bzw. S106C/S160Ch) mit dem „Strep tag“ codierenden Fragment (3430 bp) des Vektors der Mutante D7f.3-S2 verknüpft. Nach Transformation des Vektors in *E. coli* JM101-Zellen (Kap. I, 2.6.8), wurde der Ligationserfolg mittels „dirty“-PCR (Kap. I,

2.6.4.1.2) sowie durch Sequenzierung (Kap. I, 2.6.4.1.3) geprüft. Positive Klone wurden zur Herstellung von Dauerkulturen (Kap. I, 2.6.9) verwendet.

2.2 Präparative und analytische biochemische Methoden

2.2.1 Überexpression, Markierung und Rekonstitution von LHCP

Die Überexpression des Klones C3.2h (Kosemund, 1999) mit C-terminalem „His₆ tag“ sowie der Klone stC79Sh und st106/160h mit N-terminalem „Strep tag“ und C-terminalem „His₆ tag“ erfolgte wie in Kap. I (2.7.2) beschrieben. Die Markierung der Apoproteine des Klones st106/160h mit dem Fluoreszenzmarker DY731-Mal oder mit dem Spinmarker PROXYL-IA wurde in Kap. I (2.7.4) erläutert. Unmarkiertes oder markiertes Apoprotein wurde durch Zugabe eines Totalpigmentextraktes bei gleichzeitigem Detergenzwechsel zu funktionalen Pigment-Protein-Komplexen rekonstituiert (Kap. I, 2.7.5) und der Erfolg nach Aufreinigung via UZ (Kap. I, 2.7.7) mittels Fluoreszenz- (Kap. I, 2.8.2.2) und CD-Spektroskopie (Kap. I, 2.8.2.3) überprüft.

2.2.2 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist ein chromatographisches Trennverfahren zur Isolation von Molekülen aus einem Stoffgemisch. Mit Hilfe dieser Methode können beispielsweise Proteine eines Zelllysats selektiv an Oberflächen gebunden werden, während ungewollte Gemischbestandteile mit den Waschfraktionen entfernt werden. Voraussetzung ist in diesem Verfahren die spezifische Interaktion des Analyten mit einem Liganden, der an eine stationäre Matrixoberfläche gebunden ist. Diese stationäre Phase besteht häufig aus einem Gel aus quervernetzter Agarose (Sepharose®), welche mit einem geeigneten Liganden bestückt ist. Als Ligand kann, wie in den folgenden Abschnitten erläutert, beispielsweise Nickel, welches spezifisch die Aminosäure His komplexiert, oder „Strep-Tactin®“ (kurz Strep-Tactin) dienen, welches das Peptid „Strep tag“ mit hoher Affinität bindet. Insbesondere das Arbeiten mit rekombinanten Proteinen kann durch die Insertion entsprechender Affinitätsmarker deutlich erleichtert werden und eröffnet, neben der Möglichkeit der Protein-Aufreinigung, oftmals weitere Möglichkeiten. Im Falle des LHCII beispielsweise ist durch die Immobilisierung eine gezielte Trimerisierung auf der Säulenmatrix möglich. Zum besseren Verständnis werden im Folgenden verwendete Methoden der Affinitätschromatographie zur Immobilisierung und Trimerisierung des LHCII im Detail dargestellt.

2.2.2.1 Immobilisierung des LHCII mittels „His₆ tag“

Die folgenden Versuche zur Untersuchung der Wechselwirkung des C-terminalen „His₆ tag“ mit Nickel-aktivierten Oberflächen wurden alle mit der LHCII-Mutante C3.2h getestet, welche der Aminosäuresequenz des murenen Lhcb1 mit angehängtem C-terminalen „His₆ tag“ entspricht. Die Rekonstitution zu funktionalen Protein-Pigment-

Komplexen nach der Detergenzwechsel-Methode sowie die spektroskopische Charakterisierung der aufgereinigten Komplexe erfolgte wie vorher beschrieben (Kap. II, 2.2.1).

2.2.2.1.1 „His₆ tag“/Ni²⁺-NTA-Sepharose®

Wie in Kap. I (2.7.6) erläutert, ist der „His₆ tag“ ein gebräuchliches Aminosäuresequenz-Motiv in rekombinanten Proteinen zur Durchführung der Affinitätschromatographie. Ein „His₆ tag“ tragendes Protein kann über die His an Ni²⁺-Ionen komplex gebunden werden, welche wiederum an verschiedene Formen der Sepharose komplex gebunden werden können. Ein Beispiel hierfür ist die in Abb. 2.2.2 dargestellte Nitrioloessigsäure-Sepharose (NTA-Sepharose, Qiagen; rot gefärbt), welche Ni²⁺ an vier Koordinationsstellen komplexiert. Somit bleiben zwei Bindestellen frei, welche durch zwei His eines „His₆ tag“ (blau dargestellt) besetzt werden können.

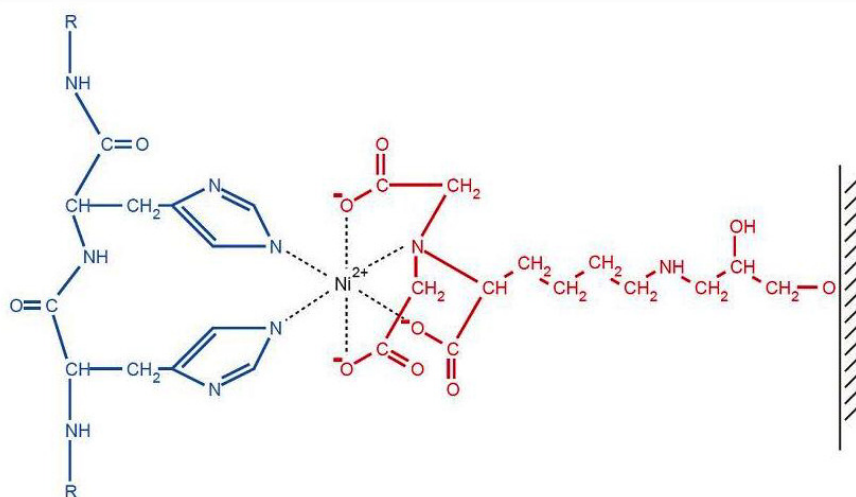


Abb. 2.2.2: „His₆ tag“/Ni²⁺-NTA-Sepharose-Interaktion (nach Qiagen, Hilden 2003). Darstellung der Komplexbildung des Ni²⁺ an die vier Koordinationsstellen der Nitrioloessigsäure (rot). Die zwei verbleibenden Bindungsstellen des Ni²⁺ können durch zwei His (blau) besetzt werden.

Die Stabilität des His-Ni²⁺-Komplexes kann durch verschiedene Chemikalien beeinflusst werden. Neben den in Tab. 2.2.2 aufgelisteten Reagenzien ist eine ausführliche Beschreibung in dem Protokoll-Buch *The QIAexpressionist* (S. 74/75, Qiagen, Hilden 2003) zu finden.

Tab. 2.2.2: Liste der mit dem „His₆ tag“/Ni²⁺-NTA-Sepharose-System kompatiblen Reagenzien mit einsetzbaren Höchstkonzentrationen (Qiagen, Hilden 2003).

Reagenz	Konzentration
Reduktionsmittel	
DTT	1 mmol/l
β-Me	20 mmol/l
Detergentien	
Nicht-ionische Detergentien (TX, Tween)	2 %
kationische Detergentien	1 %
anionische Detergentien (SDS)	0,3 %
zwitterionische Detergentien (CHAPS)	1 %
Andere	
EDTA	1 mmo/l
Ethanol	20 %
Glycerol	50 %
Imidazol	>100 mmol/l
Harnstoff	8 mol/l
GndHCl	6 mol/l
NaCl	2 mol/l
CaCl ₂	5 mmol/l
MgCl ₂	4 mol/l
Tris, HEPES, MOPS	100 mmol/l

Die Immobilisierung mit einhergehender Trimerisierung des rekombinanten LHCII via „His₆ tag“/Ni²⁺-NTA-Sepharose-System erfolgte analog zur Immobilisierung auf Ni²⁺-IDA-Sepharose (Kap. I, 2.7.6). Apoprotein der Mutante C3.2h wurde mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet und auf Säulen aufgetragen, welche nach Standard-Protokoll mit Ni²⁺-Ionen beschickt und äquilibriert worden waren. Die Waschschrirte mit OG- und TX-Puffer erfolgten mit entsprechenden Volumina, die Elution mit 300 mM Imidazol (Eluat-Puffer).

2.2.2.1.2 „His₆ tag“/Ni²⁺-IDA-Sepharose[®] und „His₆ tag“/Ni²⁺-IDA-Fractogel[®]

Neben der zuvor beschriebenen NTA-Sepharose wurde zudem die Bindung des LHCII mit C-terminalem „His₆ tag“ an Ni²⁺-IDA-Sepharose[®] der Firma GE Healthcare sowie Ni²⁺-IDA-Fractogel[®] der Firma Novagen/Merck getestet. Wie schon in Kap. I (2.7.6) gezeigt, werden an IDA im Gegensatz zu NTA-Sepharose die Ni²⁺-Ionen über lediglich drei Koordinationsstellen komplex gebunden. Somit ist das Nickel im Vergleich zur NTA-Sepharose weniger fest gebunden, umgekehrt bleiben drei Koordinationsstellen zur Bindung des „His₆ tag“ (Abb. 1.2.10). Die Immobilisierung mit einhergehender Trimerisierung der LHCII-Mutante C3.2h auf Ni²⁺-IDA-Sepharose erfolgte wie zuvor in Kap. I (2.7.6) beschrieben. Im Unterschied zu Sepharose[®], einer Matrix basierend auf Agarose, besteht Fractogel aus einem ungeladenen, synthetischen Polymer auf Methacrylat-Basis mit hoher chemischer Stabilität und Porengrößen von 40-90 µm. Die

Polymere bilden lange „Tentakel“ aus, welche an die Fractogel-Matrix gebunden sind und in der Peripherie über die IDA-Gruppen mit Kationen wie beispielsweise Ni^{2+} beladen werden können. Hauptvorteil dieser Matrix ist laut Hersteller die geringe sterische Behinderung, da durch die Tentakel-Strukturen auch schwer zugängliche Molekülbereiche erreichen werden können.

Die Vorbereitung und Nickel-Beladung der IDA-Fractogel-Matrix richtete sich weitestgehend nach den Vorgaben des Herstellers Novagen. Hierzu wurde die Fractogel-Agarose in Chromatographie-Säulen überführt (hierbei gilt: 1 ml sedimentiertes Fractogel pro 1 mg Protein) und mit zwei Säulenvolumen (SV) Aqua dest. gewaschen. Die Nickel-Beladung erfolgte durch Zugabe von 5 SV NiSO_4 . Hierbei färbte sich die Matrix nicht wie von IDA-Sepharose gewohnt stark grün, sondern lediglich schwach grün. Auch der gewohnte Farbumschlag von grün nach blau durch Äquilibrieren der Säule mit zwei SV Äquilibrierungspuffer fiel schwach aus. Der Versuchsvorschrift folgend wurde zudem mit einem SV 300 mM NaCl nachgespült und mit drei SV kaltem (4 °C) OG-Puffer die Säule vorbereitet. Analog zum Sepharose-Protokoll (Kap. I, 2.7.6) wurde die Rekonstitutionslösung aufgetragen und nach langsamen Durchlauf mit drei SV OG-Puffer und zwei SV TX-Puffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Komplexe von der schwach grün gefärbten Matrix erfolgte durch Zugabe von 300 mmol/l Imidazol im Eluat-Puffer, grünliche Fraktionen des Eluats wurden aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung dunkel auf Eis gelagert. Die Regeneration der Fractogel-Agarose erfolgte nach Herstellerangaben durch Waschen mit drei SV Regenerationspuffer, einem SV HCl, zwei SV NaCl, 10 SV NaOH, zwei SV NaCl und 10 SV Regenerationspuffer. Nach Äquilibrierung mit 10 SV Äquilibrierungspuffer konnte die Fractogel-Agarose erneut mit Ni^{2+} beladen werden.

Material:

Äquilibrierungspuffer:	300 mmol/l NaCl 25 mmol/l Natrium-Phosphat(pH8,0)
Spüllösung:	300 mmol/l NaCl
NiSO_4 :	100 mmol/l
OG-Puffer:	1 % OG (w/v) 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 9,0) 12,5 % Saccharose (w/v)
TX-Puffer:	0,05 % TX (v/v) 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 7,5) 0,1 mg/ml PG

Eluat-Puffer mit Imidazol:	0,05 % TX (v/v) 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 7,5) 0,1 mg/ml PG Imidazol 300 mmol/l
Regenerations-Puffer:	300 mmol/l NaCl 100 mmol/l EDTA 20 mmol/l Natrium-Phosphat(pH7,9)

2.2.2.1.3 Immobilisierung des LHCII mittels „His₆ tag“ nach Ultrazentrifugation

Um trimere LHCII nach Oligomerisierung an der Ni-Säule erneut an Ni²⁺-Sephrose zu binden, ist es unausweichlich, das Imidazol aus dem Protein-haltigen Eluat zu entfernen. Eine Möglichkeit hierzu ist die Aufreinigung des Eluats mittels UZ. Um die Auswirkung der Ultrazentrifugation bzw. des Lösungsmittels auf das Bindungsverhalten des „His₆ tag“ an Ni²⁺-Sephrose zu testen, wurde C3.2h durch Detergenzwechsel rekonstituiert (Kap. I, 2.7.5). Ein Aliquot der Rekonstitution wurde mittels Ni-Säule trimerisiert (Kap. I, 2.7.6) und via UZ aufgereinigt (Kap. I, 2.7.7). Sowohl monomere als auch trimere LHCII in LM-haltiger Saccharoselösung wurden erneut nach Standardprotokoll in (Kap. I, 2.7.6) auf IDA-Sephrose aufgetragen, als Referenz diente ein Aliquot der ursprünglichen C3.2h Rekonstitutionslösung. Nach den entsprechenden Waschschritten wurden die Eluate der Ni-Säule erneut durch UZ aufgereinigt und sowohl CD- (Kap. I, 2.8.2.3) als auch Fluoreszenz-spektroskopisch (Kap. I, 2.8.2.2) untersucht. Die Berechnung der Trimerausbeute in den einzelnen Teilversuchen erfolgte durch Konzentrationsbestimmung von LHCII nach Butler & Kühlbrandt (1988; Kap. I, 2.7.9) und Volumenbestimmung.

2.2.2.1.4 Einfluss von Ni²⁺-Ionen in der Proteinlösung auf die Immobilisierung des „His₆ tag“

Ein Grund für eine verringerte Bindungsausbeute von LHCII-Trimeren an Ni-Säulen könnte die Blockierung des „His₆ tag“ durch Ni²⁺-Ionen sein, welche möglicherweise aus der vorherigen Oligomerisierung auf der Ni-Säule verschleppt werden. Um die Auswirkung einer Verunreinigung der Proteinlösung mit Ni²⁺-Ionen auf das Bindungsverhalten des „His₆ tag“ an Ni²⁺-Sephrose zu testen, wurde C3.2h durch Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet (Kap. I, 2.7.5), mit 0,2 mmol/l bzw. 2 mmol/l NiCl₂-Lösung versetzt und nach Standard-Rezept auf die Ni-Säule aufgetragen (Kap. I, 2.7.6) und nach Standard-Protokoll trimerisiert. Als Referenz in der Trimerisierung diente die gleiche C3.2h Rekonstitutionslösung ohne NiCl₂. Die Eluate der Ni-Säule wurden mittels UZ aufgereinigt (Kap. I, 2.7.7) und sowohl CD- (Kap. I, 2.8.2.3) als auch Fluoreszenz-spektroskopisch (Kap. I, 2.8.2.2) untersucht.

2.2.2.1.5 Einfluss von Detergentien auf die Immobilisierung des „His₆ tag“

Um den Einfluss verschiedener Detergentien auf die Bindung des „His₆ tag“ der Trimeren an immobilisierte Ni²⁺-Ionen Ni-Kationen zu prüfen, wurde C3.2h rekonstituiert (Kap. I, 2.7.5), auf der Ni-Säule trimerisiert (Kap. I, 2.7.6) und mittels UZ aufgereinigt (Kap. I, 2.7.7). Die LHCII-Trimere wurden aus den Gradienten abgezogen, Absorptions-, Fluoreszenz und CD-spektroskopisch untersucht (Kap. I, 2.8.2) und wie bei Hobe (1995) beschrieben mittels Zugabe von KCl und „Bio Beads“ ausgefällt. Hierbei wurden je 1 ml 0,1%ige LM-Lösung 22 mg KCl und 34 mg entgaste „Bio Beads“ hinzugefügt und über Nacht im Kühlraum bei 4 °C gedreht. Am folgenden Tag wurden die Detergenzbindenden „Bio Beads“ entfernt und gegen die dreifache Menge frischer „Bio Beads“ ersetzt. Dieser Schritt wurde mehrfach stündlich wiederholt. Die ausgefallenen Trimere wurden aliquotiert, abzentrifugiert (Überstand verworfen) und jeweils in 500 µl Detergenzlösung bzw. Detergenzhaltigem Puffer auf Eis solubilisiert.

Es wurden folgende Kombinationen getestet: zum einen die Bindung von Trimeren (jeweils ca. 40 µg) in 1%iger OG-Lösung auf Ni²⁺-IDA-Sepharose, Ni²⁺-IDA-Fractogel und Ni²⁺-NTA-Sepharose. Die einzelnen Säulen wurden wie zuvor beschrieben präpariert (Kap. II, 2.2.2.1), die Proben aufgetragen und gewaschen. Zum anderen wurden ca. 55 µg der ausgefallenen Trimere in 1 % TX bzw. zu je 30 µg in jeweils verschiedenen LM- oder TX-haltigen Saccharose-Puffern rückgelöst und nach Standard-Methode auf Ni²⁺-IDA-Sepharose aufgetragen, gewaschen und eluiert (Kap. I, 2.7.6). In einem weiteren Ansatz wurden ca. 40 µg der gefällten Trimere als Referenz in 1%iger OG-Lösung solubilisiert. Außerdem wurden zwei Aliquots zu je 50 µg in zwei unterschiedlichen Rekonstitutions-„Mock“-Puffern rückgelöst. Diese wurden durch „Nachkochen“ einer Detergenzwechsel-Rekonstitution ohne Apoprotein hergestellt, wobei einer der Puffer mit Totalpigmentextrakt versetzt wurde, der zweite jedoch nicht. Nach KCl-Zugabe wurde analog zur Standard-Rekonstitution das ausgefallte KDS gründlich abzentrifugiert. Der verbleibende Überstand der einzelnen „Mock“-Puffer wurde zum Lösen je eines Trimer-Aliquots verwendet. Die rückgelösten Trimere wurden nach Standard-Protokoll auf Ni²⁺-IDA-Sepharose aufgetragen, gewaschen und eluiert (Kap. I, 2.7.6). Die Eluate der Ni-Säulen wurden erneut durch UZ aufgereinigt (Kap. I, 2.7.7) und sowohl CD- (Kap. I, 2.8.2.3) als auch Fluoreszenz-spektroskopisch (Kap. I, 2.8.2.2) untersucht.

Material:

„Bio Beads“ (entgast)

OG-Lösung (1 %)

TX-Lösung (1 %)

Saccharose-Puffer LM:

0,5 mol/l Saccharose

5 mmol/l Tricine pH 7,8

0,1 % LM

Saccharose-Puffer TX	0,5 mol/l Saccharose
	5 mmol/l Tricine pH 7,8
	0,05 % TX

Rekonstitutions-„Mock“-Puffer ohne Lhcb1 und ohne Pigment-Totalextrakt

Rekonstitutions-„Mock“-Puffer ohne Lhcb1, aber mit Pigment-Totalextrakt

2.2.2.2 Immobilisierung des LHCII mittels „Strep tag“/Strep-Tactin-System

Eine weitere Möglichkeit der Immobilisierung rekombinanter Proteine bietet die Verwendung des sogenannten „Strep tag“, eines kurzen Peptidmotivs mit hoher Affinität zu Strep-Tactin-Sepharose (Abb. 2.2.3; 8 Aminosäuren: WSHPQFEK). Analog zur Insertion des Hexahistidyl-Restes kann dieses Peptidmotiv ebenfalls molekularbiologisch mit rekombinanten Proteinen fusioniert werden (Lauterbach, unveröffentlicht). Dieses von der Firma IBA (Institut für Bioanalytik, Göttingen) entwickelte System zur Affinitätschromatographie basiert auf der Bindung des Biotin (Vitamin H) an Streptavidin (aus *Streptomyces avidinii*) und stellt eine hochaffine nichtkovalente Bindung dar. Streptavidin wurde genetisch zu Strep-Tactin modifiziert und besitzt eine hundertfach gesteigerte Affinität zum „Strep tag“.

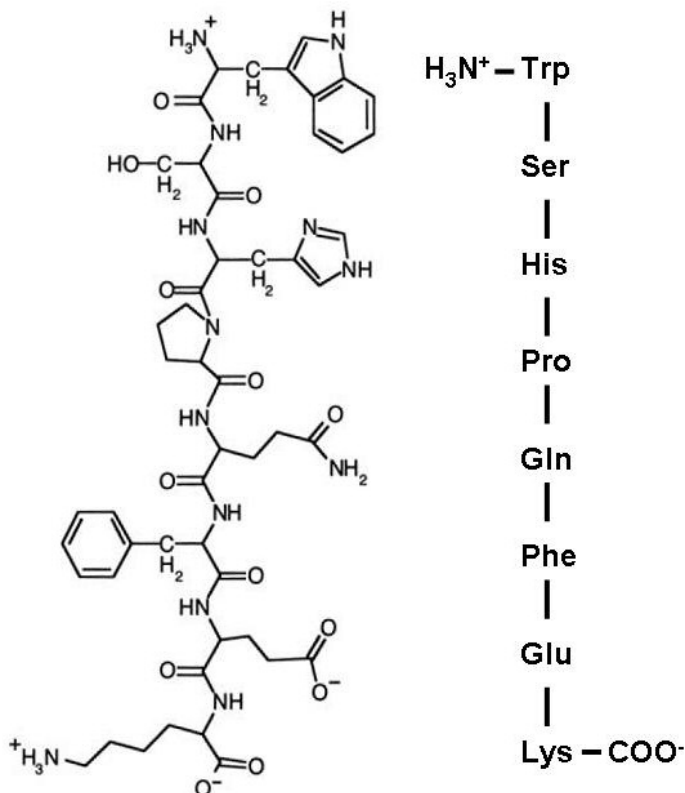


Abb. 2.2.3: Strukturformel und Aminosäuresequenz des „Strep tag“

Wie schon in Kap. I (2.7.6) für den „His₆ tag“ beschrieben, sind auch für den „Strep tag“ aufgrund seiner geringen Größe keine Interaktionen mit dem Fusionspartner zu erwarten.

ten, so dass die Bioaktivität des Fusionsproteins nicht beeinflusst werden sollte. Um eine effiziente Bindung des „Strep tag“ an Strep-Tactin-Sepharose zu erreichen, sollte allerdings die Verwendung bestimmter Chemikalien, wie in Tab. 2.2.3 aufgeführt, eingeschränkt werden.

Tab. 2.2.3: Liste der mit dem „Strep tag“/Strep-Tactin-System kompatiblen Reagenzien mit einsetzbaren Höchstkonzentrationen (IBA, Göttingen).

Reagenz	Konzentration
Reduktionsmittel	
DTT	50 mmol/l
β-Me	50 mmol/l
Nicht-ionische Detergentien	
OG	2,34 %
LM	0,007 %
TX	2 %
DM (Decyl- β-D-Maltosid)	0,35 %
NG (N-nonyl- β-D-Glucopyranosid)	0,2 %
Tween 20	2 %
Ionische Detergentien	
SDS	0,1 %
Zwitterionische Detergentien	
CHAPS	0,1 %
Andere	
EDTA	50 mmol/l
Ethanol	10 %
Glycerol	25 %
Imidazol	250 mmol/l
Harnstoff	1 mol/l
Guanidin	1 mol/l
NaCl	5 mol/l
CaCl ₂	1 mol/l
MgCl ₂	1 mol/l
Ammoniumsulfat	2 mol/l

Insbesondere die Detergentien LM, OG oder TX sowie die in Rekonstitutionsversuchen notwendigen Reduktionsmittel DTT oder β-Me, dürfen nur bis zu bestimmten Konzentrationen eingesetzt werden. Werden diese Richtlinien befolgt, ist es nach Angaben des Herstellers möglich 50 bis 100 nmol rekombinantes Protein pro 1 ml sedimentierten Säulenmaterials zu binden (entspricht 1,25 bis 2,5 mg LHCP pro 1 ml Säulenmaterial).

Die Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgt, wie in Abb. 2.2.4 gezeigt, in mehreren Binde- und Waschschrinen. Nach Bindung des Fusionsproteins an Strep-Tactin (1), werden ungebundene Proteine mit einem Waschpuffer entfernt (2). Die Elution des aufgereinigten Fusionsproteins erfolgt durch kompetitive Bindung des Desthiobiotin, einem Biotin-Derivat, welches im Gegensatz zu Biotin reversibel an Strep-Tactin bindet (3).

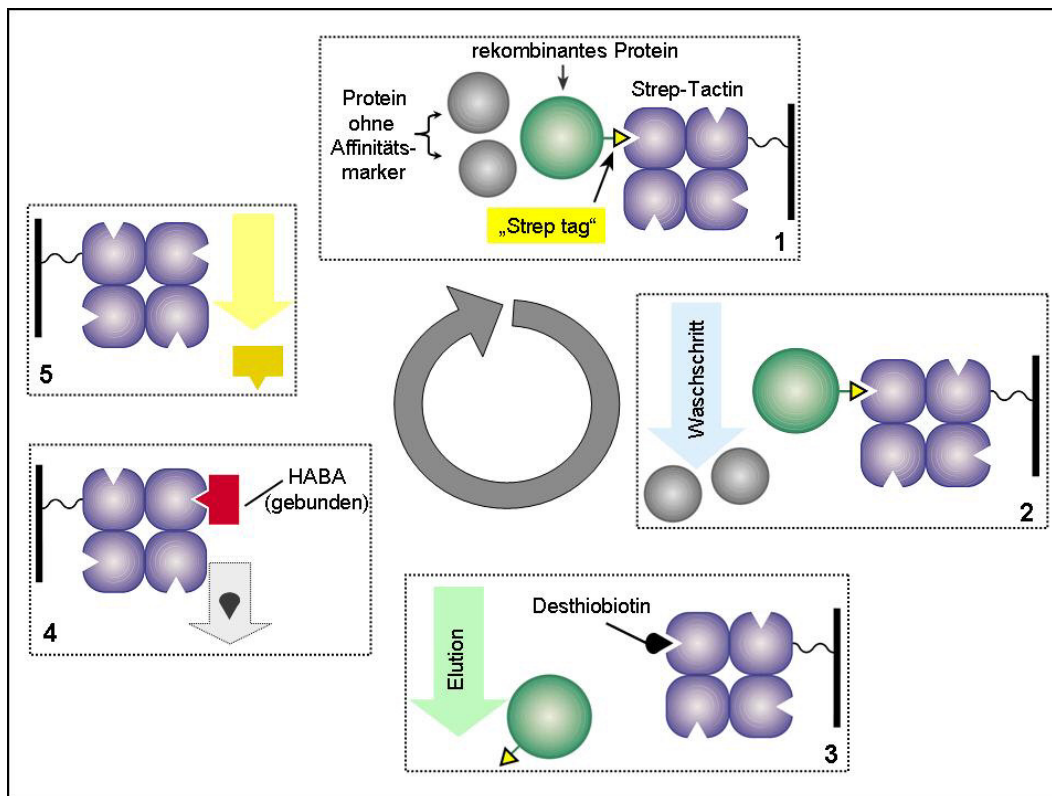


Abb. 2.2.4: Aufreinigung eines affinitätsmarkierten, rekombinanten Fusionsproteins mittels des „Strep tag“/Strep-Tactin-System (abgeändert nach IBA, Göttingen), Erläuterungen im Text.

Zur Regeneration der Säulenmatrix wird zunächst Desthiobiotin durch die Bindung von HABA (4-Hydroxy-Azobenzen-2-Carbonsäure) kompetitiv verdrängt und eluiert (4). Die Bindung an Strep-Tactin führt zu einem Farbumschlag des HABA von Gelb zu intensivem Rot (4). Erfolgt dieser Farbumschlag, kann davon ausgegangen werden, dass die Säulenmatrix sowohl Fusionsprotein-frei als auch Desthiobiotin-frei ist. Durch ausreichendes Waschen der Matrix mit einem entsprechenden Waschpuffer kann in einem letzten Arbeitsschritt das HABA eluiert werden, wobei wieder der Farbumschlag zu Gelb erfolgt. Zurück bleibt die regenerierte grünlich gefärbte Säulenmatrix.

2.2.2.2.1 Immobilisierung und Trimerisierung von rekombinantem LHCII mittels „Strep tag“

Wie zuvor in diesem Kapitel beschrieben, wurde der „Strep tag“ molekularbiologisch mit dem N-Terminus des Lhcb1 fusioniert, so dass das Peptid die N-proximale Sequenz der Domäne bildet und eine hohe Zugänglichkeit (Müller, 2008) für die Bindestellen des Strep-Tactin zeigen sollte. Ziel war es den Affinitätsmarker zum einen auf seine Nutzung zur effizienten Trimerisierung des rekonstituierten LHCII zu testen (R. Lauterbach, unveröffentlicht) und zum anderen auf die Möglichkeit der Bindung von LHCII-Trimeren. Um die dazu nötige, vom „Strep tag“ unabhängige, Trimerisierung zu

ermöglichen, waren beide Mutanten zusätzlich mit einem C-terminalen „His₆ tag“ ausgestattet.

Die Überexpression (Kap. I, 2.7.2) des Klones C3.2h mit C-terminalem „His₆ tag“ und der doppelt affinitätsmarkierten Klone stC79Sh und st106/160h sowie die Rekonstitution der aufgereinigten Apoproteine zu funktionalen Protein-Pigment-Komplexen nach der Detergenzwechsel-Methode (Kap. I, 2.7.5) erfolgten wie zuvor beschrieben. Die Trimerisierung mittels N-terminalem „Strep tag“ erfolgte auf 500 µl Strep-Tactin pro 500 µg LHCII. Hierbei sei darauf hingewiesen, dass die verwendeten Puffer sich teilweise in ihrem pH-Wert von entsprechenden „His₆ tag“/Ni-Säulen-Puffern unterscheiden. Zur Oligomerisierung wurde 1 SV Strep-Tactin sedimentiert und mit je 4 SV Puffer-W und 4 SV OG-Puffer (4 °C) äquilibriert. Nach Auftragen und Durchlaufen der Proteinelösung im Kühlraum (4 °C), wurden ungebundene Komplexe durch Waschen mit 4 SV OG-Puffer entfernt und die Trimerisierung durch Auftrag von 4 SV PG-haltigem TX-Puffer induziert. Letztlich wurden gebundene Komplexe mittels 4 SV BE-Puffer eluiert, grüne Fraktionen aufgefangen und mittels UZ (Kap. I, 2.7.7) zur spektroskopischen Charakterisierung (Kap. I, 2.8.2.2 und 2.8.2.3) aufgereinigt. Die Regeneration des Säulenmaterials erfolgte durch Waschen mit mehreren SV Regenerations- und Waschpuffer, sowie mit 0,1 % SDS, 20 % EtOH, 50 mmol/l EDTA sowie Aqua dest. .

Material:

Puffer-W:	100 mmol/l Tris/HCl (pH 8) 150 mmol/l NaCl
OG-Puffer:	1 % OG (w/v) 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 8) 12,5 % Sacchrose (w/v)
TX-Puffer:	0,05 % TX (v/v) 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 7,5) 0,1 mg/ml PG
D-Biotin-Eluat (BE)-Puffer:	0,05 % TX (v/v) 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 8) 0,1 mg/ml PG 2,5 mmol/l D-Biotin
Regenerations-Puffer:	1 mmol/l Tris/ HCl (pH 8) 0,15 mol/l NaCl 1 mmol/l EDTA 1 mmol/l HABA

Wasch-Puffer:	1 mmol/l Tris/ HCl (pH 8)
	0,15 mol/l NaCl
	1 mmol/l EDTA
0,1 % SDS	
20 % EtOH	
50 mmol/l EDTA	

2.2.2.2 Aufeinanderfolgende Immobilisierung von Klonen mit zwei Affinitätsmarkern: Trimerisierung mittels C-terminalem „His₆ tag“ und nachfolgende Bindung der Trimere mittels N-terminalem „Strep tag“

Um die Fähigkeit der Immobilisierung des trimeren LHCII an Strep-Tactin zu testen, wurde in einem ersten Versuchsansatz stC79Sh nach Standard-Protokoll rekonstituiert (Kap. I, 2.7.5) und mittels „His₆ tag“ an Ni²⁺-IDA-Sepharose trimerisiert (Kap. I, 2.7.6). Ein Aliquot der trimeren Komplexe wurde mittels UZ aufgereinigt (Kap. I, 2.7.7), das andere auf Eis dunkel gelagert. Weiterhin wurden, wie zuvor beschrieben (Kap. II, 2.2.2.1), zwei Strep-Tactin-Säulen vorbereitet, wobei die Säulen nach Äquillibrieren direkt mit TX- statt mit OG-Puffer gespült wurden, da dieser bereits PG enthält und somit gewährleistet ist, dass Trimere nicht zu Monomeren zerfallen. Zum Vergleich wurde eine der beiden Strep-Tactin-Säulen mit dem unaufgereinigten Ni-Säulen-Eluat beschickt, die andere mit aufgereinigten Trimeren. Der folgende Waschschrift geschah mit TX-Puffer, die Elution und die Regeneration des Säulenmaterials erfolgten wie zuvor berichtet. Die Eluate wurden durch UZ aufgereinigt (Kap. I, 2.7.7) und sowohl CD- (Kap. I, 2.8.2.3) als auch Fluoreszenz-spektroskopisch (Kap. I, 2.8.2.2) untersucht.

2.2.2.3 Herstellung heterogen markierter Trimere des rekombinanten LHCII

Wie im Ergebnisteil dieses Kapitels beschrieben, wurden unterschiedliche Ansätze zur Herstellung heterogener LHCII-Trimere durchgeführt. Zum Test der Methode wurde eine Mischung aus rekonstituierten Monomeren der Mutante st106/160h (Dy731-markiert; Kap. I, 2.7.4.2) und Monomeren von C3.2h (Verhältnis 1:5) auf der Ni-Säule trimerisiert (Kap. I, 2.7.6) und ohne vorherige Aufreinigung auf Strep-Tactin immobilisiert. Das Eluat wurde mittels denaturierender SDS-PAGE analysiert (Kap. I, 2.8.1.1) sowie durch UZ aufgereinigt (Kap. I, 2.7.7) und sowohl CD- (Kap. I, 2.8.2.3) als auch Fluoreszenz-spektroskopisch (Kap. I, 2.8.2.2) untersucht. Zur Herstellung einer EPR-DEER-Probe aus heterogenen Trimeren wurden 5 mg PROXYL-markierte (Kap. I, 2.7.4.1) Monomere von st106/160h mit C3.2h-Monomeren im Verhältnis 1:8 gemischt und mittels „His₆ tag“ trimerisiert (Kap. I, 2.7.6). Ohne vorherige Aufreinigung wurde das Ni-Säulen-Eluat sofort an Strep-Tactin gebunden, mit TX-Puffer gewaschen, eluiert und mittels UZ aufgereinigt. Die isolierten trimeren Komplexe wurden auf eine Konzentration von 520 µmol/l LHCII aufkonzentriert, mit Glycerin versetzt (40 %) und von Prof. Dr. Gunnar Jeschke an der ETH Zürich im DEER-Spektrometer abstandsvermessen.

3 Ergebnisse

3.1 Versuche zur Bindung des LHCII mittels C-terminalem „His₆ tag“

Die nachfolgend beschriebene Versuchsreihe zur Untersuchung der Immobilisierung des aufgereinigten LHCII mittels C-terminalem „His₆ tag“ stellt eine Fortsetzung früherer Experimente zur Herstellung des heterogen trimerisierten LHCII dar (Seimetz, 2004; Dockter, 2005). Grundlage früherer Versuche war die Idee spinmarkierte LHCII-Monomere, die gleichzeitig einen C-terminalen „His₆ tag“ tragen, mit einem Überschuss an LHCII zu mischen, der weder den Spinmarker noch den Affinitätsmarker besitzt. Nach Trimerisierung dieses Mischansatzes in Liposomen (Boggasch, 2006) besitzen dann alle entstehenden Trimere eine zueinander proportionale Zahl an Spinmarkierungen und Affinitätsmarkern mit entweder keinem bzw. einem, zwei oder drei markierten Monomeren. Belädt man eine Ni-Säule mit diesem Gemisch aus Trimeren, sollten Trimere ohne „His₆ tag“ nicht binden, solche mit einem „His₆ tag“ dagegen binden, aber schwächer als Trimere mit zwei oder drei „His₆ tag“. Dieses unterschiedlich starke Bindungsverhalten könnte man sich zunutze machen und die verschiedenen Trimerkombinationen mit einem steigenden Imidazolgradienten nacheinander von der Säule eluieren und somit von einander trennen. Nach Identifizierung der einfach markierten, heterogenen Trimere, beispielsweise durch Vorversuche mit Fluoreszenz-markiertem LHCII, könnten entsprechende EPR-Proben produziert werden.

Voraussetzung dieses Versuchsprotokolls ist die Immobilisierung des trimerisierten LHCII auf der Ni-Säule. In diversen Vorversuchen (Seimetz, 2004; Dockter, 2005; Plunger, 2007) scheiterte die Probenherstellung an diesem Protokollschritt. Daher soll im folgenden Abschnitt die Bindung des LHCII mittels C-terminalem „His₆ tag“ an unterschiedliche Ni²⁺-Affinitätssäulen unter variierenden Bedingungen getestet werden.

3.1.1 Trimerisierungs-Ausbeuten bei Verwendung unterschiedlicher Säulenmaterialien

In einem Vorversuch wurde das Bindungsverhalten des rekonstituierten LHCII an unterschiedliche Säulenmaterialien getestet (IDA-Sepharose, IDA-Fractogel und NTA-Sepharose). Das grundlegende Bindungsprinzip, nämlich die Immobilisierung der Proteine mittels C-terminalem „His₆ tag“ an komplex gebundenes Nickel, war allen Materialien gemein. Unterschiede gab es lediglich im Aufbau der jeweiligen Säulenmatrizen, was zuvor schon erläutert wurde (Kap. II, 2.2.2.1). So bilden die Polymere des IDA-Fractogels, im Gegensatz zu IDA-Sepharose, lange „Tentakel“ aus, die, terminal mit IDA-Gruppen bestückt, auch einen sterisch schwer erreichbaren „His₆ tag“ binden können. Ein Ni²⁺-Ion an NTA-Sepharose besitzt im Vergleich zu IDA-Materialien

nur zwei freie Koordinationsstellen für His, NTA-Sepharose eignet sich aber laut Hersteller durch die festere Bindung des Nickel besser zur Immobilisierung des „His₆ tag“.

Um das Bindungsverhalten des rekombinanten LHCII an unterschiedliche Materialien zu prüfen, wurde die Mutante C3.2h durch Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet und auf die vorbereiteten Säulenmaterialien aufgetragen (Abb. 2.3.1, A und B). Zu beachten ist, dass auf Säule 1 (IDA-Sepharose) und Säule 3 (NTA-Sepharose) jeweils 1 mg Protein (auf je 1 ml Säulenmaterial), auf Säule 2 (IDA-Fractogel) dagegen 0,5 mg Protein (auf 0,5 ml Säulenmaterial) immobilisiert wurden. Nach Äquilibrieren der Ni-Säulen (also vor Protein-Zugabe; Abb. 2.3.1 A), fiel zunächst auf, dass das IDA-Fractogel (Probe 2) im Gegensatz zu den Sepharosen kaum Färbung annimmt und weiß bleibt. Auch nach Immobilisierung der Komplexe auf den Säulen und nach Waschschrritten mit OG- und TX-Puffer (B) zeigte sich wenig Färbung. Während die Sepharosen durch die LHCII-Bindung insbesondere im oberen Säulenbereich deutlich grün gefärbt waren, zeigte die Fractogel-Säule nur eine schwache Grünfärbung mit dunkel-grünem oberem Rand. Die Eluate der jeweiligen Säulen wurden via UZ aufgereinigt (C), die einzelnen Banden isoliert und spektroskopisch untersucht. Mittels CD-Spektroskopie konnten die markierten Banden (*) als trimere Komplexe identifiziert werden, der Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* war vollständig gewährleistet (Daten nicht gezeigt).

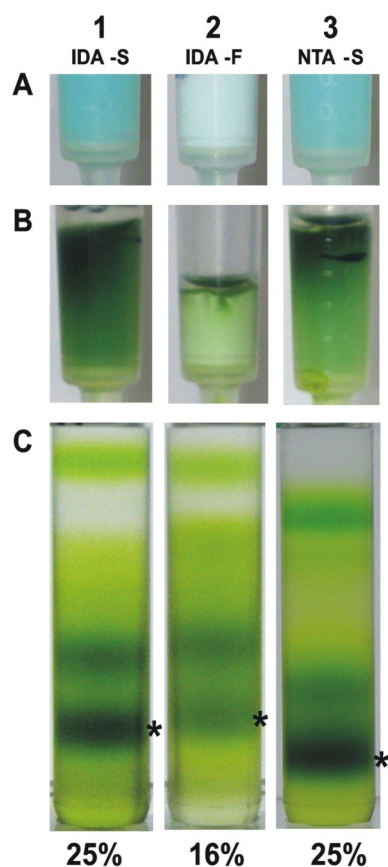


Abb. 2.3.1: Vergleich der Immobilisierung und des Trimerisierungsverhaltens von rekonstituiertem LHCII (C3.2h) auf unterschiedlichen Säulenmaterialien mit komplex gebundenem Ni²⁺. Säule 1 wurde mit IDA-Sepharose, Säule 2 mit IDA-Fractogel und Säule 3 mit NTA-Sepharose befüllt. (A) zeigt das Säulenmaterial nach Beschickung mit NiCl₂ und Äquilibrierung. (B) zeigt das Säulenmaterial mit gebundenen LHCII-Komplexen nach Waschen mit OG- und TX-Puffer. In (C) ist das Eluat der jeweiligen Säulen nach Aufreinigung im Saccharose-Dichtegradient dargestellt, die Banden des trimeren LHCII sind markiert (*). Die jeweiligen Prozentzahlen geben die Menge an trimerisiertem LHCII bezogen auf die in der Rekonstitution eingesetzte Menge an Apoprotein wieder. In Probe 2 (IDA-Fractogel) wurde im Vergleich zu Probe 1 und 3 nur die Hälfte an Protein (bei entsprechend halbem Säulenvolumen) eingesetzt.

Die mittels Absorptionsspektroskopie ermittelte LHCII-Konzentration verrechnet mit dem abgezogenen Probenvolumen, ergab für beide Sepharosen eine Ausbeute von ca. 25 % trimerem LHCII bezogen auf die in der Rekonstitution eingesetzte Menge an Apoprotein. Dagegen konnten von IDA-Fractogel nur ca. 16 % des rekonstituierten Proteins als Trimer eluiert werden. Wichtig ist es in diesem Zu-

sammenhang zu betonen, dass aus versuchstechnischen Gründen auf dem Fractogel-Gradienten nur die halbe Proteinmenge aufgetragen wurde, was von vornherein zu deutlich schwächeren Banden im Saccharose-Dichtegradienten führte. Allerdings ist in Abb. 2.3.1 C deutlich zu erkennen, dass in den Dichtegradienten der Sepharoseproben (1 und 3) das Verhältnis Trimer (markierte Bande) zu Monomer (Bande über Trimerbande) deutlich auf Seiten der Trimere liegt, während das Verhältnis im Gradienten der Fractogel-Probe (2) etwa 1:1 ist. Da weder das IDA-Fractogel, noch die NTA-Sepharose eine Verbesserung in der Bindungs- bzw. Trimerisierungsausbeute des LHCII zeigten, wurden die nachfolgenden Versuche zunächst mit der bewährten IDA-Sepharose durchgeführt.

3.1.2 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Bindung des LHCII an Ni-Säulen

3.1.2.1 Bindung des monomeren und trimeren LHCII nach Ultrazentrifugation

Wie zuvor berichtet, stellt die Immobilisierung von trimerem LHCII auf Säulenmaterialien eine Grundlage zur Produktion heterogener Trimere dar. Die in früheren Arbeiten schon oftmals bemängelte Bindungsausbeute des aufgereinigten LHCII an Ni-Säulen sollte in dieser Versuchsreihe mit IDA-Sepharose als Säulenmatrix untersucht werden. Hierzu wurde wieder C3.2h durch Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet und in zwei Fraktionen aliquotiert, wobei eine auf Ni²⁺-IDA-Sepharose trimerisiert und via Saccharose-Dichtegradient in monomeren und trimeren LHCII aufgereinigt wurde. Die andere Fraktion der Rekonstitution wurde auf Eis gelagert. Diese drei Proben wurden, wie in Abb. 2.3.2 gezeigt, zu gleichen Proteinmengen auf Ni²⁺-IDA-Sepharose immobilisiert, wobei Probe 1 den ursprünglichen Rekonstitutionsansatz darstellt, Probe 2 den aufgereinigten monomeren LHCII und Probe 3 den aufgereinigten trimeren LHCII. Wie aus (A) deutlich hervorgeht, waren nach den Waschschritten vor allem die Komplexe der Rekonstitution gebunden (Säule 1 A, stark grün gefärbt), die aufgereinigten Monomere wurden nur zu einem geringen Anteil immobilisiert (2 A), die Trimere (3 A) praktisch nicht.

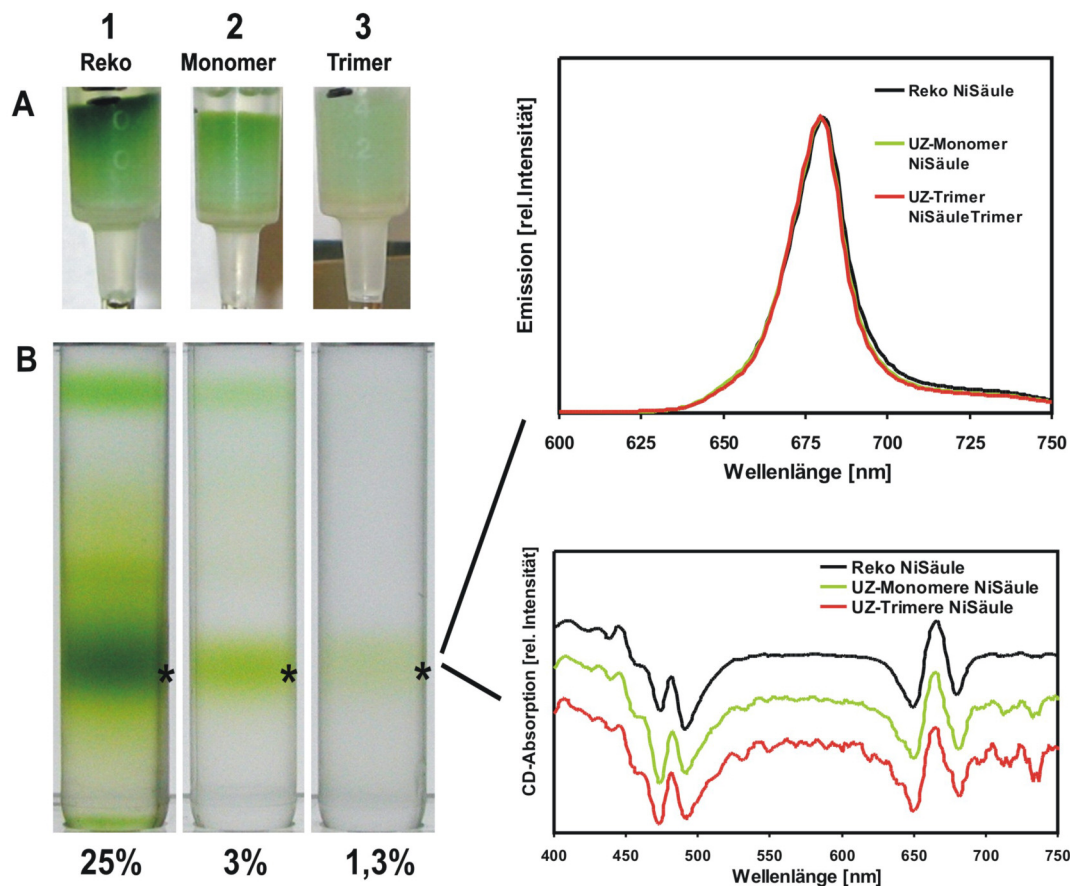


Abb. 2.3.2: Bindungs- und Trimerisierungsverhalten von monomerem und trimerem LHCII auf Ni^{2+} -IDA-Sepharose nach vorheriger Ni-Säulen-Immobilisierung und Aufreinigung via UZ. **(A)** zeigt das Säulenmaterial mit gebundenen LHCII-Komplexen nach Waschen mit OG- und TX-Puffer. In **(B)** ist das Eluat der jeweiligen Säulen nach Aufreinigung im Saccharose-Dichtegradient dargestellt, die Banden des trimeren LHCII sind markiert (*). Auf Säule 1 wurde als Positiv-Kontrolle 200 μg C3.2h nach Detergenzwechsel-Rekonstitution aufgetragen („Reko“; Proteinmenge bezogen auf eingesetzte Menge an Apoprotein). Die gleiche Rekonstitution wurde auf Ni^{2+} -IDA-Sepharose trimerisiert und mittels UZ aufgereinigt. Hiervon wurden je 200 μg der Monomere bzw. Trimere auf Säule 2 bzw. 3 aufgetragen (Proteinmenge bezogen auf aufgereinigten LHCII). Die jeweiligen Prozentzahlen geben die Menge an immobilisierten LHCII-Trimern bezogen auf die jeweils eingesetzte Menge an Protein wieder. In der rechten Bildhälfte ist die spektroskopische Charakterisierung der isolierten Komplexe mittels Fluoreszenz-Emission (Anregung des Chl *b* bei 470 nm, normiert auf max. Emission) und CD-Absorption dargestellt (zur Übersichtlichkeit gestaffelt gezeigt).

Die im Saccharose-Gradient aufgereinigten Eluate bestanden in allen drei Proben vorwiegend aus Trimeren (*). Probe 1 zeigte wie vorher (Kap. II, 3.1.1) eine Bindungs- und Trimerisierungsausbeute von ca. 25 % des in der Rekonstitution eingesetzten Apoproteins, Probe 2 enthielt noch ca. 3 % des aufgetragenen Proteins, Probe 3 nur noch 1,3 %. Hierbei ist zu beachten, dass sich in Probe 1 die Trimerisierungsausbeute auf die in der Rekonstitution eingesetzte Menge an Apoprotein bezieht. Da in der Detergenzwechsel-Rekonstitution unter optimalen Bedingungen 50-70 % des eingesetzten

Proteins zu funktionalen Protein-Pigment-Komplexen falten, bedeutet dies bei 200 µg eingesetztem Apoprotein nach optimaler Faltung (70 %) 140 µg gefaltetes Protein. Da im Eluat nach Aufreinigung ca. 25 % trimerer Komplex detektiert wurden (entspricht 50 µg LHCII), bedeutet dies eine Trimerisierungsausbeute von ca. 36 % bezogen auf das gefaltete Protein. Auf Säule 2 und 3 wurden im Gegensatz zu Säule 1 jeweils 200 µg aufgereinigtes, gefaltetes Protein aufgetragen. Richtig genommen müsste man die hier angegebenen Bindungsausbeuten von 3 % und 1,3 % also mit einer Positiv-Kontrolle von 36 % vergleichen, was die Bindungsausbeuten gegenüber rekonstituierten unaufgereinigten Komplexen noch verkleinert.

Im Unterschied zu den rekombinanten C3.2h-Komplexen, die die Ni-Säule nur einmal passiert haben (Abb. 2.3.2, rechte Bildhälfte unten, schwarze Linie), zeigen die trimerisierten Komplexe nach der zweiten Ni-Säule (grüne Linie, rote Linie) eine etwas negativere CD-Absorption bei 473 nm, identisch zu wildtypischem LHCII (Rühle & Paulsen, 2004). Der Energie-Transfer von Chl *b* zu Chl *a* ist in allen Proben gewährleistet (obere Bildhälfte).

3.1.2.2 Einfluß von Ni²⁺-Ionen in der Proteinlösung auf die Bindung des „His₆ tag“ an Ni²⁺-IDA-Sepharose

Als mögliche Ursache für die geringe Bindungsausbeute des LHCII an IDA-Sepharose nach vorheriger Standard-Trimerisierung wurde die Blockierung der „His₆ tag“ der Proteinproben mit Kationen wie Ni²⁺ oder Cd²⁺, z.B. als Überbleibsel der Trimerisierung bzw. durch Verunreinigung der verwendeten Chemikalien, gehandelt. Um den Einfluß freier Kationen in der Proteinlösung zu testen, wurde C3.2h mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet, mit 0,2 bzw. 2 mmol/l NiCl₂ versetzt und zu gleichen Mengen auf Ni²⁺-IDA-Sepharose aufgetragen. Als Referenz diente C3.2h der gleichen Rekonstitution ohne NiCl₂. Nach den einzelnen Waschschrritten waren auf allen drei Säulen grüne Komplexe gebunden (Abb. 2.3.3, A), wobei die Referenz (Probe 1) und die Probe 2 mit 0,2 mmol/l NiCl₂ deutlich stärker gefärbt waren als Probe 3 mit 2 mmol/l NiCl₂.

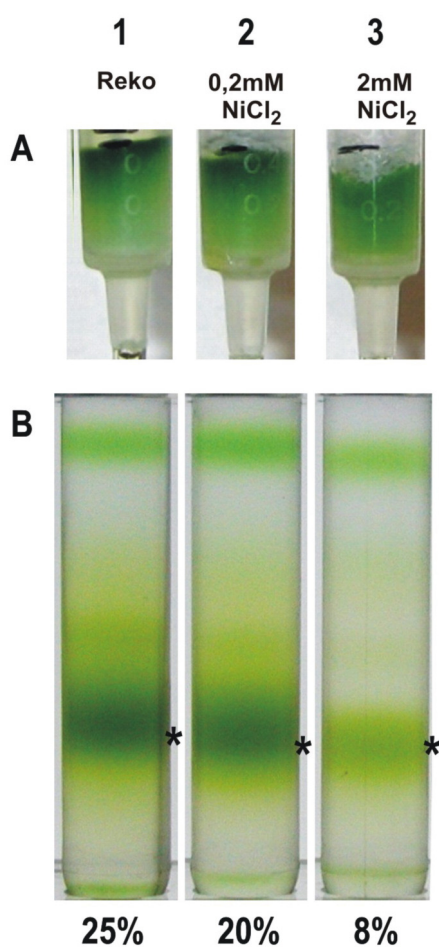


Abb. 2.3.3: Einfluß von Ni²⁺-Ionen auf das Bindungsverhalten der LHCII-Mutante C3.2h an Ni²⁺-IDA-Sepharose. Auf Säule 1 wurde als Positiv-Kontrolle LHCII nach Detergenzwechsel-Rekonstitution („Reko“) aufgetragen, auf Säule 2 bzw. 3 die gleiche Rekonstitutionslösung mit 0,2 mmol/l bzw. 2 mmol/l NiCl₂. (A) zeigt das Säulenmaterial mit gebundenen LHCII-Komplexen nach Waschen mit OG- und TX-Puffer. In (B) ist das Eluat der jeweiligen Säulen nach Aufreinigung mittels UZ dargestellt, die Banden des trimeren LHCII sind markiert (*). Die jeweiligen Prozentzahlen geben die Menge an trimerisiertem LHCII bezogen auf die in der Rekonstitution eingesetzte Menge an Apoprotein wieder.

Das aufgereinigte Eluat (Abb. 2.3.3, B) spiegelte dieses Ergebnis wider. Während die Referenzprobe (1) wie zuvor eine Trimerisierungs- und Bindungsausbeute von ca. 25 % des in der Rekonstitution eingesetzten Proteins zeigte, konnten von Probe 2 (0,2 mmol/l NiCl₂) ca. 20 % Trimere eluiert werden, von Probe 3 (2 mmol/l NiCl₂) etwa 8 % Trimere. Die in Abb. 2.3.3 B markierten Banden (*) zeigten jeweils die typischen CD-Spektren des trimeren C3.2h, der

Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* war vollständig gewährleistet (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.3 Einfluß verschiedener Detergentien in der Proteinlösung auf die Bindung des „His₆ tag“ an Ni²⁺-IDA-Sepharose

Neben der Blockierung des „His₆ tag“ durch Kationen wurde die Veränderung der Mizellen-Zusammensetzung als mögliche Ursache der Verhinderung der Bindung gehandelt. Um die Effekte von Detergentien auf die Immobilisierung des trimeren LHCII zu testen, wurde C3.2h wie zuvor rekonstituiert, trimerisiert und mittels UZ in Saccharose-Gradienten aufgereinigt. Isolierte Trimere wurden nach Hobe (1995) mittels KCl und „Bio Beads“-Behandlung gefällt. Die ausgefällten Trimere wurden in einzelnen Versuchsansätzen in unterschiedlichen Detergentien rückgelöst und kurz zentrifugiert, um nicht gelöste Komplexe zu sedimentieren. Die Konzentration der gelösten Protein-Pigment-Komplexe wurde nach Butler & Kühlbrandt (1988; Kap. I, 2.7.9) bestimmt.

In einem ersten Ansatz wurden Trimere in 1%iger OG-Lösung solubilisiert, um Detergenz-Bedingungen ähnlich denen des Rekonstitutionspuffers zu schaffen. Die gelösten Komplexe wurden auf unterschiedliche Ni²⁺-beladene Säulenmaterialien aufgetragen und nach Standard-Bedingungen gewaschen (Abb. 2.3.4). Während IDA-

Sepharose (A, Probe 1) und NTA-Sepharose (A, Probe 3) nach Waschen der Säulen eine leicht grünliche Färbung zeigten, war das Fractogel (A, Probe 2) kaum gefärbt.

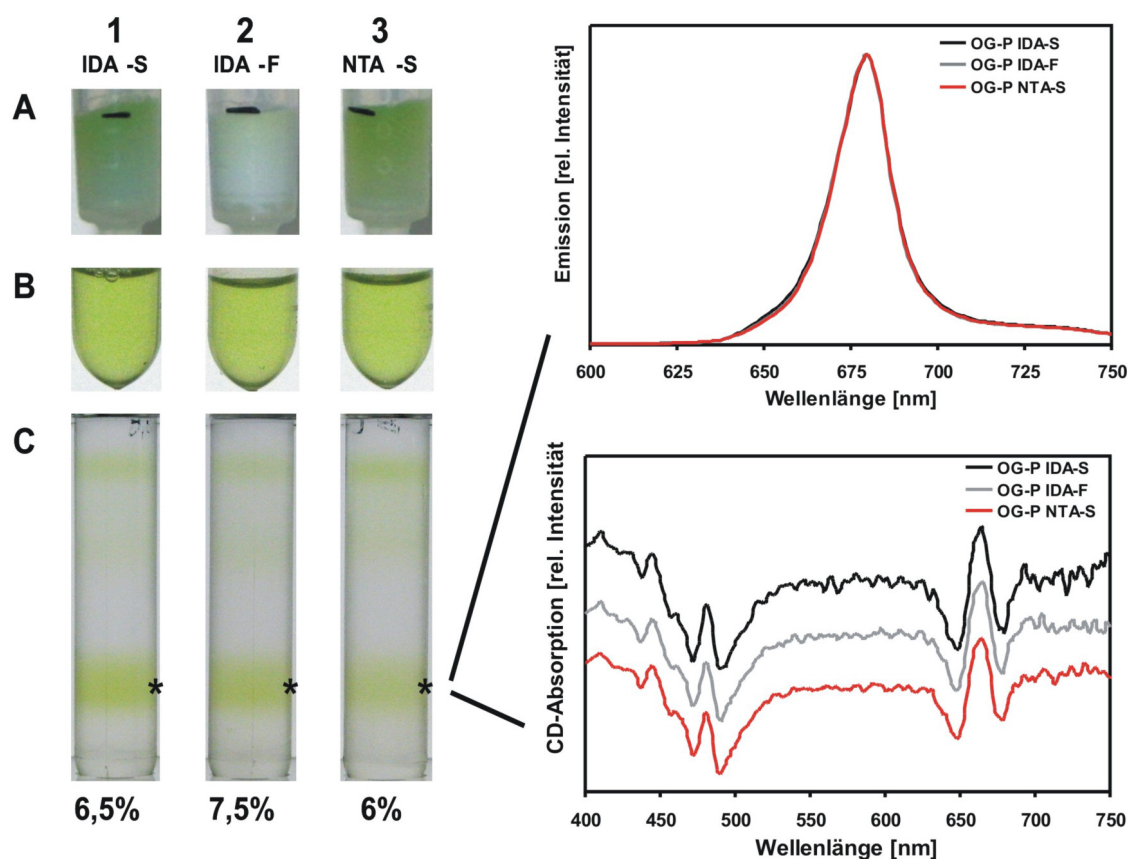


Abb. 2.3.4: Bindungsverhalten von LHCII-Trimeren (C3.2h) auf unterschiedlichen Säulenmaterialien nach vorheriger Fällung und Solubilisierung in 1%iger OG-Lösung. Auf jede Säule wurden ca. 40 μg Trimere aufgetragen, als Säulenmaterialien wurden IDA-Sepharose (1, IDA-S), IDA-Fractogel (2, IDA-F) und NTA-Sepharose (3, NTA-S) getestet. **(A)** zeigt die Säulenmaterialien mit immobilisierten Komplexen nach dem Waschen mit TX-Puffer, **(B)** die aufgefängenen Eluatfraktionen, **(C)** die mittels UZ aufgereinigten Eluate mit dem prozentualen Anteil an Trimeren bezogen auf die aufgetragene Proteinmenge. In der rechten Bildhälfte ist die spektroskopische Charakterisierung der Komplexe mittels Fluoreszenz-Emission (Anregung des Chl *b* bei 470 nm, normiert auf max. Emission) und CD-Absorption dargestellt (zur Übersichtlichkeit gestaffelt gezeigt).

Die Eluate (B) aller Säulen waren gleichmässig schwach gefärbt ($E_{670} < 0,1$) und bestanden vornehmlich aus intakten LHCII-Trimeren mit C3.2h-typischem CD-Absorptionsverhalten und unauffälliger Energieübertragung, wie die Auftrennung im Saccharose-Gradienten (C*) und die nachfolgende spektroskopische Untersuchung zeigte (Abb. 2.3.4, rechte Seite). Die berechnete Bindungsausbeute der Trimere lag, ausgehend von 100 % aufgetragenen Trimeren, mit 6-7,5 % bei den einzelnen Materialien zwar etwas höher als in den Saccharose-Dichtegradienten-Lösungen (Abb. 2.3.2,

Probe 3), war aber nicht ausreichend, um die Herstellung heterogen markierter LHCII-Trimere zu testen.

Da die Verwendung unterschiedlicher Säulenmaterialien erneut keine Vorteile brachte, wurden die nachfolgenden Versuche wie zuvor lediglich auf Ni²⁺-IDA-Sephrose durchgeführt. Wie in Abb. 2.3.5 dargestellt, verbesserte weder das Rücklösen ausgefallter Trimere in 1%iger TX-Lösung (Probe 1), noch das Rücklösen in LM- oder TX-haltigem Saccharose-Puffer (Probe 2 und 3) die Bindungsausbeuten der trimeren Komplexe. Alle drei Säulen zeigten eine sehr schwache grünliche Färbung nach dem Waschen mit OG-Puffer (A), die Extinktion der Eluate bei 670 nm (B) war so gering, dass eine weitere Untersuchung nicht in Betracht gezogen wurde.

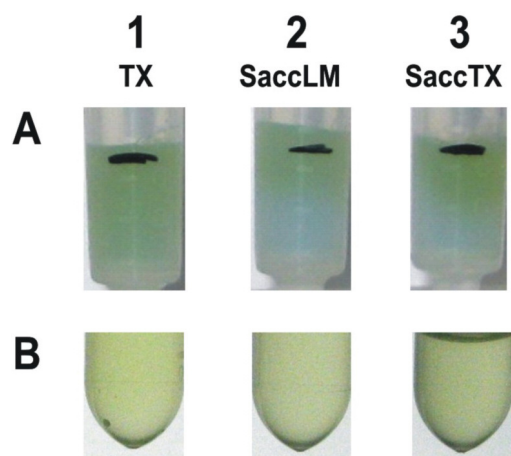


Abb. 2.3.5: Bindungsverhalten von LHCII-Trimern (C3.2h) auf Ni²⁺-IDA-Sephrose nach vorheriger Fällung und Solubilisierung in verschiedenen Detergentien bzw. Detergenzhaltigen Puffern. Auf jede Säule wurden ca. 40 µg trimerisierte Komplexe aufgetragen, die in Säule 1 in 1%iger TX-Lösung solubilisiert waren, in Säule 2 in LM-haltigem Saccharosepuffer, in Säule 3 in TX-haltigem Saccharosepuffer. (A) zeigt die Säulenmaterialien mit immobilisierten Komplexen nach dem Waschen mit OG-Puffer, (B) die aufgefangenen Eluatfraktionen.

Im dritten und letzten Ansatz dieser Versuchsreihe wurde ein Aliquot der Komplexe als Kontrolle in 1%iger OG-Lösung solubilisiert. Zwei weitere Aliquots wurden in verschiedenen Rekonstitutions-„Mock“-Puffer gelöst. Hiermit sind Puffer gemeint, die identisch sind zur Lösung nach Detergenzwechsel-Rekonstitution. Auch sie besitzen als Detergenz vornehmlich OG (1 %), jedoch kann angenommen werden, dass zudem ein geringer Restanteil an LDS sowie pflanzliche Lipide aus dem Totalpigmentextrakt vorhanden sind. Zur Herstellung der Puffer wurde eine Detergenzwechsel-Rekonstitution einmal ohne bzw. einmal mit Totalpigmentextrakt durchgeführt, jedoch jeweils ohne Protein. Die Puffer wurden nach KCl-Fällung gründlich zentrifugiert und der Überstand zum Lösen der ausgefallten Trimere verwendet. Während die Solubilisierung der eingesetzten 50 µg Trimere in 1%iger OG-Lösung problematisch war und nur 80 % der Trimere gelöst werden konnten, wurde dieses Problem in den Rekonstitutions-„Mock“-Puffern nicht beobachtet. Die gelösten Komplexe wurden nach CD-spektroskopischer Untersuchung sofort auf Ni²⁺-IDA-Sephrose aufgetragen und nach kurzer Wartezeit gewaschen. Hierbei war es wichtig zügig zu Arbeiten, um die Dissoziation der Trimere durch die hohe OG-Konzentration zu verhindern (Nussberger *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu bisherigen Vorversuchen, zeigten beide Säulen mit Rekonstitutions-„Mock“-

Puffer (Abb. 2.3.6 A, Probe 2 ohne Pigment, Probe 3 mit Pigment) eine deutliche Grünfärbung. Insbesondere die Probe mit Pigment war im oberen Säulenbereich sogar dunkelgrün gefärbt.

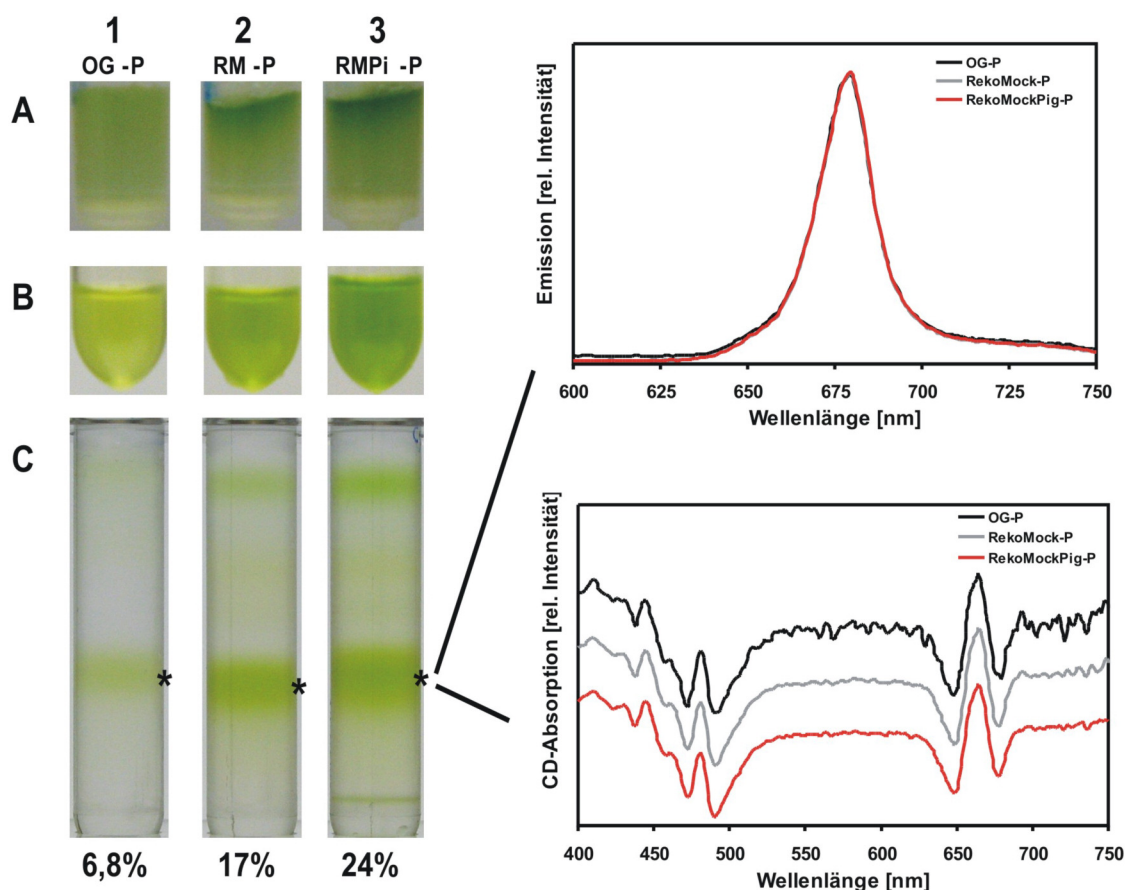


Abb. 2.3.6: Bindungsverhalten von LHCII-Trimeren (C3.2h) auf Ni^{2+} -IDA-Sepharose nach vorheriger Fällung und Solubilisierung in verschiedenen Detergentien bzw. Detergenz-haltigen Puffern. Auf Säule 1 wurden ca. 40 μg Trimere in 1%iger OG-Lösung aufgetragen, auf Säule 2 ca. 50 μg Trimere in einem pigmentfreien Rekonstitutions-„Mock“-Puffer, auf Säule 3 ca. 50 μg Trimere in pigmenthaltigem Rekonstitutions-„Mock“-Puffer. (A) zeigt die Säulenmaterialien mit immobilisierten Komplexen nach dem Waschen, (B) die aufgefangenen Eluatfraktionen, (C) die mittels Saccharose-Gradient aufgereinigten Komplexe mit dem prozentualen Anteilen an eluierten Trimeren bezogen auf die aufgetragene Proteinmenge. In der rechten Bildhälfte ist die spektroskopische Charakterisierung der Komplexe mittels Fluoreszenz-Emission (Anregung des Chl *b* bei 470 nm, normiert auf max. Emission) und CD-Absorption dargestellt (zur Übersichtlichkeit gestaffelt gezeigt).

Die Referenzprobe mit OG dagegen zeigte wie zuvor (Abb. 2.3.4) lediglich eine schwache Grünfärbung. Dieses Ergebnis wurde sowohl in der Elution (B) als auch in der Aufreinigung mittels UZ (C) bestätigt. Von allen drei Säulen konnten intakte LHCII-Trimere eluiert werden, mit jeweils wildtypischem Energie-Transfer (rechte Bildhälfte oben, Fluoreszenz-Emission) und C3.2h-typischen CD-Absorptionsspektren des trimeren LHCII. Wie in Abb. 2.3.6 deutlich erkennbar ist, wurden von OG-solubilierten Trimeren (Pro-

be 1) wieder nur etwa 7 % an Ni²⁺-IDA-Sepharose rückgebunden, während Trimere in pigmentfreier Rekonstitutions-„Mock“-Lösung zu 17 % und in pigmenthaltiger Rekonstitutions-„Mock“-Lösung sogar zu 24 % immobilisiert werden konnten. Im letzten Fall bedeutet dies zwar noch immer einen Verlust von 76 % der Trimere, die nicht ein zweites Mal an die Ni-Säule gebunden werden konnten. Die erneute Bindung von 24 % der Trimere stellt allerdings eine deutliche Steigerung zu den bisherigen Ergebnissen dar und sollte als wichtiger Hinweis gewertet werden, um das Problem der geringen Bindungsausbeute Hexahistidyl-markierter Trimere lösen zu können.

3.2 Immobilisierung des rekombinanten LHCII mittels N-terminalem „Strep tag“

Aufgrund der bisher unzureichenden Bindungsausbeuten des trimeren LHCII mittels C-terminalem „His₆ tag“ an Ni²⁺-Affinitätsäulen wurde in einem weiteren Versuchsansatz eine andere Strategie der Affinitätschromatographie getestet: das „Strep tag“/Strep-Tactin-System. Die Peptidsequenz des „Strep tag“ wurde im Zuge der Dissertationsarbeit von R. Lauterbach (unveröffentlicht) molekularbiologisch mit dem N-Terminus des Lhcb1 fusioniert, so dass das Peptid die N-proximale Sequenz der Domäne bildet und, nach letzten Erkenntnissen, eine hohe Zugänglichkeit für die Bindestellen des Strep-Tactin besitzen sollte (Müller 2008). Ziel war es, den „Strep tag“ zum einen erneut auf seine Nutzung zur effizienten Trimerisierung des LHCII zu testen und zum anderen auf die Möglichkeit der Bindung des bereits trimerisierten LHCII im Zuge der Herstellung heterogener Trimere. Dies war wie zuvor beschrieben (Kap. II, 3.1) weder mit einem „His₆ tag“ noch mit einem „His₁₂ tag“ tragenden LHCII (Plunger, 2007) in ausreichender Menge gelungen. Zu diesem Zweck wurden auf Basis des von R. Lauterbach hergestellten Lhcb1-Klones D7f.3-S2, in welchem N-terminal die Sequenz des „Strep tag“ (Aminosäuren 1-8) mit der maturen Sequenz des Lhcb1 (D7f.3; Aminosäuren 9-340) fusioniert ist, zwei neue „Strep tag“-Klone konstruiert, die zudem C-terminal noch einen „His₆ tag“ tragen.

Die Idee, die diesem Ansatz zur Herstellung heterogen markierter Trimere zugrunde liegt, ist die Mischung von spinmarkierten Monomeren, die neben dem C-terminalen „His₆ tag“ auch den N-terminalen „Strep tag“ tragen, mit unmarkierten Monomeren, die lediglich den C-terminalen „His₆ tag“ besitzen. Anschließend erfolgt die Trimerisierung mittels C-terminalem „His₆ tag“ auf Ni²⁺-IDA-Sepharose (Abb. 2.3.7, linkes Schaubild). Setzt man hier das unmarkierte Protein in einem hohen Überschuss zu spinmarkiertem Protein ein (hier 8:1), so können vier unterschiedliche Arten von Trimeren entstehen: solche ohne Spinmarkierung, die statistisch gesehen 67 % ausmachen, und solche, die ein, zwei oder drei spinmarkierte Monomere enthalten und zusammen 33 % ausmachen.

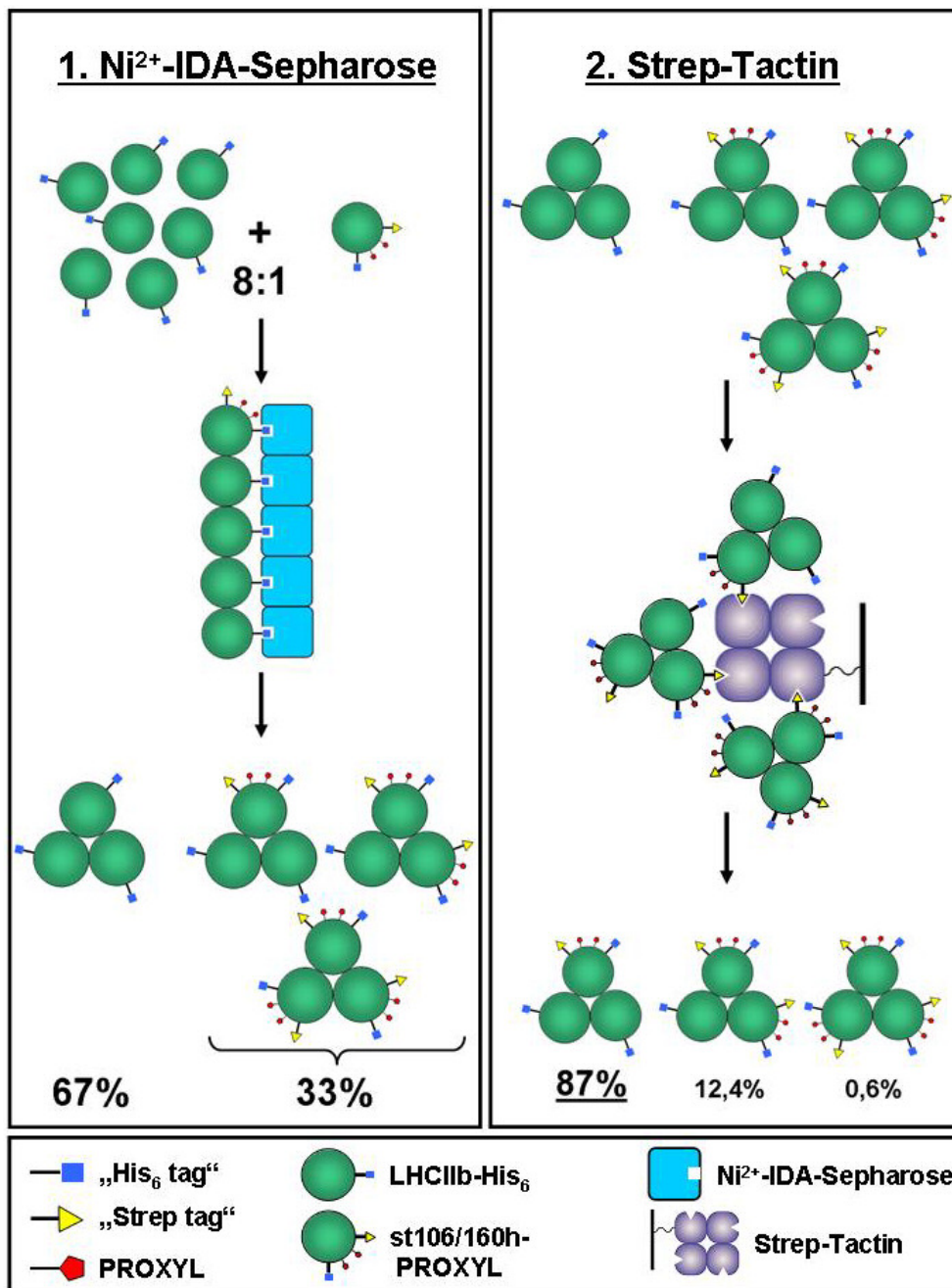


Abb. 2.3.7: Schematische Darstellung zur Herstellung heterogen markierter LHCII-Trimere nach der „unsauberen Methode“. Unmarkierte LHCII-Monomere mit C-terminalem „His₆ tag“ werden im ersten Schritt (linkes Schaubild) in hohem Überschuss mit Monomeren gemischt (hier 8:1), die neben zwei Affinitätsmarkern auch Spinmarker tragen. Dieser Mischansatz wird auf Ni²⁺-IDA-Sepharose trimerisiert. Das Eluat, bestehend aus vier Populationen von Trimeren, wird im zweiten Schritt auf Strep-Tactin aufgetragen (rechtes Schaubild), um spinmarkierte Trimere mit „Strep tag“ vom Überschuss an unmarkierten Trimeren ohne „Strep tag“ (statistisch 67 %) zu trennen. Bei den verbleibenden markierten Trimeren (von nun an 100 %) überwiegt statistisch der Anteil der Trimere mit einem spinmarkierten Monomer (87 %), gegenüber 12,4 % zweifach und 0,6 % dreifach markierter Trimere. Da einfach spinmarkierte Trimere überwiegen, eignet sich das Gemisch zur Herstellung der EPR-DEER Probe. Die Bedeutung einzelner Symbole ist im unteren Schaubild dargelegt.

Theoretisch könnte man mit solch einer Probe ohne weitere Abtrennung der unmarkierten Trimere Spin-Spin-Kopplungen messen, da von spinmarkierten Trimeren statistisch einfach markierte Trimere mit einem Anteil von 87 % deutlich überwiegen sollten. Unmarkierte Trimere würden in der DEER-Messung nicht stören, da sie kein EPR-Signal liefern. In solch einem Fall wird es aber schwierig eine Probe mit ausreichend hoher Spinkonzentration herzustellen. Geht man davon aus, dass DEER-Abstandsmessungen mit LHCII-Konzentrationen von 300 $\mu\text{mol/l}$ gute Signale liefern, müsste eine Probe, die zu lediglich 33 % aus spinmarkierten Trimeren besteht (und von denen nur 28,7 % einfach markiert sind), auf eine Konzentration von etwa 2,5 mmol/l LHCII aufkonzentriert werden. Dies ist allerdings kaum möglich.

Um die störenden, unmarkierten Trimere aus der Lösung zu entfernen, kommt der N-terminale „Strep tag“ zum Einsatz, welcher nur in spinmarkierten Trimeren vorhanden ist. Wie in Abb. 2.3.7 im rechten Schaubild dargestellt, werden spinmarkierte Trimere mittels „Strep tag“ an Strep-Tactin-Sepharose gebunden, während unmarkierte Trimere im Waschschrift entfernt werden. Statistisch werden daraufhin zu 87 % einfach markierte, zu 12,4 % zweifach markierte und zu 0,6 % dreifach markierte Trimere von der Matrix eluiert. Da hier, wie in früheren Versuchen beabsichtigt (Seimetz, 2004; Dockter, 2005), die einzelnen Populationen von markierten Trimeren nicht voneinander getrennt werden können, EPR-DEER Messungen wegen des geringen Anteils mehrfach markierter Trimere aber prinzipiell möglich sind, stellt diese Methode einen Kompromiss dar. Daher wird die Methode im Folgenden auch als „unsauber“ bezeichnet.

3.2.1 Molekularbiologische Konstruktion der *Lhcb1*-Klone stC79Sh und st106/160h

Wie im Methodenteil dieses Kapitels ausführlich beschrieben, wurden die doppelt affinitätsmarkierten Klone stC79Sh und st106/160h durch Restriktion und Ligation bereits vorhandener *Lhcb1*-Klone konstruiert. Lyophilisierte Plasmide des Klons D7f.3-S2 wurden erfolgreich in Bakterienzellen des Stammes *E. coli* JM101 transformiert und durch Sequenzierung geprüft. Die Restriktion der isolierten Plasmide der Klone D7f.3-S2, C79Sh und S106C/S160Ch mit den Endonukleasen *SacI* und *PstI* resultierte wie erwartet in zwei unterschiedlich langen Fragmenten von ca. 800 und ca. 3400 bp (Daten nicht gezeigt). Die gewünschten Fragmente wurden nach Auftrennung im präparativen Agarose-Gel erfolgreich isoliert, miteinander ligiert und in den Expressionstamm *E. coli* JM101 transformiert. Aus den Transformanten beider Ansätze wurden aus über 50 Kolonien jeweils zwei ausgewählt und mittels „dirty“-PCR überprüft. Durch Wahl eines „Strep tag“-spezifischen „forward“-Primers und eines „His₆ tag“-spezifischen „reverse“-Primers, sollten lediglich doppelt affinitätsmarkierte Klone im analytischen Agarose-Gel eine definierte Bande um die 770 bp zeigen. Bei negativen Klonen, die also nur einen der beiden Affinitätsmarker besitzen, wäre kein definiertes PCR-Produkt zu erwarten.

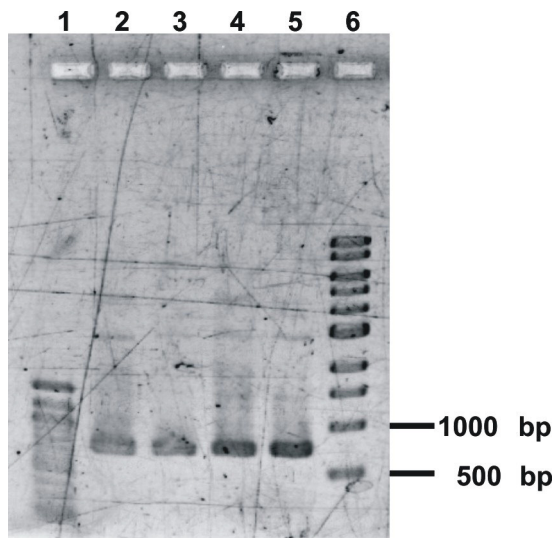


Abb. 2.3.8: Herstellung von *stLhcb1h*-Klonen. Agarose-Gel (0,8 %) zur Untersuchung des Ligation-Erfolgs mittels „dirty“-PCR. Auf Bahn 1 bzw. 6 wurden jeweils 5 μ l 100 bp bzw. 1 kb DNA-Marker aufgetragen, auf Bahn 2 bzw. 3 je 10 μ l PCR-Produkt der „dirty“-PCR der Kolonien stC79Sh und auf Bahn 4 bzw. 5 je 10 μ l PCR-Produkt der Kolonien st106/160h.

Das Ergebnis der Gel-Elektrophorese ist in Abb. 2.3.8 dargestellt. Sowohl die gewählten stC79Sh-Kolonien als auch die gewählten st106/160h-Kolonien zeigen jeweils ein deutliches PCR-Produkt mit

der erwarteten Größe von ca. 800 bp und sprechen für eine erfolgreiche Ligation der Restriktionsprodukte zu den gewünschten *stLhcb1h*-Klonen. Eine im Anschluss durchgeführte Sequenzierung durch die Firma GENTerprise (Mainz) bestätigte die erfolgreiche Konstruktion der doppelt affinitätsmarkierten Klone stC79Sh und st106/160h.

3.2.2 Biochemische Charakterisierung der LHCI-Mutanten stC79Sh und st106/160h: Rekonstitution sowie Trimerisierung mittels C-terminalem „His₆ tag“ oder mittels N-terminalem „Strep tag“

Nachdem die Klone stC79Sh und st106/160h erfolgreich durch Restriktion und Ligation aus vorhandenen *Lhcb1*-Klonen hergestellt werden konnten, sollte im Folgenden die Überexpression, die Rekonstitution sowie das Bindungsverhalten auf Affinitätssäulen überprüft werden. Dazu wurden beide Apoproteine nach Standard-Protokoll in *E. coli* JM101 in Form von „inclusion bodies“ überexprimiert und aufgereinigt. Die ermittelte Masse der neuen Klone (28 kDa) lag etwas über den Massen des WT (25,5 kDa) und der „His₆ tag“ Klone (27 kDa; Daten nicht gezeigt). Die aufgereinigten Apoproteine wurden im Folgenden mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution zu Protein-Pigment-Komplexen gefaltet, wahlweise mittels „His₆ tag“ oder „Strep tag“ auf Ni²⁺-IDA-Sepharose bzw. Strep-Tactin immobilisiert, eluiert und via UZ aufgereinigt.

Ein Teil der rekonstituierten monomeren Komplexe wurde zunächst ohne Trimerisierung aufgereinigt, um das Faltungsvermögen der neuen Klone zu prüfen (Abb. 2.3.9, linke Bildhälfte).

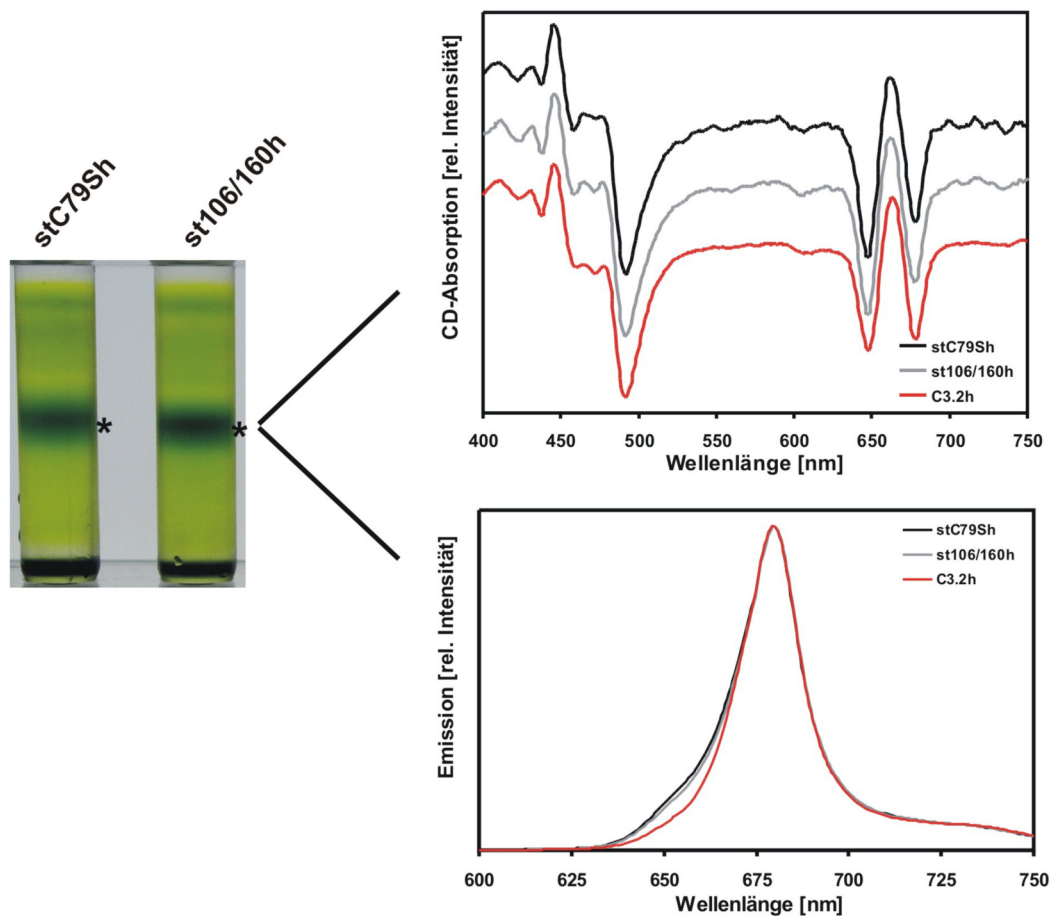


Abb. 2.3.9: Spektroskopische Charakterisierung der Mutanten stC79Sh und st106/160h im Vergleich zu rekombinantem LHCII mit wildtypischer Sequenz und C-terminalem „His₆ tag“ (C3.2h). Alle Mutanten wurden mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet und via UZ aufgereinigt (linke Bildhälfte). In der rechten Bildhälfte ist die spektroskopische Charakterisierung der Komplexe mittels CD-Absorption (oben; gestaffelt gezeigt) und Fluoreszenz-Emission (unten; Anregung des Chl *b* bei 470 nm, normiert auf max. Emission) dargestellt.

Der Vergleich der monomeren Komplexe von stC79Sh und st106/160h mit dem Klon C3.2h (wildtypische Lhcb1-Sequenz, versehen mit C-terminalem „His₆ tag“) zeigt weder CD-spektroskopisch noch Fluoreszenz-spektroskopisch signifikante Abweichungen. Wie in Abb. 2.3.9 (rechte Bildhälfte oben) dargestellt, besitzen die neuen Klone im CD-Spektrometer die „fingerprint“-typischen Absorptions-Minima des monomeren LHCII bei 491, 650 und 678 nm. Auch die Energieübertragung von Chl *b* zu Chl *a* ist im hohen Maße gewährleistet, ersichtlich an der Fluoreszenz-Emission des Chl *a* bei 680 nm nach Anregung des Chl *b* bei 470 nm (Abb. 2.3.9, rechts unten). Lediglich ein geringer Anteil der Anregungsenergie wird durch Chl *b* bei 655 nm emittiert, was vermutlich im Zusammenhang mit einer unvollständigen Aufreinigung der Proben steht (Saccharose-Dichtegradienten in linker Bildhälfte zeigen Chlorophyll-haltigen Hintergrund).

Trägt man LHCII-Monomere der neuen Mutanten nach Detergenzwechsel-Rekonstitution auf Ni^{2+} -IDA-Sepharose auf, wird ein Teil der Protein-Pigment-Komplexe durch Bindung des „His₆ tag“ immobilisiert sowie trimerisiert und kann daraufhin mit einem Imidazol-haltigen Puffer eluiert werden. Die mittels UZ aufgereinigten Trimere (Abb. 2.3.10, linke Bildhälfte) verhalten sich sowohl in der quantitativen Ausbeute an LHCII-Trimern als auch in der spektroskopischen Charakterisierung (rechte Bildhälfte) identisch zu C3.2h.

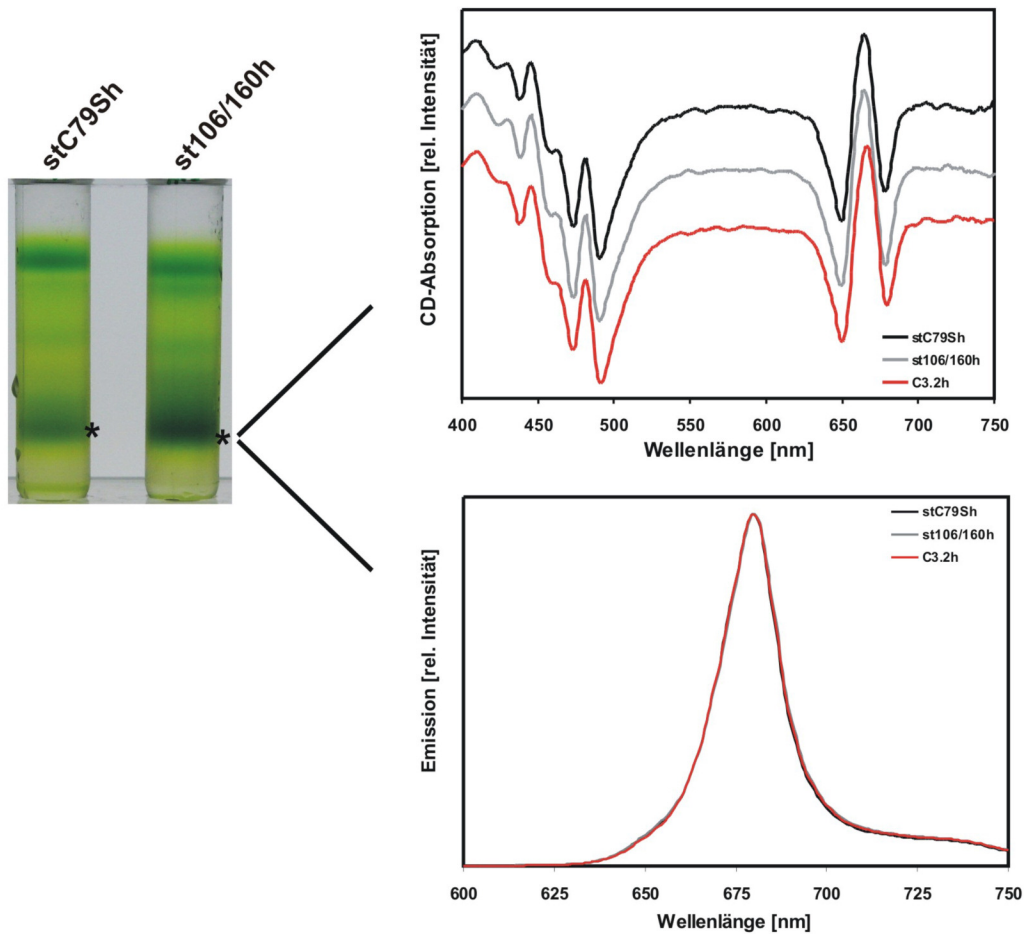


Abb. 2.3.10: Trimerisierung der Mutanten stC79Sh und st106/160h mittels C-terminalem „His₆ tag“ und spektroskopische Charakterisierung im Vergleich zu rekombinantem LHCII mit wildtypischer Sequenz und C-terminalem „His₆ tag“ (C3.2h). Alle Mutanten wurden mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet, auf Ni^{2+} -IDA-Sepharose trimerisiert und via UZ aufgereinigt (linke Bildhälfte). In der rechten Bildhälfte ist die spektroskopische Charakterisierung der Komplexe mittels CD-Absorption (oben; gestaffelt gezeigt) und Fluoreszenz-Emission (unten; Anregung des Chl *b* bei 470 nm, normiert auf max. Emission) dargestellt.

Vergleicht man die CD-Spektren aufgereingter Trimere beider Klone mit C3.2h-Trimern, so zeigen alle Proben die Trimer-typischen Minima bei 473, 491, 650 und 678 nm (Abb. 2.3.10, rechts oben). Auch die Energieübertragung zwischen den Chlorophyllen funktioniert vollständig (rechts unten). Nach Anregung des Chlorophyll *b* bei

470 nm werden lediglich Lichtquanten der Wellenlänge um 680 nm durch Chl *a* emittiert. Zwar erscheint die Ausbeute an Trimeren des Klons stC79Sh im Vergleich zu st106/160h in den dargestellten Gradienten etwas geringer, durchschnittlich erreichten beide Mutanten aber ähnlich hohe Trimerisierungsausbeuten wie C3.2h (ca. 25 % des in der Rekonstitution eingesetzten Apoproteins; siehe Kap. II, 3.1).

Im Gegensatz zu allen zuvor konstruierten LHCII-Klonen der Arbeitsgruppe können doppelt affinitätsmarkierte Klone nicht nur mittels C-terminalem „His₆ tag“, sondern auch mittels N-terminalem „Strep tag“ immobilisiert und trimerisiert werden. Trägt man LHCII-Monomere nach Detergenzwechsel-Rekonstitution auf eine Strep-Tactin-Säule auf, werden die Komplexe auch hier zu einem hohen Anteil gebunden und zu Trimeren oligomerisiert. Nach Elution und Aufreinigung zeigen die trimeren Komplexe spektroskopisch wiederum keinerlei signifikanten Unterschiede zu C3.2h (Abb. 2.3.11).

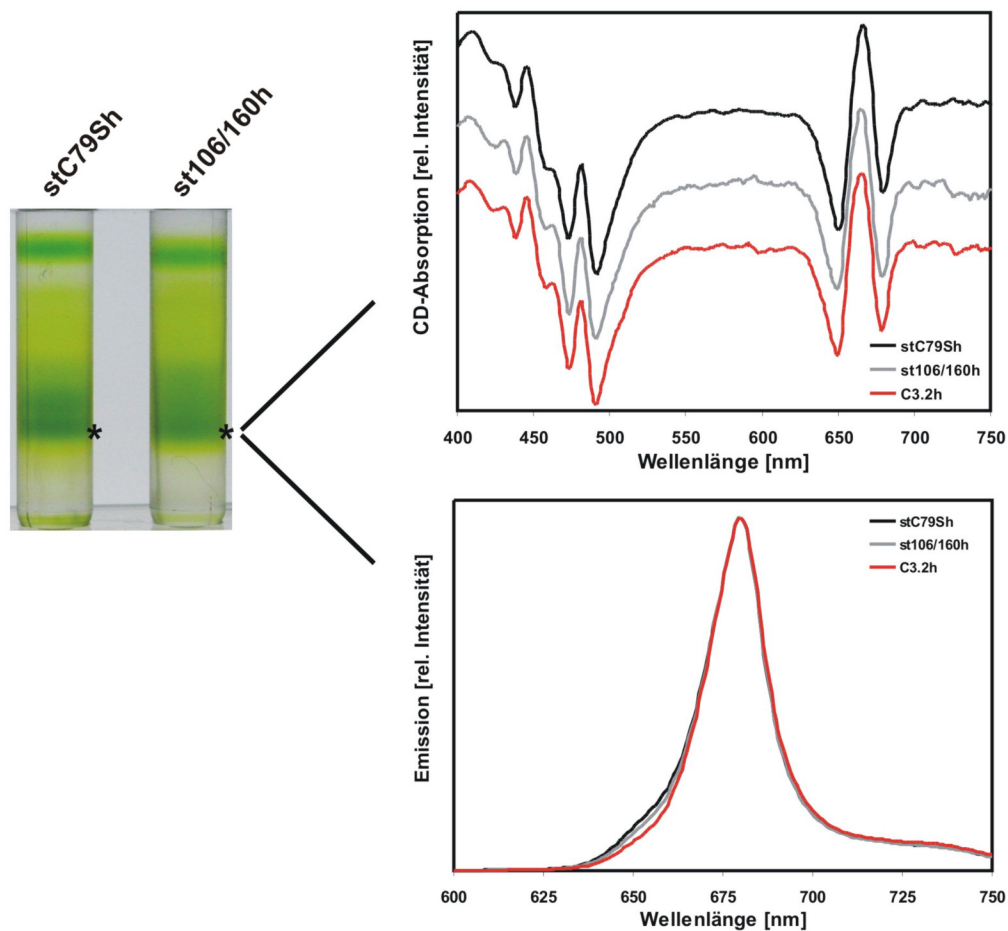


Abb. 2.3.11: Trimerisierung der Mutanten stC79Sh und st106/160h mittels N-terminalem „Strep tag“ und spektroskopische Charakterisierung im Vergleich zu rekombinantem LHCII mit wildtyperischer Sequenz und C-terminalem „His₆ tag“ (C3.2h). Alle Mutanten wurden mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet. Beide stLhcb1h-Klone wurden an Strep-Tactin trimerisiert und via UZ aufgereinigt (linke Bildhälfte). In der rechten Bildhälfte ist die spektroskopische Charakterisierung der Komplexe mittels CD-Absorption (oben; gestaffelt gezeigt) und Fluoreszenz-Emission (unten; Anregung des Chl *b* bei 470 nm, normiert auf max. Emission) dargestellt.

Sowohl die CD-Absorptions- als auch die Fluoreszenz-Emissionsspektren sind identisch zu den zuvor gemessenen Spektren „His₆ tag“-trimerisierter Komplexe (Abb. 2.3.10). Lediglich die Ausbeute an trimerisiertem Protein scheint im Vergleich zur Oligomerisierung mittels „His₆ tag“ etwas geringer zu sein. Im hier dargestellten Beispiel war dies aufgrund der unsaubereren Trennung im Saccharose-Dichtegradienten schwer zu quantifizieren. Interessanterweise beinhaltet die grüne „Schmier“ oberhalb der abgezogenen Trimerbande (*) ebenfalls größtenteils trimeren LHCII und nicht wie erwartet monomere Komplexe (CD-Daten nicht gezeigt), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Trimerisierungsausbeute an Strep-Tactin in einer ähnlichen Größenordnung liegt wie an Ni-Säulen.

3.2.3 Immobilisierung des trimeren LHCII mittels „Strep tag“/Strep-Tactin-System

Nachdem doppelt affinitätsmarkierte Klone, wie zuvor beschrieben, nach Detergenzwechsel-Rekonstitution sowohl über das „His₆ tag“/Ni²⁺-IDA-Sepharose-System als auch über das „Strep tag“/Strep-Tactin-System erfolgreich immobilisiert und trimerisiert werden können, sollte in dieser Versuchsreihe das Bindungsverhalten unaufgereinigter und aufgereinigter Trimere an Strep-Tactin untersucht werden. Die vorherige Trimerisierung erfolgte nach Standard-Methode mittels „His₆ tag“/Ni²⁺-IDA Sepharose-System.

Wie in Abb. 2.3.12 A dargestellt, wurde in einem ersten Versuchsansatz der LHCII-Klon stC79Sh mittels „His₆ tag“ auf der Ni-Säule trimerisiert und mit max. 250 mM Imidazol eluiert, da höhere Imidazol-Konzentrationen die Bindungseffizienz des „Strep tag“ an Strep-Tactin herabsetzen können. Ein Aliquot des Ni-Säulen-Eluats wurde mittels UZ aufgereinigt. Wie im Saccharose-Gradienten A1 ersichtlich ist, resultierte die Trimerisierung in einer hohen Ausbeute an Trimeren (A1*), welche unauffällige CD-Absorptions- und Fluoreszenz-Emissionsspektren zeigten (rechte Bildhälfte, Vergleich mit trimerem C3.2h). Ein zweites Aliquot des Ni-Säulen-Eluats mit gleicher Proteinmenge wurde ohne Aufreinigung auf Strep-Tactin aufgetragen. Wie anhand der Gradienten A2 und A3 zu sehen ist, wurden aufgetragenen Komplexe annähernd vollständig an Strep-Tactin gebunden. Keiner der beiden Waschschriffe der Strep-Tactin-Säule mit TX-Puffer enthält größere Mengen an LHCII (A2, A3). Das Eluat der Strep-Tactin-Säule dagegen besteht ebenfalls vorwiegend aus trimeren Lichtsammel-Komplexen (A4*), welche unauffällige CD-Absorptions- und Fluoreszenz-Emissions-Spektren zeigen.

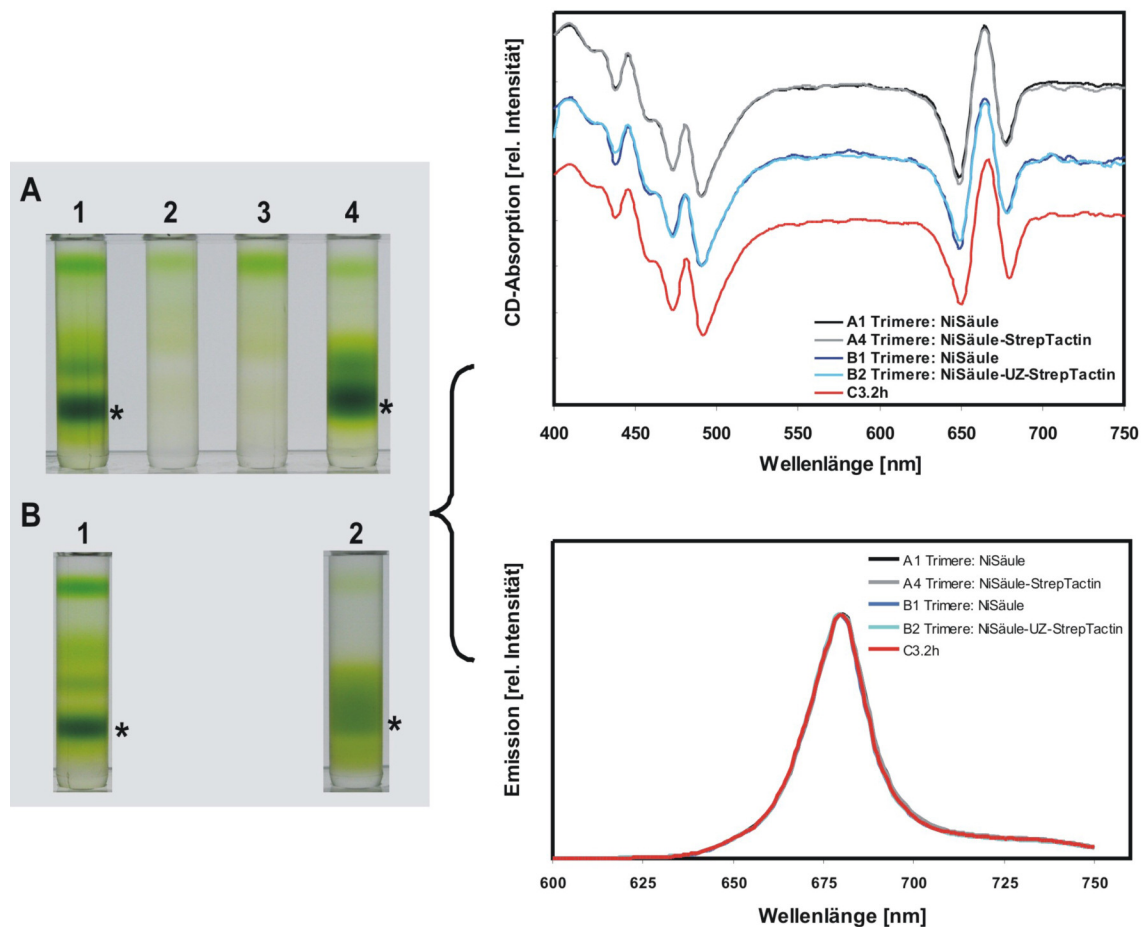


Abb. 2.3.12: Immobilisierung von trimerem LHCII an Strep-Tactin am Beispiel der doppelt affinitätsmarkierten Mutante stC79Sh nach Detergenzwechsel-Rekonstitution. In (A) wurde stC79Sh mittels „His₆ tag“ trimerisiert und ein Aliquot mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt (A1). Ein zweites Aliquot des Ni-Säulen-Eluats wurde ohne Aufreinigung an Strep-Tactin immobilisiert: A2 zeigt den ersten Waschschriff mit TX-Puffer, A3 den zweiten Waschschriff mit TX-Puffer und A4 das Eluat der Strep-Tactin-Säule. In (B) wurde stC79Sh mittels „His₆ tag“ trimerisiert und via UZ aufgereinigt (B1). Die im Gradienten markierten Trimere (B1*) wurden abgezogen und in Dichtegradienten-Lösung an Strep-Tactin immobilisiert (Waschschriffe hier nicht gezeigt): das Eluat der Strep-Tactin-Säule wurde ebenfalls via UZ aufgereinigt (B2). In der rechten Bildhälfte sind die CD-Absorptionsspektren (oben; zur Übersichtlichkeit gestaffelt) und Fluoreszenz-Emissionsspektren (unten; Anregung bei 470 nm, normiert auf max. Emission) der markierten (*) Banden aus Saccharose-Dichtegradienten dargestellt und mit Trimeren der „His₆ tag“-Mutante C3.2h verglichen.

In einem zweiten Versuchsansatz (B) wurden die Komplexe ebenfalls mittels Ni-Säule trimerisiert und via UZ aufgereinigt [B1(*), ebenfalls mit unauffälligen CD- und Fluoreszenz-Spektren]. Die funktionalen stC79Sh-Trimere wurden aus dem Gradienten isoliert und in Dichtegradienten-Lösung (0,6 mol/l Saccharose; 0,1 % LM; 5 mM Tricine pH 7,8) an Strep-Tactin immobilisiert. Auch hier wurden die Komplexe vollständig an die Säulenmatrix gebunden, die folgenden Waschschriffe mit TX-Puffer blieben farblos und wurden daher nicht aufgereinigt. Die Elution der trimeren Komplexe erfolgte voll-

ständig durch die Zugabe von Desthiobiotin, das spektroskopische Verhalten war unauffällig (B2*). Die geringere Menge an trimerem LHCII in Gradient B2 im Vergleich zu Probe A4 liegt in der geringeren Protein-Auftragsmenge begründet (auf A4 wurde ca. die doppelte Menge an Protein aufgetragen).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es möglich ist, trimeren LHCII mittels N-terminalen „Strep tag“ vollständig an Strep-Tactin zu immobilisieren. Hierbei scheint es keine Rolle zu spielen, ob die trimeren Komplexe vor der Bindung an Strep-Tactin im Saccharose-Gradienten aufgereinigt wurden oder nicht. Da letzterer Ansatz einen zeitaufwendigen Zentrifugationschritt von 16 h erspart, wurde dieses Protokoll zur Herstellung heterogener Trimere des LHCII vorgezogen.

3.2.4 Herstellung heterogen markierter LHCII-Trimere: Oligomerisierung auf der Ni-Säule sowie Aufreinigung mittels „Strep tag“/Strep-Tactin-System

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass trimerer LHCII via „Strep tag“ vollständig an Strep-Tactin immobilisiert werden kann. Damit ist eine Grundvoraussetzung erfüllt, auf welcher das in Abb. 2.3.7 dargestellte Prinzip zur Trennung spinmarkierter Trimere von unmarkierten beruht. Um die Herstellung heterogen markierter Trimere nachweisen zu können, wurde in einem Vorversuch auf den Einsatz von Spinmarkern verzichtet. Stattdessen wurde die Mutante st106/160h, welche sowohl in der lumenalen Schleife (Position 106) als auch in der stromalen Schleife (Position 160) ein Cys besitzt, mit dem Fluoreszenz-Akzeptorfarbstoff Dy731 kovalent markiert. Sowohl das Fluoreszenz-markierte Apoprotein mit doppeltem Affinitätsmarker, als auch die unmarkierte Mutante C3.2h mit C-terminalem „His₆ tag“ wurden mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet und in drei unterschiedlichen Ansätzen auf Ni²⁺-IDA-Sepharose trimerisiert. Im ersten Ansatz wurde das unmarkierte Protein mit dem markierten Protein im Verhältnis 5:1 vor Trimerisierung gemischt, im Ansatz 2 wurde als „Strep tag“-negative Kontrolle lediglich Protein der Mutante C3.2h trimerisiert, als „Strep tag“-positive Kontrolle in Ansatz 3 lediglich Fluoreszenz-markiertes Protein der Mutante st106/160h.

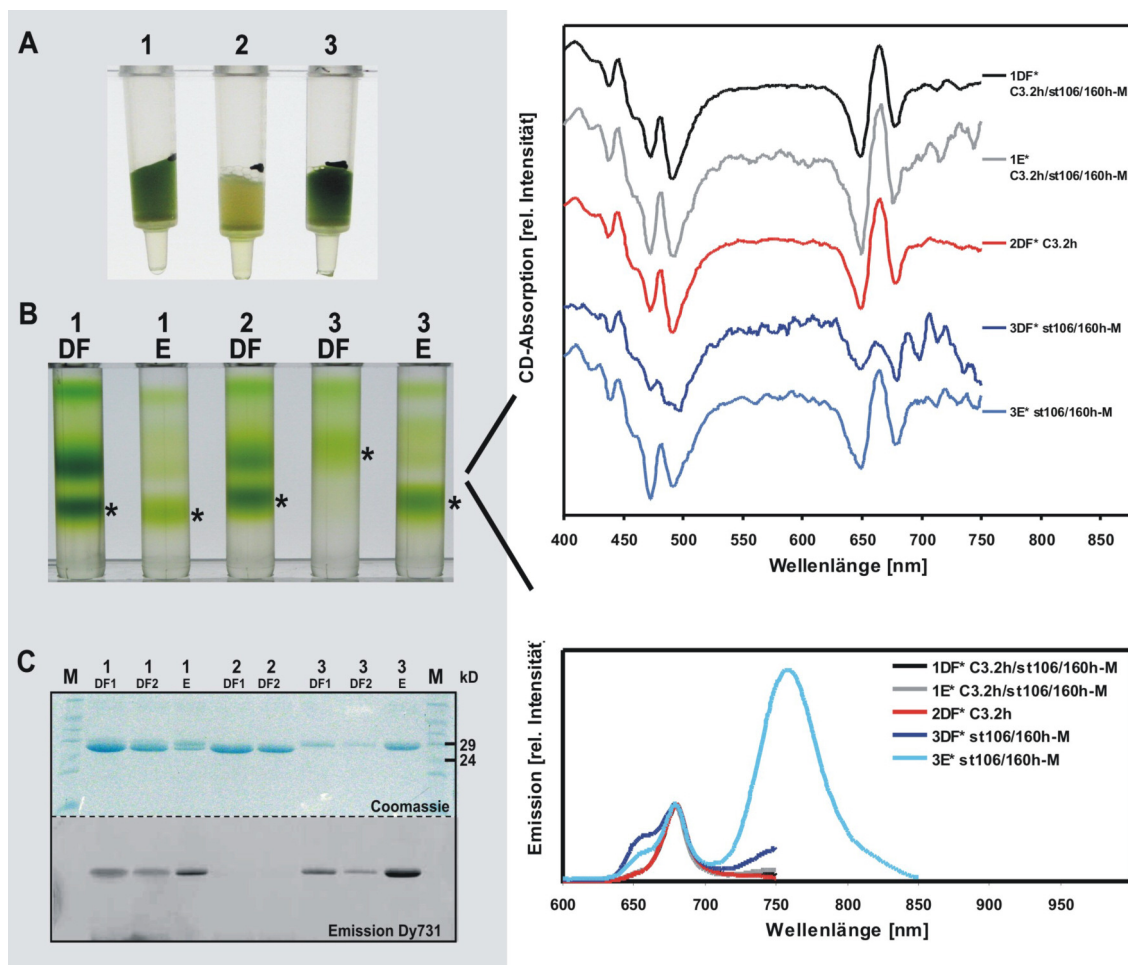


Abb. 2.3.13: Herstellung und Aufreinigung heterogener LHCII-Trimere. In (A) sind die Strep-Tactin-Säulen nach Trimerbeladung und nach Waschen mit TX-Puffer dargestellt. (B) zeigt ausgewählte Fraktionen der Strep-Tactin-Säule nach UZ sowie CD-Absorptions- und Fluoreszenz-Emissionsspektren einzelner Banden. (C) zeigt ausgewählte Fraktionen der Strep-Tactin-Säule nach Auftrennung mittels SDS-PAGE (oben, Coomassie-Blau Färbung; unten, Fluoreszenz-Emission des Dy731-markierten Proteins). In Ansatz 1 wurden Rekonstitutionen von C3.2h und von Fluoreszenz-markiertem st106/160h (st106/160h-M) im Verhältnis 5:1 gemischt und auf Ni^{2+} -IDA-Sepharose trimerisiert. Das Gemisch aus Trimeren wurde umgehend auf eine Strep-Tactin-Säule aufgetragen und mit TX-Puffer gewaschen (A, 1). Der Durchfluss wurde in B (1DF) und C (1DF1, 1DF2) charakterisiert, das Eluat in B (1E) sowie C (1E). Als Ansatz 2 wurden C3.2h-Trimere auf Strep-Tactin aufgetragen und gewaschen (A, 2), der Durchfluss in B (2DF) sowie C (2DF1, 2DF2) charakterisiert. In Ansatz 3 wurden Fluoreszenz-markierte Trimere der Mutante st106/160h ebenfalls an Strep-Tactin gebunden und gewaschen (A3) und der Durchfluss (B, 3DF bzw. C, 3DF1 und C, 3DF2), sowie das Eluat (B, 3E sowie C, 3E) charakterisiert. In der rechten Bildhälfte ist die spektroskopische Charakterisierung der Komplexe mittels CD-Absorption (zur Übersichtlichkeit gestaffelt gezeigt) und Fluoreszenz-Emission (Anregung des Chl *b* bei 470 nm, normiert auf max. Emission) dargestellt.

Nach Auftragen der Negativ-Kontrolle aus C3.2h-Trimern (Abb. 2.3.13, A2) auf Strep-Tactin zeigte sich, dass ohne vorhandenen „Strep tag“ keine Interaktion zwischen dem LHCII und dem Strep-Tactin stattfindet. Die C3.2h-Trimere werden nicht auf der Säule immobilisiert und können infolgedessen durch den Waschschrift mit TX-Puffer vollstän-

dig entfernt werden, wie deutlich an der schwach grün-gefärbten Säule (A2) zu sehen ist. Die Gesamtheit der intakten Trimere befindet sich demnach im Durchfluss, was sowohl durch Ultrazentrifugation (B, 2DF*) und spektroskopische Charakterisierung, als auch in der SDS-PAGE (C, 3DF1 und 3DF2) gezeigt werden konnte. Eine Elution von Komplexen war nach den Waschschritten nicht mehr möglich.

Ansatz 3 hingegen, die Positiv-Kontrolle, bestehend aus homogen Fluoreszenz-markierten Trimeren der Mutante st106/160h, wurde nahezu vollständig an Strep-Tactin gebunden und färbte die weiße Matrix tief grün (A3). Nur ein geringer Anteil des Proteins wurde durch Waschschriffe entfernt (C, Banden 3DF1 und 3DF2). Die aus dem Saccharose-Dichtegradienten isolierte, diffuse Komplex-Bande (B, 3DF) zeigte weder einen ausreichenden Energietransfer von Chl *b* zu Chl *a* (rechte untere Bildhälfte, dunkel-blaues Fluoreszenz-Spektrum mit ausgeprägter Chl *b*-Schulter bei 655 nm), noch das typische CD-Signal des LHCII (rechts oben, dunkel-blaue Linie, 3DF*st106/160h-M). Die gebundenen Komplexe der Positiv-Kontrolle (A3) hingegen konnten durch Zugabe des Desthiobiotin eluiert und mittels Dichtegradient (B, 3E*) separiert werden. Die isolierten Trimere zeigten die schon früher beobachteten Änderungen der CD- und Fluoreszenz-Spektren der Mutante 106/160 nach Markierung mit dem Fluoreszenz-Marker Dy731 (Christian, 2008). Diese besteht zum einen in einer negativeren CD-Absorption im Bereich der Soret-Region bei 473 nm (rechts oben, hellblaue Linie 3E*st106/160h-M), sowie in einem deutlichen Energie-Transfer der Chlorophylle auf den Akzeptor-Farbstoff. Dies hat zur Folge, dass die Fluoreszenz-Emission des Chl *a* bei 680 nm abnimmt (dadurch wird auch ein geringer Anteil an Chl *b* Fluoreszenz sichtbar, der ansonsten durch die deutlich intensivere Fluoreszenz des Chl *a* verdeckt wird), gleichzeitig kommt es zur Emission des DY731 bei 758 nm.

In der SDS-Page (C) ist zudem ersichtlich, dass C3.2h eine Masse von 27 kDa (C, 2DF1), Dy731-markierter st106/160h (C, 3E) dagegen eine Masse von 29 kDa besitzt. Außerdem kann hier durch selektive Anregung des Farbstoffes das markierte Protein vom unmarkierten Protein unterschieden werden [C3.2h (2DF1) fluoresziert nicht, während st106/160h (3E) fluoresziert].

Auch in Versuchsansatz 1, welcher die Mischtrimere aus unmarkiertem und markiertem Protein enthält, bindet zumindest ein Teil der Komplexe an Strep-Tactin und färbt die Säule deutlich grün (A1). Sowohl im Dichtegradienten (B, 1DF) als auch im Gel (C, 1DF1 und 1DF2) wird deutlich, dass ein Großteil des trimeren Proteins nicht an die Säule bindet und mit dem Waschpuffer von der Säule entfernt wird. Diese Fraktionen zeigen einerseits das typische Trimer-Signal des C3.2h in der CD-Absorption (1DF*, schwarze Linie; Minimum bei 473 nm ist weniger negativ als bei 491 nm), zum anderen wird in der SDS-PAGE deutlich, dass sich die Trimere zum Großteil aus unmarkiertem Protein zusammensetzen. Über der sehr deutlichen Bande des C3.2h bei 27 kD ist lediglich eine schwache Bande des doppelt affinitätsmarkierten Proteins zu sehen, welche lediglich eine schwache Dy731-Emission zeigt. Das entsprechende

Säulen-Eluat dieses Ansatzes besteht größtenteils aus LHCII-Trimeren (B, 1E*). Diese Trimere zeigen neben dem Energietransfer von Chl *b* zu *a* noch den Ansatz eines Energietransfers zu dem Akzeptor-Dye. Dies ist erkennbar in dem untypischen, aber nur schwach sichtbaren Anstieg der Fluoreszenz ab 720 nm (graue Linie), was auf das Vorhandensein von Fluoreszenz-markiertem Protein hindeutet. Dieses Ergebnis wird auch in der CD-Absorption bestätigt. Zur Verdeutlichung wurde die Soret-Region ausgewählter CD-Spektren der Abb. 2.3.13 vergrößert in Abb. 2.3.14 dargestellt.

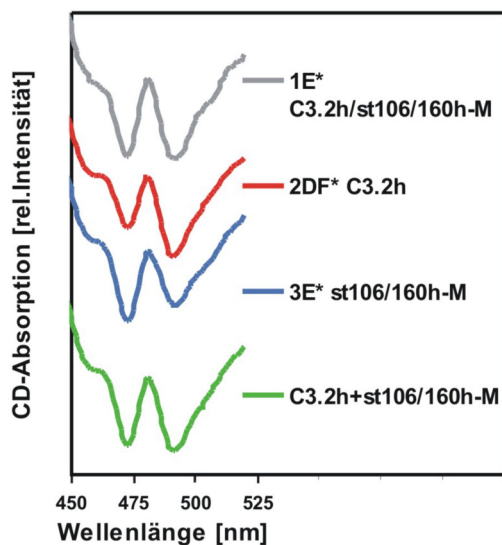


Abb. 2.3.14: Ausschnitt der CD-Absorptionsspektren im Bereich der Soret-Absorption der in Abb. 2.3.13 B dargestellten Trimer-Proben 1E* (Eluat der Mischprobe C3.2h/st106/160h-M, grau), 2DF* (Trimere des C3.2h, rot) und 3E* (Eluat der homogen markierten Trimere st106/160h-M, blau). Zusätzlich wurden rechnerisch durch Addition der Spektren 2DF* und 3E* das hypothetische Vergleichsspektrum eines Gemischs von C3.2h-Trimeren und st106/160h-M-Trimeren (C3.2h+st106/160h-M, grün) erstellt.

Wie hier deutlich zu sehen ist, zeigen die Mischtrimere des Eluats von Ansatz 1 (1E*, grau) weder das typische CD-Spektrum der

Trimere des C3.2h (2DF*, rot), noch das der homogen Fluoreszenz-markierten Trimere (3E*, blau). Ähnlich wie zuvor für die homogen Fluoreszenz-markierten Trimere gesehen (blau), zeigt das Eluat der Mischtrimere (grau) eine Verstärkung des Minimums bei 473 nm gegenüber C3.2h. Interessanterweise ähnelt das Spektrum der Mischtrimere vielmehr einem errechneten (und daher hypothetischen) Additions-Spektrum (C3.2h+st106/160h-M, grün) der unmarkierten Trimere (rot) mit den homogen markierten Trimere (blau). Auch in diesem Fall sind die Minima bei 473 und 491 nm identisch.

Dass es sich bei dem Eluat des Mischansatzes (1E*, grau) wirklich um heterogen markierte Trimere des LHCII handelt, wird durch die SDS-PAGE bestätigt (Abb. 2.3.13, C, 1E). Hier ist deutlich eine Doppelbande bei 27 und 29 kDa erkennbar. Nach densitometrischer Auswertung des Coomassie-gefärbten Gels ist die obere Bande etwas intensiver. Zudem zeigt sie die Emission des Akzeptorfarbstoffs und kann somit als Bande des Fluoreszenz-markierten st106/160h identifiziert werden. Die gemessenen Proteinverhältnisse decken sich gut mit der statistischen Erwartung. Bei einer Mischung von 1:5 (markiertes zu unmarkiertes Protein), sollten 51,2 % der Trimere C3.2h-homogen sein, 38 % einfach markiert, 10 % zweifach und 0,8 % dreifach markiert sein. Nach Abtrennung der homogen unmarkierten Trimere verbleiben lediglich heterogen und homogen Fluoreszenz-markierte Trimere. Bei diesen sollte rechnerisch das Verhältnis von markierten zu unmarkierten Monomeren 2:1,4 sein, was sich nahe-

rungsweise mit dem Verhältnis der Bandenintensitäten deckt (Abb. 2.3.14, C, 1E). Da der Ansatz mit C3.2h-Trimeren keinerlei Bindung an Strep-Tactin zeigte, muss es sich bei den eluierten Trimeren des Mischansatzes (A1) um heterogene Trimere handeln und nicht um eine Mischung homogen markierter und homogen unmarkierter Trimere, was im folgenden Abschnitt weiter experimentell belegt werden soll.

3.2.5 Herstellung heterogen spinmarkierter LHCII-Trimere zur Durchführung von DEER-Abstandsmessungen

Nach den Ergebnissen der Vorversuche erschien es möglich mit der „unsauberen“ Methode (Abb. 2.3.7) heterogen markierte Trimere des LHCII produzieren zu können. Ob es sich bei den isolierten Trimeren solcher Misch-Trimerisierungen, wirklich um heterogene Trimere oder um eine 1:1 Mischung homogen markierter und homogen unmarkierter Trimere handelt, konnte nur indirekt bewiesen werden, da unmarkierte Trimere ohne „Strep tag“ nicht an Strep-Tactin binden können. Einen direkten Nachweis bietet die Abstandsmessung mittels DEER-EPR. Sollten solche Proben wider Erwarten zur Hälfte aus homogen markierten Trimeren bestehen, so wäre in EPR-DEER Messungen der spinmarkierten Mutante 106/160 neben dem Monomer-Abstand von 3,9 nm noch eine Vielzahl anderer Abstände zwischen 4 und 7 nm zu detektieren (Abb. 2.1.1). Dies würde in einer breiten Abstandsverteilung resultieren.

Um die bisherigen Ergebnisse mittels EPR-Spektroskopie zu verifizieren, wurde daher in diesem Versuchansatz eine spinmarkierte LHCII-Probe nach der „unsauberen“ Methode (Abb. 2.3.7) im großen Maßstab hergestellt. Im Gegensatz zu den Vorversuchen wurde hier das Apoprotein von st106/160h kovalent mit dem Spinmarker PROXYL markiert. Nach Detergenzwechsel-Rekonstitution wurde das spinmarkierte Protein im Verhältnis 1:8 mit rekonstituiertem C3.2h gemischt, auf der Ni-Säule trimerisiert und im Anschluss an Strep-Tactin gebunden. Die Säule wurde mit TX-Puffer gewaschen bis der Durchfluß farblos war. Das gebundene Protein wurde mit Desthiobiotin von der dunkelgrün gefärbten Säule eluiert und mittels UZ aufgereinigt (Abb. 2.3.15 A).

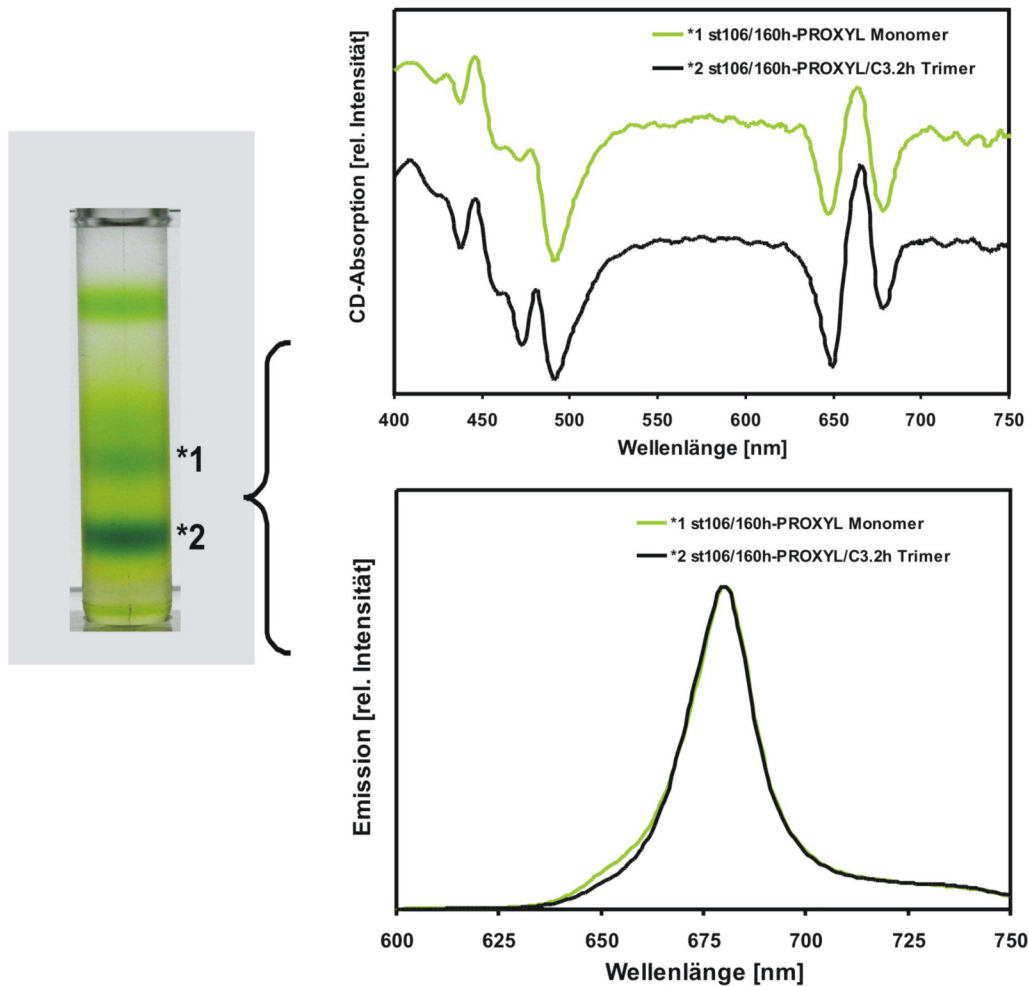


Abb. 2.3.15: Aufreinigung und Charakterisierung heterogener LHCII-Trimere aus st106/160h-PROXYL und C3.2h (gemischt im Verhältnis 1:8) zur Durchführung von EPR-DEER-Messungen. Die Herstellung der Probe erfolgte nach dem Prinzip der „unsauberen“ Methode (Abb. 2.3.7). Die linke Bildhälfte zeigt das Ergebnis der Probenaufreinigung nach UZ. Die Banden mit LHCII-typischem Sedimentationsverhalten (*1 und *2) wurden isoliert und sowohl CD- als auch Fluoreszenz-spektroskopisch untersucht. CD-Spektren (rechts oben) sind zur Übersichtlichkeit gestaffelt dargestellt, Fluoreszenz-Spektren (rechts unten; Anregung bei 470 nm) wurden auf die max. Emission normiert.

Die schwach ausgebildete obere Bande im Gradienten (A*1) bestand aus funktionalen LHCII-Monomeren, die stark ausgebildete untere Bande (A*2) aus funktionalen Trimeren. Sowohl Monomere als auch Trimere zeigten unauffällige CD-Absorptionsspektren des rekombinanten LHCII sowie einen vollständigen Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a*. Die Trimerbanden aus mehreren Gradienten-Röhrchen wurden isoliert, vereinigt und EPR-DEER vermessen.

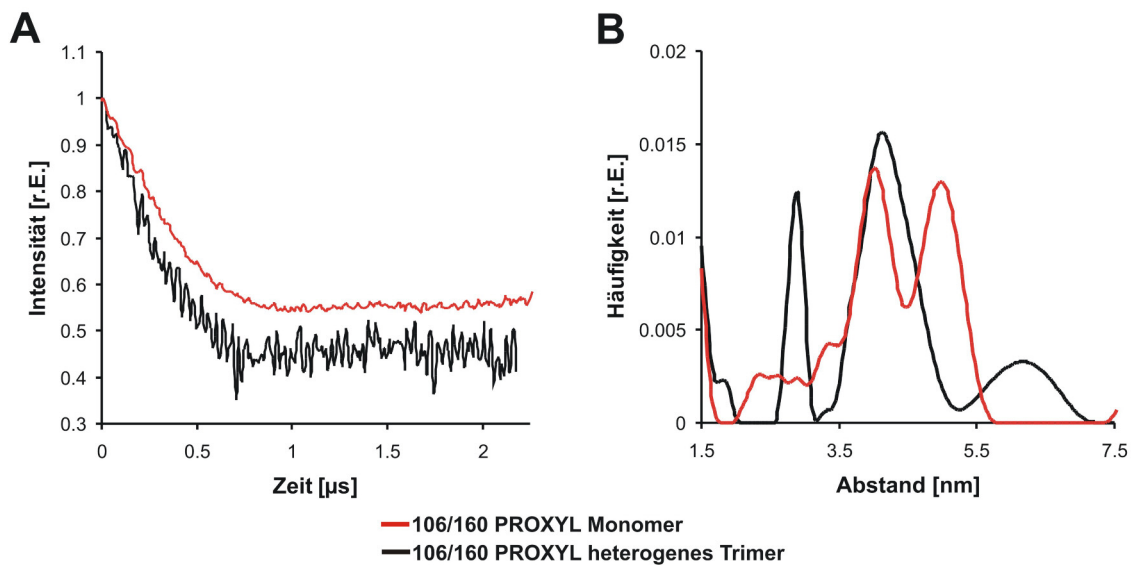


Abb. 2.3.16: EPR-DEER Abstandsmessung von heterogenen Trimeren (schwarze Linien) bestehend aus der PROXYL-markierten Mutante st106/160h und unmarkiertem C3.2h. **(A)** zeigt die Hintergrund-korrigierten Original-Daten, **(B)** die durch Tikhonov-Regularisierung errechneten Spin-Spin-Abstände, dargestellt als Abstandsverteilung. Zum Vergleich sind zusätzlich die Hintergrund-korrigierten Original-Daten sowie die Abstandsverteilung der monomeren Mutante S106C/S160Ch (rote Linien) gezeigt (identische Daten zu Abb. 1.3.10). Für beide Proben wurden die gleichen Prozessierungsparameter verwendet: Zeitnullpunkt 130 ns, Start der Hintergrundkorrektur bei 640 ns, Regulierungsparameter $\alpha=10$.

Wie in Abb. 2.3.16 (A) erkennbar ist, resultierte die DEER-Messung der heterogenen Trimere (schwarz) im Vergleich zu hochkonzentrierten Monomeren der Mutante S106C/S160Ch (rot) in einem EPR-Spektrum mit weniger gutem Signal-Rausch-Verhältnis, welches aber ausreichend interpretierbar war. Die Tikhonov-regularisierte Abstandsverteilung der heterogenen Trimere zeigt ein recht definiertes, dominantes Hauptmaximum bei 4,15 nm, die Monomere stattdessen den bereits beschriebenen (Abb. 1.3.10) etwas breiteren Doppelpeak bei 4 und 5 nm. Zudem war in heterogenen Trimeren noch ein zweites definiertes Maximum bei 2,9 nm, sowie ein breites Nebenmaximum mit langen Abständen (5,5 bis 7 nm) detektierbar. Aufgrund des drastischen Unterschieds der Signal-Rausch-Verhältnisse beider Proben ist eine Interpretation dieser Nebenmaxima rein spekulativ (mündliche Mitteilung, Prof. Dr. G. Jeschke, ETH, Zürich), was später diskutiert werden soll.

4 Diskussion

4.1 Versuch der Herstellung heterogener LHCII-Trimere durch wiederholte Immobilisierung mittels „His₆ tag“

Ziel dieser Versuchsreihe war es, eine Methode zur Herstellung heterogen spinmarkierter LHCII-Proben zu entwickeln. Früheren Versuchsansätzen folgend (Seimetz, 2004; Dockter, 2005) wurde das Bindeverhalten des LHCII mittels „His₆ tag“ an Ni²⁺-Affinitätssäulen erneut getestet. Diesen Ansätzen lag die Idee zugrunde, ein Trimergemisch, bestehend aus Populationen von einfach, zweifach und dreifach affinitätsmarkierten Trimeren, durch Immobilisierung an der Ni-Affinitätssäule aufzutrennen. Durch die unterschiedlich starke Interaktion der einfach, zweifach und dreifach Hexahistidyl-markierten Trimere, sollten diese theoretisch bei unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen eluieren.

Grundlegende Voraussetzung zur Anwendung dieses Prinzips ist die reproduzierbare Bindung des trimeren LHCII an die Ni-Säule. Diese Voraussetzung war bisher nicht gegeben (Seimetz, 2004; Dockter, 2005; Plunger, 2007) und sollte daher erneut untersucht werden. Für das ungefaltete Apoprotein (Rogl *et al.*, 1998) oder monomeren LHCII direkt nach Detergenzwechsel-Rekonstitution ist die Immobilisierung mittels C-terminalem „His₆ tag“ an Ni-Affinitätssäulen problemlos möglich. Wie entsprechende Vorversuche zeigten, können je nach Säulenmaterial bis zu 25 % des in der Rekonstitution eingesetzten Proteins oligomerisiert werden (Abb. 2.3.1). Aus früheren Versuchen ist bekannt, dass rekombinanter LHCII in der Detergenzwechsel-Rekonstitution zu einem hohen Prozentsatz zu funktionalen Protein-Pigmentkomplexen faltet (Paulsen *et al.*, 1993). Bei einer Trimerisierungsausbeute von 25 % kann dies einerseits bedeuten, dass ein Teil der Protein-Pigment-Komplexe keine Möglichkeit hat an die Affinitätssäulen komplex zu binden, obwohl die eingesetzten Proteinmengen (1 mg LHCII pro 1 ml Sepharose) weit unterhalb der Bindekapazität des Trägermaterials liegen. Andererseits ist bekannt, dass monomeres LHCII durch „Waschen“ mit hochkonzentrierten Detergenzlösungen instabil wird und zerfällt (Nussberger *et al.*, 1993). Demzufolge kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der rekonstituierten Komplexe, gebunden an die Ni-Säule, durch das Waschen mit 1%igem OG-Puffer und durch den nachfolgenden Wechsel des Detergenz (0,05 % TX) zerstört wird und somit die Trimerisierungsausbeute gesenkt wird.

Deutlich geringere Bindungsausbeuten als „frisch“ rekonstituierter LHCII zeigen Protein-Pigment-Komplexe, die mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt wurden. Hierbei scheint es gleichgültig zu sein, ob das Protein als Monomer oder als Trimer vorliegt (Abb. 2.3.2). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das

Problem der erneuten Immobilisierung mittels Hexahistidyl-Rest nicht mit dem oligomeren Zustand der Komplexe zusammenhängt. Eine frühere Vermutung war, dass in der Trimerisierung der C-Terminus des rekombinanten LHCII mit angehängtem Affinitätsmarker beispielsweise zwischen den Monomeren im Trimer zu liegen kommt und daher nicht, wie in der Kristallstruktur gezeigt (Standfuss *et al.*, 2005), ins Lösungsmittel gerichtet ist. Die verminderte Zugänglichkeit des C-terminalen Affinitätsmarkers im trimeren Komplex würde hier die verschlechterte Bindungsfähigkeit erklären. In solch einem Fall sollten aber zum einen aufgereinigte Monomere genauso gut an der Affinitätssäule immobilisiert werden können wie „frisch“ rekonstituierte Monomere, nur trimerisierte Komplexe würden ihre Fähigkeit zur Bindung verlieren. Zum anderen wäre unter solchen Umständen zu erwarten gewesen, dass die Verwendung des IDA-Fractogels im direkten Vergleich zu IDA- oder NTA-Spharose Vorteile in der Bindung des LHCII zeigt, da nach Herstellerangaben durch die langen „Tentakel“ des Säulenmaterials auch ein wenig zugänglicher „His₆ tag“ komplex gebunden werden kann.

Die Vermutung, dass eine Verunreinigung der LHCII-Lösung mit zweiwertigen Kationen wie Ni²⁺ oder Cd²⁺ die Bindungsfähigkeit des Hexahistidyl-Restes an die Affinitätssäulen beeinträchtigen kann, wurde zunächst bestätigt. Hintergrund war hier die Annahme, dass solche Kationen entweder aus der ersten Affinitätschromatographie verschleppt werden oder verwendete Puffer durch die Verwendung unreiner Chemikalien „verschmutzt“ sind. Ein diesbezüglich durchgeführter Versuch mit „frisch“ rekonstituiertem LHCII, versetzt mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ni-Kationen, zeigte eine deutliche Abnahme der Bindungsausbeute mit steigender Ni²⁺-Konzentration (Abb. 2.3.3). Vergleicht man aber die Bindungsausbeuten des LHCII in Ni²⁺-versetzten Lösungen mit denen der aufgereinigten Komplexe nach Ultrazentrifugation, müssten in der eingesetzten Saccharose-Dichtegradienten-Lösung mehr als 30 Ni-Kationen pro His zur Verfügung stehen (entspricht 2 mmol/l NiCl₂). Eine solch starke Verunreinigung der Lösungen kann sicher ausgeschlossen werden. Frühere Versuche durch Seimetz (2004) zeigten zudem, dass auch eine Behandlung der aufgereinigten LHCII-Proben mit dem Komplexbildener EDTA, welcher in direkter Konkurrenz zum Hexahistidyl-Rest um gebundenes Ni²⁺ steht, die erneute Immobilisierung nicht ermöglicht. Aus diesen Versuchsansätzen kann gefolgert werden, dass die Belegung des Affinitätsmarkers mit zweiwertigen Kationen nicht als Hauptgrund für die starke Verhinderung der Bindung des aufgereinigten LHCII an die Ni-Säule in Frage kommt.

Als weiterer Erklärungsansatz für das schlechte Bindungsverhalten des aufgereinigten LHCII wurde von Seimetz (2004) die Zusammensetzung der Detergenzmizelle bzw. der verwendeten Detergenz-haltigen Lösungen diskutiert. Analog zum schlechten Bindungsverhalten in Saccharose-Dichtegradienten-Lösung (Abb. 2.3.2), führte bei Seimetz (2004) die Verdünnung rekonstituierter Monomere mit LM-haltiger Saccharoselösung abhängig von der Inkubationsdauer ebenfalls zu einer Verschlechterung der Bindung mittels Hexahistidyl-Rest. Dass diese Verschlechterung der Bindung in direk-

tem Zusammenhang zur Zusammensetzung der Detergenzmizelle steht, konnte hier in einem Versuchsansatz mit ausgefällten Trimeren, welche in verschiedenen Detergentien oder Detergenz-Mischlösungen rückgelöst wurden, eindeutig bestätigt werden (Abb. 2.3.4, 2.3.5 und 2.3.6). Um möglichst definierte Mizellenzusammensetzungen zu testen, wurde trimerisiertem LHCII durch „Bio Beads“-Behandlung das Detergenz zunächst komplett entzogen. Bei entsprechender Salzzugabe bildet LHCII stabile Aggregate ohne dabei zu Monomeren zu zerfallen. Dass durch die Behandlung mit „Bio Beads“ native Lipide, wie das für die Trimerisierung essentielle PG, entfernt werden, kann ausgeschlossen werden (Rigaud *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2008). In Detergenzlösungen rückgelöste Komplexe wurden sicherhaltshalber kurz zentrifugiert, um ungelöste Proteinaggregate zu entfernen, und wurden zudem vor Wiederbindung an die Affinitätssäule spektroskopisch charakterisiert. Während trimere Komplexe, solubilisiert in LM, TX oder in verschiedenen Detergenz-haltigen Saccharoselösungen, praktisch nicht rückgebunden wurden, wurden OG-solubilisierte Trimere immerhin zu 6 % an verschiedenen Ni-Affinitätssäulen immobilisiert. Wie zuvor bereits erwähnt, neigen LHCII-Trimere, solubilisiert in höheren Konzentrationen des Detergenz OG, bei längerer Inkubation dazu zu Monomeren zu zerfallen (Nussberger *et al.*, 1993). Dies kann in diesem Fall als Grund für die leicht bessere Bindungseffizienz aber ausgeschlossen werden. Zum einen erfolgte die Beschickung der Affinitätssäule mit Protein sofort nach der Solubilisierung auf Eis, zum anderen wurde ein Aliquot des solubilisierten Proteins mittels CD-Absorption positiv auf trimeren LHCII getestet.

Eine signifikante Verbesserung der Wiederbindung an die Affinitätssäule (17 % bis 25 % des eingesetzten Proteins) zeigten Trimere, die in einem Rekonstitutions-„Mock“-Puffer rückgelöst wurden. Insbesondere ein „Mock“-Puffer versetzt mit einem Totalpigmentextrakt zeichnete sich durch gute Bindungsausbeuten der trimeren Komplexe aus. Vergleicht man diesen „Mock“-Puffer mit allen zuvor getesteten Detergenzhaltigen Lösungen, fallen vor allem drei Unterschiede auf, die im Folgenden einzeln diskutiert werden sollen: der pH-Wert der Lösungen, das Vorhandensein von nativen Lipiden im eingesetzten Totalpigmentextrakt sowie das Vorhandensein eines Restes an Dodecylsulfat aus der Rekonstitutionsreaktion.

Hierbei ist insbesondere der erste Punkt, der abweichende pH-Wert, ein ernstzunehmender und bisher unzureichend geprüfter Unterschied. Sowohl der in der Rekonstitution als auch der auf der Affinitätssäule verwendete OG-Puffer besitzen jeweils einen basischen pH-Wert von 9. Alle anderen bisher verwendeten Puffer, in denen monomeres oder trimeres LHCII gelöst war, zeigen deutlich niedrigere pH-Werte, die im neutralen Bereich von pH 6,8 bis 7,6 liegen. Das grundlegende Prinzip der komplexen Bindung des „His₆ tag“ an Ni²⁺ ist stark abhängig vom pH-Wert der Lösung oder genauer gesagt von der Stärke der Protonierung der His-Reste. Während der Hexahistidyl-Rest im Basischen deprotoniert ist und komplex an die Ni-Säule binden kann, wird im niedrigen pH der Stickstoff des His protoniert, was die Bindung an die Affinitätssäule

verhindert. Inwiefern die Senkung des pH-Wertes von 9 auf 7,6 ausreichend ist, den Hexahistidyl-Rest zu protonieren, kann an dieser Stelle nicht gesagt werden. Hierbei gilt es zu bedenken, dass LHCII in wässriger Lösung durch die Detergenzmizelle geschützt wird und nicht vorhergesagt werden kann, inwiefern die gemessenen pH-Werte für die Grenzschicht von Mizelle mit wässriger Lösung, in welcher sich der C-Terminus des LHCII voraussichtlich befindet, zutreffend sind. Allerdings kann der Einfluss des pH-Wertes auf die Bindung des monomeren und trimeren LHCII unter geringem Arbeitsaufwand getestet werden. Hierzu sollte ausgefallter LHCII in Detergenzlösungen mit variierenden pH-Werten solubilisiert, CD-spektroskopisch charakterisiert und auf Ni²⁺-Affinitätssäulen rückgebunden werden.

Ein weiterer Unterschied in der Zusammensetzung der verwendeten Puffer liegt im Vorhandensein nativer Lipide im pigmenthaltigen „Mock-Puffer“. Dünnschichtchromatographische Analysen mehrerer Totalpigmentextrakte zeigten stets große Mengen an den nativen Lipiden Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), DGDG, PG und Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG). Von den genannten vier Lipiden ist im Hinblick auf die Immobilisierung des C-terminalen „His₆ tag“ an Ni-Affinitätssäulen insbesondere DGDG von Interesse, da die verbesserte Auflösung der LHCII-Struktur durch Standfuss *et al.* (2005) drei Bindestelle für dieses Lipid im Trimer in unmittelbarer Nähe der einzelnen C-Termini offenbarte (Abb. 2.4.1).

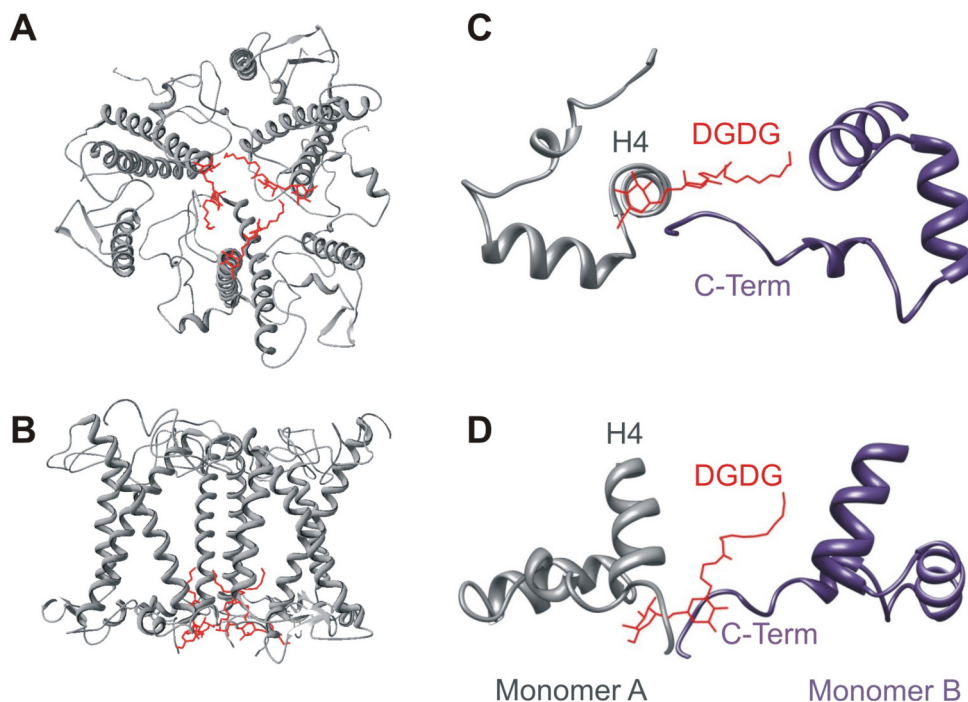


Abb. 2.4.1: DGDG-Bindestellen in der Kristallstruktur des LHCII-Trimers nach Standfuss *et al.* (2005; PDB-Eintrag 2BHW). In (A) und (C) ist das Peptidrückgrat des Trimers mit gebundenem DGDG (rot) in lumenaler Aufsicht gezeigt, in (B) und (D) als Seitenansicht. (C) und (D) zeigen jeweils einen vergrößerten Ausschnitt. Hier ist das Proteinrückgrat (Aminosäuren 190-232) des Monomer A grau, das des Monomer B lila dargestellt. C-Term bedeutet C-Terminus, H4 Transmembranhelix 4. Die Abbildung wurde mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004).

Während frisch rekonstituiertem LHCII sowie den Trimeren, die in pigmenthaltigem Rekonstitutions-„Mock“-Puffer rückgelöst wurden, pro LHCII-Protein zwischen 10 und 50 DGDG-Moleküle zur Verfügung stehen (Schätzwert nach visueller Auswertung der Dünnschicht-Chromatogramme), sind alle anderen getesteten Lösungen frei von nativem DGDG. In diesem Zusammenhang muss zudem die Frage gestellt werden, ob in rekombinanten Trimeren, oligomerisiert mittels Ni-Säule, diese Bindestellen mit nativem Lipid besetzt sind. Nussberger *et al.* (1993) konnten nachweisen, dass native LHCII-Trimere durch 2 tägige Inkubation in 1,2%iger OG-Lösung zum einen langsam zu Monomeren zerfielen und zum anderen keine signifikanten Mengen an Galactolipiden mehr gebunden hatten. Bedenkt man, dass rekonstituiertes Protein nach Bindung an die Affinitätssäule mehrmals mit 1%iger OG-Lösung gewaschen wird, ist fraglich, ob hierbei das gebundene DGDG nicht vom Protein gewaschen wird. Dieser Hypothese folgend wäre in rekombinanten, aufgereinigten Trimeren diese Bindetasche entweder frei oder mit Detergenz besetzt. Dass dieser Gedanke nicht abwegig ist und durch Hinweise gestützt werden kann, soll in Kap. III dieser Dissertationsschrift im Zusammenhang mit strukturellen Änderungen in der lumenalen Schleife des LHCII diskutiert werden.

Wie in Abb. 2.4.1 C und D vergrößert dargestellt ist, bindet die polare Kopfgruppe des Lipids DGDG in unmittelbarer Nähe des lumenalen Endes der Transmembranhelix H4 des Monomer A (grau) im trimeren LHCII. Der Abstand des Zuckers zu einzelnen Aminosäurenresten beträgt hierbei zwischen 4,5 Å und 6,5 Å. Gleichzeitig liegt das Lipid in engem Kontakt zum C-Terminus des Monomer B (lila) im trimeren Komplex. Hier gemessene Abstände des polaren Zuckers zu einzelnen Seitenketten der Aminosäuren in unmittelbarer Nähe betragen zwischen 2,7 Å und 9 Å. Die Hypothese, die sich aus dieser neuen strukturellen Information entwickelt, ist, dass das Lipid DGDG, ähnlich wie für das Lipid PG nachgewiesen (Nussberger *et al.*, 1993), eine Funktion als eine Art „molekularer Klebstoff“ innehaben könnte und in dieser Funktion die Position des C-Terminus B an der rigiden Helix H4 des Monomer A fixieren kann. Für solch eine Hypothese spricht zum einen die Behinderung der Trimerisierung durch Markierung der Position 196 (in H4) mit Spinmarker (Kap. I), was möglicherweise eine Blockierung der DGDG-Bindestelle zur Folge hat. Desweiteren ist es möglich, LHCII-Proben mit hohem DGDG-Gehalt zu trimerisieren, auch wenn PG abwesend ist (Hobe, 1995). Solche Trimere sind allerdings deutlich instabiler als Trimere mit PG.

Wie in Abb. 2.4.1 weiterhin ersichtlich ist, kommen die einzelnen C-Termini des trimeren LHCII so zu liegen, dass sie aus der Membranebene hinaus in das Lösungsmittel zeigen. Ein C-terminal angehängter Affinitätsmarker sollte in diesem Fall eine gute Zugänglichkeit zur Ni-Säule besitzen. Greift man die obige Hypothese wieder auf, könnte die Nichtbesetzung der DGDG-Bindestelle dazu führen, dass der C-Terminus nicht in seiner Position fixiert wird. Wie in Abb. 2.4.2 gezeigt, liegt der C-Terminus des Monomer B in der Nähe der lumenalen Schleife des Monomer A und wird durch die

Interaktion des Trp 222 (Monomer B) mit Helix H3 (Monomer A) in seiner Position fixiert (Barros & Kühlbrandt, 2009). Fällt nun die hypothetische Fixierung durch DGDG weg, wäre es vorstellbar, dass das Ende des C-Terminus B inklusive angehängtem Affinitätsmarker (hier nicht gezeigt) beispielsweise auf der lumenalen Schleife des Monomer A (H2) zu liegen kommt und damit die Fähigkeit zur Bindung an die Ni-Säule deutlich eingeschränkt wird.

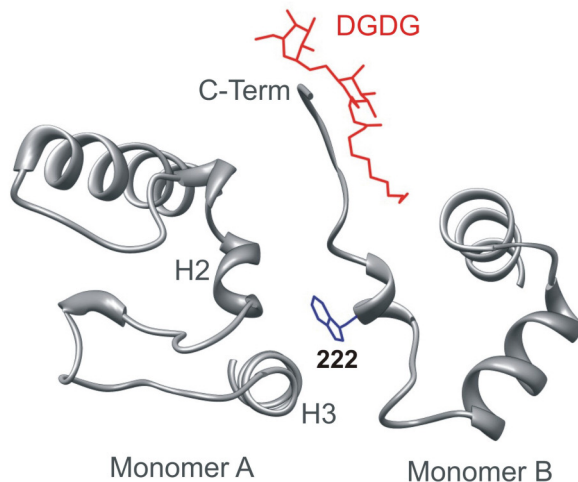


Abb. 2.4.2: Ausschnitt aus der Kristallstruktur des LHCII-Trimers (PDB-Eintrag 2BHW). Darstellung der Interaktion des Tryptophan 222 des Monomer B mit der Helix H3 von Monomer A, sowie des C-Terminus des Monomer B mit dem DGDG A als lumenale Aufsicht. Das Peptidrückgrat ist grau dargestellt, DGDG ist rot, die Seitenkette des Tryptophan 222 blau. C-Term bedeutet C-Terminus, H steht für Helix. Die Abbildung wurde mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004).

Es kann lediglich spekuliert werden, inwiefern die Bindung von Detergenz in die, nach obiger Hypothese leere, DGDG-Bindestasche die Konformation des C-Terminus wirklich beeinflussen kann. Vorstellbar wäre eine Situation, in welcher die einzelnen Detergentien durch die unterschiedliche Länge ihrer Alkylketten auf verschiedene Weise in der Bindetasche zu liegen kommen. Der unterschiedliche Aufbau der Detergenz-Kopfgruppen im Vergleich zum Dissaccharid des DGDG könnte in diesem hypothetischen Modell die Fixierung des C-Terminus stören und somit das zuvor erwähnte „Umklappen“ begünstigen und damit die Bindung des „His₆ tag“ verhindern.

Auch der dritte Unterschied zwischen den in den Immobilisierungs-Versuchen getesteten Puffern, nämlich das hypothetische Vorhandensein eines nicht gefällten Restes an Dodecylsulfat aus der Detergenzwechsel-Rekonstitution, lässt lediglich Raum für Spekulationen. In solch einem Fall wäre beispielsweise vorstellbar, dass LDS genau wie zuvor für nicht-ionische Detergentien angenommen mit seiner Alkylkette in die Bindetasche des DGDG binden kann. Dodecylsulfat besitzt allerdings eine deutlich kleinere Kopfgruppe und könnte daher einen geringeren sterischen Einfluss auf den C-Terminus ausüben, was wiederum das „Umklappen“ des C-Terminus weniger begünstigen würde. Ob das Dodecylsulfat durch die eingebrachte negative Ladung bzw. die mitgeführte Hydrathülle einen stabilisierenden Effekt auf den C-Terminus ausüben kann, was wiederum in einer verbesserten Zugänglichkeit des angebrachten Affinitätsmarkers resultieren würde, bleibt höchst fraglich. Insbesondere die in Dodecylsulfat-Mizellen beobachtete Senkung des lokalen pH-Wertes (Lima *et al.*, 2002), sollte hierbei vielmehr die Protonierung des Hexahistidyl-Restes begünstigen, was die Bin-

dungseffizienz des „His₆ tag“ verschlechtern statt verbessern müsste. Von LHCII-Trimerisierungsstudien (Rogl *et al.*, 1998) ist aber bekannt, dass ungefalteter LHCII, denaturiert in Harnstoff, in hohem Maß an der Ni-Säule immobilisiert wird und durch Waschen mit einer 2%igen LDS-Lösung nicht abgewaschen werden kann. Insofern scheint Dodecylsulfat zumindest keinen negativen Einfluss auf die Bindung des Hexahistidyl-Restes auszuüben.

Insgesamt betrachtet ist die Situation in einer solchen OG/LDS-Mischmizelle nur schwer nachvollziehbar und es bleibt spekulativ, inwiefern negative Ladungen in solchen Mischmizellen deren Eigenschaften ändern können, bzw. inwiefern die Interaktion zwischen Mizelle und den hydrophoben Domänen des Membranproteins beeinträchtigt wird. Experimente zur Faltungskinetik des LHCII (Kap. III), durchgeführt durch Z. Joly-Lopez (DAAD-RISE Programm, 2007) zeigten bereits, dass die Eigenschaften von Detergenz-Mischmizellen (6 % OG, 1 % TX) durch Zumischen von 0,02 % des anionischen Detergenz Desoxycholat deutlich verändert wurden. Chlorophylle, welche zuvor zur Aggregation neigten, blieben hier bis zu 45 min stabil in Lösung. Hier hatte das Einbringen weniger geladener Moleküle in die Mizelle eine beachtliche, aber unvorhersehbare Wirkung erzielt.

Großer Vorteil der zuvor diskutierten, hypothetischen Gründe für die geringe Bindungseffizienz des trimeren LHCII an Ni-Affinitätssäulen, ist ihre schnelle Überprüfbarkeit unter vergleichsweise geringem Arbeitsaufwand. Genau wie für die Veränderung des pH-Wertes diskutiert, sind Versuche zur Bindung der LHCII-Trimere, solubilisiert in Mischmizellen mit variierendem LDS-Gehalt, schnell durchgeführt. Auch hierbei sollte stets darauf geachtet werden, solubilisierte Komplexe vor Bindung an die Ni-Affinitätssäule CD-spektroskopisch auf ihren Oligomerisierungsgrad zu prüfen. Versuche zur Bindung des DGDG erfordern etwas mehr Arbeitsaufwand. Da in kommerziell erhältlichem DGDG nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Alkylketten oxidiert wurden, ist fraglich, wie gut das Lipid in die Bindetasche binden kann. Zumindest Kristallisationsansätze mit peripher gebundenem DGDG zwischen zwei Trimeren reagieren sehr empfindlich auf solch eine Oxidation (Nussberger *et al.*, 1993). Daher wäre es von Vorteil, natives DGDG, möglichst in inerter Schutzatmosphäre, selbst aus Erbsenpflanzen zu isolieren. Hier wäre es sicherlich interessant, zum einen DGDG in unterschiedlichen Konzentrationen zu Detergenz-solubilierten Trimeren zuzumischen, zum anderen wäre es sinnvoll zu testen, inwiefern DGDG in der Trimerisierungsreaktion einen Einfluss auf rekombinanten LHCII ausüben kann. Durch entsprechende DGDG-Konzentrationen in Ni-Säulen-Puffern sowie im Saccharose-Gradient könnte geprüft werden, ob die Immobilisierungseigenschaften der Trimere verbessert werden.

Letztendlich bleibt die Erkenntnis, dass es erstmalig gelungen ist, zuvor isolierte rekombinante LHCII-Trimere in signifikanter Menge mittels „His₆ tag“ an einer Ni²⁺-Affinitätssäule zu immobilisieren. Hierbei erreichte Bindungsausbeuten eignen sich zwar nicht zur Herstellung von heterogen markierten Trimeren im großen Maßstab.

Das eigentliche Problem der Verhinderung der Immobilisierung der Trimere konnte aber stark eingegrenzt werden, so dass es möglich sein sollte, mit überschaubarem Arbeitsaufwand die Bindungsausbeute des trimeren LHCII an Ni-Affinitätssäulen weiter zu steigern.

4.2 Versuch der Herstellung heterogener LHCII-Trimere durch Immobilisierung mittels „Strep tag“

Nachdem das Problem der unzureichenden Immobilisierung des trimeren LHCII mittels „His₆ tag“ nicht ausreichend behoben werden konnte, wurde alternativ das von R. Lauterbach (unveröffentlicht) im Labor etablierte System der „Strep tag“/Strep-Tactin-Immobilisierung aufgegriffen und mit der Trimerisierungsmethode mittels C-terminalem „His₆ tag“ kombiniert. Die Konstruktion der doppelt affinitätsmarkierten Klone stC79Sh und st106/160h mittels Restriktion und Ligation bereits vorhandener Klone funktionierte, analog zur Konstruktion von „His₆ tag“-Klonen in Kapitel I dieser Arbeit, problemlos. Wie zuvor diskutiert, sind solche Konstruktionen vergleichsweise zeitaufwendig. Daher wurde auch hier für zukünftige Mutagenesen ein doppelt affinitätsmarkierter Klon ohne Cys konstruiert (stC79Sh), welcher als Ausgangsklon zur Herstellung weiterer Cys-Klone mittels punktspezifischer Mutagenese dienen kann.

Die biochemische Charakterisierung der neuen Mutanten zeigte, dass sie aufgrund der 8 zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren in der denaturierenden SDS-PAGE wie erwartet ein leicht verändertes Laufverhalten zeigen. Während Mutanten mit C-terminalem „His₆ tag“ eine Bande bei 27 kDa bilden, besitzt das Apoprotein der neuen Klone aufgrund der zusätzlichen Aminosäuren ein Masse von ca. 28 kDa. Die Rückfaltung der neuen Mutanten mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution nach Paulsen *et al.* (1993) und die Trimerisierung mittels „His₆ tag“ auf der Ni-Säule funktionierten problemlos und resultierten in den erwarteten spektroskopischen Eigenschaften (Abb. 2.3.9 und 2.3.10). Wie in Kapitel I diskutiert, kann rekombinanter LHCII unter Umständen sehr empfindlich auf Mutationen der Peptidsequenz reagieren. Aufgrund der Bindung zahlreicher Kofaktoren können aus Mutationen resultierende negative Auswirkungen bezüglich der Komplex-Stabilität oder Pigment-Bindung verhältnismässig einfach detektiert werden. Da die neuen doppelt affinitätsmarkierten Mutanten sich in Rekonstitution und Trimerisierung spektroskopisch unauffällig verhalten, kann davon ausgegangen werden, dass die 8 zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren des „Strep tag“ keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinstruktur ausüben.

Im Unterschied zu allen bisher konstruierten Klonen der AG Paulsen können die doppelt affinitätsmarkierten Klone sowohl an Ni-Säulen als auch an Step-Tactin-Oberflächen immobilisiert werden, was wie später diskutiert neue Möglichkeiten der Probenpräparation ermöglicht. Dass die zuletzt genannte Interaktion spezifisch für den „Strep tag“ mit Strep-Tactin ist, konnte durch das Bindungsunvermögen des „Strep tag“-freien Klones C3.2h bewiesen werden (Abb. 2.3.13). Interessanterweise lassen

sich die N-terminal immobilisierten Mutanten auf der Strep-Tactin-Säule ebenfalls durch Zugabe des Lipids PG trimerisieren. Bindungs- und Trimerisierungsausbeuten sowie spektroskopische Eigenschaften sind hierbei identisch zu den mittels „His₆ tag“-immobilisierten Mutanten (Abb. 2.3.11). Insofern lässt sich feststellen, dass die Immobilisierung von LHCII nach Detergenzwechsel-Rekonstitution mittels „Strep tag“ keinerlei Vorteile, aber auch keine Nachteile bietet. Vergleicht man dagegen beide Affinitätsmarker hinsichtlich der Immobilisierung trimerer Komplexe, so ist der „Strep tag“ klar im Vorteil. Sowohl unmarkierte als auch spin- oder Fluoreszenz-markierte Trimere werden zu annähernd 100 % an Strep-Tactin immobilisiert (Abb. 2.3.12 und 2.3.13). Dieses hohe Bindungsvermögen ist zusätzlich unabhängig von der Aufreinigung der Trimere nach Ni-Säulen-Elution (Abb. 2.3.12). Eluiert man trimeren LHCII mit entsprechend geringerer Imidazol-Konzentration (250 mmol/l) von der Ni-Säule, so kann die Probe direkt an Strep-Tactin gebunden werden und, beispielsweise, von Imidazol befreit oder ein Pufferwechsel durchgeführt werden.

Zusätzlich ermöglicht diese Eigenschaft die Herstellung heterogen markierter Trimere nach der „unsauberen Methode“. Durch Beimischung eines hohen Überschusses unmarkierten Proteins zu Fluoreszenz- oder spinmarkiertem st106/160h vor der Trimerisierung ist es möglich einfach markierte Trimere im hohen Überschuss zu mehrfach markierten Trimeren zu produzieren. Der Hauptteil der gebildeten Trimere, bestehend aus „Strep tag“-freiem LHCII, kann einfach abgetrennt werden (Abb. 2.3.13). Wie entsprechende Vorversuche mit Fluoreszenz-markiertem st106/160Ch in Trimermischungen zeigten, wird ein Großteil der Trimere nicht auf Strep-Tactin immobilisiert. Solche Trimere enthalten aber keine signifikanten Mengen an Fluoreszenz-markiertem Apoprotein und somit auch keinen „Strep tag“. Nach erfolgreicher Bindung eluierte Trimere solcher Mischansätze zeigten dagegen in der SDS-PAGE die mengenmäßig erwartete Mischung aus unmarkiertem und markiertem LHCII. Auch das spektroskopische Verhalten solcher heterogen Fluoreszenz-markierter Trimere ist interessant. Wie schon früher beschrieben, zeigen DY731-markierte Trimere der Mutante 106/160 ein wildtypisches Trimersignal in der CD-Absorption (Christian, 2008). Heterogen DY731-markierte Trimere zeigen dagegen ein „Misch“-Signal nativer und rekombinanter Trimere, was in Kap. III dieser Dissertationsschrift weiter diskutiert werden soll.

Die zuvor angesprochene Unsicherheit, ob die Ergebnisse nicht aus einer 1:1 Mischung homogen unmarkierter und homogen markierter Trimere resultieren, kann letztlich durch die DEER-Abstandsmessung ausgeschlossen werden. Die ermittelte Abstandsverteilung der trimeren EPR-Sonde mit PROXYL-Markierungen in der luminalen und der stromalen Schleife (Pos 106 und 160) zeigt vor allem Abstände zwischen 3,5 und 5 nm und ist damit einer monomeren Probe recht ähnlich. Da die spinmarkierten LHCII-Komplexe aber CD-spektroskopisch eindeutig als Trimere identifiziert wurden, ist dies ein starkes Indiz für die erfolgreiche Herstellung einer heterogen markierten Trimerprobe des LHCII mit nur einem doppelt spinmarkiertem Monomer im Trimer.

Wie schon zuvor angesprochen, kann über die zusätzlich auftretenden kürzeren und längeren Abstände aufgrund des schlechteren Signal-Rausch-Verhältnisses gegenüber doppelt spinmarkierten Monomeren lediglich spekuliert werden. Tatsache ist aber, dass in einer homogen markierten Probe bzw. in einer 1:1 Mischung aus homogen unmarkierten und homogen markierten Trimeren die längeren Abstände deutlich hätten überwiegen müssen (Abb. 2.1.1 B). Da, wie zu Beginn des Kapitels angesprochen, die hier vorgestellte Methode lediglich einen Kompromiss darstellt und die EPR-Proben neben einfach markierten Trimeren einen gewissen Anteil zweifach und dreifach markierter Trimere enthalten kann, ist nicht auszuschließen, dass die gemessenen längeren Abstände durch intermolekulare Spin-Spin-Kopplung zwischen Monomeren im Trimer hervorgerufen werden. Hierüber könnten sicherlich höher konzentrierte Proben des heterogen markierten LHCII sowie der Vergleich zu der DEER-Abstandsverteilung einer Probe homogen markierter Trimere der Cys-Doppelmutante S106C/S160Ch Aufschluss geben. Im ersteren Fall ist jedoch zu bedenken, dass bei Einsatz der doppelten Menge an spinmarkiertem LHCII (also 10 mg), entsprechend 70 mg unmarkiertes Protein und bis zu 175 mg Totalpigmentextrakt eingesetzt werden müssten.

5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Herstellung heterogen markierter LHCII-Proben für EPR-DEER Messungen letztendlich erfolgreich war. In diesem Zusammenhang konnte die eigentlich angestrebte Methode der doppelten Immobilisierung des LHCII mittels „His₆ tag“ zwar verbessert, aber nicht ausreichend weiterentwickelt werden. Erst der Umstieg auf die Strategie der Verwendung unterschiedlicher Affinitäts-chromatographischer Systeme in Reihe mit vorheriger Konstruktion von doppelt affinitätsmarkierten Mutanten des LHCII, führte zum Erfolg. Die letztlich vorgestellte Methode stellt im Gegensatz zu der früher diskutierten doppelten Immobilisierung mittels „His₆ tag“, zwar eine „unsaubere“ Lösung zur Herstellung heterogen markierter Trimere dar, die Rückbindung von annähernd 100 % des trimerisierten LHCII ist aber beachtlich, insbesondere in Hinblick auf die benötigten Proteinnengen in EPR-DEER Proben. Als Nachteil gegenüber der zuvor diskutierten Immobilisierung mittels „His₆ tag“ ist die Herstellung einer Vielzahl neuer, doppelt affinitätsmarkierter Klone des LHCII zu nennen. Durch die erfolgreiche Konstruktion eines doppelt affinitätsmarkierten Ausgangsklons (stC79Sh) in Verbindung mit der vorgestellten Optimierung der punktspezifischen Mutagenese (Kap. I), ist der benötigte zusätzliche Arbeitsaufwand aber überschaubar. Trotzdem sollte auch weiterhin an einer Optimierung des Prinzips der doppelten Immobilisierung mittels „His₆ tag“ gearbeitet werden, bis auch hier die Produktion heterogen markierter Trimere erfolgreich ist.

Nicht verschwiegen werden sollen andere interessante Nutzungsmöglichkeiten der neu konstruierten doppelt affinitätsmarkierten Mutanten des LHCII. Wie schon vorher erwähnt, bietet die ausordentlich hohe Bindungsausbeute des trimeren LHCII an Strep-Tactin die Möglichkeit trimerisiertes Protein beispielsweise nach Markierungsreaktionen schnell und effizient von ungebundenem Farbstoff „vorzureinigen“. Hierbei muss aber in Kauf genommen werden, dass der eluierte LHCII nach Elution mit Desthiobiotin verunreinigt ist. Weiterhin könnte man versuchen durch die feste Bindung des „Strep tag“ an das Protein Streptavidin die von Boggasch (2006) beschriebene Methode zur gerichteten Insertion des rekombinanten LHCII in Liposomen weiterzuentwickeln. Statt des dort genutzten, irreversibel gebundenen hydrophilen „Anker“-Protein GFP („green fluorescent protein“), könnte Streptavidin, reversibel gebunden an den N-terminalen „Strep tag“, zum Einsatz kommen. Vorteil wäre hier die effiziente Entfernung des „Ankers“ nach geglückter Insertion.

Kapitel III

EPR-spektroskopische Untersuchung der Struktur des LHCII in Lösung.

1 Einleitung

Die dreidimensionale Struktur eines Proteins ist ausschlaggebend für seine Funktion. Das Wissen um die Struktur eines Proteins gewährt somit Einblick in dessen Arbeitsweise und Aufgabenbereiche. Gängige Methoden zur Aufklärung von Proteinstrukturen sind insbesondere die Kristallographie, sowie die Kernspinresonanz (NMR)- und Elektronenspinresonanz (EPR)-Spektroskopie. Die Struktur des majoren Lichtsammelkomplex konnte vor ca. 15 Jahren mittels hochauflösender Elektronenmikroskopie bereits größtenteils aufgeklärt werden (Kühlbrandt *et al.*, 1994), der LHCII zählt damit zu den ersten kristallographisch erfassten Membranproteinen (Booth & Curnow, 2006). Während Kühlbrandt *et al.* (1994) die Struktur der Aminosäuren 26 bis 100 und 116 bis 224 nativer LHCII-Trimere aus Erbse bis auf 3,4 Å auflösten, erweiterten Liu *et al.* (2004) die Strukturdaten auf die Reste 14 bis 231 des LHCII aus Spinat bei 2,72 Å, gefolgt von Standfuss *et al.* (2005) bei einer Auflösung von 2,5 Å (Erbsen-LHCII). Die Lage der ersten 9 Aminosäuren der N-terminalen Domäne blieb kristallographisch ungeklärt. Als Grund hierfür wird zum einen der heterogene Aufbau nativer Trimere aus den Genprodukten Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 mit jeweils variierender N-terminaler Peptidsequenz diskutiert (Standfuss & Kühlbrandt, 2004), andererseits legen EPR-spektroskopische Versuche der eigenen Gruppe einen gewissen Grad an N-terminaler Strukturflexibilität in rekombinanten Trimeren des LHCII nahe (Jeschke *et al.*, 2005).

Die Erfassung solcher flexiblen Strukturdomänen gestaltet sich in kristallographischen Experimenten als schwierig, da nur Proteinstrukturen erkannt werden können, die sich im Kristall in einem absolut identischen Zustand befinden. Die Entdeckung von dynamischen Proteindomänen ist folglich nur möglich, wenn einzelne Proben des gleichen Proteins in unterschiedlichen stationären Zuständen präpariert und kristallographisch erfasst werden können. Insbesondere hier liegen die Stärken der NMR- und EPR-Spektroskopie, beide Methoden eignen sich besonders zur Strukturauflösung von Makromolekülen in Lösung und damit zur Beobachtung von Struktur- und Dynamik. Versuche, LHCII mittels NMR-Spektroskopie zu untersuchen, gestalten sich bisher allerdings als schwierig. Aufgrund einer Molekülgröße (Detergenzhülle eingeschlossen) von über 25 kDa kommt der Einsatz der etablierten ¹H-NMR-Spektroskopie oder auch der „nuclear Overhauser effect“ (NOE)-Spektroskopie mit verschiedenen Kernspins nicht in Frage. Zur Durchführung von ¹⁹F-NMR war die obligatorische kovalente Markierung des rekombinanten LHCII mit ¹⁹F-Markern zwar erfolgreich, nachfolgende NMR-Messungen bis dato aber problematisch (Dietz, 2008).

Im Unterschied dazu sind EPR-spektroskopische Untersuchungen an rekombinantem LHCII seit mehreren Jahren etabliert. Die kovalente Einführung von Spinmarkern mittels SDSL (Berliner, 1976; Hubbel *et al.*, 1998) macht den LHCII für die EPR-Spektroskopie zugänglich (Bender, 2004) und resultierte bereits in einer Vielzahl an Erkenntnissen bezüglich der Struktur der Protein-Pigment-Komplexe in Lösung. Früher durchgeführte CW-spektroskopische Untersuchungen zur Lage einzelner Domänen des spinmarkierten LHCII zeigten bereits die aus der Kristallstruktur erwarteten Daten (Docker, 2005) und verifizierten die Stärken der Methode zur Strukturbestimmung in Membranproteinen (Farahbakhsh *et al.*, 1993; Steinhoff *et al.*, 1994). Gleiches gilt für DEER-spektroskopische Abstandsmessungen in doppelt spinmarkierten Monomeren oder dreifach markierten Trimeren des LHCII. Bisher durchgeführte Experimente an kristallographisch aufgelösten Domänen des rekombinanten LHCII bestätigten die Kristallstruktur; die kristallographisch unvollständig aufgeklärte N-terminale Domäne zeigte dagegen in Lösung eine flexible Struktur (Jeschke *et al.*, 2005).

Wie in Kap. I ausführlich dargelegt, resultierte die Verbesserung der Mutagenese-Technik verbunden mit einer effizienten Spinmarkierung des LHCII in einer Vielzahl neuer, funktionaler LHCII-Mutanten, die für EPR-spektroskopische Experimente zur Verfügung standen. Hauptziele der vorliegenden Dissertationsschrift waren, mit Hilfe der neuen LHCII-Klone verschiedene Puls-EPR-Techniken zur Entschlüsselung von Membranprotein-Strukturen zu etablieren und diese zur weiteren Verifizierung der Struktur des monomeren und trimeren LHCII in Lösung anzuwenden. Hierzu sollte zunächst die Möglichkeit der Erfassung lokaler Strukturen mittels verschiedener Puls-EPR-Monitore an rekombinantem LHCII getestet werden. Aufgereinigte Proben des einzeln spinmarkierten LHCII, eingefrorenen in einem glasartigen stationären Zustand, wurden mittels Puls-EPR-Methoden vermessen und mit gängigen Methoden der CW-EPR sowie mit aktuellen Daten der Kristallstruktur verglichen. Doppelt markierte Monomere und dreifach markierte Trimere, ebenfalls in stationärem Zustand eingefroren, sollten mittels DEER-EPR vermessen werden. Die Ergebnisse dieser eher globalen „Abstandskartographie“ sollten mit einer Datenbank möglicher Spinmarker-Rotamere, simuliert anhand aktueller Daten der Kristallstruktur des trimeren LHCII (Standfuss *et al.*, 2005), verglichen und auf Strukturunterschiede geprüft werden. Nach Verifizierung der Puls-EPR-Techniken sollten in einem zweiten Schritt kristallographisch nicht erfasste oder potentiell dynamische Domänen des LHCII in Lösung untersucht werden sowie die Detektion von zeitaufgelöster Strukturodynamik mittels Puls-EPR in Faltungsexperimenten getestet werden. Zur Wahrung der Übersicht sind in diesem Kapitel auch Messergebnisse der Diplomanden A. Müller (2008) und C. Dietz (2008) dargestellt und unter Einbeziehung aktueller Sichtpunkte diskutiert.

2 Material und Methode

Allgemein gebräuchliche Materialien und Methoden wurden bereits in Kapitel I beschrieben und sind durch entsprechende Verweise gekennzeichnet. Mutantenbezeichnungen aller Cys-Klone des LHCII sind in diesem Kapitel aus Gründen der Leserlichkeit in der Namensgebung auf die Mutationspositionen reduziert (siehe Kap. I, Tab. 1.2.2). In fast allen Positionen wurde das Cys im konservativen Austausch gegen Ser oder Ala eingeführt, Ausnahmen sind lediglich Position 4 (Ala) und 7 (Lys).

2.1 Präparation des spinmarkierten LHCII in stationärem Zustand für CW-EPR- und Puls-EPR-Messungen

Einzel- und Doppelmutanten des Lhcb1 mit punktspezifisch eingeführten Cys wurden wie zuvor beschrieben konstruiert (Kap. I, 2.6), in *E. coli* JM101 überexprimiert (Kap. I, 2.7.2) und kovalent mit PROXYL markiert (Kap. I, 2.7.4.1). Spinmarkiertes Apoprotein wurde nach Standard-Protokoll mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution zu LHCII-Monomeren gefaltet (Kap. I, 2.7.5), gegebenenfalls auf der Ni-Säule trimerisiert (Kap. I, 2.7.6) und mittels UZ aufgereinigt (Kap. I, 2.7.7). Die Funktionalität der isolierten Komplexe wurde mittels Fluoreszenz-Energietransfer (Kap. I, 2.8.2.2) und CD-Spektroskopie (Kap. I, 2.8.2.3) geprüft. Aufgereinigte, funktionale Komplexe wurden auf Konzentrationen von bis zu 800 $\mu\text{mol/l}$ LHCII gebracht (Kap. I, 2.7.8), 1:1 mit 80%igem Glycerin als Gefrierschutz verdünnt, in 3 mm EPR-Kapillaren überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Kap. I, 2.8.2.4.2).

Die Durchführung der CW-EPR- und ESEEM-EPR-Messungen ist in Kap. III (3.1.1.1) genau beschrieben. DEER-EPR Messungen wurden wie in Kap. I (2.8.2.4.2) beschrieben durchgeführt. Die Prozessierungsparameter waren: Zeitnullpunkt 130 ns, Start der Hintergrundkorrektur 640 ns, Regularisierungsparameter $\alpha=10$.

DEER-Proben der Diplomanden A. Müller (2008) und C. Dietz (2008) wurden im Unterschied zum Standard-Protokoll nach Isolierung und Charakterisierung der Komplexe wie in Kap. III (3.1.1.1) beschrieben deuteriert und dann mit einer Endkonzentration von 300-400 $\mu\text{mol/l}$ LHCII (in 40 % deuteriertem Glycerin) in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2 Präparation des spinmarkierten LHCII für zeitaufgelöste Puls-EPR-Messungen

Zeitaufgelöste Puls-EPR-Messungen wurden mit der Einzelmutante 196 (ESEEM-EPR) und den Doppelmutanten 106/160 sowie 90/196 (DEER-EPR) durchgeführt. Die Konstruktion der Mutante 106/160 ist in Bender (2004) dargelegt, die Konstruktion von 196 sowie 90/196 in Kap. I (2.6). Die Überexpression der Apoproteine in *E. coli* JM101

(Kap. I, 2.7.2), deren Markierung mit PROXYL (Kap. I, 2.7.4.1) und Aufreinigung durch Fällung mit TCA (Kap. I, 2.7.4.4) erfolgte wie vorher beschrieben.

Da in zeitaufgelösten EPR-Messungen die Faltung des LHCII durch Schockfrieren gestoppt wurde, konnten Proteinkonzentrationen im Nachhinein nicht weiter erhöht werden. Um der Anforderung ausreichend hoher Spinkonzentrationen für EPR-spektroskopische Untersuchungen nachzukommen, wurde das Rekonstitutionsprotokoll für zeitaufgelöste Messungen der LHCII-Faltung (Booth & Paulsen, 1996; Horn *et al.*, 2007) grundlegend verändert. Nach einer 20fachen Erhöhung der Proteinkonzentration, mussten Pigment- und Detergenz-Konzentrationen an die veränderten Verhältnisse angepasst werden. Die in der Faltungsreaktion erforderlichen Pigmente wurden zwar wie im Standard-Protokoll beschrieben aus Erbsen-Thylakoiden isoliert (Kap. I, 2.7.1), um aber den Anteil natürlicher Lipide zu erhöhen, wurden die Pigmente nicht in Diethylether überführt. Stattdessen wurden die nativen Pigmente mittels Aceton aus den Thylakoiden gelöst und sofort am Rotationsverdampfer bei 25 °C Wassertemperatur im Dunkeln eingetrocknet. Im Kolben verbliebenes Restwasser wurde manuell abgezogen, die Pigmente erneut in Aceton gelöst und wieder eingetrocknet. Dieser Schritt wurde mehrmals wiederholt, bis der Totalpigmentextrakt wasserfrei war. Durch den höheren Gehalt an nativen Lipiden war es möglich, die Löslichkeit der Pigmente in Ethanol auf die erforderliche Konzentration von 20 mg/ml zu steigern.

Die Rekonstitution des LHCII erfolgte nach dem Prinzip der Verdünnungsmethode (Horn *et al.*, 2007), musste aber für zeitaufgelöste EPR-Experimente modifiziert werden. Hierzu wurde eine Proteinlösung mit 160 $\mu\text{mol/l}$ spinmarkiertem LHCP vorbereitet. Das Apoprotein der spinmarkierten Mutanten wurde für 2 min in Rekonstitutionspuffer 2 gekocht. Nach Abkühlung der Lösung bei RT wurde der klaren Lösung $\beta\text{-Me}$ (10 mmol/l) hinzugefügt.

Möglichst zeitnah wurde Totalpigmentextrakt zu 20 mg/ml in kaltem Ethanol im Ultraschallbad gelöst und kurz zentrifugiert. Pigment-Aliquots die nicht komplett löslich waren, wurden in der Regel verworfen, da sie erfahrungsgemäß nicht zum Rekonstitutionserfolg führten. Totalpigmentextrakte mit geringen Konzentrationen an Xanthophyllen wurden nachträglich mit Lutein und Neoxanthin angereichert, so dass mindestens ein zweifach molarer Überschuss (über Protein) an den jeweiligen Xanthophyllen in der Rekonstitution vorhanden war. Die gelösten Pigmente wurden mit Rekonstitutionspuffer 1 gemischt (dreifach molarer Überschuss an Chl über Protein), 30 s geschüttelt und sofort weiterverarbeitet.

Die Rekonstitution wurde durch manuelles Mischen (1:1) der jeweils frisch angesetzten Rekonstitutionslösungen 1 und 2 initiiert. Hierzu wurde die pigmenthaltige Lösung 1 in die proteinhaltige Lösung 2 gegeben, durch mehrmaliges „auf- und abpipettieren“ vermischt und bei RT dunkel gestellt. Nach der jeweiligen Reaktionszeit wurden 50 μl des Rekonstitutionsgemisches 1:1 mit 80%igem Glycerin verdünnt, kurz auf dem Vortexer geschüttelt, sofort mit einer Spritze in EPR-Quarzkapillaren überführt

und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dieser Vorgang benötigte etwa 10 ± 1 s, die Faltungszeit wurde beim Schockfrieren gestoppt. Jeder Datenpunkt in kinetischen EPR-Messungen entspricht damit einer eigens gemischten LHCII-Probe mit einer Proteinkonzentration von etwa $40 \mu\text{mol/l}$. Die Durchführung der DEER-Messungen ist in Kap. III (3.2.3) genau beschrieben. Die hier angewendete Methode mit manuellem Mischen der Pigment- und Proteinlösungen war auf Faltungszeiten oberhalb von 30 s beschränkt.

Material:

kaltes Ethanol (p.A.)

Totalpigmentextrakt (nach modifiziertem Protokoll)

Rekonstitutionslösung 1:	100 mmol/l Lithiumborat (pH 8,1)
	12,5 % (w/v) Saccharose
	6 % (w/v) OG
	1 % (v/v) TX
	0,26 % (w/v) PG
	0,02 % (w/v) Deoxycholat
	10 mmol/l β -Me

Rekonstitutionslösung 2:	160 $\mu\text{mol/l}$ spinmarkierter LHCP
	1 % (w/v) LDS
	100 mmol/l Lithiumborat (pH 8,1)
	12,5 % (w/v) Saccharose

β -Me (1 mol/l)

Glyzerin 80 %

2.3 Simulation der theoretischen Abstandsverteilung in PROXYL-markierten LHCII-Mutanten

Theoretische Abstandsverteilungen verschiedener monomerer und trimerer Mutanten des LHCII wurden anhand der Kristallstruktur des trimeren LHCII (Standfuss *et al.*, 2005) durch Dr. Y. Polyhach (ETH Zürich, Schweiz) wie folgt berechnet. Die Spinsondenseitenkette des PROXYL hat sechs Rotationsfreiheitsgrade (Diederwinkel χ_1 bis χ_6). Basierend auf Molekulardynamiksimulationen wurden für jeden Freiheitsgrad einige diskrete Werte des Diederwinkels definiert, die "erlaubt" sind. Jeder dieser Werte kann zunächst einmal mit jedem anderen kombiniert werden. Je nach gewünschter Genauigkeit erhält man dabei zwischen etwa 200 und 600 Kombinationen (Rotamere). Alle in der MD-Simulation beobachteten Strukturen (100.000 Schnappschüsse) wurden dann dem nächstgelegenen Rotamer zugeordnet. Manchen Kombinationen von Diederwinkeln wird dabei keine der beobachteten Strukturen zugeordnet. Die endgültige Bibliothek besteht nur aus den Rotameren, die in der MD-Simulation auch tatsächlich

beobachtet werden. Das waren in dem Fall des Spinmarkers PROXYL 293 unterschiedliche Konformations-Rotamere.

Eine frühere Software zur Berechnung der Konformations-Rotamere lieferte bereits genaue Datensätze (Jeschke *et al.*, 2007; Volkov, 2008; Hilger *et al.*, 2009), die Weiterentwicklung führte zur Optimierung des Programms mit genaueren Vorhersagen. Die in dieser Dissertationschrift gezeigten theoretischen Abstandsverteilungen wurden mit der optimierten Software berechnet und weichen daher moderat von den in Volkov (2008) gezeigten Vorhersagen ab. Eine detaillierte Beschreibung der Berechnung zur Erstellung der Datenbank ist im Abschnitt „supporting information“ der Veröffentlichung zur DEER-Faltungskinetik des LHCII in Kap. III (3.2.3) zu finden. Eine Veröffentlichung zur Anwendung der optimierten Software in Datensätzen kristallographisch aufgelöster Membranproteine ist geplant (Polyhach, unveröffentlicht).

3 Ergebnisse

3.1 Puls-EPR-Experimente an LHCII-Proben in stationärem Zustand

Primäre Ziele dieser Versuchsreihe war zum einen die Verifizierung und Weiterentwicklung von Puls-EPR-Techniken zur Strukturaufklärung von Membranproteinen sowie die Sammlung von Daten bezüglich der LHCII-Struktur in Lösung. Zur Verifizierung der Puls-EPR-Techniken wurden aus der Vielzahl neuer LHCII-Mutanten kristallographisch erfasste ausgewählt und in stationärem Zustand vermessen. In einer folgenden Versuchsreihe sollten mit Hilfe der verifizierten Puls-Techniken kristallographisch nicht erfasste bzw. potentiell dynamische Domänen untersucht werden. Während die nachfolgend beschriebenen EPR-ESEEM- und Relaxationsmessungen an Cys-Einzelmutanten der Erfassung lokaler Strukturinformationen dienten, lieferten DEER-Messungen (Kap. III, 3.1.2) sehr spezifische Daten zur Lage ganzer Proteindomänen.

3.1.1 Detektion lokaler Strukturinformation durch Messung der Wasserzugänglichkeit mittels ESEEM-EPR

Eine etablierte Technik zur Bestimmung lokaler Strukturinformation in Membranproteinen ist die CW-EPR-Spektroskopie (Hubbel *et al.*, 1998). Während mit dieser Technik lediglich die Zugänglichkeit des Spinmarkers für hydrophile (Kaliumtris(oxalato)chromat, CrOx) bzw. lipophile (O_2) paramagnetische Substanzen bestimmt werden kann (Dockter, 2005), erlauben verschiedene Puls-EPR-Techniken die Detektion der direkten Interaktion von Spinmarkern mit ihrer lokalen Umgebung, also unabhängig von zugefügten paramagnetischen „Quenchern“. Hervorzuheben sei hier die ESEEM-EPR, die es erlaubt den Abstand des Spinmarkers zu umliegenden Deuterium-Kernen im Umkreis von 3 bis 6 Å sehr genau vorherzusagen. Um das Potential und die Genauigkeit solcher Puls-EPR-Messungen zur Strukturaufklärung von Membranproteinen zu prüfen, wurden verschiedene Cys-Einzelmutanten des rekombinanten LHCII mittels Puls-EPR und CW-EPR vermessen und die Ergebnisse untereinander sowie mit aktuellen Daten der Kristallstruktur des LHCII (Standfuss *et al.*, 2005) verglichen.

- 3.1.1.1 Publikation I. Volkov *et al.* (2009) Pulsed EPR determination of water accessibility to spin-labeled amino acid residues in LHCIIb. *Biophys. J.*, **96**, 1124-1141.**

Pulsed EPR determination of water accessibility to spin-labeled amino acid residues in LHCIIb.

Running title:

EPR accessibility studies on LHCIIb.

A. Volkov¹, C. Dockter², T. Bund,² H. Paulsen², G. Jeschke³

¹ Max-Planck-Institute for Polymer Research
Postfach 3148, 55021 Mainz, Germany

² Institute of General Botany, Johannes Gutenberg University Mainz,
Müllerweg 6, 55099 Mainz, Germany

³ Lab. Phys. Chem., ETH Hönggerberg,
8093 Zürich, Switzerland

*Corresponding author, Tel.: +41-44 632 5702, Fax: +41-44 632 1021
E-mail address: gunnar.jeschke@phys.chem.ethz.ch

Keywords:

EPR, LHCIIb, membrane protein, site-directed spin labeling, ESEEM, electron spin relaxation.

ABSTRACT

Membrane proteins reside in a structured environment with some of their residues being accessible to water, some being in contact with alkyl chains of lipid molecules, and some being buried in the protein. Water accessibility of residues may change during folding or function-related structural dynamics. Several techniques based on the combination of pulsed electron paramagnetic resonance (EPR) with site-directed spin labeling can be used to quantify such water accessibility. Accessibility parameters for different residues in major plant light harvesting complex LHCIIb are determined by electron spin echo envelope modulation (ESEEM) spectroscopy in the presence of deuterated water, deuterium contrast in transversal relaxation rates, analysis of longitudinal relaxation rates and line shape analysis of electron-spin echo detected EPR spectra as well as by the conventional techniques of measuring the maximum hyperfine splitting and progressive saturation in continuous-wave EPR. Systematic comparison of these parameters allows for a more detailed characterization of the environment of the spin-labeled residues. These techniques are applicable independently of protein size and require about 10-20 nmol of singly spin-labeled protein per sample. For a residue close to the N-terminus, in a domain unresolved in the existing x-ray structures of LHCIIb, all methods indicate high water accessibility.

INTRODUCTION

Membrane proteins define the functionality of the interface between living cells and their environment and play an important role in cell energetics. Their function can be understood in detail only if their structure and in many cases also their structural dynamics is known. Despite recent progress structure determination of membrane proteins remains a challenging task (1, 2). Membrane proteins do not crystallize easily and current size limitations of NMR techniques (3), in particular for α -helical species, exclude many proteins of interest. Electron cryomicroscopy provides an interesting alternative technique although it usually requires at least two-dimensional crystals for obtaining highly resolved structures (4). In principle, near-atomic resolution can also be achieved with electron cryomicroscopy based on single-particle reconstruction techniques, as was recently demonstrated on a rotavirus particle (5). Applicability of such a high-resolution approach to membrane proteins remains to be shown. In this situation alternative techniques for characterization of membrane protein structure are of great interest.

In particular, there is a lack of approaches that provide reliable information on partially ordered structures and on structural changes in membrane proteins. Such information is required to characterize folding intermediates and flexible domains that are involved in regulatory processes. It cannot easily be obtained with established techniques since signal assignment to particular sites in the protein molecule fails for lack of resolution in ensembles with a broad conformational diversity. Site-directed spin labeling (SDSL) techniques circumvent this problem as the signal originates exclusively from the labeled sites (6, 7) so that site-specific ensemble-averaged information can be obtained. No crystallization is required and the techniques are applicable to proteins reconstituted into membranes, liposomes, or detergent micelles. The same applies to site-directed fluorescence labeling techniques (8, 9, 10), which have the advantage of higher sensitivity and can be applied even to single molecules *in vivo* (11). However, compared to such fluorescence labeling, spin labeling offers two advantages. First, nitroxides have a size that is comparable to the size of amino acid side groups, while chromophores are often significantly larger. Second, the weak coupling of spins to their environment allows for a separation of interactions by pulsed EPR experiments (12). Such separation of interactions improves reliability of the interpretation of signals and precision of their quantification. Fluorescence and SDSL EPR techniques thus nicely complement each other.

To date the majority of SDSL studies on membrane proteins has been performed with continuous-wave (CW) EPR approaches (6, 7). Pulsed EPR techniques were applied mostly for long-range distance measurements (13, 14, 15, 16). In this work we explore the potential of several pulsed EPR techniques for determination of water accessibility of spin-labeled residues in membrane proteins.

Due to the dependence of the fluorescence spectrum on the polarity of a chromophore's environment, water accessibility can be characterized by fluorescence techniques (8, 9, 10). Likewise, EPR spectra are sensitive to the polarity of the environment. In particular, the A_{zz} principle value of the ^{14}N hyperfine tensor and the g_{xx} principal value of the g tensor depend on the dielectric constant of the environment and on hydrogen bonding to the nitroxide (17, 18). Accordingly, these parameters correlate with immersion depth in the membrane (19). An alternative way of characterizing water accessibility by CW EPR relies on relaxation enhancement by water-soluble paramagnetic quenchers that can be detected by progressive saturation measurements (20). Both techniques measure parameters that depend strongly on proximity of water but can also be modified by other influences. Here we propose electron spin echo envelope modulation (ESEEM) spectroscopy as the main new technique for obtaining a reliable water accessibility parameter in a large transmembrane protein by quantification of hyperfine couplings to deuterium nuclei in deuterated water molecules. This technique can provide estimates of the distance and number of nuclear spins in the proximity of an electron spin on length scales between about 3 and 6 Å (21, 12). Thus ESEEM is suitable to provide a water accessibility parameter, as was demonstrated before in studies on water penetration in micelles (22) and along the membrane (23, 24, 25, 26), on localization of peptides in membranes (27, 28), and in detection of changes in water accessibility of a fatty acid by interaction with a protein binding pocket (29).

Deuterium exchange of water also influences transversal relaxation of electron spins at low temperatures as such relaxation is mainly driven by proton spin diffusion (30, 31, 32). This technique can be applied to the same samples as used for ESEEM, provided that samples with protonated water have also been prepared. It is sensitive to proton concentration on length scales between about 7 and 20 Å and thus provides access to an intermediate-distance water accessibility parameter.

Longitudinal relaxation is related to spin label dynamics, which is influenced by the local solvation cage around a spin label (33). As water solvation cages are unique with respect to their hydrogen-bond related rigidity, this parameter may also be correlated to water accessibility, although in a more indirect way. Local dynamics also influences the line shape in echo-detected EPR spectra (33, 34, 35). In this work we compare all these different water-accessibility related parameters on a model system.

Our model system is the main light-harvesting complex LHCIIb of photosystem II of green plants. It consists of a membrane protein and several cofactors, such as chlorophyll *a* and *b*, carotenoids and lipids that are non-covalently bound to it. The protein, in turn, consists of a 232 amino acid polypeptide chain and features three transmembrane helices (36, 37, 38). LHCIIb is involved in a number of regulatory processes, which are associated with conformational changes (39, 40, 41), and self-assembles from its components *in vitro* on a time scale of a few minutes (42, 43).

Crystal structures of the complex, except for the first few residues of the N-terminal domain of the protein, are available (37, 38). Hence, sites with high, moderate and low water accessibility can be predicted. With respect to the N-terminal domain an earlier EPR study suggested that it exists in at least two different conformational states and that at least one of those should be exposed to water (14).

This manuscript is structured as follows: In the Results section we define, for each of the techniques, a water accessibility parameter. In ideal cases this parameter is proportional to local water concentration in a certain region around the spin label. This parameter is then determined for several spin-labeled LHCIIb mutants as well as for two reference samples consisting of free spin labels, one in an aqueous solvent and one in a solution of the detergent-containing buffer used for LHCIIb purification. In the Discussion section we compare relative water accessibilities obtained by the various methods and consider the influence of other changes in spin label environment for each of these parameters. The data are also discussed in terms of the structure of detergent-solubilized, monomeric LHCIIb as compared to trimeric LHCIIb in crystals and in terms of the localization of the N terminus. We conclude with considerations on applying the entire toolbox to the same protein sample.

MATERIALS AND METHODS

Mutagenesis, Expression, Spin labeling and Reconstitution

Several mutant versions of the Lhcb1*2 (AB80) gene (44) from pea (*Pisum sativum*) that contain a single cysteine were constructed by replacing serine or valine at different protein sites. The mutation positions as well as a schematic picture of the LHCIIb protein are shown in Figure 1. In all mutants the native single cysteine at position 79 was replaced by serine. Protein overexpression in *Escherichia coli* was performed as described previously in (45).

The purified apoproteins were dissolved (1 mg/ml) in an aqueous solution of 0.5% LDS (Applichem, Darmstadt), 20 mM sodium phosphate (Merck, Darmstadt) (pH 7), and 2 mM tris-(2-cyanoethyl)phosphine (Alfa Aesar, Waard Hill MA, USA) (1 M in DMF) and were incubated 2 h at 37°C. The proteins were then spin labeled on cysteine by adding 3-(2-iodoacetamido)-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy (IAA-PROXYL) (Sigma) (10 mg/ml DMSO solution, 20-fold molar excess over protein) and incubated overnight at 37°C on a shaker. The labeling efficiency was determined to be at least 90%. In the following spin-labeled mutants are abbreviated in the form S52r for a serine at position 52 that was mutated to a cysteine and then labeled by IAA-PROXYL.

Spin-labeled proteins were precipitated by adding 5% trichloroacetic acid (Merck, Darmstadt) at room temperature and immediate centrifugation (12000 g for 5 min at 4

°C). This step has to be performed fast, as reduction of the spin label can occur (46). The protein pellet was washed 5 times with distilled water and dried for 15 min at ambient temperature. The spin-labeled protein was then reconstituted with a pigment extract from pea thylakoids (47) isolated as described in (45) to self-assemble in the biologically relevant light-harvesting complex LHCIIb.

Monomeric LHCIIb was purified by ultracentrifugation on 0.1 to 1 M sucrose density gradients containing 0.1% (w/w) n-dodecyl- β -D-maltoside (Merck, Darmstadt) and 5 mM Tris-HCl (pH 7.8) (Serva). After spinning for 16 h at 230000 g at 4°C, the band containing monomeric LHCIIb was collected and concentrated by “Centricon” centrifugal filter units (30 kDa), (Millipore) up to ca. 600 μ M. The mutants thus prepared were checked by fluorescence- and CD-spectroscopy in order to detect possible structural changes due to the mutations and spin labeling. The fluorescence spectra of all the used mutants showed the characteristic peak of chlorophyll *a* fluorescence at 680 nm when exciting chlorophyll *b* at 470 nm. The CD spectra were used as a fingerprint and showed characteristic peaks at 491 nm, 649 nm and 680 nm for all the used mutants.

The concentrated protein was then mixed 1:1 with 80% glycerol (Roth, Karlsruhe) as a cryoprotectant (14) to a final concentration of around 300 μ M. Samples for saturation measurements were prepared in the same way, with the only difference that to some of them tris(oxalato)chromium(III) complex $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$ (Aldrich) was added to the final concentration of 10 mM.

A solution of IAA-PROXYL in water (300 μ M) with 0.8% DMSO was measured as a reference. This sample will be further referred to as Reference 1. Another reference sample is prepared as follows: IAA-PROXYL was dissolved in DMSO (20 mg/ml). The solution was then added to the buffer consisting of 0.275 M saccharose, 0.1% n-dodecyl- β -D-maltoside and 5 mM Tris-HCl (pH 7.8) to obtain a spin label concentration of 600 μ M. This buffer simulates the one after ultracentrifugation on a sucrose gradient. The spin label solution in buffer is then mixed with an equal volume of 80% glycerol. Such a sample also allows the detection of micellization effects of the unbound spin probe. In the case of deuterated samples the buffer was prepared with deuterated water. Glycerol d_8 (Isotec, purchased by Sigma-Aldrich) was diluted with D_2O (Aldrich) to a concentration of 80%. The reference sample contains some DMSO, which is not the case for the protein sample. This sample will be further referred to as Reference 2.

The concentration of samples for three-pulse ESEEM measurements was kept at 300 μ M, as slight concentration effects were observed in the data. Slightly different concentrations were used for V196r (395 μ M) and S52r (263 μ M), but these are still assumed to be in the range where concentration effects are smaller than other experimental errors.

For CW progressive saturation measurements the concentration was also kept fixed at 300 μ M. The sample concentration for CW EPR and relaxation measurements

was not specifically adjusted. After preparation all samples were in a concentration range between 130 and 400 μM and no significant effects were observed in CW EPR spectra or relaxation data when reproducing experiments for the same mutant at different concentrations in this range. In echo-detected EPR (ESE) experiments concentration varied from 150 to 300 μM . As the observed effects on line shape are relaxation induced (33) and no effects on relaxation time were detected in this concentration range, we assume that this variation is not a significant source of errors. The sample concentration by W-band measurements was 300 μM .

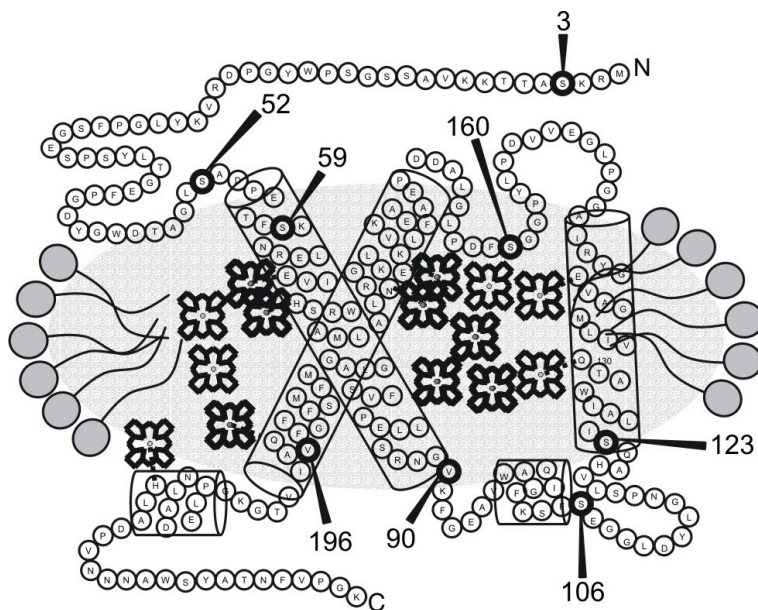


Figure 1: Schematic structure of light harvesting complex IIb (LHCIIb). Each circle with a letter represents an amino acid residue. Circles with numbers show mutation positions where spin labels were attached in this work. Cylinders represent helices and chlorophylls are symbolized by schematic porphyrin formulas. Other pigments and lipids are not shown. The gray oval around the protein represents the micelle as expected from analyzing the crystal structure. (36, 37, 38). The top corresponds to the stromal side and the bottom to the luminal side of the thylakoid membrane.

Deuterium exchange experiments

4 ml of the reconstituted purified LHCIIb sample, prepared as described above, in buffer consisting of 0.275 M sucrose, 0.1 % n-dodecyl- β -D-maltoside, 5 mM Tris-HCl (pH 7.8) was concentrated at 3000 g in a 30 kDa Centrikon filter unit at 4°C until the sample volume reached 50 μl . The sample was then diluted to the volume of 250 μl with the same buffer as described above, however this time prepared with deuterated water. After that the sample was again concentrated to 50 μl . This procedure was repeated five times. Concentration was adjusted by dilution with buffer and determined photometrically at 670 nm. The samples were then mixed with glycerol- d_8 [80% solution

in D₂O (Aldrich)] as a cryoprotectant to a final buffer:glycerol ratio of 1:1 (v/v). The CD and fluorescence spectra of the samples after the deuteration did not show changes compared to the samples that were not deuterated.

X- Band CW measurements

Experimental

CW EPR spectra were measured on a Miniscope 200 spectrometer (Magnetech GmbH, Berlin) with a TE102 rectangular resonator at a temperature of 103 K with liquid nitrogen cooling using a TC HO2 temperature controller (Magnetech). Samples were loaded into 3 mm home made quartz capillaries (50-100 μ L volume), shock frozen in liquid nitrogen, and rapidly inserted into the resonator at 103 K.

We checked that the typical microwave power of 10 μ W applied during these measurements did not lead to saturation broadening. The modulation amplitude was set to 0.2 mT with the width of the central line of nitroxide spectrum being around 1 mT. The sweep width was 15 mT. Ten scans were averaged with 4096 data points and a scan time of 60 s each.

Data analysis

The $2A_{zz}$ values were obtained by fitting the minima and maxima of the nitroxide spectrum by fifth-order polynomials (48) using the home-written MATLAB (The MathWorks, Natick, MA) based "DynAnalysis" program that is available from the authors on request. The error in these measurements is dominated by determination of these relatively broad extrema.

CW progressive power saturation measurements

The saturation measurements were performed on Bruker Elexsys EX 580 EPR spectrometer (Bruker) with a loop gap resonator (JagMar, Kraków) at X-band frequencies. Samples were inserted into a TPX capillary and subjected to continuous N₂ or air flow at 295 K for at least 15 minutes before measurement. Continuous gas flow was upheld during measurements. Samples with [Cr(ox)₃]³⁻ as a relaxation agent were measured in N₂ atmosphere. A Bruker ER4111VT variable temperature unit was used for temperature control at 295 K. The microwave power was increased from 23 dB to 8 dB in 3 dB steps. The modulation amplitude was set to 0.1 mT with the width of the central line of nitroxide spectrum at this temperature being about 0.3 mT in the unsaturated spectra. The sweep width was 7.5 mT with 512 data points.

Data analysis

The CW spectra were background-corrected using a home-written MATLAB program, by subtracting a first-order polynomial fitted to the first and last 15% of the data points. The intensity of the central nitroxide peak (A) was determined manually with Origin (Microcal Software Inc., Northampton, MA). In saturation measurements the intensity dependence of the central nitroxide peak as a function of microwave power (P) is measured. This data was fitted by a home-written MATLAB program to Eq. 1 (49)

$$A = I\sqrt{P} \left[1 + \left(2^{\frac{1}{\varepsilon}} - 1 \right) \frac{P}{P_{1/2}} \right] \quad (1)$$

The amplitude scaling factor I , the homogeneity coefficient ε and the power $P_{1/2}$, where the intensity of the nitroxide peak is reduced to half of its unsaturated value, are adjustable parameters. The saturation power $P_{1/2}$ is directly proportional to the relaxation rate of the spin label which increases due to collision with paramagnetic species such as O_2 or $[Cr(ox)_3]^{3-}$. This increase is directly proportional to the collision frequency and thus is a measure for relative spin label accessibility to the paramagnetic quenchers (20). As $[Cr(ox)_3]^{3-}$ is well soluble in water (50) while oxygen is better soluble in membranes or the hydrophobic core of micelles (51, 52, 53), water or membrane accessibility of the spin label can thus be probed (20).

To factor out contributions of other relaxation mechanisms and technical parameters of the spectrometer and resonator a dimensionless accessibility parameter $\Pi(\text{Quencher})$ is calculated by Eq. 2 (50)

$$\Pi(\text{Quencher}) = \frac{P_{1/2}(\text{Quencher}) - P_{1/2}(N_2)}{\Delta H} \cdot \frac{\Delta H(\text{DPPH})}{P_{1/2}(\text{DPPH})}, \quad (2)$$

where $P_{1/2}(\text{DPPH})$ is the power where the intensity of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) peak is reduced to the half of its unsaturated value, $\Delta H(\text{DPPH})$ the line width of the DPPH line, and ΔH is taken as the average line width of the central line of nitroxide spectrum with and without quencher. Accessibility parameters for O_2 were multiplied by 5 as the measurements were performed with air rather than pure oxygen.

Pulse EPR measurements

Experimental

X-band pulsed EPR measurements were performed on a Elexsys E580 EPR spectrometer (Bruker) at frequencies of about 9.3 GHz using a Flexline split-ring resonator ER 4118X_MS3 (Bruker). The resonator was overcoupled to $Q \sim 100$. Temperature was kept at 50 K with liquid helium cooling and was controlled by a CF935 (Oxford Instruments, Witney, Oxon) cryostat with an ITC4 temperature controller (Oxford Instruments LTD, Oxford). The waiting time between repetitions was 6 ms.

Samples were loaded into 3 mm O.D. capillaries (50-100 μL volume) home-made from Herasil tubing, shock-frozen in liquid nitrogen, and rapidly inserted into the resonator at 50 K. EPR spectra were measured with field-swept echo-detected EPR using a Hahn echo sequence $\pi/2-\tau-\pi-\tau$ -echo (12) and a 15 mT field sweep. The interpulse delay time τ was 200 ns and the pulse lengths were 16 ns for the $\pi/2$ pulse and 32 ns for the π pulse.

Transversal relaxation data were acquired with a Hahn echo sequence $\pi/2-\tau-\pi-\tau$ -echo and applying a $[(+x)-(-x)]$ phase cycle to the $\pi/2$ pulse. An initial interpulse delay τ of 200 ns and an increment of 8 ns were used. The integrated echo intensity was measured as a function of this increment with an integration gate of 32 ns length centered at the echo maximum. The pulse lengths were 16 ns for the $\pi/2$ pulse and 32 ns for the π pulse.

Three-pulse ESEEM measurements were performed with a $\pi/2-\tau-\pi/2-T-\pi/2-\tau$ -echo pulse sequence with a standard phase cycle (12). The pulse length of the $\pi/2$ pulses was 16 ns and the interpulse delay $\tau = 344$ ns, corresponding to a proton blind spot, was kept constant. Suppression of the proton modulations at the blind spot improves precision of the fitting of the deuterium modulation. The second interpulse delay T with an initial value of 80 ns was incremented in steps of 8 ns. The integration gate length was 32 ns.

Longitudinal relaxation data were acquired with an inversion recovery pulse sequence $\pi-T-\pi/2-\tau-\pi-\tau$ -echo with a $[(+x)-(-x)]$ phase cycle applied to the $\pi/2$ pulse. The delay time T with an initial value of 2000 ns was incremented in steps of 5800 ns and the interpulse delay $\tau = 400$ ns was kept constant. The pulse lengths were 52 ns for the $\pi/2$ pulse, 104 ns for the π pulse of the detection echo subsequence and 24 ns for the inversion pulse. The integration gate length of 104 ns matched the longest pulse in the detection subsequence to maximize signal-to-noise ratio (54). This combination of a hard inversion pulse with soft echo detection is sufficient to eliminate contributions by spectral diffusion at temperatures of 40 K and higher (55). The inversion pulse was tuned by maximizing the negative echo at a delay time $T = 1000$ ns. Other flip angles

and phases were generally adjusted with a $\pi/2$ - τ - π - τ -*echo* pulse sequence by changing the amplitude and the phase of the pulse at $\tau = 400$ ns, except for ESE experiments where the signal phase was tuned at $\tau = 200$ ns.

W-band pulse EPR measurements were performed on an Elexsys EX 680 EPR spectrometer (Bruker) using W-band EN600-1021H TeraFlex ENDOR resonator (Bruker). The resonator was not overcoupled. All pulse measurements were performed at 50 K with liquid helium cooling by an CF935 (Oxford Instruments, Witney, Oxon) cryostat with an ITC4 temperature controller (Oxford Instruments LTD, Oxford).

Samples were loaded with a syringe into 0.87 mm outer diameter and 0.7 mm inner diameter home made quartz capillaries to the height of about 3 mm, and inserted in the resonator at 50 K.

Because of a less favorable ratio between excitation bandwidth and spectral width at W band longitudinal relaxation data (T_1) were acquired with a saturation recovery pulse sequence *saturation*- T - $\pi/2$ - τ - π - τ -*echo* and a [(+x)-(-x)] phase cycle applied to the $\pi/2$ pulse. The saturation pulse substitutes for the inversion pulse in the inversion recovery pulse sequence. Actually this experiment is less susceptible to spectral diffusion effects than the inversion recovery experiment used at X band. It becomes possible at W band as the resonator does not need to be overcoupled and the solid-state amplifier can provide much longer saturation pulses than the travelling wave tube amplifier used at X band. The delay time T with an initial value of 22000 ns was incremented in steps of 5800 ns, and the interpulse delay $\tau = 400$ ns was kept constant. The pulse lengths were 48 ns for the $\pi/2$ pulse and 96 ns for the π pulse for the detection subsequence and 20000 ns for the saturation pulse. The integrator gate width was 96 ns. The saturation pulse was set to the maximum power value. The experiment was performed on the field corresponding to the maximum of the nitroxide spectrum.

The flip angles and phases for the saturation recovery experiment were adjusted with a $\pi/2$ - τ - π - τ -*echo* pulse sequence by changing the amplitudes and the phases of the pulses at $\tau = 400$ ns. Flip angles could not be adjusted with the same precision as at X-band. As small misadjustments of flip angles cause only slight sensitivity losses, but no changes in recovery curves, this does not lead to an additional error in the relaxation times. The waiting time between the repetitions was 15 ms.

Data analysis

Relaxation curves could not always be fitted by monoexponential decay functions. To compare different relaxation behavior between the mutants we define the relaxation parameters τ_1 and τ_2 that serve to quantify the decay by a single number. For monoexponential fits τ_2 was taken directly from the fit. Otherwise it was taken as the time

where echo intensity has decayed to $1/e$ of its initial value, which was the case for the two reference samples. To determine this value for non-exponential decay curves, we fitted transversal relaxation curves by a biexponential decay of the form

$$V(t) = A \exp(-t/T_A) + B \exp(-t/T_B), \quad (3)$$

and longitudinal relaxation decays by the corresponding form $-2 \cdot V(t) + C$. The relaxation parameter τ_1 or τ_2 is then obtained as the time where $V(t)$ has decayed from its initial value $A+B$ to $(A+B)/e$. This time is determined numerically from the four parameters A , B , T_A , and T_B by a home-written Matlab program, as the equation cannot be solved analytically. Compared to directly extracting the $1/e$ time from the experimental trace, this method has the advantage that it averages noise and depends less on the efficiency of echo inversion (55).

Even if non-exponential decays are nicely fitted by Eq. (3) the relaxation behavior cannot necessarily be interpreted in terms of two distinct contributions. Computation of the relaxation time distribution from a sum of exponential decays is an ill-posed problem where apparently bimodal distributions may fit data due to a broad monomodal distribution rather well. Therefore we refrain from interpreting the contributions of the two components in physical terms. A distribution of relaxation times is indeed expected in glassy samples, where local environments of the spin probes vary.

Note that transversal relaxation parameters relate to twice the interpulse delay τ . Decay curves acquired by Hahn echo experiments were fitted over the maxima of the proton or deuterium modulation as described in (30) to minimize the influence from destructive interference of nuclear modulations.

ESEEM data were analyzed with a home-written MATLAB program. Phase, frequency and intensity of the deuterium modulation were determined from the spectrum that was obtained by fitting a 11th order polynomial background function to the primary data, subtracting this background function and dividing the difference by the background function, applying a Hamming window, zero-filling the data to four times the original length of the data set, Fourier transformation and computation of the magnitude spectrum. By virtue of the division step that corresponds to a deconvolution, modulation depth information is preserved in the spectrum. Alternatively, modulation depth was determined by deconvolution and baseline correction of the primary data as above and fitting an oscillation with Gaussian decay envelope and fixed frequency as well as variable amplitude, phase and Gaussian width to the time domain data (see Results section). As a third alternative, primary time-domain data were analyzed in terms of the number and distance of closest approach of the deuterium nuclei using the spherical shell model (21) as implemented in a home-written MATLAB program (56). All programs for data analysis are available upon request.

RESULTS

Maximum extrema splitting $2A_{zz}$ in CW spectra at low temperature

The maximum extrema splitting $2A_{zz}$ in the solid state corresponds to twice the hyperfine coupling constant along the lobes of the p_π orbital on the ^{14}N nucleus of the nitroxide. Localization of the unpaired electron in this orbital corresponds to a charge-separated state, while localization in the p_π orbital on oxygen corresponds to a neutral state. Hence spin density in the ^{14}N orbital and thus A_{zz} increase with polarity of the environment (17, 18, 19). In addition hydrogen bonding of solvent molecules influences the spin density distribution, so that A_{zz} depends not only on polarity but also on proticity of the solvent. Hence A_{zz} values can provide information about relative water accessibility of spin labels in membranes (57, 19, 24, 23) and polarity of the spin label environment in proteins (17). Here we use A_{zz} directly as an accessibility parameter. To a first approximation changes in A_{zz} between different environments are dominated by the contribution from water and in this regime, A_{zz} scales roughly linearly with water concentration. Accordingly, proton donor profiles expected in membranes were found to be similar to profiles of the isotropic hyperfine coupling a_0 whose dependence on polarity and hydrogen bonding is the same as the one of A_{zz} (19).

The dependence of A_{zz} on the mutation position in LHCIIb is shown in Figure 2. As no difference in A_{zz} values between deuterated and non-deuterated samples was observed, the average from both measurements was taken, except for mutants S160r and V196r, where only one measurement was performed. The estimated errors are shown in the plot. The maximum error for IAA-PROXYL in different solvents was estimated to be 0.05 mT. The Reference 2 sample corresponds to the case of full water accessibility and does indeed exhibit the maximum A_{zz} value. Among the protein samples the mutants S3r, S52r and S59r form a group with large A_{zz} , V90r and S123r a group with intermediate A_{zz} , and S160r and V196r a group with low A_{zz} .

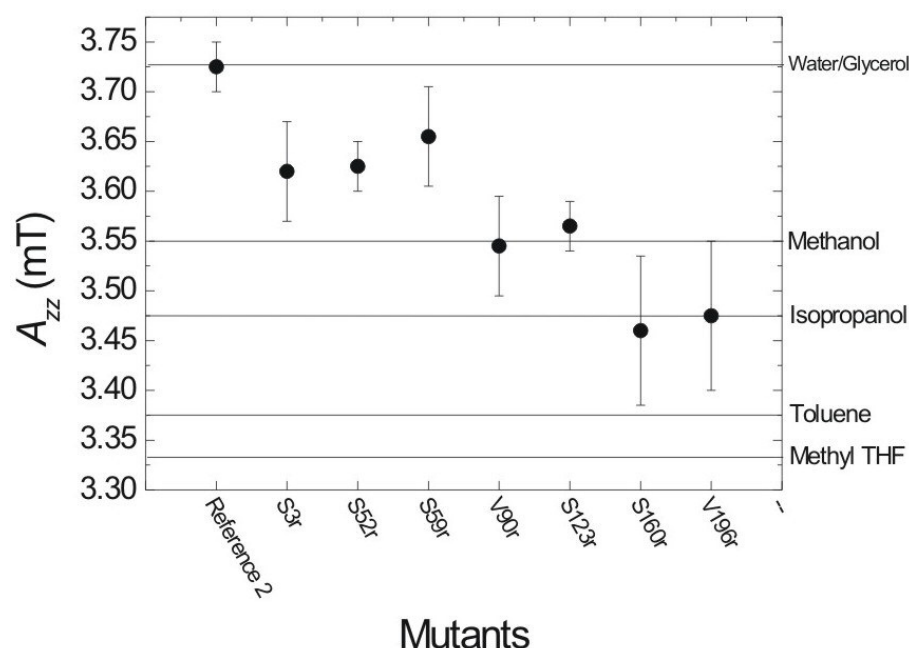


Figure 2: A_{zz} values as a function of spin label environment. Data from reference measurements on the free spin probe IAA-PROXYL in various solvents are shown as horizontal lines.

A semiquantitative estimate of the polarity of the spin label environment for the different residues in LHCIIb can be obtained by comparison to A_{zz} of IAA-PROXYL in solvents with different polarity. The data for several solvents are shown in Figure 2 as horizontal lines. Although micelles are present in the reference sample, the nitroxide has an environment comparable to the one in a water/glycerol mixture without detergents (dielectric constant $\epsilon = 64$ at 25 °C). Mutants S3r, S52r, and S59r have environments less polar than this mixture but more polar than methanol ($\epsilon = 32.6$ at 25 °C), V90r and S123r have an environment with a polarity comparable to the one of methanol, and mutants S160r and V196r have an environment with a polarity similar to the one of isopropanol ($\epsilon = 18$ at 25 °C). The range of A_{zz} values observed on detergent-solubilized LHCIIb labeled with IAA-PROXYL (3.45-3.65 mT) is similar to the one found for membrane-solubilized bacteriorhodopsin labeled with 1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrroline-3-methyl)methanethiosulfonate (3.50-3.675 mT) (17) but differs significantly from the one observed with DOXYL-labeled lipids in lipid bilayers (3.20-3.50 mT) (19). Because of the different structure of the DOXYL moiety compared to the PROXYL moiety $2A_{zz}$ values should not be compared between these two families of spin labels. The correlation of the polarity dependence of isotropic hyperfine couplings for different spin labels has been addressed in a recent study (58).

We also checked whether the EPR lineshapes at 295 K, which are dominated by effects of label mobility, correlate with water accessibility. We observe intermediate mobility with rotational correlation times in the nanosecond range (1-10 ns) for most

mutants, except for S123r and S160r, which exhibit slower motion (data not shown). No correlation between mobility and water accessibility was found.

CW progressive saturation measurements.

The dependence of the intensity of the central nitroxide peak on microwave power is generally well fitted by Eq. 1 both in the absence and presence of relaxation agents. Typical data are shown in Figure 3 for mutant S52r whose environment is highly polar according to the A_{zz} value and mutant V196r whose environment is only weakly polar. Although differences in the curves can be discerned they are less impressive than the clear differences in A_{zz} .

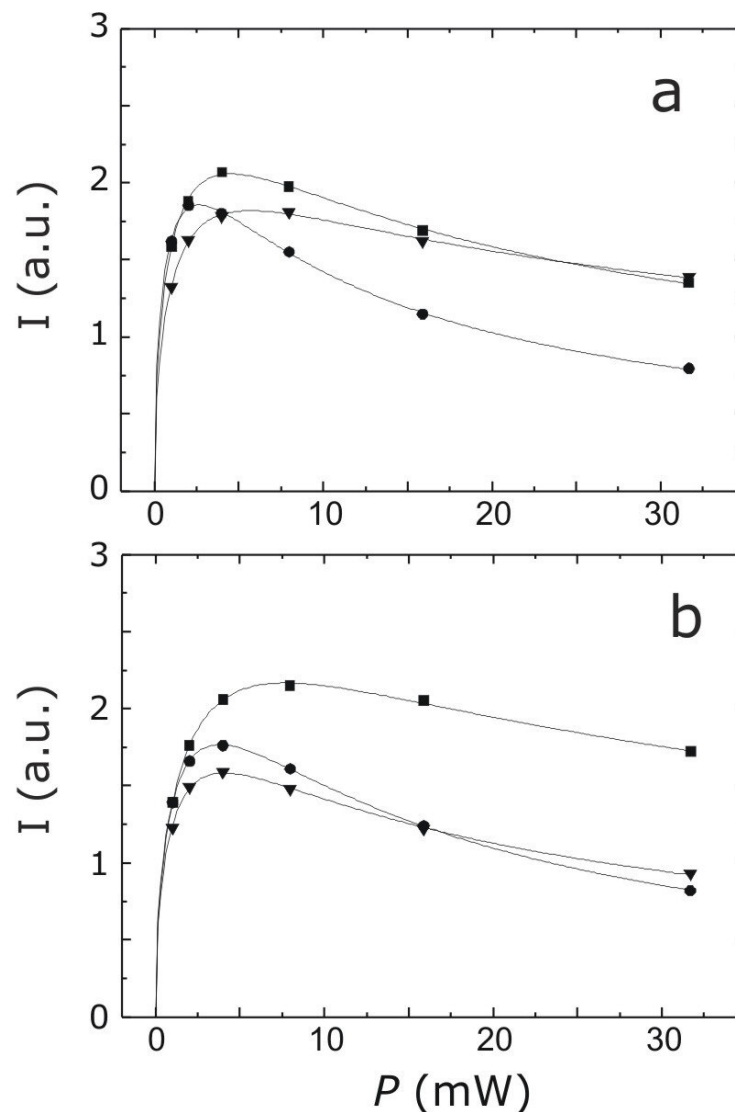


Figure 3: Peak-to-peak amplitude of the central nitroxide line as a function of microwave power for progressive saturation measurements at 295 K on LHCIIb mutants (a) S52r and (b) V196r. ● N₂, ▼ N₂/[Cr(ox)₃]³⁻, ■ 20% O₂ (air). Solid lines are fits by Eq. 1.

Variation of the water accessibility parameter $\Pi(\text{CrOx})$ computed by Eq. 2 for $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$ as a relaxation agent is rather small among all the mutants, except for mutant S3r, which exhibits $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$ accessibility similar to the one of unbound spin label in the buffer (Figure 4). The negative value for $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$ accessibility of the V196r mutant is due to experimental errors in determination of $P_{1/2}$ and is interpreted as non-accessibility to $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$.

Variation of the oxygen accessibility parameter is generally small although significantly larger than the experimental error. Mutants S123r, S160r and V196r exhibit enhanced oxygen accessibility correlated with very low $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$ accessibility. Such behavior is usually interpreted as an exposure to a lipid environment, or, in our case, a location in the core of the micelle exposed to detergent alkyl chains.

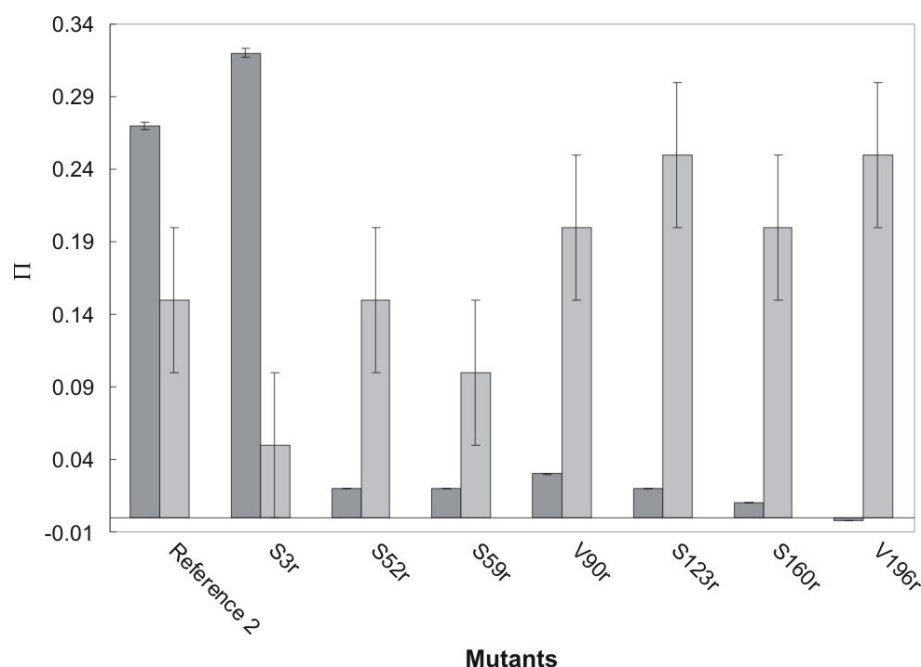


Figure 4: Accessibility parameters $\Pi(\text{CrOx})$ (dark gray bars) and $\Pi(\text{O}_2)$ (light gray bars) determined by CW progressive saturation measurements at 295 K for different mutation positions in LHCIIb. The originally determined oxygen accessibility parameter was multiplied by a factor of five, as measurements were performed in air with only 20% oxygen.

The relative error of these measurements was estimated to be 1% for $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$ accessibility and 5% for oxygen accessibility. The main error is assumed here to stem from the error of quencher concentration. A systematic bias may be introduced by the bulkiness of $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$, which is much larger than a water molecule, and by its nominal charge of $-3e$, which can lead to repulsion by negatively charged detergent or lipid headgroups. This bias cannot be quantified as a relative error.

ESEEM

Differences in water accessibility between different mutants are clearly seen in primary three-pulse ESEEM data. Typical data sets are shown in Figure 5a-c. In most of our measurements modulation depths larger than 10% were observed, which makes the use of linearized analytical expressions for data analysis somewhat precarious (59). Therefore our main data analysis method is based on modulation depth. Nevertheless, fits by the spherical shell model (21) were also performed and are compared to modulation depths.

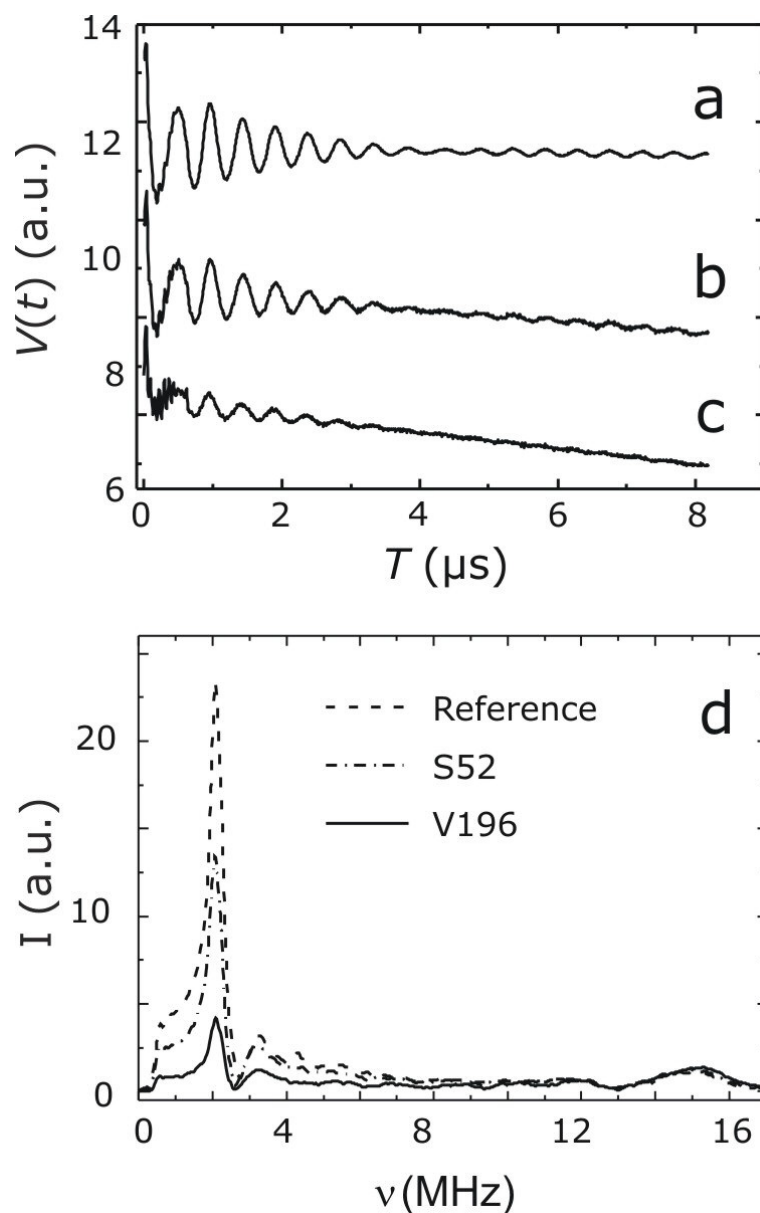


Figure 5: Three-pulse ESEEM time-domain data (a-c) and spectra (d) of (a) the Reference 2 sample (dashed line in (d)), (b) mutant S52r (dash-dot line), and (c) mutant V196r (solid line).

In previous work ESEEM-based water accessibility parameters were defined in different ways. In a simple definition the intensity of the deuterium ESEEM peak is normalized to the intensity of the proton peak (23). However, this definition depends on the assumption that the local concentration of non-water protons in contact with the spin label is invariable. This assumption may not apply to membrane proteins. Due to suppression effects for protons it also depends rather strongly on the choice of the first interpulse delay τ in the three-pulse ESEEM sequence. A more robust definition is based on the modulation depth K , defined as the peak-to-peak amplitude between the first maximum and first minimum of the deuterium modulation (27). This parameter is a direct measure for the distance and concentration of deuterium nuclei. However, the definition by a visual fit that involves averaging of proton modulations leads to decreased precision. Furthermore modulation depth also depends strongly on the choice of τ .

The deuterium modulation depth k can be determined precisely in the following way. The primary ESEEM data are corrected for the unmodulated part by fitting a polynomial function $B(t)$ (12), subtracting $B(t)$ from the primary data, and dividing the difference by $B(t)$ to obtain a deconvoluted and normalized nuclear modulation function $N(t)$. Fourier transformation of $N(t)$ provides the complex ESEEM spectrum and computation of the absolute value the magnitude spectrum. Typical magnitude ESEEM spectra are shown in Figure 5d. Due to proper normalization the amplitude $I(\nu_D)$ of the peak at the deuterium frequency ν_D in these spectra is proportional to the modulation depth, as previously noted in Baute and Goldfarb (60).

The proportionality constant may depend on implementation of the Fourier transform algorithm and on the number of data points. For that reason $I(\nu_D)$ is unlikely to be comparable between studies performed in different labs. From the real and imaginary peak intensities in the complex spectrum, $\text{Re}(\nu_D)$ and $\text{Im}(\nu_D)$, the phase ϕ of the deuterium modulation can be estimated as $\phi = \text{atan}[\text{Im}(\nu_D) / \text{Re}(\nu_D)]$. A damped harmonic oscillation

$$D(t) = k_D \cos(2\pi\nu_D T + \phi) \exp(-T^2 / \tau_0^2), \quad (4)$$

is then least-square fitted to $N(t)$ by varying deuterium modulation depth k_D , damping constant τ_0 and phase ϕ while keeping ν_D fixed. The Gaussian damping function was found to provide good fits of the decay of the oscillation for all our samples. The modulation depth k_D is directly related to the primary data and is thus independent of the choice of computational algorithm. It is related to an orientation average $\langle k \rangle$ of the modulation depth k in the theoretical description of three-pulse ESEEM (12).

The relation is given by

$$k_D = \frac{\langle k \rangle}{2} [1 - \cos(2\pi\nu_D\tau)], \quad (5)$$

where time τ in the second factor on the right-hand side (suppression factor) is the delay between the first two pulses. To the modulation depth parameter as defined in (27) k_D is related through $k_D \approx K/2$. The suppression factor $1 - \cos(2\pi\nu_D\tau)$ can range between 0 and 2. To minimize the influence of proton modulations on the fit of the deuterium modulation, we performed our measurements at $\tau = 344$ ns, which corresponds to the $j = 5$ blind spot of proton modulation ($\nu_H \tau = 5$, where ν_H is the proton Larmor frequency). Compared to the choice of $\tau = 204$ ns in (25), which corresponds to the $j = 3$ proton blind spot, this value leads to stronger suppression of the broad wings due to hydrogen-bonded deuterons and thus to more stable fits of the modulation that stems exclusively from non-hydrogen-bonded deuterons. For $\tau = 344$ ns the suppression factor has a value of 1.21, for $\tau = 204$ ns it has a value of 1.89, and for the $j = 4$ blind spot at $\tau = 272$ ns it has a value of 1.92.

According to ESEEM theory k depends on the number n and distances r_i of nuclei coupled to the electron spin. By fitting with fixed frequency ν_D , only deuterium nuclei contribute to k_D . Neglecting effects of the small deuterium quadrupole coupling on modulation depth and assuming sufficiently long distances the contribution of each individual deuteron is proportional to r^{-6} (21). The modulation depth is thus dominated by deuterons at the distance of closest approach. However, the contribution of directly hydrogen-bonded deuterons, which leads to the low-intensity broad wings of the deuterium peaks in Figure 5d (25, 26), is suppressed in k_D , as the Gaussian damping function guards against fitting of fast-decaying components of the modulation. Our fitting procedure thus selects the narrow spectral component whose intensity and corresponding modulation depth are proportional to the concentration of D_2O molecules that are not hydrogen-bonded to the spin label (25).

For these molecules at sufficiently long distances $r > 3$ Å, the modulation depth k at any orientation and thus also its orientation average $\langle k \rangle$ scales as ν_D^{-2} (12). To obtain a three-pulse ESEEM based water accessibility parameter $\Pi(D_2O)$ that is independent of the choice of interpulse delay τ and the exact static field B_0 for the measurement, we define

$$\Pi(D_2O) = \frac{2k_D}{[1 - \cos(2\pi\nu_D\tau)]} \cdot \left(\frac{\nu_D}{2 \text{ MHz}} \right)^2. \quad (6)$$

By normalization of the deuterium frequency to a standard value of 2 MHz we ensure that at X-band frequencies with $\tau = 344$ ns our accessibility parameter is similar to the parameter K defined in (27).

As the phase of the echo and the microwave frequency were checked after every experiment and were found to be stable, the main error in this parameter is assumed to result from noise. Differences in relaxation behavior between the different mutants might also introduce small errors, although most of the relaxation effects are corrected for by the deconvolution. As a rather good signal-to-noise ratio can be obtained the error for these measurements is estimated to be as small as 5 %.

The modulation depth is influenced by the number of nuclei and their distance of closest approach. These influences can be separated by fitting the whole modulation by the spherical shell model, since the damping of the modulation, quantified by our empirical parameter τ_0 , depends on the distance, but not on the number of nuclei (21). Such an analysis provides a distance of closest approach 0.35 nm for all LHCIIb mutants, corresponding to van-der-Waals contact of the closest non-hydrogen-bonded water molecules. As this distance does not significantly vary, variations in modulation depth are exclusively due to variations in the average number n of deuterons. This number ranges between about 0.2 for the least accessible sites V90r and V196r and 0.55 for the most accessible site S59r. Even larger values of about 0.8 are found for the reference samples with unbound spin labels. Note that these values may not be unique, as was pointed out in previous work (25), where longer distances of closest approach were assumed. The error in the water accessibility parameter n determined by this analysis method is assumed to be larger than the one in $\Pi(\text{D}_2\text{O})$, as only a few deuterium modulations were taken for analysis and only their local minima and maxima are used. The error of this evaluation method is thus assumed to be 10%.

The various water accessibilities determined from ESEEM data are presented in Figure 6.

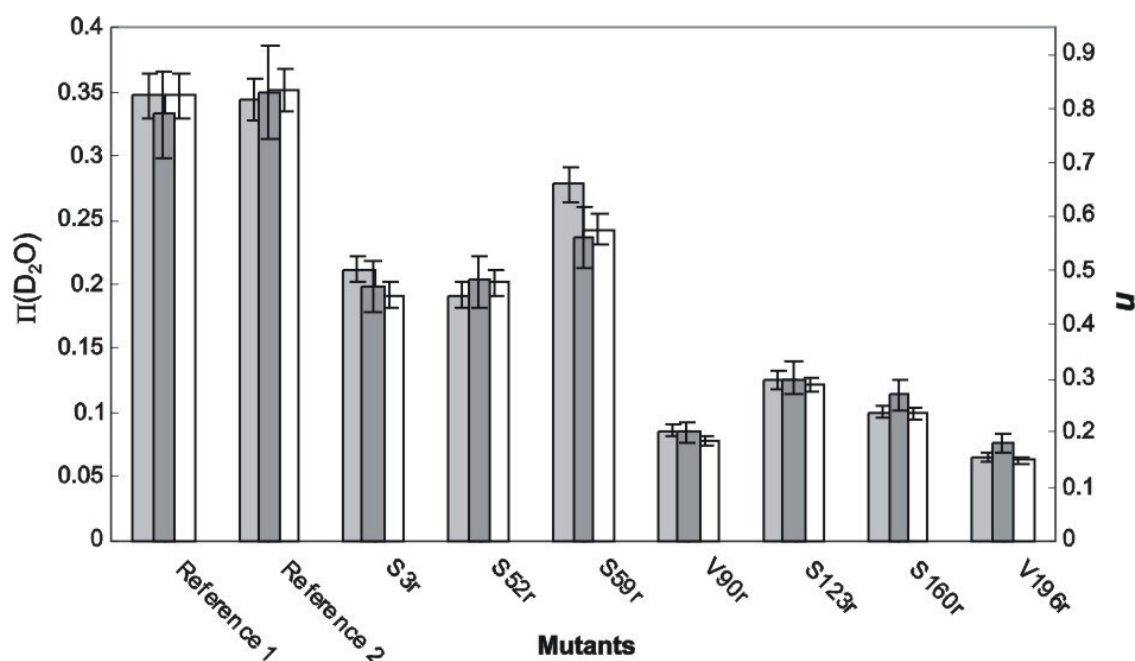


Figure 6: Water accessibility parameters obtained by different analysis procedures from deuterium three-pulse ESEEM data. For each sample are given: $\Pi(\text{D}_2\text{O})$ (light gray bars, left vertical scale), the deuterium peak intensity in ESEEM spectra normalized to Reference 1 sample (white bars, arbitrary units), and the average number of deuterium nuclei obtained by a spherical shell model fit (dark gray bars, right vertical scale).

As seen in Figure 6 the accessibility parameter $\Pi(\text{D}_2\text{O})$, the deuterium peak intensity I , and the average number n of deuterium nuclei correlate very well with each other. Among these parameters $\Pi(\text{D}_2\text{O})$ is best suited for comparison of measurements on different proteins and in different laboratories. However, if the technique is applied at the same EPR frequency with the same interpulse delay τ , and data sets with the same number of points are background-corrected and Fourier-transformed by the same programs, $\Pi(\text{D}_2\text{O})$ is related to I by $\Pi(\text{D}_2\text{O}) = C \times I$ with a constant factor C .

In contrast to $\Pi(\text{CrOx})$, $\Pi(\text{D}_2\text{O})$ for all LHCIIb mutants, including mutant S3r, is significantly smaller than for the reference samples. Unlike with $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$ the slight water accessibility of the V196r mutant can still be detected. In general, differences in water accessibility between different sites are better visible than with the progressive saturation experiments. Water accessibility of mutant V90r is smaller than might have been expected from the A_{zz} measurement, but the difference does not significantly exceed experimental error.

Relaxation measurements

Since many stochastic processes can influence relaxation in the solid state and mechanisms are not quantitatively understood for protein samples in glassy frozen so-

lutions, interpretation of relaxation data is not as straightforward as interpretation of CW EPR and ESEEM data. Here we try to understand the effects that govern electron spin relaxation of nitroxide labels in LHCIIb on the basis of empirical relaxation parameters. Such understanding would be useful, as relaxation measurements provide unique information and are technically not as demanding as many other pulse experiments.

The $1/e$ time τ_1 for longitudinal relaxation was determined from biexponential fits as described in the Materials and Methods section. The fits are indistinguishable from the data with bare eyes and no particular problems were encountered in this analysis (primary data not shown). No significant differences were observed between samples prepared with normal and deuterated water (Table 1). There might be a slight trend towards shorter τ_1 values on deuteration, but the differences do not exceed experimental error. This maximum error for τ_1 determination was estimated to be 10%.

Table 1: Longitudinal (τ_1) and transversal (τ_2) effective relaxation times (see text) at different mutation positions in LHCIIb at X-band frequencies of about 9.4 GHz.

Mutant	$\tau_1 / \mu\text{s}$		τ_2 / ns	
	H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O	D ₂ O
Reference 1	1331	1350	3200	4030
Reference 2	1352	1337	3408	5063
S3r	1070	1029	2178	3893
S52r	1054	1029	2185	3532
S59r	1140	1181	2369	5174
V90r	1021	978	2140	2525
S123r	1063	1027	2118	2488
S160r	871	871	1924	2468
V196r	862	705	2000	1923

Determination of the effective transversal relaxation time τ_2 , which coincides with the phase memory time T_m for stretched exponential and monoexponential decays, is more complicated. This is because the maxima of the nuclear modulation have to be fitted in modulated echo decays [see e.g. (30)]. Furthermore for the two protonated reference samples, decays were strongly non-exponential and were not well fitted by biexponential decays (data not shown). Such stretched exponential decays have been observed before for surface-exposed sites in the soluble protein human carbonic anhydrase, while monoexponential decays were typical for buried sites (30). Because of the different decay function for the reference samples compared to the LHCIIb samples, no conclusions can be drawn from comparison of τ_2 values between these two groups. We may not exclude that the effect is due to the presence of DMSO in the reference samples that is required to solubilize the free spin label and might thus be associated with it. In any case, Eq. 7 (*vide infra*) cannot be assumed to apply to these data, so that local proton concentrations computed for the reference samples cannot be trusted.

The error in τ_2 for the LHCIIb mutants is estimated to be 40 ns from comparison of data obtained on two independently prepared samples of the same mutant.

In contrast to the soluble protein human carbonic anhydrase II, where labels at surface-exposed sites have much longer relaxation times than those at buried sites (32), for detergent-solubilized LHCIIb we find only minor variations of τ_2 between different mutation positions in protonated buffer. However, the *change* in τ_2 on deuteration of the buffer in LHCIIb depends strongly on accessibility of the site (Table 1) as it does in carbonic anhydrase II.

This variation arises because transversal relaxation of electron spins in the low temperature limit in protonated samples is predominantly due to fluctuations of the hyperfine field at the electron imposed by the protons. These fluctuations in turn are induced by proton spin diffusion. For deuterons, with an about seven times smaller magnetic moment, the fluctuations are much smaller. The contribution of this mechanism to the relaxation rate is given by (61, 12)

$$\Delta\left(\frac{1}{\tau_2}\right) = \frac{0.37\mu_0(g\mu_B)^{1/2}(g_n\mu_n)^{3/2}[I(I+1)]^{1/4}}{4\pi\eta} C, \quad (7)$$

where C is the number concentration of nuclear spins that induce this relaxation, I their spin quantum number, g_n their nuclear g value, g the electron spin g value, μ_n the nuclear and μ_B the Bohr magneton. Eq. 7 suggests that the contribution is about 13 times smaller for deuterons than for protons. This still neglects additional slow-down of spin diffusion for quadrupole nuclei such as deuterium due to quadrupolar broadening of their resonance line. The contribution of deuterons can thus be neglected in the difference of relaxation rates between protonated and deuterated media and a local concentration of protons can be computed by equating $\Delta(1/\tau_2)$ in Eq. 7 with the experimentally determined rate difference.

Note that this approach implicitly assumes that all exchangeable protons are fixed in space. While libration of protons in hydrogen bonds can be neglected on the relevant length scales, hyperfine field fluctuations due to rotation of methyl groups may be relevant. As long as the methyl groups are protonated in both samples, as is the case in experiments with deuterated water, their contribution to transversal relaxation would be expected to cancel in the difference $\Delta(1/\tau_2)$ and could be neglected. However, if this relaxation mechanism dominates, it may be impossible to extract reliable values for $\Delta(1/\tau_2)$ from the data. This may be the case for our two reference samples, where we observe stretched exponential decays.

The difference in relaxation rates between protonated and deuterated samples is sensitive to proton concentration on a different length scale than ESEEM modulation depth. Due to its r^{-6} dependence the modulation depth is strongly biased towards dis-

tances of closest approach, *i.e.* to water molecules in van-der-Waals contact with the label. Exactly those protons, as well as the hydrogen-bonded protons, are decoupled from the proton spin bath by their hyperfine splitting. Thus there is no proton spin diffusion in direct neighborhood to the electron spin (31, 32, 62). Protons are effective in spin-diffusion induced relaxation if their hyperfine coupling is comparable to or smaller than the proton-proton dipole-dipole linewidth of about 35-100 kHz. The dipolar proton hyperfine coupling falls below 100-300 kHz at distances between about 5 to 7 Å from the electron spin. Thus the technique is most sensitive to the concentration of protons in a distance range between approximately 6 and 20 Å, where protons couple both to the electron spin and to the large spin bath of remote protons.

Concentrations of exchangeable protons in this distance range, computed according to Eq. 7, range between 10 nm^{-3} for mutant S123r and 30 nm^{-3} for mutant S3r (Figure 7). These values compare to a proton concentration in pure water of 67 nm^{-3} . For mutant V196r no relaxation suppression by deuteration is found within experimental error. In fact, due to experimental error in determination of τ_2 we find an apparent slight decrease of the relaxation time on deuteration for this sample.

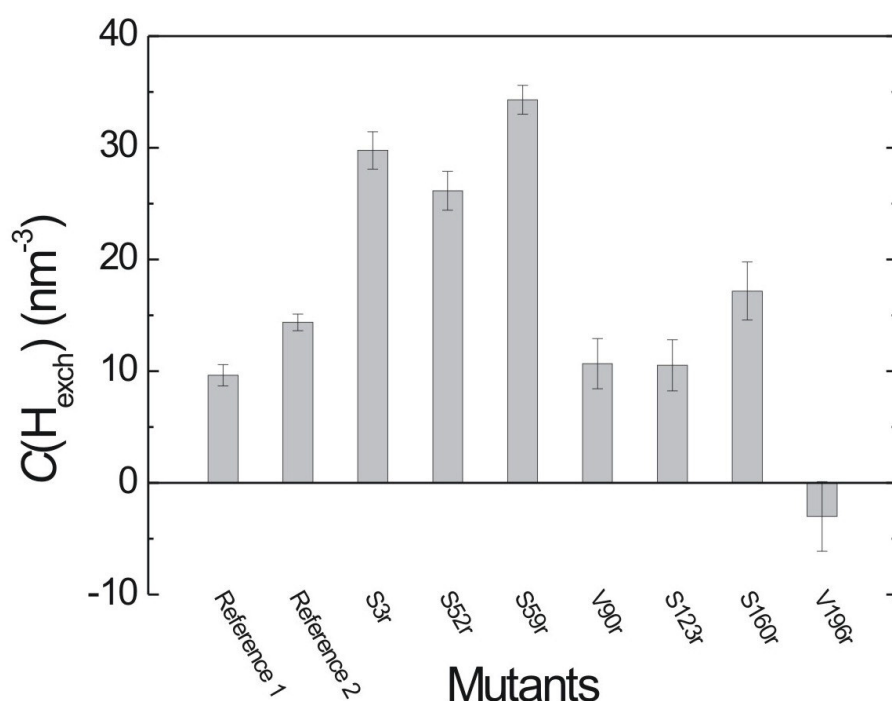


Figure 7: Local concentration of exchangeable protons according to Eq. 6 for different mutation sites in LHCIIb. Pure water has $C(H_{\text{exch}}) = 67 \text{ nm}^{-3}$.

Although effective longitudinal relaxation times τ_1 do not exhibit significant changes on deuteration of the buffer, they vary significantly among the different sites in LHCIIb

(Table 1). In general, relaxation times are longer for sites that are known to be exposed to water (reference samples) or have high water accessibility according to ESEEM.

At these low temperatures longitudinal relaxation of nitroxides in a glassy matrix is dominated by modulation of the hyperfine field due to libration motion (63). The prolonged τ_1 for both reference samples and for mutant S59r as well as the shortened τ_1 at sites S160r and V196r can then be understood by considering restriction of this librational motion by the environment of the spin labels. In an aqueous environment a stiff cage of ordered water molecules is formed around the spin label due to the hydrophobic effect. This cage hinders small angle motion of the spin label to a larger extent than an alkyl chain solvation shell in a membrane, liposome, or micelle or neighboring protein side groups. This stronger hindrance of motion in turn is reflected in a longer τ_1 .

This hypothesis is in line with lineshape effects in ESE spectra of the different samples that arise from anisotropy of the transversal relaxation time (33, 34, 35).

The relaxation anisotropy can be quantified most easily in terms of an anisotropy ratio h_1/h_2 of spectral intensities at two positions in the spectrum that roughly correspond to the orientations in the nitroxide molecular frame along the orbital lobes of the nitrogen p_z orbital and perpendicular to it (33). The spectral intensity h_1 is measured at the local maximum of the absorption lineshape near the low-field edge while h_2 is measured in the local minimum between the low-field edge and the central peak (global maximum). By a study on spin probes in ionomers (63) and a detailed study on a broad range of radicals and glassy matrices (35) transversal relaxation anisotropy for nitroxides has been related to reordering of the solvent cage. From ESE spectra of our samples (data not shown) we have determined the anisotropy ratios h_1/h_2 . As is seen in Figure 8 longitudinal relaxation and anisotropy ratio are correlated with each other, which indicates that both parameters are related to stiffness of the solvation cage.

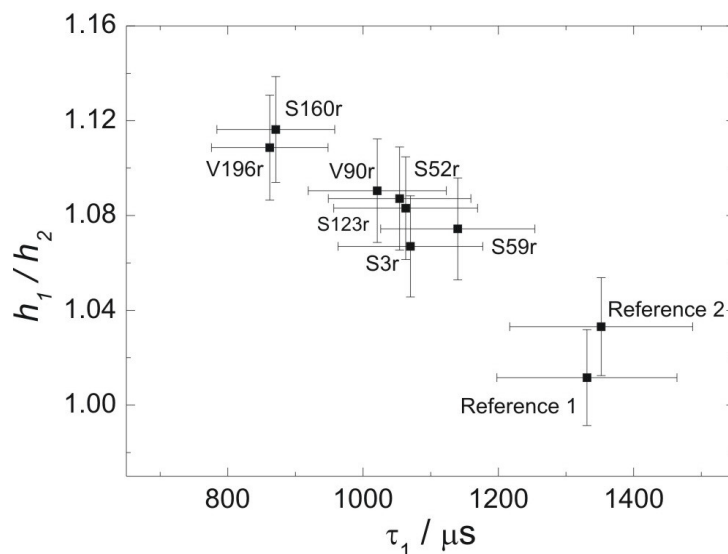


Figure 8: Anisotropy ratio h_1/h_2 for transversal relaxation obtained from ESE spectra plotted as a function of effective longitudinal relaxation time τ_1 for different sites in LHCIIb and two reference samples.

The largest error obtained from ESE spectra analysis is assumed to originate from the selection of the position at which h_1 is determined. Comparison of h_1/h_2 values at different spectral positions provides an error estimate of 2%.

The ratio h_1/h_2 is proportional to the product of the square of the libration amplitude and the correlation time of the libration (33). Longitudinal relaxation probes the cage stiffness on a picosecond time scale in the case of a direct relaxation process, or is independent on the time scale of the process in the case of a Raman process. According to van-Vleck theory of paramagnetic relaxation (64) this independence on the time scale in the Raman process arises since the energy of the electron spin transition needs to match only the difference of the energies of two quanta of lattice vibrations or modes. The typical energies of these modes at 50 K are so much larger than the Zeeman interaction that this interaction can be neglected in the computation of transition probabilities. Measurements of τ_1 at W-band frequencies of about 94 GHz for selected mutation positions showed similar relaxation times as at X-band as can be seen from Table 2.

Table 2: Effective longitudinal relaxation time (τ_1) for different LHCIIb mutants at W-band frequencies of about 94 GHz.

Mutant	$\tau_1 / \mu\text{s}$
S3r	993
S160r	800
V196r	716

Such behavior is consistent with a Raman process and inconsistent with a direct process. As differences between different spin-labeled sites are still observed, we assume that they are related to differences in libration amplitude.

DISCUSSION

Comparative discussion of the various techniques

Different methods were presented and tested on LHCIIb mutants that provide information on the environment of a spin label in a membrane protein in general and its water accessibility in particular. The simultaneous application of well established CW EPR methods and pulse EPR methods significantly increases the amount of available information. This is, first, because these methods are based on different physical interactions and thus are influenced by different properties of the spin label environment besides water accessibility. They are also sensitive to different length scales and to different water environment types. Second, one of the CW EPR methods can be applied

at ambient temperature, in a sample state that is closer to physiological conditions than a shock-frozen state, while the separation of interactions that is feasible with pulse techniques can provide better quantification of water accessibility. Third, solid-state methods allow for studying the kinetics of structural changes with freeze-quench techniques.

The easiest way to obtain information on water accessibility is the measurement of the CW EPR spectrum of a shock-frozen sample and extraction of the A_{zz} principle component of the hyperfine tensor that is sensitive to solvent polarity. This technique also features high concentration sensitivity, but has the disadvantage that large changes of the dielectric constant induce only small changes in A_{zz} . Furthermore, this parameter can be extracted only with rather low precision due to line broadening by anisotropic interaction, unresolved hyperfine splittings of protons and heterogeneity of the spin label environment.

In addition, A_{zz} may be influenced by contributions to the environment other than the presence of water, as for instance charged amino acid side groups in the vicinity. Although characterization of water accessibility by that technique works well in less complex systems, such as membranes or micelles (19, 23, 24, 57), it is thus rather inexact for membrane proteins. If complemented by high-field measurement of the principal g tensor component g_{xx} , the technique can distinguish influences due to hydrogen bonding and changes in dielectric constant of the environment (17, 18). This makes interpretation more clear cut if not unique. However, additional high-field measurements imply an experimental effort that may be higher than with the other methods discussed here and lead to decreased sensitivity at a given protein concentration. However, when other accessibility data is available, sensitivity of A_{zz} to charged amino acids in the vicinity of the label can be turned into an advantage, as poor correlation of A_{zz} with other accessibility parameters can provide a hint for their presence.

Progressive saturation measurements with CW irradiation provide information on accessibility of a spin label to paramagnetic molecules, called quenchers. This method can be applied at physiological temperatures in the presence of fluid water, which is not the case for any other method described here. Generally we find that the saturation curves can be fitted nicely by the theoretical expression, Eq. 1, and that scatter of the data points is small. Accessibility parameters obtained from such measurements thus have a smaller relative error than the polarity-related change in A_{zz} .

Water-soluble quenchers, such as $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$, Ni(II) diethylene diamine diacetic acid (NiEDDA), and Ni(II) bis(acetyl acetonate) (NiAA) (62) are used in progressive saturation measurements to characterize water accessibility, or, more precisely the immersion depth of a labeled site in the membrane or micelle. These quenchers are much larger than water molecules. They are thus most suitable to determine whether a residue is in the bulk aqueous phase outside the membrane or micelle, but not whether a residue is in contact with a single water molecule or only a few water molecules that

access through a channel or cavity in the protein. This enhanced sensitivity for strongly water-exposed residues is most prominent with $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$ due to its negative charge, which in the case of LHCIIb leads to repulsion by negatively charged detergent headgroups. This may be advantageous if the water accessibility parameter from progressive saturation measurements is determined together with other water accessibility parameters that are more sensitive to local water at short length scales. Positively charged headgroups or positively charged amino acid side groups may enhance the frequency of collisions of the $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$ quencher with the label, which is generally an unwanted effect. If progressive saturation measurements are used exclusively, it may be more appropriate to select a neutral water-soluble quencher such as NiEDDA or NiAA. Among those NiAA is characterized by a lower complex stability so that putative coordination sites in the protein might compete with it for the Ni^{2+} ion, thus leading to erroneous results. Due to the chelate effect NiEDDA is more stable, but unfortunately EDDA appears not to be commercially available.

The complementary information on short-length water accessibility can be obtained most precisely by ESEEM measurements. This method directly measures the interaction of spin-labeled amino acids with water molecules by detecting deuterium hyperfine coupling. As there is no effect at all in the absence of deuterium nuclei in the vicinity of a spin label and modulation may exceed 20 % of the total echo signal for water-exposed residues (Figures 5, 6), this technique is very sensitive to changes in water accessibility. This improved sensitivity of ESEEM compared to CW techniques was also reported in (24). If modulation depths are obtained by time-domain fitting, or after calibration-depth-preserving Fourier transformation, they can be determined with high precision. Normalization by the square of the deuterium resonance frequency and correction for the blind-spot behavior of three-pulse ESEEM (Eq. 6) ascertain that the accessibility parameter $\Pi(\text{D}_2\text{O})$ can be compared for measurements performed in different laboratories. This parameter is sensitive to the presence of deuterium nuclei at van-der-Waals contact distances of about 3.5 Å.

Problems in interpretation may arise from the fact that this method does not distinguish between deuterium exchange of protons in water and of exchangeable protons in the protein backbone or nearby amino acid side groups. Whether this affects conclusions depends on the specifics of sample preparation and freezing. If exchange of the water by deuterated water is performed after reconstitution and the sample is shock-frozen immediately after preparation, exposed amide backbone and amine protons on the surface may exchange on a time scale of milliseconds to about 100 seconds (66), while such protons in buried residues may be protected against deuterium exchange even on time scales of hundreds of minutes (67). In general, exchange of protons is expected to correlate to water accessibility on the time scale of sample preparation. Deuterium exchange before reconstitution should be avoided, as it might

lead to significant background modulation from exchanged backbone amide or side-group amine protons.

The ESEEM accessibility parameter may also be influenced by contributions from deuterated glycerol. This contribution could be diminished, but not completely excluded, by using glycerol- d_3 instead of glycerol- d_8 . Glycerol may penetrate somewhat more deeply into the membrane than water and may thus lead to a background signal.

Quantification of water accessibility at somewhat longer distances than with ESEEM can be obtained from measurements of transversal relaxation rate enhancement by protons. Feasibility of this technique for a large membrane protein is demonstrated here for the first time. Quantitative analysis of the difference in the transversal relaxation rate $1/\tau_2$ between non-deuterated and deuterated samples allows for estimating the concentration of exchangeable protons at length scales between about 6 and 20 Å. Relative errors may be somewhat larger than for the ESEEM-based accessibility parameter $\Pi(D_2O)$ but compare favorably with measurements of changes in A_{zz} .

In principle, the same cautionary remarks on exchangeable backbone and side group protons as in the case of ESEEM apply also to transversal relaxation enhancement. However, while an exchangeable proton can be accidentally in contact with a spin label, the concentration of such protons in a protein is much smaller than in water. Transversal relaxation rates are thus expected to be less affected by this problem. This is borne out by the fact that no enhancement is detected at position V196r in LHCIIb, while significant deuterium modulation is observed in ESEEM (Figure 6, Table 1, Figure 7).

Based on a theoretical expression for protons that are homogeneously distributed in space, according to Eq. 6, quantitative estimates can be derived for proton concentration near the label. For the most accessible residue in LHCIIb, mutant S3r, we find a value of 30 nm^{-3} that is about half as large as proton concentration in pure water (67 nm^{-3}). This value is reasonable, although a somewhat larger value might have been expected for the N-terminal domain if it would reside entirely in an aqueous environment. Poorly water-accessible residues have values between 10 and 15 nm^{-3} , while for a non-accessible residue the error bar includes zero concentration. This quantification assumes that exchangeable protons dominate transversal relaxation at low temperatures. It failed for reference samples in a solvent that contained a small amount of DMSO.

The simultaneous use of ESEEM and transversal relaxation enhancement may be particularly important for localization of residues that are near the membrane water interface, as these positions should be solvent inaccessible on a short length scale, but accessible on long length scales. This effect can however be weakened by the ability of water to penetrate to some extent into the alkyl chain region of lipid bilayers and micelles.

The expected effects of the environment on longitudinal relaxation are hard to quantify, but the trends can be understood based on studies of orientational motion of spin labels in non-crystalline media (34, 63, 68). This technique detects effects on spin label libration caused by local rigidity of the environment. These effects appear to be strongly correlated to the formation of a rigid solvation cage for water-exposed spin labels. Line shape analysis of ESE-detected EPR spectra, which is also sensitive to libration, supports this interpretation. The changes in ESE-detected EPR spectra could also derive from collective motion of the solvent matrix (35). Such an interpretation would be consistent with our results and picture of spin label environment, as this type of motion would also be restricted for a stiff, hydrogen-bonded solvation cage. Both techniques thus appear to probe formation of a complete solvent cage, as it is possible only for residues strongly exposed to water. They might be useful for detecting water-filled cavities in a protein near a spin label. If such correlation of τ_1 with water accessibility is confirmed for other membrane proteins, this technique may even be used as a stand-alone method. The drawback of both techniques is that the error of the measurements is relatively large compared to the accessibility-related changes.

As a consequence of the domination of longitudinal relaxation rates by solvation effects, relaxation measurements in the solid state cannot differentiate between residues in helix and loop regions. As seen in Figure 8, longitudinal relaxation is slower for the supposedly very mobile backbone near the N-terminus (mutant S3r) than for the supposedly rigid backbone in a helix (mutant V196r).

Accessibility parameters and structure of LHCIlb

Further insight into the specifics of each method can be obtained by comparing the respective accessibility parameters and discussing their correlation in terms of the structure of LHCIlb. Such a discussion also provides information on the structure of LHCIlb monomers reconstituted into detergent micelles as compared to trimeric, crystalline LHCIlb. As a reference parameter for the detection of correlations, we use the three-pulse ESEEM accessibility parameter $\Pi(D_2O)$, which is assumed to give the most direct water accessibility information. To relate our results to the crystal structure (38), we also compare them with a theoretical accessibility parameter determined with the Swiss-Pdb Viewer (69). All correlation plots are shown in Figure 9.

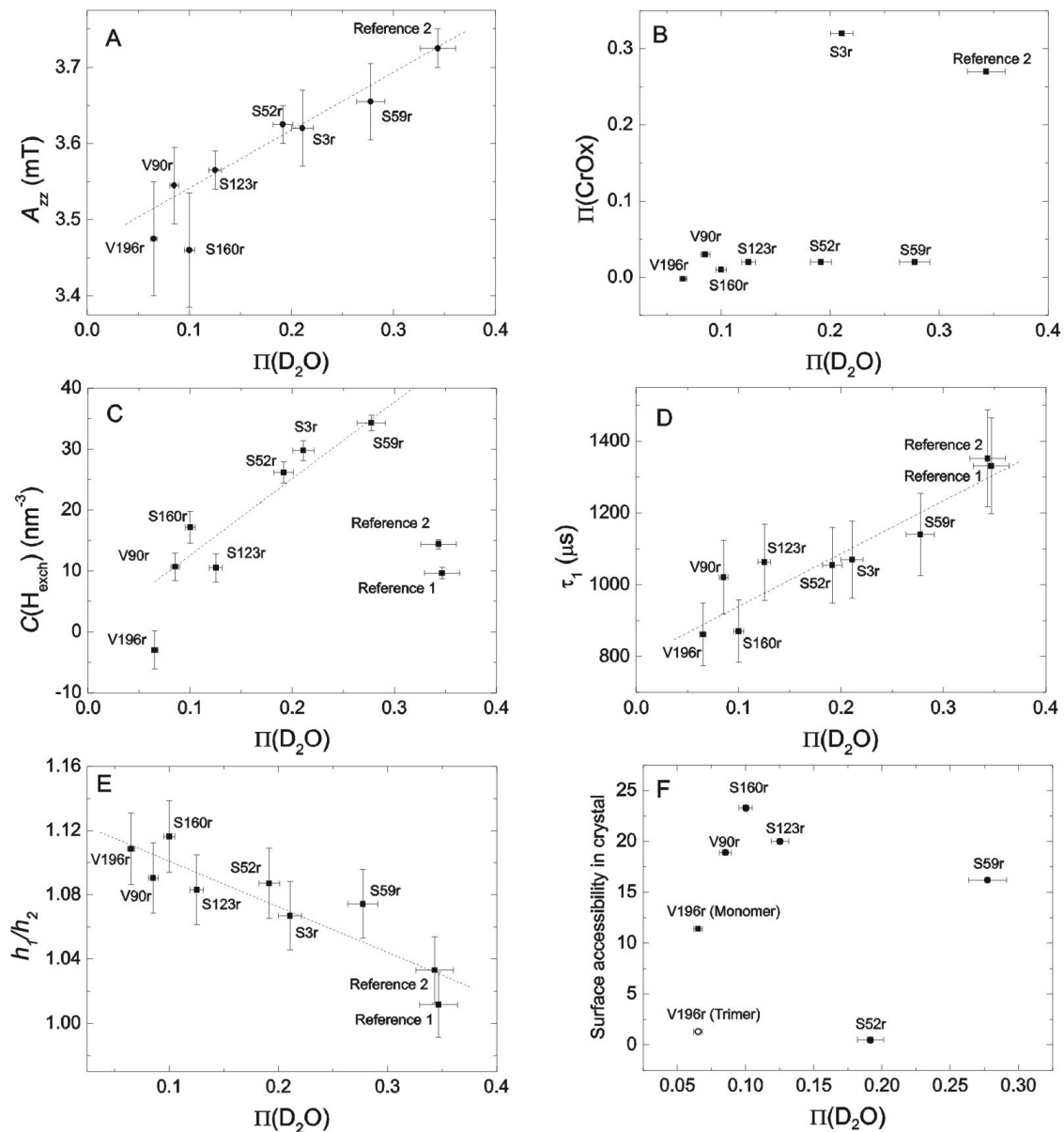


Figure 9: Correlation of various water accessibility parameters with the three-pulse ESEEM accessibility parameter $\Pi(\text{D}_2\text{O})$. A) Maximum hyperfine splitting A_{zz} , B) progressive saturation accessibility parameter $\Pi(\text{CrOx})$, C) local proton density $C(\text{H})$ from transversal relaxation rate change on deuteration, D) Effective longitudinal relaxation time τ_1 , E) intensity ratio h_1/h_2 in ESE-detected EPR spectra, F) surface accessibility predicted by Swiss-Pdb Viewer (69) from the crystal structure (38) for an isolated monomer (filled squares) and within a trimer (open circles). Dashed lines are linear regressions of the data. In C) proportionality of $C(\text{H})$ to $\Pi(\text{CrOx})$ was assumed in regression analysis. If error bars are not shown, error is assumed to be within the size of data markers. No error range is given for surface accessibility predicted by Swiss-Pdb Viewer is assumed.

The accessibility parameters A_{zz} , $C(\text{H})$, τ_1 , and h_1/h_2 are all correlated with $\Pi(\text{D}_2\text{O})$. The correlation coefficients are 0.97 for A_{zz} , 0.92 for τ_1 and -0.91 for h_1/h_2 (Figure 9A, 9D, 9E). For $C(\text{H})$ such correlation is observed only among the LHCIIb samples (Figure

9C). For the reference samples this analysis fails, as was explained above. If data for the reference samples are left out, the correlation coefficient is $R = 0.90$. For the other three cases the reference samples correlate as well as the LHCIIb samples and are included in the fits. Such correlation analysis presupposes that the relationship between two accessibility parameters is linear. This is strictly expected only for the relationship between $C(H)$ and $\Pi(D_2O)$, as these two parameters depend linearly on proton concentration at different length scales. Even in that case linear correlation is expected only in the absence of distance dependent heterogeneity of the proton distribution. We find that for LHCIIb $C(H)$ is proportional to $\Pi(D_2O)$, except for mutant V196r and perhaps mutants S160r and S123r (Figure 9C). In the former case the deviation is significant and corresponds to a situation where the density of exchangeable protons is higher in the immediate vicinity of the label (van-der-Waals contact) than at somewhat longer distances of 6 to 20 Å. As described previously this may be caused by the exchange of protein protons by deuterium. The reason for the deviation of the S160r mutant from the linear behavior can be explained by its interfacial position between the core of the micelle and water. From an analysis of polarity of the neighboring amino acids it is not possible to say whether this loop region should reside in water or in the membrane. The measurements thus suggest that it is situated in an intermediate position. This observation indicates that combination of ESEEM measurements with measurements of the transversal relaxation rate can be used to identify residues near the interface of the lipid bilayer or micelle.

In the other cases a linear relationship cannot be predicted from theory. Yet we find that A_{zz} (Figure 9A), τ_1 (Figure 9D) and h_1/h_2 (Figure 9E) scale linearly with $\Pi(D_2O)$ within experimental error. Quality of the correlation suggests that the dependence of A_{zz} on mutation position is dominated by water accessibility. It remains to be seen whether this also applies to membrane proteins reconstituted into liposomes or lipid bilayers. Linear correlation of both h_1/h_2 and τ_1 with $\Pi(D_2O)$ is most easily explained by assuming that the square of the libration amplitude of the spin label decreases linearly with local water concentration. However, our experimental error is too large to actually prove this relationship.

Interestingly, correlation of $\Pi(CrOx)$ with $\Pi(D_2O)$ is poor (Figure 9B). In agreement with expectations reference sample 2 exhibits a high $[Cr(ox)_3]^{3-}$ accessibility. High accessibility is also found for mutant S3r near the N terminus that has one of the highest accessibilities according to all the other methods. However, in strong contrast to the high water accessibility implied by the deuterium modulation depth in ESEEM, the A_{zz} value, transversal relaxation enhancement, slowdown of longitudinal relaxation and the h_1/h_2 ratio, mutant S59r appears to be only weakly accessible to $[Cr(ox)_3]^{3-}$. Similar behavior is observed for mutant S52r. Both mutants have only intermediate oxygen accessibility (Figure 4), which would identify them as protein-buried if only the results

from progressive saturation measurements were available. Analysis of all the other water accessibility parameters suggests that the residues are in the micelle interface and are at least partially exposed to water. Most likely, $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$ accessibility is lowered due to electrostatic repulsion of charged detergent headgroups or due to the bulkiness of the neutral maltoside detergent headgroups. Which of the two scenarios is the case could be decided by repeating accessibility measurements with a neutral water-soluble quencher such as NiEDDA.

A further possible explanation would be a change of protein conformation during shock-freezing. However, label-to-label distances of spin-labeled double mutants measured under the same conditions correlate quite nicely with simulated distance distributions based on the x-ray structure (A. Volkov, C. Dockter, Ye. Polyhach, G. Jeschke, H. Paulsen, to be published), which makes this explanation rather unlikely. For the relaxation-based parameters an influence of dissolved oxygen might be expected from observations described in (24). However, we explicitly tested for effects of sample degassing on ESEEM and relaxation measurements on both deuterated and non-deuterated samples and did not find significant changes. Degassed samples were prepared for the Reference 2 sample and the S106r mutant. The results for these samples suggest that the labels are solvent accessible in both of them and that an effect of the dissolved oxygen *in water* on relaxation rates can be safely excluded.

The comparison of the τ_2 relaxation times between the deuterated and non-deuterated mutants suggests that proton spin diffusion dominates transversal relaxation at 50 K also for sites in the interior of the micelles and that oxygen dissolved in the micelle does not have a strong effect. We may not safely exclude the possibility that such oxygen may be the reason for the decreased τ_1 relaxation time for the micelle-buried residues. This is however rather unlikely, as the main mechanism for relaxation enhancement by oxygen in liquid solution depends on diffusional collisions with the spin label. This mechanism is not available in the solid state. Relaxation enhancement by a fast relaxing paramagnetic species (oxygen) in the solid state due to dipole-dipole interaction with the observed slowly relaxing species (nitroxide) is relevant for transversal relaxation only in a relatively narrow temperature range (70). For longitudinal relaxation such effects may be relevant in a broader temperature range, but their magnitude depends strongly on a matching between the longitudinal relaxation rate of the fast relaxing species and the Larmor frequency of the slowly relaxing species. As effective longitudinal relaxation times τ_1 are very similar at two resonance frequencies that differ by an order of magnitude (see Tables 1 and 2), a significant effect of the membrane-dissolved oxygen on τ_1 in the solid state is rather unlikely.

As we did not observe oxygen-related relaxation enhancement at a temperature of 50 K for some of the mutants and do not expect this effect for the other mutants, all measurements were performed without degassing. This makes the experiments much easier to perform, as the preparations tended to foam strongly during this procedure.

Theoretical accessibility parameters based on the x-ray structure of the LHCIIb trimer (38), considering either only one LHCIIb molecule or all three molecules in the trimer, do not correlate with the ESEEM accessibility parameter $\Pi(D_2O)$ (Figure 9F). In fact, this is expected as Swiss-Pdb Viewer and similar programs predict surface accessibility of residues, which for membrane proteins is a sum of lipid and water accessibility. But predictive power of the approach remains poor even if this is taken into account. Mutants V196r and S52r are suggested to be buried sites in the trimer. While this is in agreement with all the water accessibility parameters for V196r measured in this work, it contradicts the high oxygen accessibility of this residue (Figure 4). This apparent contradiction can be traced back to the facts that our measurements are performed on LHCIIb monomers and that this residue is situated in the interface between LHCIIb molecules in the trimer, as is apparent from the predicted accessibility of this residue being different in monomers and trimers. All our data combined thus suggest that V196r in our samples is exposed to alkyl chains in the micelle interior.

For mutant S52r we find moderate oxygen accessibility and water accessibility similar to the one of mutant S3r, where the residue is clearly water-exposed. This is in stark contradiction to predictions for both, the LHCIIb trimer and the monomer cut out of the trimer. Barring a conformational difference between LHCIIb in crystals and in the detergent micelle, this difference could be explained by the fact that the spin-labeled side groups are larger than the native side groups and may thus protrude more strongly from the protein surface. Furthermore for the labels different rotamers may be preferred than for the native side groups. For these reasons, accessibility modeling should explicitly account for the label and should include a prediction of its conformational distribution. However, preliminary simulations based on a rotamer library approach (71) suggest that the few allowed conformers of mutant S52r are also buried (A. Volkov, C. Dockter, Ye. Polyhach, G. Jeschke, H. Paulsen, to be published). Thus, it is likely that the conformation of the N-terminal domain in LHCIIb monomers reconstituted into detergent micelles is different from the one in trimers in LHCIIb crystals, as has already been suggested earlier (14).

The opposite difference between theoretically predicted surface accessibility and experimentally observed water accessibilities is found for mutants V90r, S123r, and S160r. According to all experimentally determined parameters accessibilities are low or at best moderate for these sites, but according to predictions they are very high. In all three cases oxygen accessibility is rather high (Figure 4), indicating that these residues are lipid-accessible. This is indeed consistent with the x-ray structure, although this structure would also allow for positioning all three residues in the lipid head group layer.

Interestingly, mutant S59r near the stromal end of helix A is both predicted and found to be highly water accessible. A closer look at the amino acid sequence shows that most of the amino acids in the direct neighborhood of this site are polar. Our data

suggest that, in detergent micelles, the site is water exposed. A larger protrusion length from the membrane on the stromal side was also deduced from the crystal structure (38). Thus our data support previous results that suggest that membrane proteins reconstituted into detergent micelles behave similarly to membrane proteins in lipid bilayers (72).

For mutant S3r accessibility cannot be predicted, as this residue is situated in the part of the N-terminal domain that is not resolved in crystal structures. This domain is known to be important for the response of the photosynthesis apparatus to changes in light conditions (40). Our results on water accessibility suggest that at least in the monomeric state this residue is not immersed in the micelle (or membrane), but is highly solvent accessible up to the distances of 2 nm. This observation confirms and extends previously obtained information about the N-terminal domain (14, 73).

Accessibility for mutant S106r was also tested, but was not as well reproducible as for all the other mutants. For this site high or low solvent accessibilities were obtained in analogous measurements on samples prepared in the same way (data not shown). These accessibility changes were found to be correlated with slight changes in CD spectra. This poor reproducibility might be connected to the marginal stability of a short helix near this site. To a lesser extent, we also found variations in accessibility between different preparations of mutant V90r, which is close to the flexible domain that contains the short helix with marginal stability. More detailed investigations are required in order to understand how each of the two states can be prepared in a controlled way.

CONCLUSION

Several EPR parameters that provide complementary information on water accessibility of a spin label in a membrane protein were determined on the different sites in major plant light harvesting complex LHCIIb and compared with each other.

Detailed insight in the local environment of spin labels was obtained by simultaneous determination of the polarity-dependent ^{14}N hyperfine splitting A_{zz} , the dynamics sensitive longitudinal relaxation time and intensity ratio h_1/h_2 in ESE-detected EPR, and the ESEEM water accessibility parameter $\Pi(\text{D}_2\text{O})$ that quantifies the average number of water molecules in van-der-Waals contact with the label. A water accessibility parameter characterizing the average density of exchangeable protons at distances between about 6 and 20 Å from the label was computed from the change $\Delta(1/\tau_2)$ of the relaxation rate on exchange of the water protons by deuterium. Among these parameters the normalized ESEEM deuterium accessibility parameter $\Pi(\text{D}_2\text{O})$ appears to be the one that can be measured with best precision and is most robust with respect to other changes in the environment of the label.

Strong correlations or negative correlations were found between all these parameters. Thus environment polarity and spin label mobility in detergent-solubilized LHCIIb appear to be dominated by water accessibility. In two reference samples consisting of free spin labels, transversal relaxation behavior was found to be qualitatively different which hints at a qualitatively different relaxation mechanism in these samples and shows that the relaxation data should be used with care.

The parameter $\Pi(\text{CrOx})$ determined by progressive saturation measurements in the presence of the paramagnetic quencher $[\text{Cr}(\text{ox})_3]^{3-}$ exhibited surprisingly poor correlation with the ESEEM water accessibility parameter $\Pi(\text{D}_2\text{O})$, probably due to the negative charge of the quencher, but possibly also due to its bulkiness. This suggests that the presented pulse EPR methods are more exact in determining the local accessibility to the small water molecule compared to the saturation measurements, which are more suitable for determining the immersion depth in the membrane or micelle.

Experimental water accessibility parameters for LHCIIb were compared with theoretical predictions of surface accessibility using the oxygen accessibility parameter $\Pi(\text{O}_2)$ as additional information, confirming earlier findings on structural similarity of LHCIIb monomers reconstituted into detergent micelles with LHCIIb trimers in crystals. The unexpectedly high water accessibility of residue S52 in the N-terminal domain suggests that this domain has a different conformation in detergent-solubilized monomers than in trimers in LHCIIb crystals. High water accessibility of residue S3 indicates that the first few residues of the N-terminal domain, which are not resolved by x-ray crystallography, are water-exposed in the monomers in detergent micelles.

The techniques presented in this work are applicable to any membrane protein that can be spin-labeled, regardless of its size or degree of structural order. For disordered domains of a protein or folding intermediates these techniques can thus provide ensemble-averaged water accessibility parameters. An investigation of the kinetics of protein folding during LHCIIb self-assembly by observation of changes in water accessibility is now in progress.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. D. Hinderberger for providing the program RANA for analysis of three-pulse ESEEM spectra, Hans Wolfgang Spiess for providing access to a pulsed EPR spectrometer and Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 625, TP B10) for financing this work.

REFERENCES

- (1) Arora, A., L. K. Tamm. 2001. Biophysical approaches to membrane protein structure determination. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11:540-547.
- (2) Lacapere, J. J., E. Pebay-Peyroula, J. M. Neumann, C. Etchebest. 2007. Determining membrane protein structures: still a challenge! *Trends Biochem. Sci.* 32:259-270
- (3) Tamm, L. K., B. Liang. 2006. NMR of membrane proteins in solution. *Prog. Nucl. Magn. Res. Sp.* 48:201-210.
- (4) Henderson, R. 2004. Realizing the potential of electron cryo-microscopy. *Q. Rev. Biophys.* 37:3-13.
- (5) Zhang, X., E. Settembre, C. Xu, P. R. Dormitzer, R. Bellamy, S. C. Harrison, N. Grigorieff. 2008. Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:1867-1872.
- (6) Hubbell, W. L., D. S. Cafiso, C. Altenbach. 2000. Identifying conformational changes with site-directed spin labeling. *Nat. Struct. Biol.* 7:735-739.
- (7) Fanucci, G. E., D. S. Cafiso. 2006. Recent advances and applications of site-directed spin labeling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16:644-653.
- (8) Munishkina, L. A., A. L. Fink. 2007. Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins. *BBA-Biomembranes.* 1768:1862-1885.
- (9) Thóren P. E. G., D. Persson, E. K. Ersbjörner, M. Goksör, P. Lincoln, B. Nordén. 2004. Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides. *Biochemistry.* 43:3471-3489.
- (10) Heuck A. P., A. E. Johnson. 2002. Pore-forming protein structure analysis in membranes using multiple independent fluorescence techniques. *Cell Biochem. Biophys.* 36:89-101.
- (11) Wennmalm, S., S. M. Simon. 2007. Studying individual events in biology. *Annu. Rev. Biochem.* 76:419-476.
- (12) Schweiger, A., G. Jeschke. 2001. Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance. Oxford University Press, Oxford.
- (13) Jeschke, G., C. Wegener, M. Nietschke, H. Jung, H.-J. Steinhoff. 2004. Inter-Residual Distance Determination by Four-Pulse DEER in an Integral Membrane Protein: the Na⁺/Proline Transporter PutP of Escherichia coli. *Biophys. J.* 86:2551-2557.
- (14) Jeschke, G., A. Bender, T. Schweikardt, G. Panek, H. Decker, H. Paulsen. 2005. Localization of the N-terminal domain in light-harvesting chlorophyll a/b protein (LHCIIb) by electron paramagnetic resonance (EPR) measurements. *J. Biol. Chem.* 280:18623-18630.
- (15) Xu Q, J. F. Ellena, M. Kim, D. S. Cafiso. 2006. Substrate-dependent unfolding of the energy coupling motif of a membrane transport protein determined by double electron-electron resonance. *Biochemistry.* 45:10847-10854.
- (16) Vamvouka, M., J. Cieslak, N. Van Eps, W. Hubbell, A. Gross. 2008. The structure of the lipid-embedded potassium channel voltage sensor determined by double-electron-electron resonance spectroscopy. *Protein Sci.* 17:506-517.
- (17) Steinhoff H. J., A. Savitsky, C. Wegener, M. Pfeiffer, M. Plato, K. Möbius. 2000. High-field EPR studies of the structure and conformational changes of site-directed spin labeled bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1457:253-262.

- (18) Owenius, R., M. Engström, M. Lindgren, M. Huber. 2001. Influence of solvent polarity and hydrogen bonding on the EPR parameters of a nitroxide spin label studied by 9-GHz and 95-GHz EPR spectroscopy and DFT calculations. *J. Phys. Chem. A*. 105:10967-10977.
- (19) Kurad, D., G. Jeschke, D. Marsh. 2003. Lipid membrane polarity profiles by high-field EPR. *Biophys. J.* 85:1025-1033.
- (20) Altenbach, C., S. L. Flitsch, H. G. Khorana, W. J. Hubbell. 1989. Structural studies on transmembrane proteins. 2. Spin labeling of bacteriorhodopsin mutants at unique cysteines. *Biochemistry*. 28:7806-7812.
- (21) Ichikawa, T., L. Kevan, M. K. Bowman, S. A. Dikanov, Y. D. Tsvetkov. 1979. Ratio analysis of electron-spin echo modulation envelopes in disordered matrices and application to the structure of solvated electrons in 2-methyltetrahydrofuran glass. *J. Chem. Phys.* 71:1167-1174.
- (22) Szajdzinska-Piętek, E., R. Maldonado, L. Kevan, R. R. M. Jones. 1984. Electron-spin resonance and electron-spin echo modulation studies of N,N,N',N'-Tetramethylbenzidine photoionization in anionic micelles – structural effects of tetramethylammonium cation counterion substitution for sodium-cation in dodecyl-sulfate micelles. *J. Am. Chem. Soc.* 106:4675-4678.
- (23) Bartucci, R., R. Guzzi, D. Marsh, L. Sportelli. 2003. Intramembrane polarity by electron spin echo spectroscopy of labeled lipids. *Biophys. J.* 84:1025-1030
- (24) Noethig-Laslo, V., P. Cevc, D. Arčon, M. Šentjerc. 2004. Comparison of CW-EPR and E-SEEM technique for determination of water permeability profile in liposome membranes. *Appl. Magn. Reson.* 27:303-309.
- (25) Erilov D. A., R. Bartucci, R. Guzzi, A. A. Shubin, A. G. Maryasov, D. Marsh, S. A. Dzuba, L. J. Sportelli. 2005. Water concentration profiles in membranes measured by ESEEM of spin-labeled lipids. *J. Phys. Chem. B*. 109:12003-12013.
- (26) Bartucci, R., D. A. Erilov, R. Guzzi, L. Sportelli, S. A. Dzuba, D. Marsh. 2006. Time-resolved electron spin resonance studies of spin-labelled lipids in membranes. *Chem. Phys. Lipids*. 141:142-157.
- (27) Carmieli, R., N. Papo, H. Zimmerman, A. Potapov, Y. Shai, D. Goldfarb. 2006. Utilizing ESEEM spectroscopy to locate the position of specific regions of membrane-active peptides within model membranes. *Biophys. J.* 90:492-505.
- (28) Salnikov, E.S., D. A. Erilov, A. D. Milov, Yu. D. Tsvetkov, C. Peggion, F. Formaggio, C. Toniolo, J. Raap, S. A. Dzuba. 2006. Location and aggregation of the spin-labeled peptide trichogin GA IV in a phospholipids membrane as revealed by pulsed EPR. *Biophys. J.* 91:1532-1540.
- (29) De Simeone, F., R. Guzzi, L. Sportelli, D. Marsh, R. Bartucci. 2007. Electron spin-echo studies of spin-labelled lipid membranes and free fatty acids interacting with human serum albumin. *BBA- Biomembranes*. 1768:1541-1549.
- (30) Lindgren, M., G. R. Eaton, S. S. Eaton, B. -H. Jonsson, P. Hammarström, M. Svensson, U. Carlsson. 1997 Electron spin echo decay as a probe of aminoxyl environment in spin-labeled mutants of human carbonic anhydrase II. *J. Chem. Soc. Perk. T. 2*. 12: 2549-2554.
- (31) Zecevic, A., G. R. Eaton, S. S. Eaton, M. Lindgren. 1998. Dephasing of electron spin echoes for nitroxyl radicals in glassy solvents by non-methyl and methyl protons. *Mol. Phys.* 95:1255-1263.

- (32) Huber, M., M. Lindgren, P. Hammarström, L.-G. Mårtensson, U. Carlsson, G. R. Eaton, S. S. Eaton. 2001. Phase memory relaxation times of spin labels in human carbonic anhydrase II: pulsed EPR to determine spin label location. *Biophys. Chem.* 94:245-256.
- (33) Dzuba, S. A. 1996. Librational motion of guest spin probe molecules in glassy media. *Phys. Lett. A.* 213:77-84.
- (34) Kirilina, E. P., S. A. Dzuba, A. G. Maryasov, Yu. D. Tsvetkov. 2001. Librational dynamics of nitroxide molecules in a molecular glass studied by echo-detected EPR. *Appl. Magn. Reson.* 21:203-221.
- (35) Kirilina, E. P., I. A. Grigorjev, S. A. Dzuba. 2004. Orientational motion of nitroxides in molecular glasses: Dependence on the chemical structure, on the molecular size of the probe, and on the type of the matrix. *J. Chem. Phys.* 121:12465-12471.
- (36) Kühlbrandt, W., D. N. Wang, Y. Fujiyoshi. 1994. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature.* 367:614-621.
- (37) Liu, Z., H. Yan, K. Wang, T. Kuang, J. Zhang, L. Gui, X. An, W. Chang. 2004. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 angstrom resolution. *Nature.* 428:287-292.
- (38) Standfuss, J., A. C. van Scheltinga Terwisscha, M. Lamborghini, W. Kühlbrandt. 2005. Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* 24:919-928.
- (39) Nilsson, A., D. Stys, T. Drakenberg, M. D. Spangfort, S. Forsén, J. F. Allen. 1997. Phosphorylation controls the three-dimensional structure of plant light harvesting complex II. *J. Biol. Chem.* 272:18350-18357.
- (40) Allen J. F., J. Forsberg. 2001. Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.* 6:317-326.
- (41) Ruban, A. V., R. Berera, C. Iliaia, I. H. M. van Stokkum, J. T. M. Kennis, A. A. Pascal, H. van Amerongen, B. Robert, P. Horton, R. van Grondele. 2007. Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature.* 450:575-578
- (42) Reinsberg, D., K. Ottmann, P. J. Booth, H. Paulsen. 2001. Effects of chlorophyll a, chlorophyll b, and xanthophylls on the in vitro assembly kinetics of the major light-harvesting chlorophyll a/b complex, LHCIIb. *J. Mol. Biol.* 308:59-67.
- (43) Horn, R., G. Grundmann, H. Paulsen. 2007. Consecutive binding of chlorophylls a and b during the assembly in vitro of light-harvesting chlorophyll-a/b protein (LHCIIb). *J. Mol. Biol.* 366:1045-1054.
- (44) Cashmore, A. R. 1984. Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a chlorophyll a b-binding polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:2960-2964.
- (45) Paulsen, H., U. Rümmler, W. Rüdiger. 1990. Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll-a/b-binding protein overexpressed in escherichia-coli. *Planta.* 181: 204-211.
- (46) Kroll, C. 1999. PhD-Thesis. Humboldt-University Berlin.
- (47) Paulsen, H., B. Finkenzeller, N. Kühlein. 1993. Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll alpha/beta-binding protein. *Eur. J. Biochem.* 215:809-816.
- (48) Panek, G., S. Schleidt, Q. Mao, M. Wolkenhauer, H. W. Spiess, G. Jeschke. 2006. Heterogeneity of the surfactant layer in organically modified silicates and polymer/layered silicate composites. *Macromolecules.* 39:2191-2200.

- (49) Altenbach, C., D. A. Greenhalgh, H. G. Khorana, W. J. Hubbel. 1994. A collision gradient-method to determine the immersion depth of nitroxides in lipid bilayers- Application to spin-labeled mutants of bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:1667-1671.
- (50) Farahbakhsh Z. T., C. Altenbach, W. L. Hubbell. 1992. Spin labeled cysteines as sensors for protein lipid interaction and conformation in rhodopsin. *Photochem. Photobiol.* 56:1019-1033.
- (51) Wilhelm, E., R. Battino. 1973. Thermodynamic functions of solubilities of gases in liquids at 25 degrees C. *Chem. Rev.* 73:1-9.
- (52) Wilhelm, E., R. Battino, J. R. Wilcock. 1977. Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chem. Rev.* 77:219-262.
- (53) Windrem, D. A., W. Z. Plachy. 1980. The diffusion-solubility of oxygen in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 600:655-665.
- (54) Jeschke, G. 2007. Instrumentation and Experimental Setup, in: M. A. Hemminga, L. J. Berliner (Eds.) *ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics*, Springer, New York.
- (55) Jäger, H., A. Koch, V. Maus, H. W. Spiess, G. Jeschke. Submitted.
- (56) Hinderberger, D., H. W. Spiess, G. Jeschke. 2004. Dynamics, site binding, and distribution of counterions in polyelectrolyte solutions studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Phys. Chem. B.* 108:3698-3704.
- (57) Griffith O. H., P. J. Dehlinger. S. P. Van. 1974. Shape of hydrophobic barrier of phospholipids bilayers (evidence for water penetration in biological-membranes). *J. Membrane Biol.* 15:159-192.
- (58) Marsh D., C. Toniolo. 2008. Polarity dependence of EPR parameters for TOAC and MTSSL spin labels: Correlation with DOXYL spin labels for membrane studies. *J. Magn. Reson.* 190: 211-221.
- (59) Ponti, A. 1997. Electron-spin-echo envelope modulation arising from hyperfine coupling to a nucleus of arbitrary spin. *J. Magn. Reson.* 127:87-104.
- (60) Baute D., D. Goldfarb. 2007. Interaction of nitrates with pluronic micelles and their role in the phase formation of mesoporous materials. *J. Phys. Chem. C* 111: 10931-10940.
- (61) Brown, I. M. 1979. Time-domain electron spin resonance. L. Kevan. R. N. Schwartz. Wiley, New York.
- (62) Blumberg, W. E. 1960. Nuclear spin-lattice relaxation caused by paramagnetic impurities. *Phys. Rev.* 1960. 119:79-84.
- (63) Loporini, D., V. Schaedler, U. Wiesner, H.W. Spiess, G. Jeschke. 2003. Electron spin relaxation due to small-angle motion: Theory for the canonical orientations and application to hierarchic cage dynamics in ionomers. *J. Chem. Phys.* 119:11829- 11846.
- (64) Van Vleck, J. H.. 1940. Paramagnetic Relaxation Times for Titanium and Chrome Alum. *Phys. Rev.* 57: 426-447.
- (65) Hubbell, W. L., C. Altenbach. 1994. Investigation of structure and dynamics in membrane proteins using site-directed spin labeling. *Curr. Opin Struct. Biol.* 4: 566-573.
- (66) Englander, S. W., L. Mayne. 1992. Protein folding studied using hydrogen-exchange labeling and two-dimensional NMR. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21: 243-265.
- (67) Scheirlinckx, F., V. Raussens, J.-M. Ruysschaert, E. Goormaghtigh. 2004. Conformational changes in gastric H⁺/K⁺-ATPase monitored by difference Fourier-transform infrared spectroscopy and hydrogen/deuterium exchange. *Biochem. J.* 382: 121-129.

- (68) Dzuba, S. A., Yu. D. Tsvetkov, A. G. Maryasov. 1992. Echo-induced EPR-spectra of nitroxides in organic glasses - model of orientational molecular motions near equilibrium position. *Chem.Phys.Lett.* 188:217-222.
- (69) Guex, N., M. C. Peitsch. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 18:2714-2723.
- (70) Seiter, M., V. Budker, J.-L. Du, G. R. Eaton, S. S. Eaton. 1998. Interspin distances determined by time domain EPR of spin-labeled high-spin methemoglobin. *Inorg. Chim. Acta.* 273:354-366.
- (71) Jeschke, G., Ye. Polyhach. 2007. Distance measurements on spin-labelled biomacromolecules by pulsed electron paramagnetic resonance. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9: 1895-1910.
- (72) Roth, M., A. Lewit-Bentley, H. Michel, J. Deisenhofer, R. Huber, D. Oesterhelt. 1989. Detergent structure in crystals of a bacterial photosynthetic reaction center. *Nature.* 340:659-662.
- (73) Dockter, C. 2005 Diploma thesis. University of Mainz.

3.1.1.2 Wasserzugänglichkeit ausgewählter Aminosäuren der N-terminalen Domäne im Vergleich zu membranständigen Aminosäuren des monomeren LHCII

Der Vergleich mit konventioneller CW-EPR-Technik zeigt das Potential von Puls-EPR-Experimenten zur Bestimmung der Wasserzugänglichkeit spinmarkierter Membranprotein-Domänen. Neben einer sehr guten Reproduzierbarkeit zeichnen sich die verschiedenen Puls-Methoden durch den vielfältigen Informationsgehalt bezüglich der Erfassung lokaler Unterschiede der Spinmarker-Umgebung im Umkreis verschiedener Skalenlängen aus. Unter den vorgestellten Methoden lieferte ESEEM-EPR durch die direkte Messung der Deuterium-Hyperfeinkopplung zwischen Spinmarker und Lösungsmittel die präzisesten Informationen bezüglich der nahen Spinmarkerumgebung.

Zusätzlich zu den publizierten Werten wurde durch A. Müller eine Reihe N-terminaler Mutanten des LHCII konstruiert, deren Wasserzugänglichkeit erst nach Abgabe der Diplomarbeit (Müller, 2008) vermessen werden konnten. Die Darstellung der Messergebnisse monomerer Proben (Abb. 3.3.1) soll an dieser Stelle zur Vervollständigung des Datensatzes nachgeholt und mit ESEEM-Daten des trimeren LHCII (Abb. 3.3.4) sowie mit kristallographischen Strukturdaten verglichen werden. Zur Verdeutlichung der Lage der betreffenden Aminosäuren sind in den Abb. 3.3.2 und 3.3.3 jeweils Seitenansichten eines Monomers des trimeren LHCII aus Standfuss *et al.* (2005) dargestellt, membranständige Proteindomänen sind hellgrau hervorgehoben, die Abgrenzungen der Membran als graue Balken. Zudem werden, wie in allen folgenden Strukturbildern dieses Kapitels, einzelne Aminosäuren-Seitenreste rot im Kalottenmodell gezeigt, die nativen Ser oder Val wurden jeweils durch Tyr ersetzt, da dies der Größe eines PROXYL-markierten Cys am Nächsten kommt (Jeschke *et al.*, 2007).

Die in Abb. 3.3.1 gezeigten Zugänglichkeitsparameter des monomeren LHCII entstammen teilweise der Publikation Volkov *et al.* (2009; Kap. III, 3.1.1.1) (Mutanten 52, 90, 123, 160 und 196), bei den restlichen Proben handelt es sich um unveröffentlichte Daten der N-terminale Monomere von A. Müller (Mutanten 3, 4, 10, 11, 12, 14, 22, 34 und 59).

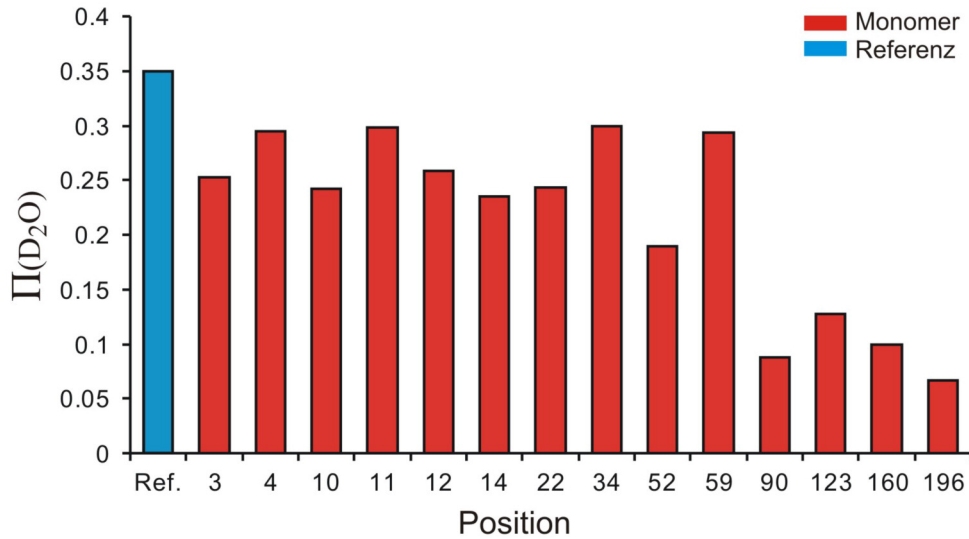


Abb. 3.3.1: ESEEM-Wasserzugänglichkeitsparameter $\pi(\text{D}_2\text{O})$ für verschiedene Aminosäuren des monomeren LHCII in LM-Mizellen. Die gemessenen Werte monomerer Mutanten sind rot dargestellt, die der wasserzugänglichen Referenz blau (PROXYL-IA in D_2O).

Wie in Volkov *et al.* (2009) beschrieben, sind die Positionen 90, 123, 160 und 196 rekombinanter Monomere in Detergenz-Mizellen wenig zugänglich für das wässrige Lösungsmittel. Dies geht aus dem geringen ESEEM-Wasserzugänglichkeitsparameter $\pi(\text{D}_2\text{O})$ zwischen 0,067 (Position 196) und 0,128 (Position 123) hervor und steht im Einklang mit den Kristallstrukturdaten nativer LHCII-Trimere (Abb. 3.3.2).

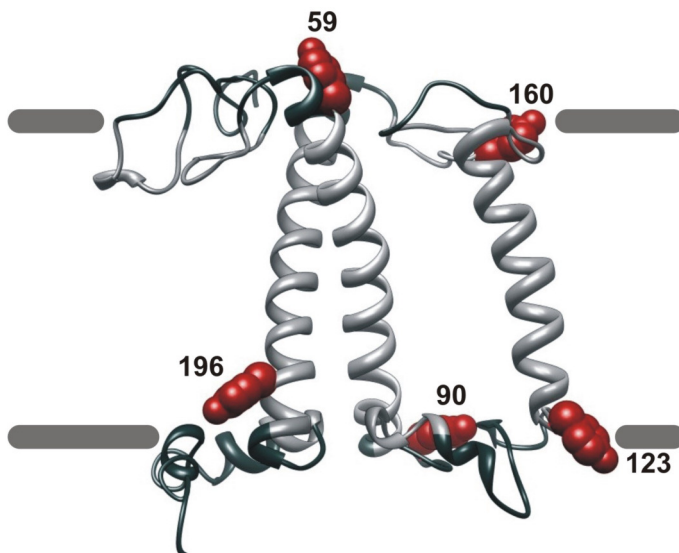


Abb. 3.3.2: Peptidrückgrat eines Monomers des trimeren LHCII (PDB-Eintrag 2BHW) in der Seitenansicht zur Verdeutlichung der Wasserzugänglichkeit einzelner Aminosäuren. Membranständige Domänen sind hellgrau dargestellt. Die Grenzflächen der Membran sind schematisch als graue Balken gezeigt (oben stromale Seite, unten lumenale Seite). Einzelne Aminosäuren sind rot im Kalottenmodell dargestellt, die jeweiligen Aminosäuren wurden durch Tyr ausgetauscht (Rotamer mit der höchsten Wahrscheinlichkeit). Die Abbildung wurde mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004).

Von allen spektroskopisch vermessenen Positionen liegt Aminosäure 196 (Abb. 3.3.2) am tiefsten innerhalb der hydrophoben Membranschicht und sollte den Kristalldaten zufolge keinerlei Kontakt zum Lösungsmittel haben. Die Aminosäuren 90, 123 und 160 sind dagegen alle im Bereich der Grenzfläche aus hydrophober Membran und wässrigem Lösungsmittel positioniert und können, je nach Ausrichtung des bevorzugten Rotamers, mehr oder weniger stark aus der Membranebene herausragen. Dies bestätigt sich für die Lage der einzelnen Aminosäuren des rekombinanten LHCII in Detergenz-Mizellen. Entsprechende ESEEM-Zugänglichkeitsparameter zeigen (Abb. 3.3.1), dass Position 196 praktisch Wasser-unzugänglich ist, von Position 90 über 160 zu 123 steigt die Zugänglichkeit leicht an, liegt aber stets signifikant niedriger als die aller anderen vermessenen Positionen.

Im Gegensatz dazu ragt Aminosäure 59 (Abb. 3.3.3 A), welche den Beginn der transmembranen Helix H1 bildet, nach Kristalldaten auf stromaler Seite weit aus der Membranebene heraus. Dies kann ebenfalls für rekombinanten LHCII in Detergenz-Mizellen bestätigt werden. Mit einem ESEEM-Zugänglichkeitsparameter von 0,293 kommt diese Mutante dem Referenzwert von 0,35, gemessen an Spinmarker in wässriger Lösung, recht nahe, was somit für einen außerordentlich guten Zugang zum Lösungsmittel spricht.

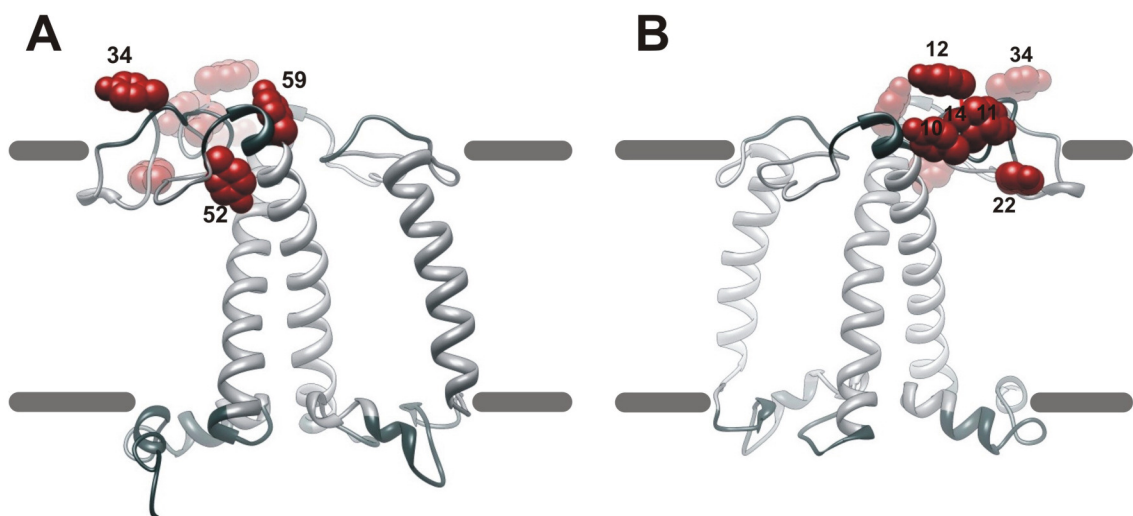


Abb. 3.3.3: Struktur des Peptidrückgrates eines Monomers des trimeren LHCII (PDB-Eintrag 2BHW) in der Seitenansicht (oben stromale Seite, unten lumenale Seite) zur Verdeutlichung der Wasserzugänglichkeit einzelner Aminosäuren der N-terminalen Domäne. (A) und (B) zeigen das gleiche Monomer von zwei Seiten. Membranständige Domänen sind hellgrau dargestellt. Die Grenzflächen der Membran sind schematisch als graue Balken gezeigt. Die Abbildung wurde mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004).

Die kristallographisch ermittelte Lage der N-terminalen Aminosäuren 59 bis 10 ist in Abb. 3.3.3 in verschiedenen Seitenansichten gezeigt (hier ist nur ein Monomer aus der Kristallstruktur des trimeren LHCII dargestellt). Während in der Kristallstruktur Helix 1

mit Aminosäure 59 weit außerhalb der Membranebene liegt, bildet die Peptidsequenz von Asp 54 bis Glu 31 eine alternierende Schleifenstruktur aus, die zunächst in die Membranebene eintaucht (Asp 54 bis Phe 40) und dann wieder heraussteht (Glu 39 bis Glu 31). Dies bestätigt sich erneut für rekombinanten LHCII. Während die Aminosäure 59 höchst wasserzugänglich ist, sinkt die Wasserzugänglichkeit zu Position 52 deutlich ab und steigt zu Aminosäure 34 wieder stark an (Abb. 3.3.1).

Eine ähnlich alternierende Wasserzugänglichkeit wäre nach Kristalldaten für die Aminosäuren 22 bis 10 zu erwarten (Abb. 3.3.3 B). Position 22, innerhalb der Schleife Glu 31 bis Arg 21 liegend, sollte eine geringe Zugänglichkeit besitzen, zu Position 12 sollten die Werte wieder signifikant steigen, danach wieder leicht fallen (Position 11 und 10). Dies scheint sich für rekombinante Monomere, solubilisiert in Detergenz-Mizellen, nicht exakt zu bestätigen (Abb. 3.3.1). Im Vergleich zu Position 34 nimmt in ESEEM-Messungen die Zugänglichkeit der Position 22 zwar ab, aber weniger deutlich als erwartet. Der Anstieg der Werte bis Aminosäure 12 fällt schwächer aus als vorhergesagt, dafür besitzt Position 11 eine höhere Zugänglichkeit zum Lösungsmittel als erwartet. Im Unterschied zum kristallinen, trimeren LHCII scheint diese N-terminale Schleifenregion in rekombinanten Monomeren also weniger tief in die hydrophobe Grenzschicht einzutauchen. Die in der Kristallstruktur nicht erfassten Aminosäuren 3 und 4 liegen ebenfalls exponiert zum Lösungsmittel, was im Fall der von Müller hergestellten Probe 3 nochmals die Reproduzierbarkeit der Methode bestätigt (Volkov *et al.*, 2009).

3.1.1.3 Vergleich der N-terminalen Domäne des monomeren und trimeren LHCII mittels ESEEM-EPR

Im Gegensatz zu allen kristallographischen Ansätzen zur Strukturierung des LHCII ist die Lage der ersten 10 Aminosäuren des trimeren LHCII mittels ESEEM-EPR erfassbar (Abb. 3.3.4, schwarze Balken). Die einzeln markierten Positionen 3, 4, 7 und 9 besitzen alle eine ähnlich exponierte Lage zum Lösungsmittel, die in Position 4 im Vergleich zu monomerem LHCII deutlich geringer ist. Im Unterschied zu den zuvor besprochenen ESEEM-Daten des monomeren LHCII, zeigen die Werte rekombinanter Trimere der Positionen 11 bis 34 exakt die in der Kristallstruktur vorhergesagten Lagen zum wässrigen Lösungsmittel (Abb. 3.3.3 B sowie Abb. 3.3.4). Hier steigt, wie in der Kristallstruktur vorhergesagt, die Zugänglichkeit von Position 11 zu 12 leicht an, nimmt dann wieder konstant bis Position 22 durch Eintauchen der Schleifenregion in die Mizelle ab, um erneut bis Position 34 anzusteigen.

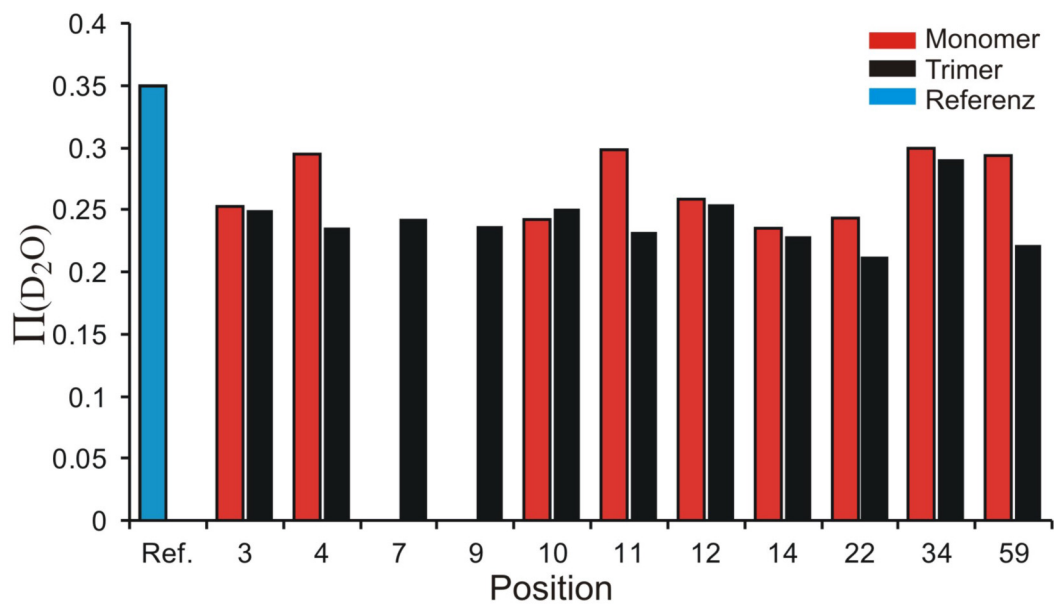


Abb. 3.3.4: ESEEM-Wasserzugänglichkeitsparameter $\pi(D_2O)$ für verschiedene Aminosäuren des monomeren LHCII (rote Balken) und trimeren LHCII (schwarze Balken), jeweils in LM-Mizellen. Die Werte der wasserzugänglichen Referenz (blauer Balken, PROXYL-IA in D_2O) entstammen der Publikation Volkov *et al.* (2009), die Werte aller dargestellten N-terminalen Mutanten wurden in Proben von A. Müller ermittelt. Trimerdaten sind der Diplomarbeit (Müller, 2008) entnommen.

Im Vergleich zu rekombinanten Monomeren zeigen die entsprechenden Trimere der Position 59 eine deutliche Verringerung der Wasserzugänglichkeit und widersprechen damit auch den Daten der Kristallstruktur. Da eine signifikante Strukturänderung innerhalb einer rigiden Transmembranhelix (H1) nicht zu erwarten ist, soll dieser Sonderfall ausnahmsweise gleich diskutiert werden.

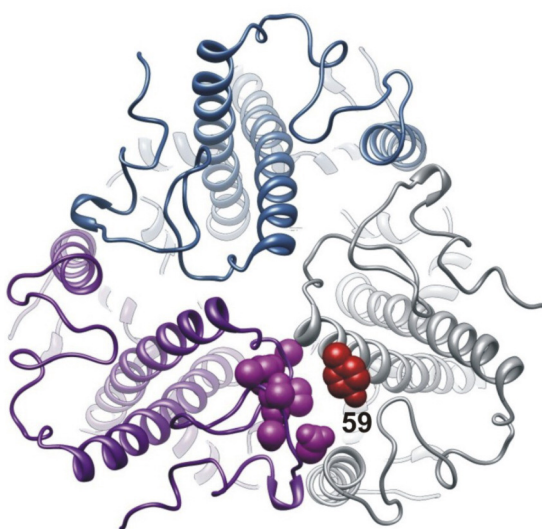


Abb. 3.3.5: Struktur des Peptidrückgrates des nativen, trimeren LHCII (PDB-Eintrag 2BHW) in der stromalen Aufsicht zur Verdeutlichung der Wasserzugänglichkeit der Aminosäure 59. Die einzelnen Monomere des Trimers sind farblich voneinander abgegrenzt, die betreffende Position 59 ist rot im Kalottenmodell dargestellt, das entsprechende Monomer ist grau. Reste der Aminosäuren des gegenüberliegenden Monomers (lila), die in räumlicher Nähe zur Position 59 liegen sind ebenfalls im Kalottenmodell dargestellt (Gly 30 bis Tyr 34, Thr 48 bis Ser 52). Die Abbildung wurde mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004).

Wahrscheinlicher ist hier die Verringerung der Zugänglichkeit des Spinmarkers 59 (Abb. 3.3.5, rot im grauen Monomer) durch die Anlagerung des gegenüberliegenden

Monomers (lila) in trimeren Komplexen. Die Aminosäuren Glycin (Gly) 30 bis Tyr 34 und Thr 48 bis Ser 52 könnten das PROXYL seitlich zumindest teilweise gegen das wässrige Lösungsmittel abschirmen.

Für die Positionen 11 und 22, welche ebenfalls deutliche Unterschiede in den ESEEM-Werten von Monomeren und Trimeren aufweisen, hat solch eine Argumentation keine Gültigkeit, da beide Positionen nicht in der Grenzfläche der Monomere, sondern in der Peripherie des Trimers zu liegen kommen, was später im Zusammenhang mit entsprechenden DEER-Daten diskutiert werden soll. Ein Vergleich monomerer Proben mit Trimeren der Positionen 7, 9 und 52 war bisher nicht möglich. Letzterer Mutante fehlt die Fähigkeit Trimere auszubilden (Storf, 2001). Die beiden ersteren Proben werden derzeit durch C. Dietz präpariert.

3.1.2 Detektion der Proteinstruktur mittels DEER-Abstandsmessungen

Im Gegensatz zur vorher beschriebenen ESEEM-Spektroskopie, liefert DEER-EPR eher globale Information zur Struktur von Membranproteinen. Die Messung intramolekularer Abstände zwischen den Nitroxiden eingeführter Spinmarker-Pärchen im Bereich von 2-8 nm (Pannier *et al.*, 2004; Jeschke *et al.*, 2007) eignet sich zur Erstellung von „Abstandskarten“ und damit sowohl zur Aufklärung unbekannter Proteinstrukturen (Hilger *et al.*, 2007; Jao *et al.*, 2008) als auch zur Erfassung von Proteindynamik (Jeschke *et al.*, 2005; Altenbach *et al.*, 2008). Auf den Ergebnissen von Jeschke *et al.* (2005) aufbauend, wurden die DEER-Experimente zur Klärung von Struktur und Dynamik des monomeren und trimeren LHCII in Lösung fortgeführt. Ein Teil der ermittelten Abstandsdaten wurde zusätzlich mit theoretischen Abstandsverteilungen einer Rotamer Datenbank-basierten Simulation verglichen. In diesem Zusammenhang sei nochmals explizit erwähnt, dass sämtliche in dieser Dissertationsschrift gezeigten theoretischen Abstandsverteilungen moderat von den in Volkov (2008) dargestellten Daten abweichen. Dies liegt in der zwischenzeitlichen Optimierung des entsprechenden Simulationsprogramms begründet, welches genauere Vorhersagen zur wahrscheinlichen Lage von PROXYL-Markern in der Kristallstruktur nach Standfuss *et al.* (2005) zulässt (Polyhach, unveröffentlichte Ergebnisse).

An dieser Stelle soll vorausgreifend erwähnt werden, dass ein Teil der aufgereinigten, monomeren LHCII-Proben unerwartet lange DEER-Abstände zeigte, die nicht mit den simulierten Abstandsdaten vereinbar waren. Die Auswertung der primären DEER-Daten durch Prof. Dr. G. Jeschke und Dr. A. Volkov zeigte, dass Signale solcher Proben einen Anteil enthielten, der den Signalen von Trimeren der beiden entsprechenden Einzelmutanten ähnlich war, wobei dieser Anteil eine deutlich geringere Modulationstiefe aufwies als in Trimerproben. Durch Anwendung einer experimentellen Hintergrundkorrektur konnten solche Nebenmaxima deutlich reduziert werden (Volkov, 2008), die Hauptmaxima wurden dagegen nicht beeinflusst. In dieser Prozedur können die realen Abstände von den Artefaktabständen unterschieden werden, da letztere

auch in einer Mischung von markierten Einzelmutanten existieren, wobei man annehmen muss, dass der Trimerisierungsgrad der Doppelmutanten-Probe und der Einzelmutanten-Probe ähnlich ist (kleine Unterschiede kann die Modulationstiefenskalierung ausgleichen). Nach Vermessung beider Proben hat man einmal das gewünschte Signal zusammen mit Artefaktsignal und einmal nur das Artefaktsignal und kann durch Differenzbildung das gewünschte Signal sauber erhalten. Wegen der nicht ganz reproduzierbaren Probenpräparation ist die Mathematik etwas komplizierter als einfache Subtraktion und auch mit kompensierender Mathematik verschwindet das Artefaktsignal nicht vollständig, aber weitgehend (G. Jeschke, schriftliche Mitteilung). Dieses Ergebnis muss als starker Hinweis auf eine Verunreinigung monomerer Proben mit trimerisiertem LHCII gewertet werden, was später erneut aufgegriffen werden soll.

3.1.2.1 Intramolekulare Abstandsmessungen in kristallographisch erfassten Domänen des monomeren LHCII

Eine erste Abstandsmessreihe wurde an doppelt spinmarkierten Monomeren des rekombinanten LHCII durchgeführt, die markierten Domänen waren hierbei jeweils kristallographisch erfasst. Diese Messungen dienten insbesondere der Verifizierung der Struktur des rekombinanten LHCII durch Vergleich mit den bekannten Abstandsdaten des kristallinen LHCII (Standfuss *et al.*, 2005), die Zuverlässigkeit der Methode war bereits in früheren Versuchsreihen bestätigt worden (Jeschke *et al.*, 2005). Allgemein kann gesagt werden, dass DEER-Abstandsmessungen aufgereinigter Monomere des rekombinanten LHCII in Datensätzen mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis und ausreichender Modulationstiefe resultierten, beispielsweise ersichtlich in den Hintergrund-korrigierten Originaldaten in Abb. 3.3.6 (B). Die dargestellten Primärdaten der verschiedenen Doppelmutanten waren zudem wie erwartet signifikant unterschiedlich zueinander.

Wie zuvor bereits beschrieben (Kap. I) zeigt Mutante 106/160, welche den Abstand zwischen stromaler und lumenaler Schleife definiert (Abb. 3.3.6, 1A), nach Tichonov-Regularisierung eine recht breite Abstandsverteilung (schwarze Linie in 1C). Detektierte Interspin-Distanzen liegen vorwiegend zwischen 3,5 und 5,5 nm mit Maxima bei 4,1 und 4,9 nm. Die kürzeren Abstände stimmen sehr gut mit der C_{α} -Distanz der entsprechenden Aminosäuren des kristallinen Trimers überein (grauer Balken bei 3,9 nm). Längere Abstände dagegen sind nahezu identisch mit einer theoretischen Abstandsverteilung (graue Linie in 1C; Polyhach, unveröffentlicht), welche anhand der Rotamer-Datenbank von PROXYL-Markern, basierend auf der Kristallstruktur nach Standfuss *et al.* (2005), simuliert wurde. Lange DEER-Abstände repräsentieren hier also Nitroxidmarker, die voneinander weggerichtet sind, was zu einer Verlängerung der C_{α} -Distanz von bis zu 1,5 nm führt.

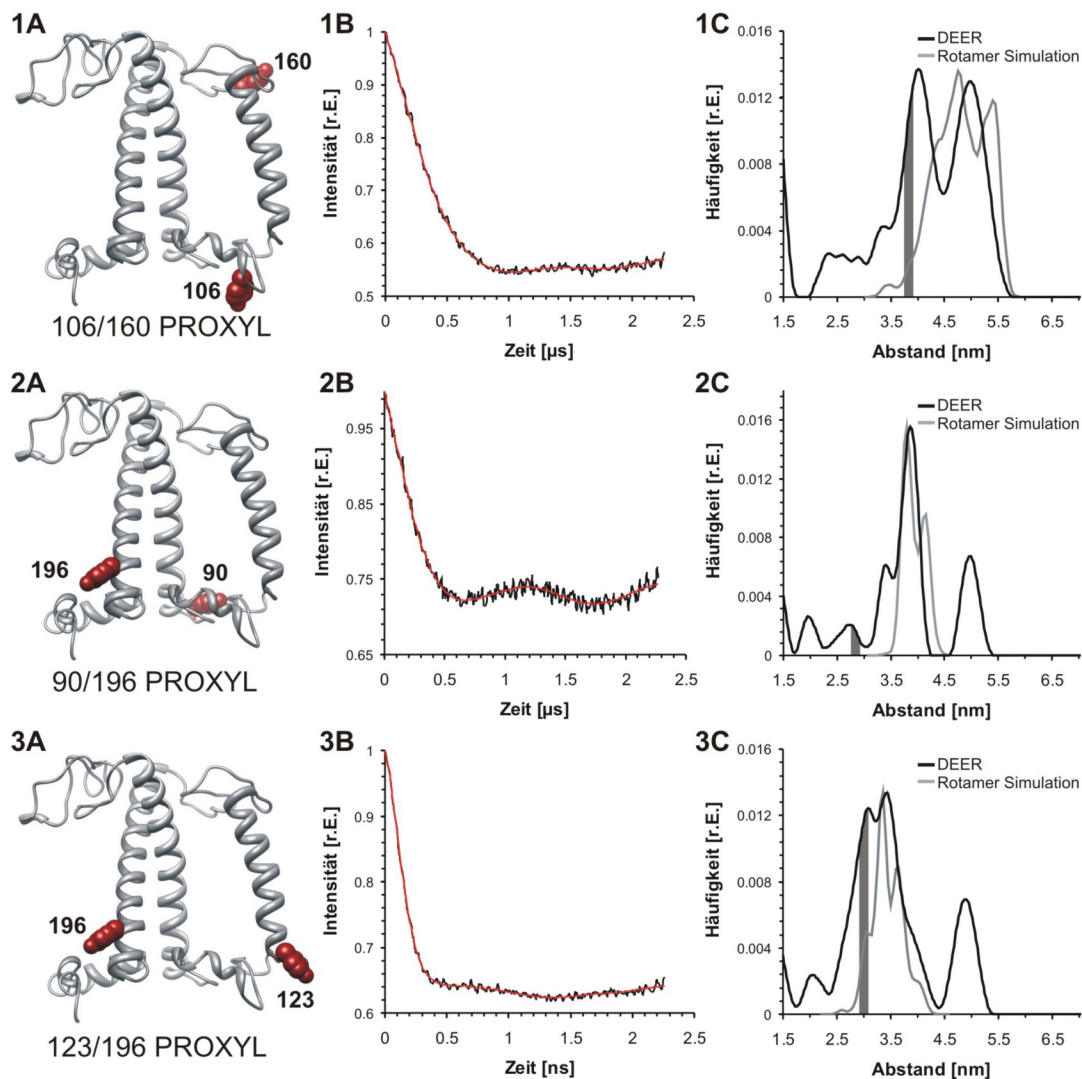


Abb. 3.3.6: DEER-Abstandsmessungen zwischen kristallographisch erfassten Domänen des LHCII. Doppelt PROXYL-markierte LHCII-Mutanten 106/160 (**1**), 90/196 (**2**) und 123/196 (**3**) wurden mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet, via UZ aufgereinigt und spektroskopisch charakterisiert. Funktionale Monomere in LM-Mizellen wurden abstandsvermessen. **(A)** zeigt jeweils das Proteinrückgrat eines Monomers des nativen, trimeren LHCII in der Seitenansicht (PDB-Eintrag 2BHW). Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004). **(B)** zeigt die Hintergrund-korrigierten Original-DEER-Daten (schwarze Linie) mit bestem Fit (rote Linie). In **(C)** sind DEER-Abstandsverteilungen dargestellt (schwarze Linie), errechnet aus den Original-Daten mittels Tichonov-Regularisierung. Die graue Linie zeigt die errechnete Abstandsverteilung einer Rotamer Datenbank-basierten Simulation, der graue Balken entspricht dem Abstand der C_{α} -Atome der markierten Aminosäuren in der Kristallstruktur des trimeren LHCII.

Doppelmutante 90/196, markiert an den luminalen Seiten der transmembranen Helices H1 (Abb. 3.3.6, 2A, Position 90) und H4 (Position 196), zeigt eine deutlich schmalere Abstandsverteilung mit einem Maximum bei 3,85 nm (schwarze Linie in 2A). Zudem können zu einem geringen Anteil kurze Abstände unter 3 nm sowie ein Nebenmaximum mit Abständen um 5 nm detektiert werden. In dieser Mutante weicht der Großteil der gemessenen DEER-Abstände von der Distanz der entsprechenden C_{α} -

Atome der Kristallstruktur ab (2,85 nm, grauer Balken in 2C). Andererseits besteht eine hohe Übereinstimmung der DEER-Daten zur theoretischen Abstandsverteilung (graue Linie in 2C). In diesen Markierungspositionen scheinen durch die Lage der gebundenen Pigmente (Chl 3, 4 und 12 in Position 196) bzw. der umgebenden Aminosäuren-Seitenreste solche PROXYL-Rotamere bevorzugt zu sein, die voneinander weggerichtet sind. Das Auftreten sehr langer Abstände von 4,5 bis 5,5 nm kann hierdurch nicht erklärt werden, da diese durchschnittlich über 2 nm von der Distanz der entsprechenden C_{α} -Atome abweichen.

Unterschiedlich zu den vorherigen LHCII-Proben stimmen in Mutante 123/196 die Distanz der C_{α} -Atome der Kristallstruktur (2,96 nm; grauer Balken in 3C) und die Abstände theoretisch möglicher Rotamere (2,5 bis 4 nm; graue Linie in 3C) gut überein. Ermittelte DEER-Abstände (schwarze Linie in 3C) passen sehr gut zu der Vorhersage und sind mit vorherrschenden Distanzen zwischen 2,7 und 4 nm etwas breiter verteilt als in Mutante 90/196. Wie vorher bei Mutante 90/196 gesehen (2C), ist auch in 123/196 ein zweites Maximum detektierbar. Mit Abständen um 4,9 nm ähnelt es dem Nebenmaximum der Mutante 90/196 und ist nicht mit möglichen Distanzen der PROXYL-Rotamere in der Kristallstruktur vereinbar.

Während die in Abb. 3.3.6 dargestellten DEER-Abstände mit Ausnahme einiger unerwarteter Nebenmaxima in guter Übereinstimmung zu theoretischen Abstandsverteilungen sind, weichen DEER-Daten der Mutanten 59/90 sowie 90/123 (Abb. 3.3.7) leicht von der Vorhersage ab. Für Mutante 59/90, an stromaler und lumenaler Seite der transmembranen Helix H1 markiert (1A), liegt die C_{α} -Distanz der markierten Aminosäuren in der Kristallstruktur bei 4,45 nm (grauer Balken in Abb. 3.3.7, 1C). Die Simulation sagt eine theoretische Abstandsverteilung mit einem Maximum bei 5,4 nm vorher (graue Linie in 1C), gemessene DEER-Abstände sind durchschnittlich etwas kürzer und liegen zwischen 4,3 und 5,5 nm (schwarze Linie in 1C). Zudem treten zu geringem Anteil kurze Abstände zwischen 2 und 4 nm auf.

Auch in Mutante 90/123 sind Vorhersage und Messergebnis nicht vollständig identisch. Während die Rotamer-Simulation eine recht hohe Bewegungsfreiheit der PROXYL-Marker mit Abständen zwischen 1,5 und 4 nm und einem Maximum bei 2,7 nm vorhersagt (graue Linie in Abb. 3.3.7, 2C), sind DEER-Abstände zwischen 1,8 und 4,5 nm recht breit verteilt, besitzen jedoch ein signifikantes Maximum bei 3,45 nm (schwarze Linie in 2C). Genau wie zuvor bei Mutante 123/196 (Abb. 3.3.6, 3C) tritt bei 90/123 ein Nebenmaximum mit Abständen um 4,9 nm auf, welches nicht mit möglichen PROXYL-Rotameren in der Kristallstruktur vereinbar ist.

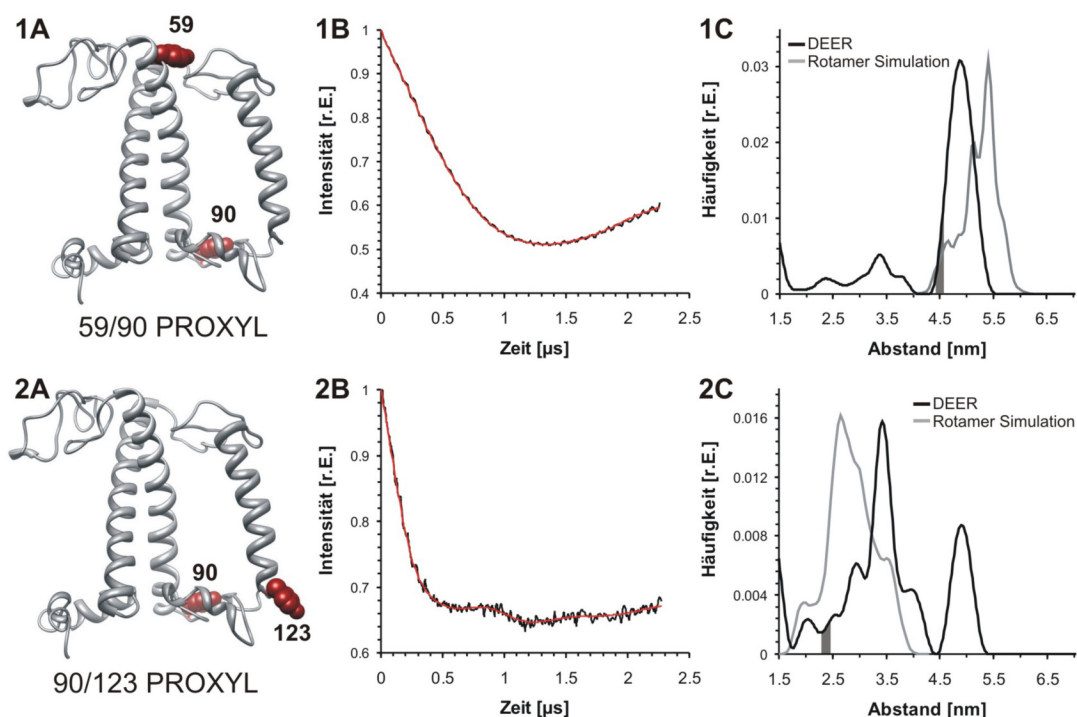


Abb. 3.3.7: DEER-Abstandsmessungen zwischen kristallographisch aufgelösten Domänen des LHCII. Doppelt PROXYL-markierte LHCII-Mutanten 59/90 (1) und 90/123 (2) wurden mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet, via UZ aufgereinigt und spektroskopisch charakterisiert. Funktionale Monomere in LM-Mizellen wurden abstandsvermessen. (A) zeigt jeweils das Proteinrückgrat eines Monomers des nativen, trimeren LHCII in der Seitenansicht (PDB-Eintrag 2BHW). Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004). (B) zeigt die Hintergrund-korrigierten Original-DEER-Daten (schwarze Linie) mit bestem Fit (rote Linie). In (C) sind DEER-Abstandsverteilungen dargestellt (schwarze Linie), errechnet aus den Original-Daten mittels Tichonov-Regularisierung. Die graue Linie zeigt die errechnete Abstandsverteilung einer Rotamer Datenbank-basierten Simulation, der graue Balken entspricht dem Abstand der C $_{\alpha}$ -Atome der markierten Aminosäuren in der Kristallstruktur des trimeren LHCII.

3.1.2.2 Abstandsmessungen in kristallographisch erfassten Domänen des LHCII in Abhängigkeit der Mizellen-Zusammensetzung

Neben seiner Funktion als Lichtsammler spielt LHCII eine entscheidende Rolle im Schutz des Photosynthese-Apparates unter Lichtstress-Bedingungen. Verschiedene Versuchsansätze legen nahe, dass bestimmte Bereiche der lumenalen Schleifendomäne, welche in Kontakt zum Lösungsmittel des Thylakoidlumens stehen, auf wechselnde pH-Bedingungen reagieren und dabei einer Strukturveränderung unterliegen. In Verdacht stehen sowohl verschiedene saure Aminosäuren als auch das antiparallele β -Faltblatt der lumenalen Schleife (Liu *et al.* 2008; Yang *et al.*, 2008). Auffällig an solchen Mutationsexperimenten ist stets eine Veränderung der Position lumenal gebundener Pigmente, erkennbar an einer signifikant veränderten CD-Absorption. Ähnliche CD-spektroskopische Effekte können auch in Abhängigkeit der Mizellen-Zusammensetzung detektiert werden. Insbesondere der Wechsel von LM- zu α -DM

(Georgakopoulou *et al.*, 2007) oder TX-Mizellen (Boggasch, 2006) resultiert in einer deutlichen Änderung der Soret-Absorption rekombinanter Trimere.

Auf den Ergebnissen der zuvor durchgeführten DEER-Messungen an LM-solubilisierten Monomeren aufbauend, sollten in dieser Versuchsreihe monomere und trimere Mutanten des rekombinanten LHCII vergleichend in TX-Mizellen vermessen werden (Abb. 3.3.8). Hierzu sei erwähnt, dass bisher lediglich eine relevante Trimerprobe (Position 123) produziert werden konnte, andere Proben aber in Bearbeitung sind (Trimere 90 und 106, C. Dietz).

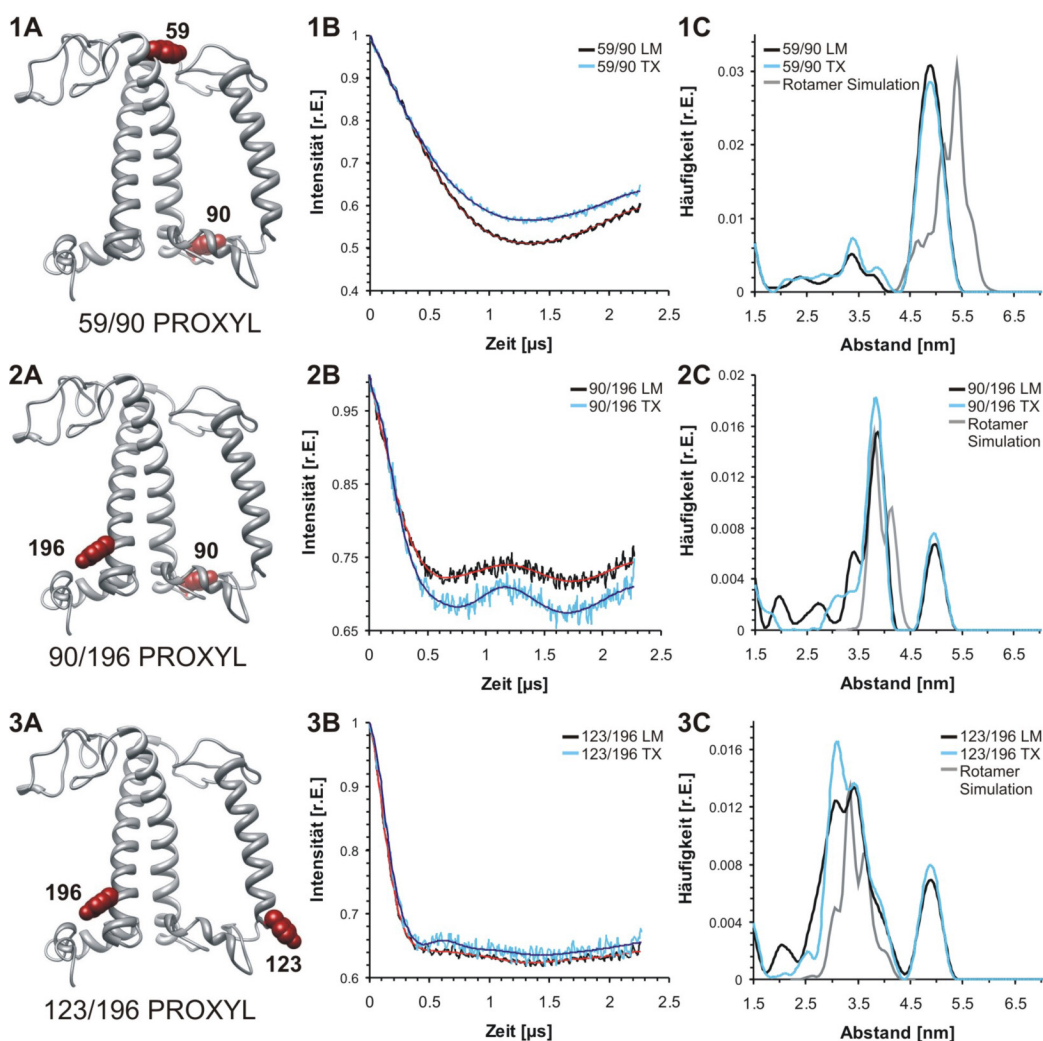


Abb. 3.3.8: DEER-Abstandsmessungen zwischen kristallographisch aufgelösten Domänen des LHCII in Abhängigkeit der Mizellen-Zusammensetzung. Doppelt PROXYL-markierte LHCII-Mutanten 59/90 (1), 90/196 (2) und 123/196 (3) wurden mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet, via UZ in LM- oder TX-haltigen Saccharose-Dichte-gradienten aufgereinigt und abstandsvermessen. (A) zeigt jeweils das Proteinrückgrat eines Monomers des nativen, trimeren LHCII in der Seitenansicht (PDB-Eintrag 2BHW). Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004). (B) zeigt die Hintergrund-korrigierten Original-DEER-Daten [schwarze Linie (LM), hellblaue Linie (TX)] mit jeweils bestem Fit (rote bzw. blaue Linie). In (C) sind DEER-Abstandsverteilungen dargestellt [schwarze Linie (LM), hellblaue Linie (TX)], errechnet aus den Original-Daten mittels Tichonov-Regularisierung. Die graue Linie zeigt die errechnete Abstandsverteilung einer Rotamer Datenbank-basierten Simulation.

Die entsprechenden Hintergrund-korrigierten DEER-Originaldaten (B) und daraus resultierende Abstandsverteilungen (C) der LHCII-Proben in unterschiedlichen Detergenz-Mizellen sind in den Abb. 3.3.8 und 3.3.9 dargestellt. Während bei Mutante 59/90 (Abb. 3.3.8, 1C) die Abstandsverteilungen in LM und TX praktisch identisch sind, zeigen andere Mutanten leichte bis signifikante Änderungen der DEER-Signale in Abhängigkeit der Mizellen-Zusammensetzung. Die Verteilung der DEER-Abstände der Mutanten 90/196 (Abb. 3.3.8, 2C) und 123/196 (Abb. 3.3.8, 3C) ist in TX-Mizellen jeweils etwas schmaler als zuvor in LM. Wie aus Abb. 3.3.8 ersichtlich ist, sind in beiden Mutanten kurze Abstände in LM-Mizellen etwas geringer ausgeprägt, insgesamt sind die Abstandsverteilungen in unterschiedlichen Detergentien einander aber recht ähnlich.

Etwas deutlicher fallen die Unterschiede in den Mutanten 90/123 (Abb. 3.3.9, 1C) und 90/106 (2C; Präparation Dietz, 2008) aus. Während 90/123 in TX-Mizellen eine signifikant breitere Abstandsverteilungen mit deutlicher Zunahme kurzer und langer Abstände zeigt, tritt bei Mutante 90/106 der umgekehrte Fall ein. Hier ist in TX-Mizellen eine signifikant schmalere Abstandsverteilung zu sehen als in LM. Unabhängig von der Mizellen-Zusammensetzung liegen bei dieser Mutante die gemessenen DEER-Abstände innerhalb der theoretisch vorhergesagten Verteilung, zeigen aber jeweils leicht unterschiedliche Maxima. Während die Rotamer-Simulation Spin-Distanzen von vorwiegend 2 bis 3 nm vorhersagt, liegt das Maximum in LM bei 2,6 und in TX bei 2,8 nm.

Die signifikantesten Unterschiede werden in den Abstandsverteilungen der trimeren Mutante 123 deutlich (Abb. 3.3.9, 3C). Während die Verteilung der Abstände in LM sehr breit ist, zeigt die TX-Probe die schmalste Abstandsverteilung aller bisher gemessenen Proben. Obwohl die Unsicherheit in der Breite der Verteilung bei Beobachtung von weniger als einer vollen Oszillation, wie hier der Fall, recht groß ist, wird doch bereits in den Zeitbereichsdaten ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Proben sichtbar. Die durchschnittlichen DEER-Abstände beider Proben sind zudem kürzer als die anhand der Kristalldaten simulierten Abstände. Weiterhin ist auffällig, dass beide trimere Proben im Gegenteil zu monomeren Proben keine Nebenmaxima zeigen, und dass die Abstandsdaten der Trimere sehr gut mit den vorher detektierten langen Abständen um 4,9 nm der monomeren Doppelmutanten 90/123 und 123/196 übereinstimmen. Letzterer Punkt soll später im Zusammenhang mit dem Verdacht auf eine Verunreinigung der monomeren Proben mit trimerem LHCII diskutiert werden.

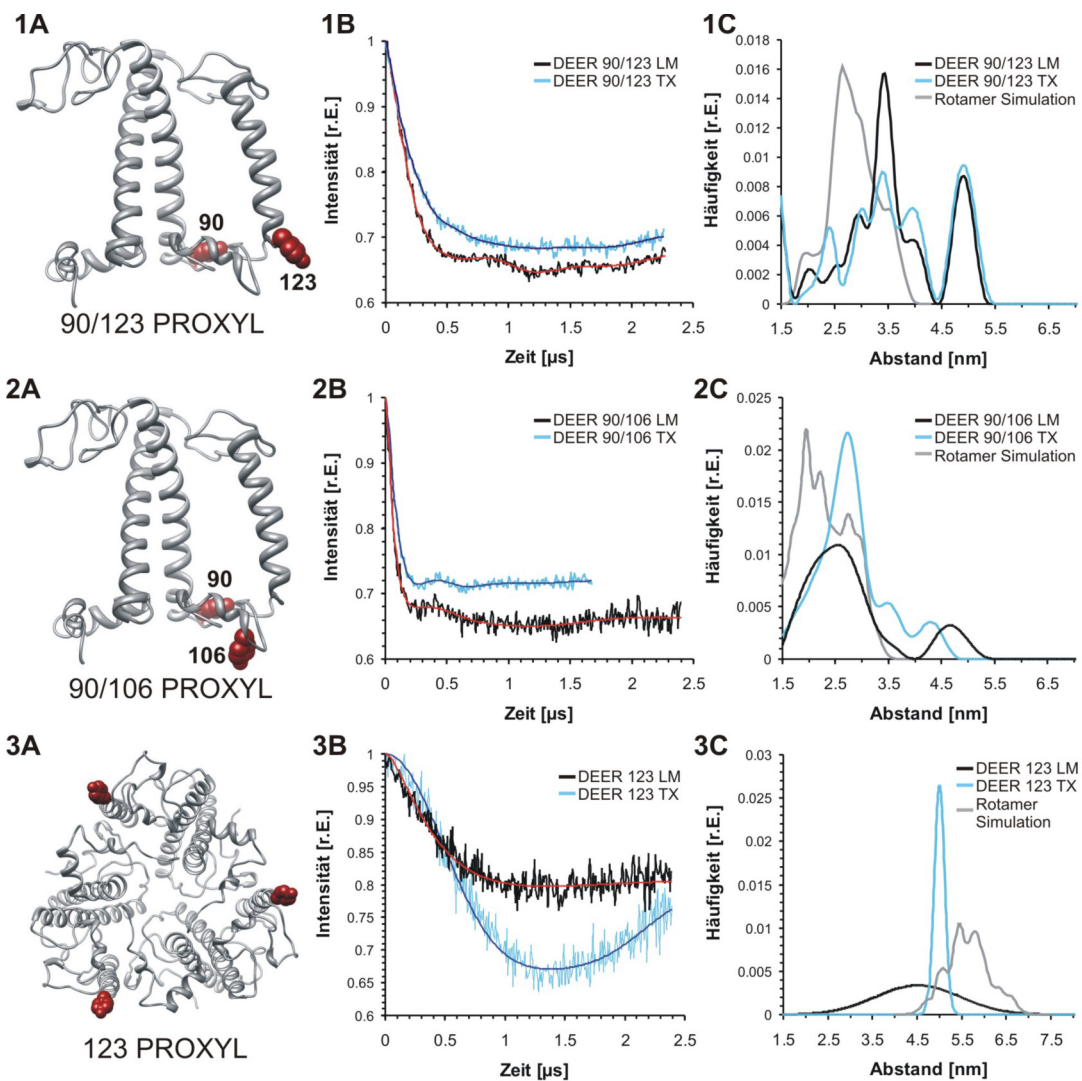


Abb. 3.3.9: DEER-Abstandsmessungen in monomerem und trimerem LHCII in Abhängigkeit der Mizellen-Zusammensetzung. PROXYL-markierte Monomere 90/123 (**1**), 90/106 (**2**, Präparation Dietz, 2008) sowie Trimere 123 (**3**; Präparation Dietz, 2008) wurden mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet, via UZ in LM- oder TX-haltigen Saccharose-Dichtegradienten aufgereinigt und abstandsvermessen. (**A**) zeigt jeweils das Proteinrückgrat des monomeren LHCII in der Seitenansicht (1, 2) bzw. des trimeren LHCII in lumenaler Aufsicht (3, PDB-Eintrag 2BHW). Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004). (**B**) zeigt die Hintergrund-korrigierten Original-DEER-Daten [schwarze Linie (LM), hellblaue Linie (TX)] mit jeweils bestem Fit (rote bzw. blaue Linie). In (**C**) sind DEER-Abstandsverteilungen dargestellt [schwarze Linie (LM), hellblaue Linie (TX)], errechnet aus den Original-Daten mittels Tichonov-Regularisierung. Die graue Linie zeigt die errechnete Abstandsverteilung einer Rotamer Datenbank-basierten Simulation.

3.1.2.3 DEER-spektroskopische Untersuchung der Konformation des N-Terminus in monomerem LHCII

Der N-Terminus des trimeren LHCII ist die einzige Domäne, die kristallographisch nicht komplett erfasst werden konnte (Standfuss *et al.*, 2005). DEER-spektroskopische Untersuchungen an N-terminalen Mutanten des monomeren und trimeren LHCII durch Jeschke *et al.* (2005) offenbarten bereits die flexible Struktur dieser Domäne. Um da-

malige Ergebnisse zu stützen und die Modellierung der Domäne zu verbessern, wurde durch den Diplomanden A. Müller (2008) ein „Cys-walk“ durch den kompletten N-Terminus durchgeführt, entsprechende spinmarkierte Monomere und Trimere des LHCII wurden abstandsvermessen. Die DEER-spektroskopischen Ergebnisse sollen an dieser Stelle übersichtshalber erneut dargestellt werden. Zudem war geplant, die ermittelten DEER-Daten mit theoretischen Abstandsverteilungen der Rotamer-Datenbank zu vergleichen. Dies war aus zeitlichen Gründen nicht mehr umsetzbar, soll aber zeitnah nachgeholt und publiziert werden. Es sei außerdem darauf hingewiesen, dass aus Gründen der Konsistenz die Abstände aus Kristalldaten nicht wie in Müller (2008) zwischen den Sufhydryl-Schwefelatomen der markierten Aminosäuren gemessen wurden, sondern zwischen den C_{α} -Atomen. Um die zuvor angedeutete Verunreinigung der monomeren Proben mit LHCII-Trimeren im Nachhinein überprüfen zu können, sind in den folgenden Abbildungen zusätzlich DEER-Abstandsverteilungen entsprechender Trimerproben als blaue Linien dargestellt. Wie weiter unten diskutiert, werden solche Trimer-Messungen auch für die bisher dargestellten Abstandsmessungen (falls entsprechende Trimerdaten vorhanden) berücksichtigt werden müssen.

In Abb. 3.3.10 sind die DEER-Daten der spinmarkierten Monomere 29/59 und 14/29 sowie der entsprechenden Trimere 29 und 59 bzw. 14 und 29 gezeigt. Beiden monomeren Mutanten ist gemein, dass C_{α} -Abstände der Kristallstruktur (graue Balken in 1C und 2C) mit 2,3 nm bzw. 1,75 nm sehr kurz sind, gemessene DEER-Abstände dagegen deutlich länger und jeweils breit verteilt sind (schwarze Linien in C). Die Hauptmaxima der DEER-Abstandsverteilung beider Proben liegen um 3,4 bzw. 2,9 nm. Zudem ist auffällig, dass in beiden Proben Nebenmaxima um 4,7 nm (1C) bzw. 4,6 nm (2C) auftreten, sowie dass jeweils ein Anteil kurzer Abstände um die 2,3 nm zu detektieren ist.

In der monomeren Mutante 29/59 ist die Herkunft der kürzeren und mittleren Abstände mit Rotamerpositionen der Nitroxide vereinbar. Kurze Abstände entsprechen gleichgerichteten, mittlere Abstände voneinander abgewandten Spinmarkern. Der beträchtliche Anteil langer Abstände ist hierdurch nicht erklärbar. Auffällig ist jedoch, dass die entsprechenden Trimerproben 29 und 59 in DEER-Messungen kurze Abstände (Position 59, dunkelblaue Linie in 1C) bzw. lange Abstände besitzen (Position 29, hellblaue Linie in 1C), wobei letztere aber durchschnittlich länger sind als die des monomeren Nebenmaximums. Die Situation in Mutante 14/29 ist annähernd gleich, hier sind die Nebenmaxima allerdings schwächer ausgeprägt als in Mutante 29/59. Kurze und mittlere Abstände sind ebenfalls mit möglichen Rotamerpositionen erklärbar, das Nebenmaximum 4,6 nm wiederum nicht. Mögliche Trimerkombinationen zeigen hier nur lange Abstände zwischen 3 und 6 nm mit Maxima bei 4,7 nm (Trimer 14) bzw. 5,4 nm (Trimer 29), was dem Nebenmaximum der Monomere recht ähnlich ist.

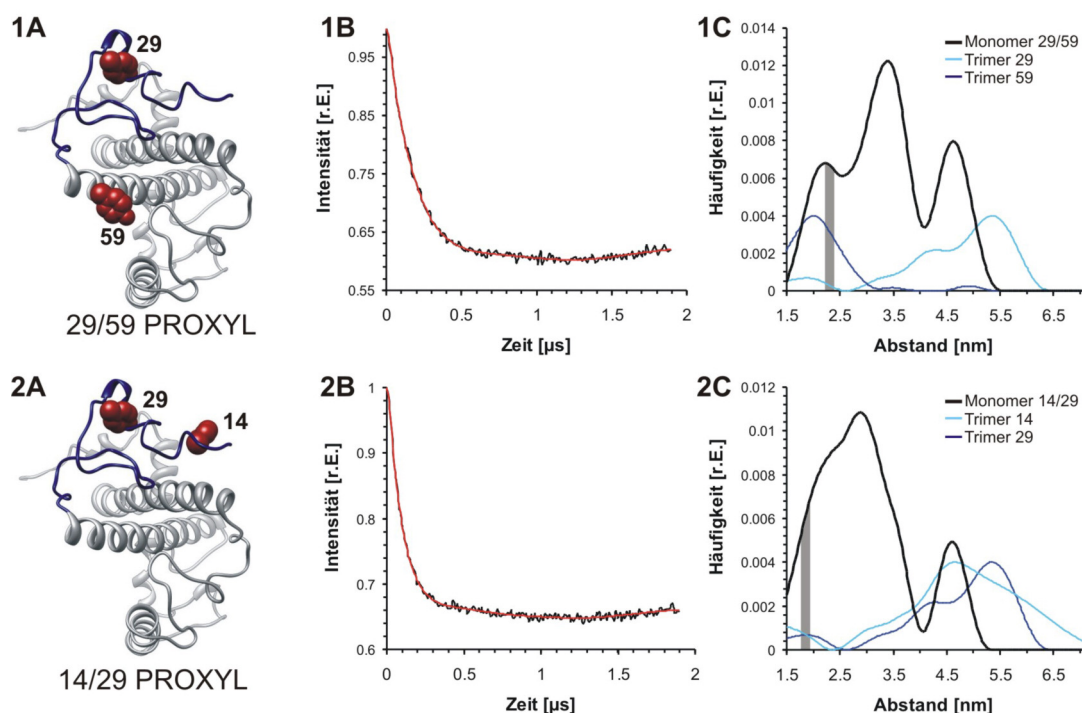


Abb. 3.3.10: DEER-Abstandsmessungen innerhalb der N-terminalen Domäne des LHCII. PROXYL-markierte Monomere 29/59 (**1**) und 14/29 (**2**), sowie entsprechende Trimere 14, 29 und 59 wurden mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet, gegebenenfalls trimerisiert, via UZ aufgereinigt und abstandsvermessen. Die Präparation in LM-Mizellen erfolgte durch Müller (2008). (**A**) zeigt jeweils das Proteinrückgrat des monomeren LHCII in der stromalen Aufsicht, die N-terminale Domäne ist blau dargestellt (PDB-Eintrag 2BHW). Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004). (**B**) zeigt die Hintergrund-korrigierten Original-DEER-Daten (schwarze Linie) mit bestem Fit (rote Linie). In (**C**) sind DEER-Abstandsverteilungen dargestellt (Monomere schwarz, Trimere hell- bzw. dunkelblau), errechnet aus den Original-Daten mittels Tichonov-Regularisierung. Der graue Balken entspricht dem Abstand der C_{α} -Atome der markierten Aminosäuren in der Kristallstruktur des trimeren LHCII.

Verschiedene Doppelmutanten der kristallographisch nicht erfassten N-terminalen Position 3 zeigen sehr breite Abstandsverteilungen (Abb. 3.3.11). In den Proben 3/59 und 3/29 ist jeweils eine breite Verteilung von Abständen zwischen 1,5 und 3,5 nm zu detektieren, zudem ein signifikantes Hauptmaximum um 4,5 nm. Die Abstandsverteilungen der jeweiligen Trimere sind praktisch über den gesamten Messbereich verteilt und lassen wenig Interpretationsmöglichkeit. Signifikant ist für beide Doppelmutanten, dass in entsprechenden Trimeren aber längere Abstände bis zu 6 nm auftreten. Mutante 3/14 zeigt ein breites Hauptmaximum um 2,7 nm, zudem ein Nebenmaximum von 4,6 nm, welches den Trimeren 14 nicht unähnlich ist. Auch in dieser Mutante sind die detektierten Abstände insgesamt kürzer als in Trimeren der Position 3 und 14.

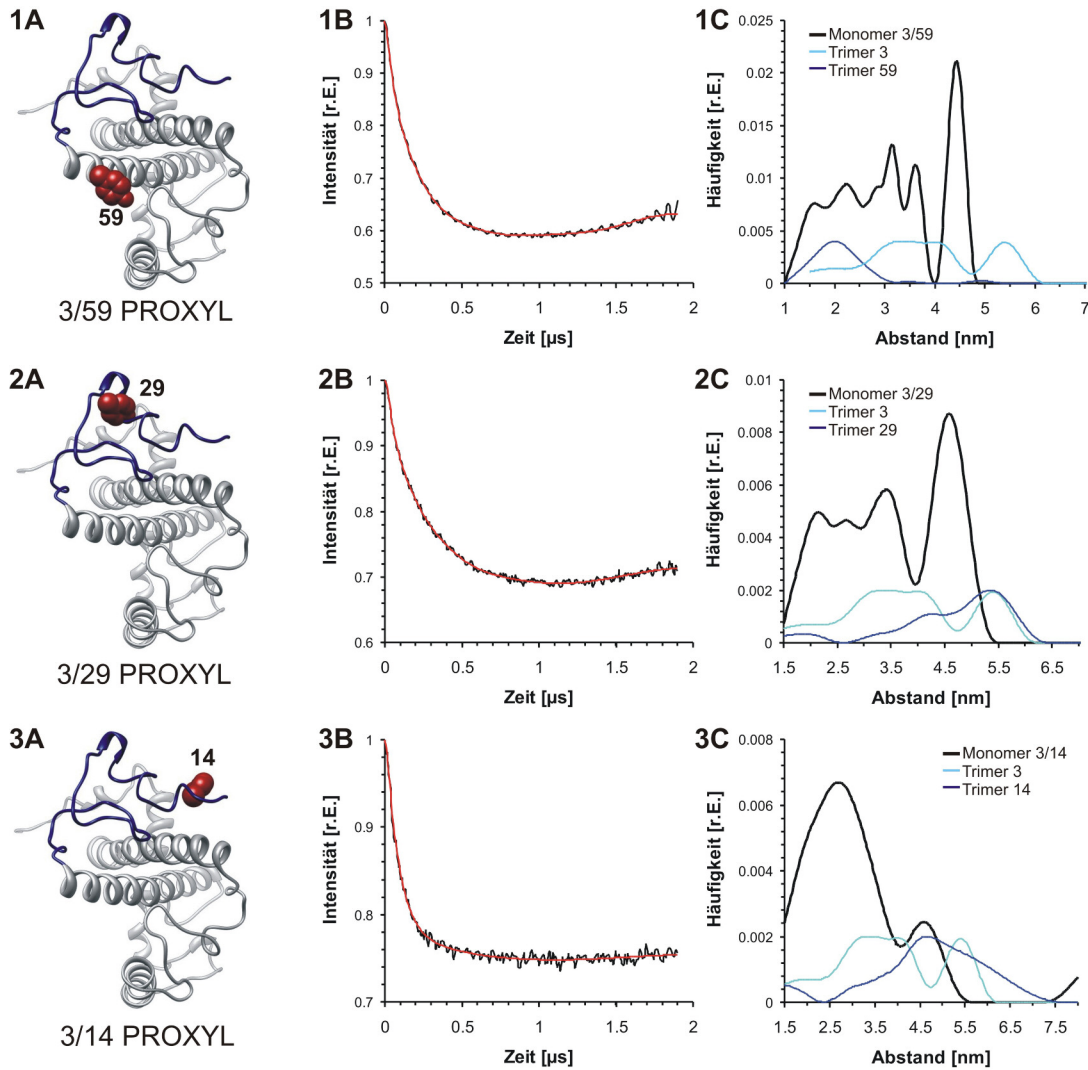


Abb. 3.3.11: DEER-Abstandsmessungen innerhalb der N-terminalen Domäne des LHCII. PROXYL-markierte Monomere 3/59 (1), 3/29 (2) und 3/14 (3) sowie entsprechende Trimere 3, 14, 29 und 59 wurden mittels Detergenzwechsel-Rekonstitution gefaltet, gegebenenfalls trimerisiert, via UZ aufgereinigt und abstandsvermessen. Die Präparation in LM-Mizellen erfolgte durch Müller (2008). (A) zeigt jeweils das Proteinrückgrat des monomeren LHCII in der stromalen Aufsicht, die N-terminale Domäne ist blau dargestellt (PDB-Eintrag 2BHW). Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004). (B) zeigt die Hintergrund-korrigierten Original-DEER-Daten (schwarze Linie) mit bestem Fit (rote Linie). In (C) sind DEER-Abstandsverteilungen dargestellt (Monomere schwarz, Trimere hell- bzw. dunkelblau), errechnet aus den Original-Daten mittels Tichonov-Regularisierung.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den monomeren Proben N-terminaler LHCII-Mutanten von A. Müller (2008) neben den prinzipiell möglichen Rotamer-Abständen zusätzlich unerwartet lange Abstände auftreten, die nicht mit möglichen Konformations-Rotameren der Spinmarker vereinbar sind. Inwiefern das Auftreten dieser Abstände mit einer Strukturänderung der N-terminalen Domäne oder mit der

Verunreinigung der monomeren Proben durch Trimere zusammenhängt, soll später diskutiert werden.

3.1.2.4 DEER-spektroskopische Untersuchung der N-terminalen Domäne in trimerem LHCII

DEER-spektroskopische Abstandsmessungen zur Untersuchung der Konformation der N-terminalen Domäne des trimeren LHCII wurden ebenfalls durch den Diplomanden A. Müller (2008) durchgeführt. Die angesprochene Optimierung der Software zur Berechnung theoretischer Abstandsverteilungen sollte auch hier die ermittelten DEER-Daten durch den direkten Vergleich mit Daten der Kristallstruktur weiter aufwerten. Dies konnte aber bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht verwirklicht werden. Übersichtshalber sind in den folgenden Abb. 3.3.12, 3.3.13 und 3.3.14 (hinten angestellt) die DEER-Daten der vermessenen N-terminalen Trimere erneut dargestellt und mit C_{α} -Abstände aus Kristalldaten verglichen (graue Balken in 3.3.12 und 3.3.13). Hier sei zudem vorab erwähnt, dass eine Verunreinigung solcher trimerer Proben mit LHCII-Monomeren deutlich unwahrscheinlicher ist, als der zuvor angesprochene umgekehrte Fall, da sich LHCII-Trimere durch eine hohe Stabilität auszeichnen und bei entsprechender Behandlung nicht zu Monomeren zerfallen. Außerdem wären die Monomere hier nur einfach markiert und würden nicht zur Abstandsverteilung beitragen. Die Ergebnisse der Abstandsmessungen sollen im Folgenden ausgehend von Position 59 bis hin zu Position 3 dargestellt werden.

Wie zuvor erwähnt, liegt Position 59 im Beginn der transmembranen Helix H1 (Abb. 3.3.12, 1A). Im Unterschied zu allen bisher vermessenen monomeren Proben zeigt diese Trimerprobe eine sehr enge Verteilung der Abstände mit einem Maximum von 2,1 nm, Nebenmaxima treten praktisch nicht auf (1C). Durch die Lage in einer rigiden Helix und die zuvor in ESEEM-Versuchen angesprochene Abschirmung dieser Position durch Aminosäurereste des benachbarten Monomers (Abb. 3.3.5) ist die Abstandsverteilung nicht nur sehr eng, sondern auch identisch zu den vorhergesagten C_{α} -Abständen aus Kristalldaten. Das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis (1B) kann in diesem Fall ignoriert werden. Eine eigens hergestellte Präparation der Mutante zeigte bei weniger Rauschen ein identisches Ergebnis (Volkov, 2008), aus Konsistenzgründen soll hier aber trotzdem die Probe von Müller (2008) gezeigt werden.

Die spinmarkierten Trimere 34 (Abb. 3.3.12, 2) zeigen eine ähnlich schmale Abstandsverteilung mit einem Maximum von 1,85 nm, die C_{α} -Abstände im kristallinen Trimer liegen bei 2,3 nm (2C). Diese Position wird laut Kristalldaten von zwei Schleifenregionen umgeben (Ser 52 bis Gly 42 bzw. Gly 30 bis Asp 20), die jeweils in die Membran bzw. Detergenz-Mizelle eintauchen und dort von Pigmenten und Lipiden (Lut2 und Chl4 bzw. Chl9 und PG) stabilisiert werden. Dies führt anscheinend auch zur Stabilisierung der Peptidstruktur zwischen Pro 41 und Glu 31, hier repräsentiert durch Position 34. Obwohl diese Position in der Kristallstruktur sterisch nicht durch andere Aminosäu-

ren-Seitenreste behindert wird und zudem die ESEEM-Wasserzugänglichkeit (Abb. 3.3.4) sehr hoch ist, scheint eine Rotamer-Konformation zu existieren, die bevorzugt auf die anderen Spinmarker hin ausgerichtet ist.

Vergleicht man die DEER-Abstandsdaten der folgenden Trimere, dann wird ersichtlich, dass mit Annäherung an den Beginn der Domäne (also Position 1) die gemessenen Abstandsverteilungen stetig breiter werden. Auffällig ist auch, dass sich die Daten der folgenden Trimere 29 und 22 (Abb. 3.3.12, 3C und 4C) recht ähnlich sind. Beide zeigen ein Maximum um die 5,5 nm sowie eine Schulter bei etwa 4,5 nm, die in etwa den gemessenen C_{α} -Abständen des Kristalls entsprechen. Wie vorher bereits angedeutet, taucht hier eine Schleife des N-Terminus in die Membran bzw. Mizelle ein (Gly 30 bis Asp 20), wobei sich Position 29 und 22 in der Schleife direkt gegenüber liegen. Durch die enge Packung von Peptidschleife und Chl9, ist eine sterische Behinderung nicht auszuschließen. Infolgedessen müssten die PROXYL-Marker in die Peripherie des LHCII ragen, was zu einer Verlängerung der Abstände gegenüber der Kristallstruktur führt.

Die Daten der Trimere 14 und 12 (Abb. 3.3.13, 1C und 2C) sind mit Abständen zwischen 2,5 und 7,5 nm annähernd deckungsgleich und liegen breit verteilt um den erwarteten Kristallabstand. Die Trimere 11 (Abb. 3.3.13, 3C) zeigen eine ähnlich breite Verteilung, hier sind die Abstände aber durchschnittlich kürzer als erwartet. Während der N-Terminus im Kristall des trimeren LHCII durch eine kurze Schleife mit den Aminosäuren Trp 16 und Pro 15 die Membrangrenzfläche streift, wird der Rest des N-Terminus (Ser 11 bis Arg 1) anscheinend nicht weiter fixiert. Dies wird auch anhand Position 10 deutlich (Abb. 3.3.13, 4C). Hier besitzen etwa 50 % der N-Termini die erwarteten Abstände zueinander, die andere Hälfte zeigt deutlich kürzere Distanzen, die N-Termini nähern sich also einander an.

Die Positionen 9, 7, 4, und 3 (Abb. 3.3.14, 1 bis 4) können nicht mit der Kristallstruktur verglichen werden, dieser Teil der Domäne entzieht sich bisher der kristallographischen Strukturanalyse (Standfuss *et al.*, 2005). Trimere 9 und 7 zeigen annähernd identische DEER-Abstandsverteilungen. In beiden Fällen breit verteilt, nähern sich die N-Termini durchschnittlich weiter einander an. Das Maximum der Trimere 9 liegt bei 4,3 nm, das der Trimere 7 bei 3,9 nm, schematisch dargestellt als farbige Kreise in Abb. 3.3.15 A. Auch die Abstände der Trimere 4 und 3 verteilen sich sehr breit, hier zeigen die N-Termini jeweils zwei Vorzugskonformationen mit Abständen von etwa 3,5 bzw. 5,5 nm (schematisch als Kreise in A dargestellt).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die gemessenen DEER-Daten von Position 59 bis Position 22 sehr gut, bis Position 12 zumindest gut mit den Daten der Kristallstruktur übereinstimmen. Die ersten 11 Aminosäuren scheinen dagegen einen gewissen Grad an Flexibilität zu besitzen, was später diskutiert werden soll.

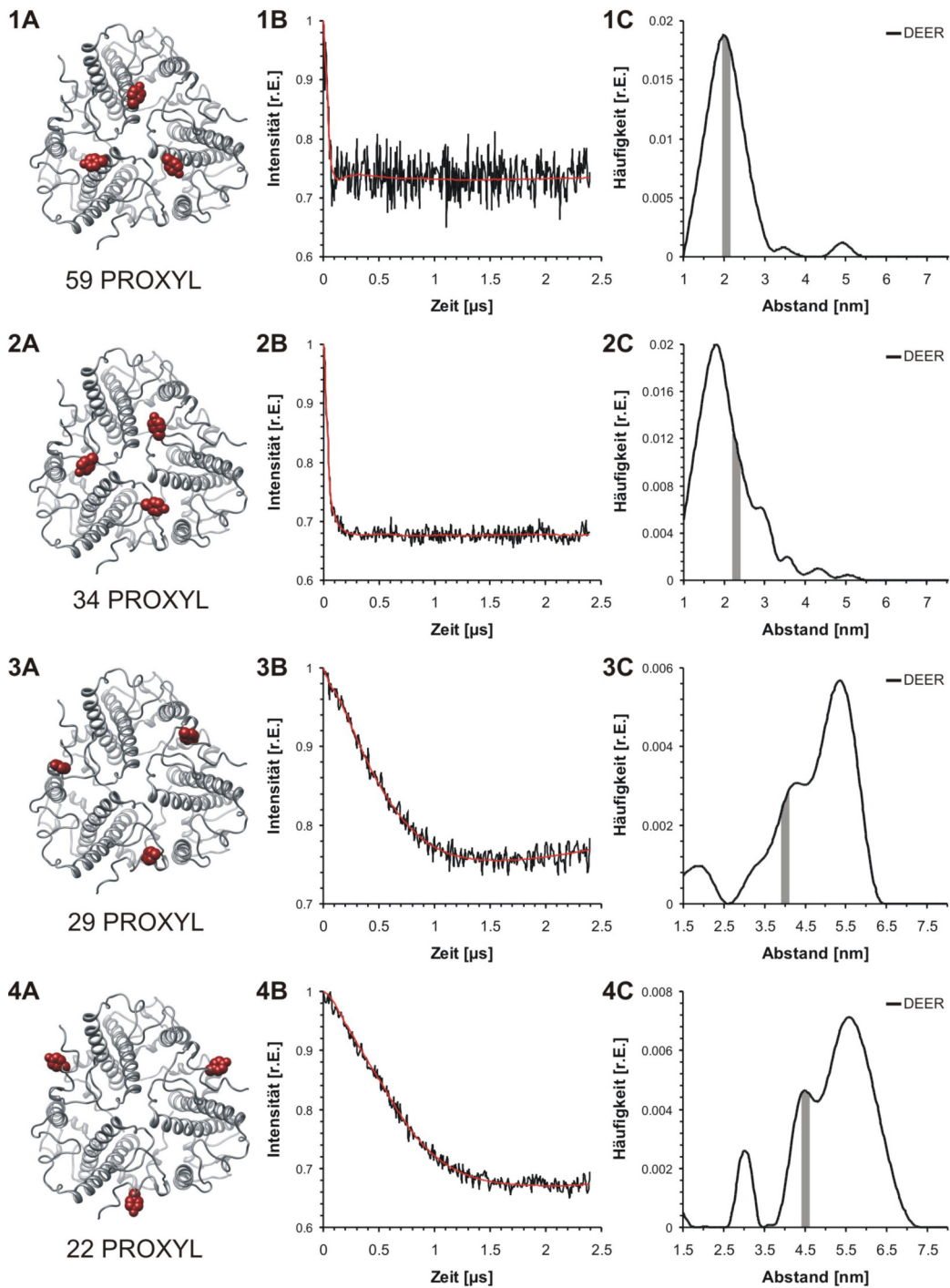


Abb. 3.3.12: Intermolekulare DEER-Abstandsmessungen zwischen den N-Termini des trimeren LHCII. PROXYL-markierte Trimere 59 (**1**), 34 (**2**), 29 (**3**) und 22 (**4**) wurden rekonstituiert, trimerrisiert, via UZ aufgereinigt und abstandsvermessen. Die Präparation in LM-Mizellen erfolgte durch Müller (2008). (**A**) zeigt jeweils das Proteinrückgrat des trimeren LHCII in der stromalen Aufsicht (PDB-Eintrag 2BHW). Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt (Pettersen et al., 2004). (**B**) zeigt die Hintergrund-korrigierten Original-DEER-Daten (schwarz) mit bestem Fit (rot). In (**C**) sind DEER-Abstandsverteilungen dargestellt (schwarze Linie). Der graue Balken entspricht dem Abstand der $C\alpha$ -Atome der markierten Aminosäuren in der Kristallstruktur des trimeren LHCII.

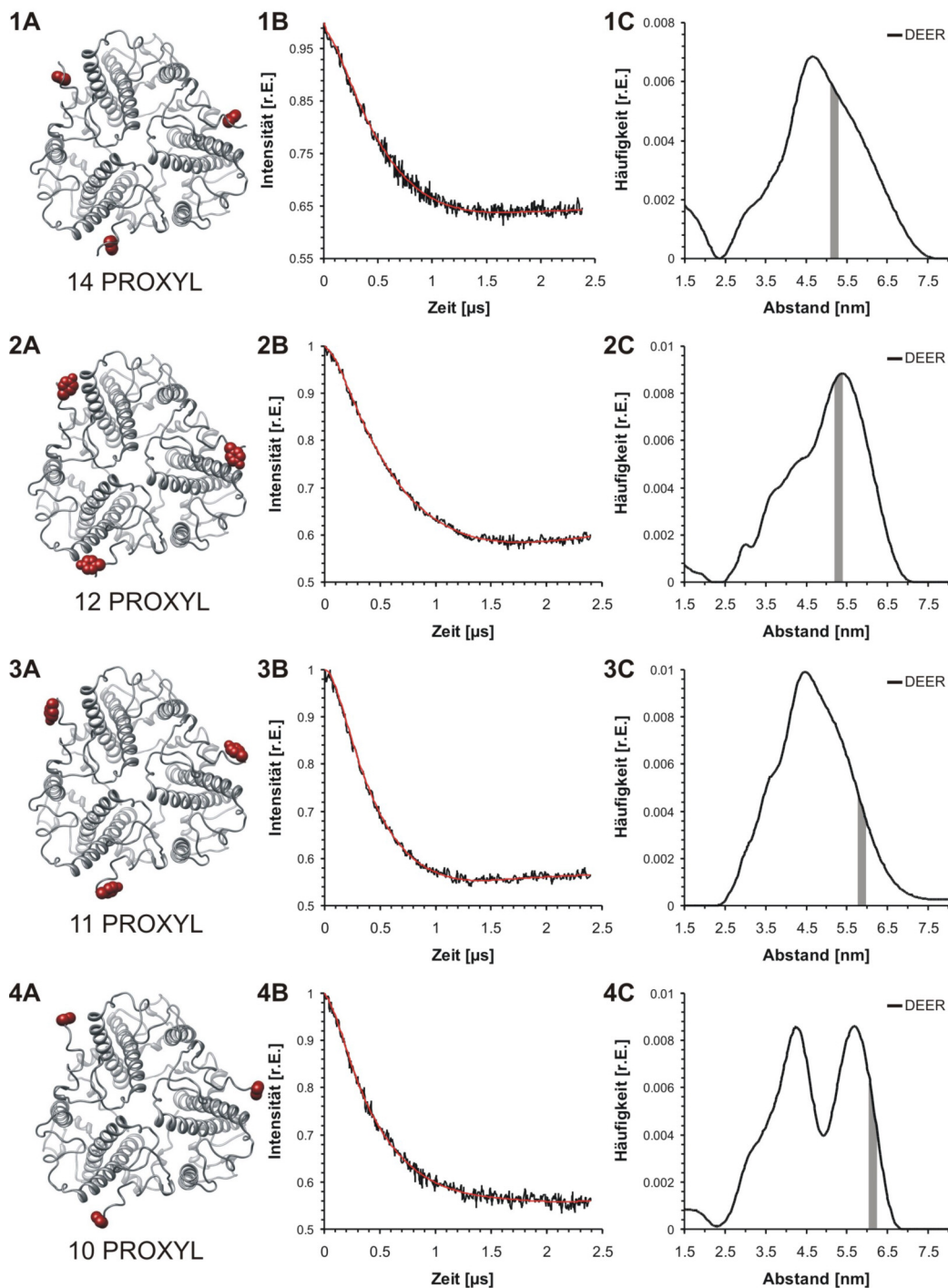


Abb. 3.3.13: Intermolekulare DEER-Abstandsmessungen zwischen den N-Termini des trimeren LHCII. PROXYL-markierte Trimere 14 (**1**), 12 (**2**), 11 (**3**) und 10 (**4**) wurden rekonstituiert, trimersiert, via UZ aufgereinigt und abstandsvermessen. Die Präparation in LM-Mizellen erfolgte durch Müller (2008). (**A**) zeigt jeweils das Proteinrückgrat des trimeren LHCII in der stromalen Aufsicht (PDB-Eintrag 2BHW). Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004). (**B**) zeigt die Hintergrund-korrigierten Original-DEER-Daten (schwarz) mit bestem Fit (rot). In (**C**) sind DEER-Abstandsverteilungen dargestellt (schwarze Linie). Der graue Balken entspricht dem Abstand der C_{α} -Atome der markierten Aminosäuren in der Kristallstruktur des trimeren LHCII.

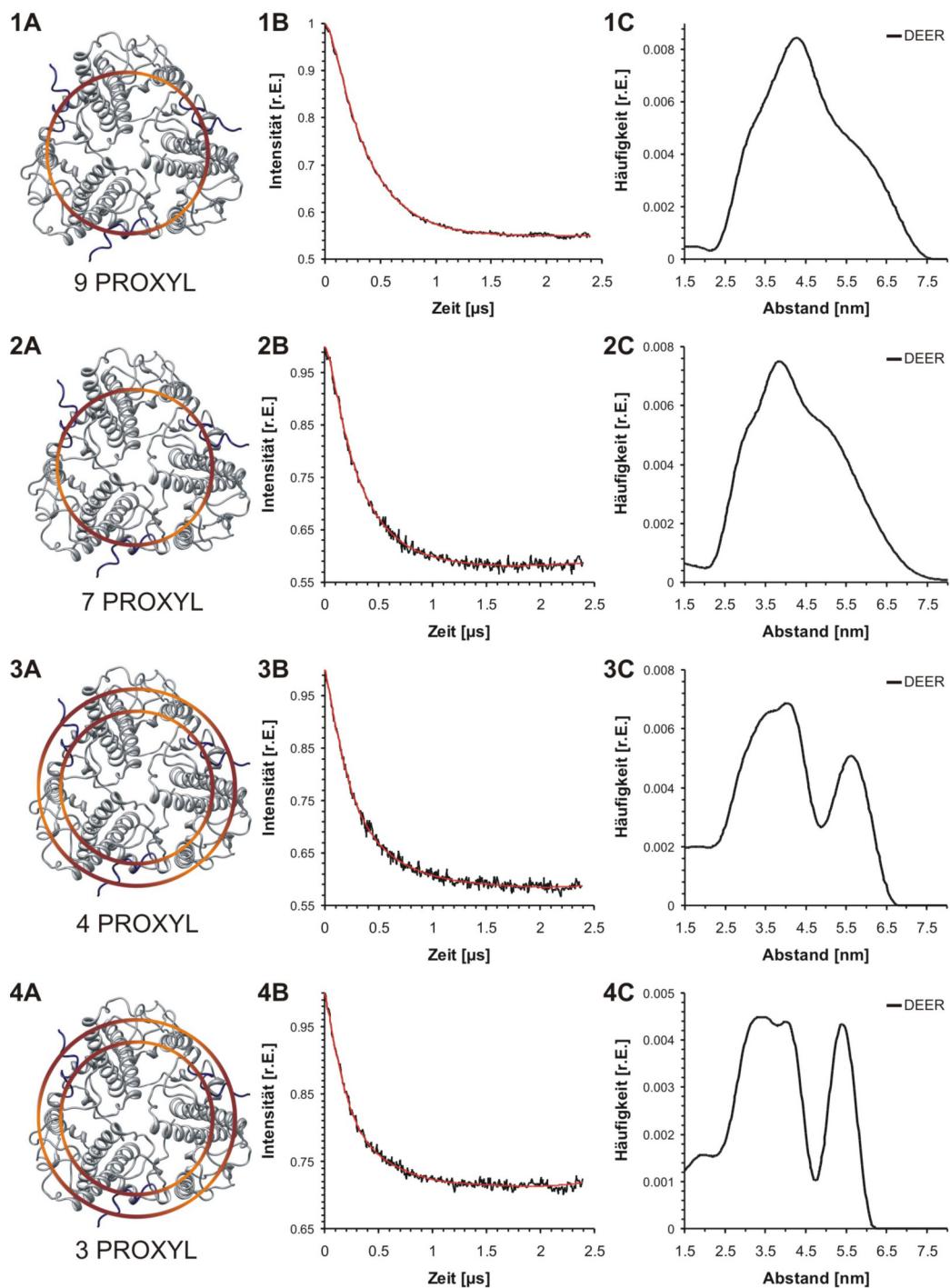


Abb. 3.3.14: Intermolekulare DEER-Abstandsmessungen zwischen kristallographisch nicht erfassten Resten der N-Termini des trimeren LHCII. PROXYL-markierte Trimere 9 (**1**), 7 (**2**), 4 (**3**) und 3 (**4**) wurden rekonstituiert, trimerisiert, via UZ aufgereinigt und abstandsvermessen. Die Präparation in LM-Mizellen erfolgte durch Müller (2008). **(A)** zeigt jeweils das Proteinrückgrat des trimeren LHCII in der stromalen Aufsicht (PDB-Eintrag 2BHW). Die Abbildungen wurden mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004). Kreise entsprechen den gemessenen DEER-Abständen höchster Häufigkeit, N-Termini sind blau dargestellt. **(B)** zeigt die Hintergrundkorrigierten Original-DEER-Daten (schwarz) mit bestem Fit (rot). In **(C)** sind DEER-Abstandsverteilungen dargestellt (schwarze Linie).

3.2 Detektion von Membranproteinfaltung mittels Puls-EPR

Puls-EPR-Messungen an aufgereinigten LHCII-Proben in stationärem Zustand konnten sowohl das Potential von ESEEM-EPR zur lokalen Bestimmung der Wasserzugänglichkeit einzelner Aminosäuren als auch das Potential von DEER-EPR zur Detektion von Strukturinformation ganzer Proteindomänen von Membranproteinen zeigen. Das Experimentieren in Lösung bietet zudem die Möglichkeit der Durchführung zeitaufgelöster Messungen der Struktur­dynamik. Hierbei ist insbesondere der Faltungsvorgang von Membranproteinen von Interesse. Aufgrund seiner Eigenschaft der spontanen Selbstorganisation in pigmenthaltiger Detergenzlösung eignet sich rekombinanter LHCII sehr gut für solche Faltungsstudien. In vitro wurde die Faltung des LHCII durch Verwendung unterschiedlicher Monitore bereits gründlich untersucht. Zeitaufgelöste Fluoreszenz-Spektroskopie konnte zeigen, dass die Faltung des LHCII abhängig von der Bindung seiner Pigmente ist und dass die Ausbildung des Protein-Pigment-Komplexes in mindestens zwei unterscheidbaren zeitlichen Bereichen innerhalb von Sekunden beziehungsweise Minuten stattfindet (Booth & Paulsen, 1996; Reinsberg *et al.*, 2000). Der schnellere Faltungsschritt wird von der Bindung des Chl *a* dominiert, während der langsamere ausschließlich der Bindung des Chl *b* zugeschrieben werden kann (Horn *et al.*, 2007). Zudem konnte mittels zeitaufgelöster CD-Spektroskopie in beiden Faltungsphasen die Ausbildung von α -helikaler Sekundärstruktur nachgewiesen werden (Horn & Paulsen, 2002). Während erstere Versuche das kinetische Bindungsverhalten der Kofaktoren widerspiegeln, detektiert die CD-Spektroskopie lediglich global die Veränderung der Sekundärstruktur. Die zuvor vorgestellten Puls-EPR-Techniken liefern dagegen Strukturinformation über bestimmte Proteindomänen. Aus diesem Grund lag es nahe in zeitaufgelösten ESEEM-Experimenten die lokale Strukturänderung einzelner Domänen und mittels DEER die Veränderung verschiedener Domänen zueinander zu untersuchen, um ein detaillierteres Bild der Proteinfaltung während der LHCII-Assemblierung in vitro zu erhalten.

3.2.1 Etablierung eines modifizierten Rekonstitutionsprotokolls für zeitaufgelöste EPR-Messungen

Um eine für EPR-Versuche erforderliche Spinkonzentration zu erreichen, musste das Rekonstitutionsprotokoll des LHCII für zeitaufgelöste Faltungsexperimente (Booth & Paulsen, 1996; Horn *et al.*, 2007) grundlegend geändert werden. Während gefaltete Protein-Pigment-Komplexe nach Aufreinigung durch Verringerung des Lösemittel-Volumens aufkonzentriert werden konnten, ist dies in zeitaufgelösten Experimenten aufgrund des Schockfrierens zur Unterbrechung des Faltungsvorganges nicht möglich. Daher mussten entsprechende Proben von Beginn an hohe Proteinkonzentrationen besitzen. Nach 20facher Erhöhung der Proteinkonzentration gegenüber dem Standardprotokoll mussten verschiedene Parameter wie Detergenz- und Pigmentkonzentra-

tion angepasst werden, um eine erfolgreiche Rekonstitution des LHCII zu gewährleisten.

Zunächst war eine Änderung des Protokolls zur Proteinmarkierung notwendig. Um hohe Konzentrationen des spinmarkierten Apoproteins in 1%iger LDS-Lösung vollständig zu solubilisieren, musste LHCP nach der Markierungsreaktion mit Trichloressigsäure gefällt werden (Kap. I). Mittels Acetonfällung und Ethanolwaschung behandeltes Protein war dagegen in hohen Konzentrationen nur teilweise löslich (Daten nicht gezeigt). Auch die Herstellung stabiler, hochkonzentrierter Pigmentlösungen erforderte Veränderungen des Standardprotokolls. Um die maximal zulässige Konzentration von 8 % Ethanol in der LHCII-Rekonstitution nicht zu überschreiten, mussten Chlorophylle zu 20 mg/ml in Ethanol gelöst werden. Dies war nur durch Änderung des Pigmentextraktionsprotokolls möglich. Nach Auslassen der Pigment-Überführung in Diethylether während der Extraktion verblieb ein höherer Anteil an nativen Lipiden im Totalpigmentextrakt. Solche Pigmentextrakte konnten zu höheren Konzentrationen in Ethanol gelöst werden.

Das Prinzip der Rekonstitutionsmethode für zeitaufgelöste Faltungsexperimente beruht auf einer Verdünnung des LDS mit einem hohen Überschuss an OG (Booth & Paulsen, 1996). LDS-solubilisiertes Apoprotein wird dadurch in OG-Mizellen gezwungen, der Umgebungswechsel mit Zugang zu den Pigmenten resultiert in der spontanen Selbstorganisation zu funktionalen Pigment-Protein-Komplexen. Um den Verdünnungseffekt bei hohen LDS-Konzentrationen zu gewährleisten, musste die OG-Konzentration ebenfalls erhöht werden. Dies führte zur Aggregation der Chlorophylle innerhalb von Minuten, eine Faltung des Proteins blieb aus. Erst eine Mischung verschiedener Detergenzien führte zu einer stabilen Pigmentlösung, die auch nach 45 min Inkubation noch über 80 % an gelöstem Chl aufwies. Neben OG (6 %), TX (1 %) waren insbesondere geringe Konzentrationen des anionischen Deoxycholat (0,02 %) essentiell um die Pigmente stabil in Lösung zu halten (Daten nicht gezeigt). Somit war gewährleistet, dass dem faltenden Protein während der Assemblierung stets gleich hohe Konzentrationen an Cofaktoren zur Verfügung stehen.

Die Überprüfung der modifizierten Rekonstitutionsmethode erfolgte durch biochemische Charakterisierung einzelner Faltungsproben sowie mittels verschiedener EPR-Monitore. Die Aufreinigung der nach modifiziertem Protokoll rekonstituierten Komplexe resultierte in unauffälligem spektroskopischem Verhalten. Der Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* war gewährleistet, die CD-Absorption entsprach der des wildtypischen LHCII-Monomers. Zusätzlich wurde ein Aliquot jeder einzelnen EPR-Probe mittels schwach denaturierender LDS-PAGE auf ihr Faltungsvermögen überprüft. Nur Proben, die eine intensive grüne Bande mit einer Faltungsausbeute von 40 bis 50 % zeigten, wurden weiter vermessen. Nach Überprüfung auf Protein-Aggregation mittels ESE-EPR sowie Versuchen zur instantanen Diffusion (Volkov, 2008) wurden die Fal-

tungsprodukte der PROXYL-markierten Mutante mittels Puls-EPR-Techniken vermessen.

3.2.2 Änderung der Wasserzugänglichkeit während der Faltung des LHCII: zeitaufgelöste ESEEM-Spektroskopie

Zur Detektion lokaler Veränderungen der Proteinstruktur während des Faltungsvorganges, wurde die LHCII-Mutante 196, welche innerhalb der transmembranen Helix H4 spinmarkiert ist, zeitaufgelöst ESEEM vermessen. Im gefalteten LHCII liegt Position 196 innerhalb des hydrophoben Kerns der Detergenz-Mizelle (Abb. 3.3.15 A) und zeichnet sich durch eine sehr geringe Wasserzugänglichkeit aus, charakterisiert durch einen niedrigen ESEEM-Wasserzugänglichkeitsparameter (Abb. 3.3.1). Die geringe Zugänglichkeit lässt sich für Mutante 196, gefaltet nach modifiziertem Protokoll, ebenfalls bestätigen. Die Intensität des ermittelten „Deuterium-Peak“ bei 2,1 MHz in Fourier-transformierten ESEEM-Daten (Abb. 3.3.15 B, schwarze Linie), welcher ein direktes Maß für Interaktion mit umgebenden Deuterium-Kernen darstellt, ist in der Probe gefaltet nach modifiziertem Protokoll identisch niedrig zur aufgereinigten LHCII-Präparat gefaltet nach Standard-Protokoll (Volkov *et al.*, 2009).

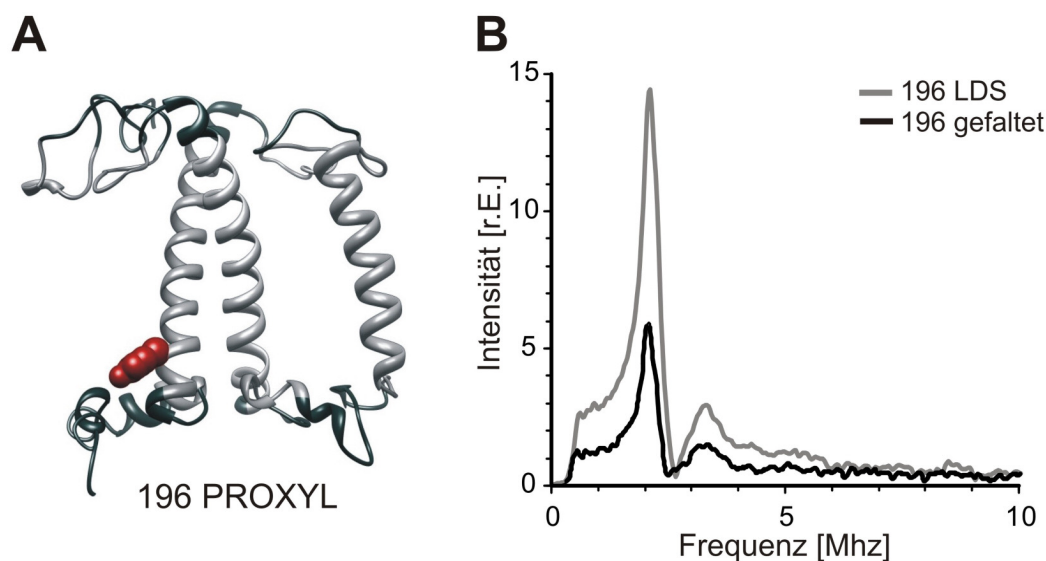


Abb. 3.3.15: Detektion der Änderung der Wasserzugänglichkeit mittels ESEEM-EPR in Abhängigkeit des Faltungszustand des PROXYL-markierten LHCII (Position 196). (A) zeigt die Struktur des Peptidrückgrates eines Monomers des nativen, trimeren LHCII (PDB-Eintrag 2BHW) in der Seitenansicht. Membranständige Domänen sind hellgrau dargestellt, Position 196 rot gezeigt. Die Abbildung wurde mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004). (B) zeigt die Veränderung der „Deuterium-Peak“-Intensität des ESEEM-Spektrums nach Fourier-Transformation. Die graue Linie zeigt LDS-solubilisiertes Apoprotein, die schwarze Linie gefalteten LHCII (Rekonstitution für zeitaufgelöste EPR-Messungen).

Im Gegensatz dazu zeigt die LDS-solubilierte Probe (B, graue Line) eine sehr gute Zugänglichkeit zum Lösungsmittel, die vergleichbar ist mit der Zugänglichkeit aufgerei-

nigter LHCII-Monomere der N-terminalen Mutante an Position 3 (Volkov *et al.*, 2009). Der zentrale „Deuterium-Peak“ erreicht annähernd eine Intensität von 15 und ist damit fast dreimal höher als in der gefalteten Probe. Dieser deutliche Unterschied zwischen denaturierter und gefalteter Probe stellt die Grundvoraussetzung zur Messung der Faltungskinetik mittels ESEEM-EPR dar.

Zur Erstellung einer ESEEM-Faltungskinetik des LHCII (Position 196) wurden vorbereitete Pigment- und Proteinlösungen gemischt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten schockgefroren. Wie in Abb. 3.3.16 A ersichtlich ist, nimmt die Intensität des zentralen „Deuterium-Peak“ während des Faltungsvorganges konstant ab. Nach 32 s Faltungszeit besitzt der Peak bei 2,1 MHz nur noch eine Intensität von etwa 8,8, nach 123 s von 8,5, nach 327 s von 7,6, nach 621 s von 6,7 bis letztendlich bei einem Wert von 5,9 (3000 s) die Faltung beendet ist. Während im denaturierten Zustand Position 196 also sehr gut zugänglich für das wässrige Lösungsmittel ist, wird durch die Ausbildung der transmembranen Helix H4 sowie deren Anordnung im Helixkrenz, die PROXYL-Sonde aus dem Lösungsmittel in das hydrophobe Innere der Detergenz-Mizelle gezogen.

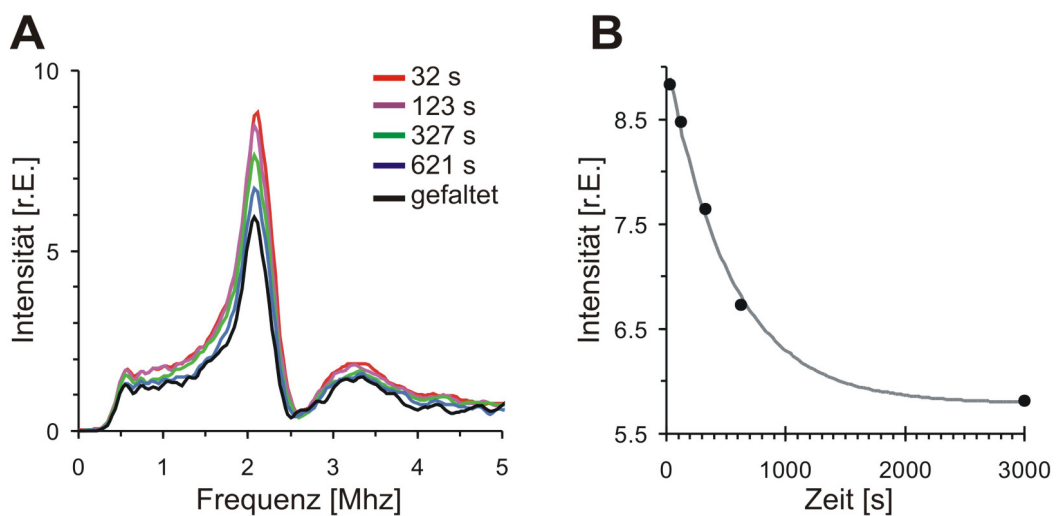


Abb. 3.3.16: Detektion der zeitabhängigen Änderung der Wasserzugänglichkeit während der Faltung der PROXYL-markierten LHCII-Mutante 196 mittels ESEEM-EPR. (A) zeigt die Veränderung des Fourier-transformierten ESEEM-Spektrums für Faltungszeiten zwischen 32 s und 3000 s (gefaltet). In (B) ist die Veränderung des zentralen „Deuterium-Peak“ bei 2,1 MHz gegen die Faltungszeit aufgetragen (schwarze Punkte). Die graue Linie zeigt den monoexponentiellen Fit.

Trägt man die Intensität des zentralen „Deuterium-Peak“ als Funktion der Faltungszeit auf (Abb. 3.3.16 B), kann die Faltungszeitkonstante (k) für Position 196 errechnet werden. Sie beträgt etwa 500 s (Volkov, 2008). In Konsistenz zu kinetischen Faltungsexperimenten mittels DEER-EPR (Kap. III, 3.2.3) wurde in dieser Kinetik darauf verzichtet, die LDS-solubilisierte Probe mit einzubeziehen, da der Puffer dieser Probe nicht

identisch ist zu dem der Faltungsproben. Stattdessen wurde versucht in Faltungs-„Mock“-Versuchen mit Rekonstitutionspuffer, aber ohne Zugabe von Pigment, einen Faltungsnullpunkt zu ermitteln. Messungen zur instantanen Diffusion zeigten, dass in solchen Präparationen der spinmarkierte LHCP sehr stark zur Bildung von Aggregaten neigt (Volkov, 2008). Da die Ausbildung von LHCII-Aggregaten ein irreversibler Prozess ist, der auch durch nachträgliche Pigment-Zugabe nicht rückgängig gemacht werden kann, ist die Verwendung der Zugänglichkeitsparameter solcher Proben zur Definition eines Faltungsnullpunktes in der Kinetik wenig sinnvoll, was später kurz diskutiert werden soll.

3.2.3 Publikation II. Dockter *et al.* Refolding of the integral membrane protein light-harvesting complex II monitored by pulse EPR. [Submitted]

Refolding of the integral membrane protein light-harvesting complex II monitored by pulse EPR

Christoph Dockter^{*}, Aleksei Volkov[‡], Christian Bauer[‡], Yevhen Polyhach[§],
Zoé Joly-Lopez[¶], Gunnar Jeschke^{§†} and Harald Paulsen^{*†}

^{*}Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 55099 Mainz, Germany

[‡]Max-Planck-Institut für Polymerforschung, 55021 Mainz, Germany

[§]Laboratorium für Physikalische Chemie, ETH Zürich, 8093 Zürich, Switzerland

[¶]Department of Biology, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

Key words: LHCII, DEER, membrane protein, assembly kinetics, EPR

Author contributions: C.D., A.V., Y.P., G.J. and H.P. designed research; C.D., A.V., Y.P. and Z.J.-L. performed research; C.B., G.J. and H.P. contributed new reagents/analytic tools; A.V., Y.P. and G.J. analyzed data; C.D., G.J. and H.P. wrote the paper.

[†]To whom correspondence may be addressed.

Prof. Dr. H. Paulsen
Institut für Allgemeine Botanik
Müllerweg 6
55099 Mainz, Germany
telephone: +49 (0) 6131-3924633
fax: +49 (0) 6131-3923787
paulsen@uni-mainz.de

ABSTRACT

The major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHCII) of the photosynthetic apparatus in plants self-organizes *in vitro*. The recombinant apoprotein, denatured in dodecyl sulfate, spontaneously folds when it is mixed with its pigments, chlorophylls and carotenoids in detergent solution, and assembles into structurally authentic LHCII in the course of several minutes. Pulse EPR techniques, specifically double-electron-electron resonance (DEER), have been used to analyze protein folding during this process. Pairs of nitroxide labels were introduced site-specifically into recombinant LHCII and shown not to affect the stability and function of the pigment-protein complex. Interspin distance distributions were measured at various time points between two spin pairs, one pair located on either end of the second transmembrane helix (helix 3), the other one located near the luminal ends of the intertwined transmembrane helices 1 and 4. In the dodecyl sulfate-solubilized apoprotein, both distance distributions were consistent with a random-coil protein structure. A rapid freeze-quench experiment on the latter spin pair indicated that 1 s after initiating reconstitution the protein structure is virtually unchanged. Subsequently, both distance distributions monitored protein folding in the same time range in which the assembly of chlorophylls into the complex had been observed. The positioning of the spin pair spanning the hydrophobic core of LHCII clearly preceded the juxtaposition of the spin pair on the luminal side of the complex. This indicates that superhelix formation of helices 1 and 4 is a late step in LHCII assembly.

INTRODUCTION

The major light-harvesting complex LHCII largely increases the efficiency of the photosynthesis process by collecting light energy and conducting it to a photosynthetic reaction center where light-driven charge separation takes place. The apoprotein of LHCII is one of the most abundant membrane proteins on Earth. An estimated 10^9 t are produced per year (1) and assembled with the photosynthetic pigments chlorophyll (Chl) *a*, Chl *b*, and carotenoids. Although each spring this mass process is easily visible in greening plants, its molecular mechanism is only partially understood.

LHCII offers several advantages for studying its folding and assembly in vitro. Its crystal structure is known (2), its apoprotein can be recombinantly expressed in *Escherichia coli* (3), and the protein spontaneously folds and assembles with pigments in detergent solution (3, 4). This spontaneous self-organisation can be triggered by mixing the apoprotein solubilized in the ionic detergent dodecyl sulfate with a non-ionic detergent solution of the pigments. The assembly process can then easily be monitored by time-resolved fluorescence spectroscopy using the Chls as built-in fluorescence labels. Such experiments showed that protein folding is dependent on the binding of pigments, and that LHCII formation in vitro occurred in at least two apparent phases, a faster one in the range of some tens of seconds and a slower one taking several minutes (5, 6). The faster step could be assigned to the binding of mostly Chl *a* whilst the slower one represents Chl *b* binding exclusively (7, 8). On the other hand, CD spectroscopy showed the formation of α -helical secondary structure during both kinetic phases (9). Both techniques are limited when used in protein folding studies. While time-resolved fluorescence measurements only yield information on Chl assembly into the complex, CD is a good monitor for the folding state of proteins in that it indicates the overall composition of secondary structure, but detailed information about positions of individual protein domains is not accessible.

Information about the structural behavior of individual protein domains during the LHCII assembly process can be gathered by various techniques of EPR in combination with site-directed spin labeling (SDSL). Double electron-electron resonance (DEER) spectroscopy allows the measurement of distances between two spin-labeled residues in the range of 2 -6 nm, in favorable cases even 8 nm (10, 11). This technique is especially useful for the prediction of unsolved protein structure (12, 13) as well as structure dynamics (14, 15). Electron spin echo envelope modulation (ESEEM) spectroscopy, also a pulse EPR technique, yields additional structural information by determining the water accessibility of singly spin-labeled protein domains (16). Continuous-wave (CW) spectroscopy is a widely-used technique to monitor changes in the structure of both membrane proteins and water-soluble proteins (17-19) and additionally in time-resolved studies to analyze the process of protein folding (20).

DEER recently provided insight into the pattern of helix movement in rhodopsin due to light activation (14) and has been used to determine intra- and intermolecular

distance distributions between individual protein domains in LHCII monomers and trimers, respectively (12). Additional information about the accessibility of single residues in various domains of LHCII monomers were obtained by comparison of conventional CW and pulsed EPR measurements (16).

In the present work, we employed DEER to obtain information about LHCII assembly by monitoring the change of distances between two spin label pairs. Double-labeled mutant versions of lithium dodecyl sulfate (LDS)-denatured LHCII apoprotein were refolded using a modified reconstitution protocol, flash-frozen in liquid nitrogen after certain folding times, and the intramolecular distances were measured. Based on the obtained kinetic data, we compared the folding in vitro of LHCII with that of other membrane proteins.

MATERIALS AND METHODS

Protein preparation, SDSL and reconstitution of LHCII with pigments.

Proteins used in this study were derivatives of the Lhcb1*2 (AB80) gene from pea (*Pisum sativum*) (21) with its single Cys in position 79 replaced with Ser. In DEER measurements, two different double mutants were used (106/160 and 90/196), each containing two Cys replacing Ser at positions 106, 160 and replacing Val in positions 90, 196. All derivatives have either been described in earlier studies (12) or were constructed by using the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene). Bacterial expression of the Lhcb1 gene derivatives (3) and labeling of the protein with PROXYL spin labels [3-(2-Iodoacetamido)-PROXYL, Aldrich] were performed as described elsewhere (16).

For steady-state DEER the spin-labeled complexes were reconstituted using the detergent-exchange procedure (henceforward called “standard reconstitution”) as described in (22) except that 10 mM β -mercaptoethanol (β -Me) was used as a reductant. Purification of LHCII and preparation of EPR samples were performed as described in (12).

For time-resolved DEER measurements, reconstitution was initiated by manually mixing protein and pigment solutions containing high reactant concentrations (“reconstitution for EPR measurements”) or by mixing the solutions in a rapid freeze-quench apparatus and spraying them into a cold brass funnel as described in supporting information (*SI Text*). After the reaction times indicated, 40% glycerol was added immediately as a cryoprotectant, and samples were flash-frozen in liquid nitrogen. Each data point in the EPR kinetic measurements represents an independently mixed protein sample exhibiting a final protein concentration of about 40 μ M LHCII.

EPR-spectroscopy.

The X-band (9 GHz) pulse EPR measurements were performed on a Bruker Elexsys EX 580 EPR spectrometer using a Bruker Flexline split-ring resonator ER 4118X_MS3

overcoupled to $Q \sim 100$. All pulse measurements were performed at 50 K with liquid helium cooling using an Oxford CF935 cryostat with an Oxford ITC4 temperature controller.

Four-pulse DEER experiments were performed as described by Jeschke *et al.* (12) with interpulse delays τ_2 between 800 ns and 2500 ns depending on the transverse relaxation times, a repetition time of 6 ms and a total measurement time between 8 and 24 h, depending on spin label concentration. Sample quality was checked by electron spin echo (ESE) measurements as described in (16).

Data analysis.

DEER data were analyzed using the “DeerAnalysis2006” program (23), which can be downloaded at <http://www.epr.ethz.ch/software/index>. Processing parameters are given in *SI Text*.

Rotamer library simulations.

Distance distributions were predicted from the crystal structure (2) with rotamer library modeling of spin label conformations using a modified version of an approach introduced in earlier work (11, 13). Details are given in *SI Text*.

RESULTS

Functional and structural characterization of spin-labeled LHCII.

The folding state of Lhcb1 protein upon or during LHCII assembly was measured by monitoring two different intramolecular distances, one between the luminal ends of helices H1 and H4 (90/196, Fig. 1), the other one spanning the hydrophobic centre of the complex between the stromal and luminal loops (106/160). The distances were defined by PROXYL spin labels attached to engineered Cys residues replacing two Val in mutant 90/196 and two Ser residues in mutant 106/160. The chosen sites were facing the peptide surface to avoid structural perturbation due to overpacking of the protein core but, except for 106, were located inside the detergent micelle (16).

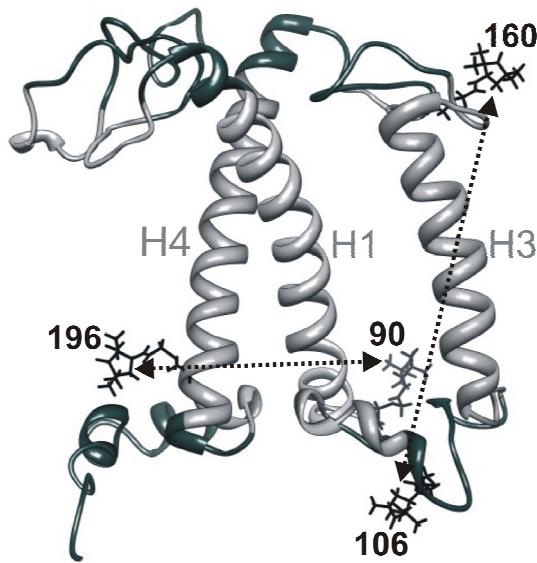


Fig. 1. Side view of the backbone structure of monomeric LHCII based on the crystal structure (PDB ID code 2BHW). H1, H3, H4 indicate the three transmembrane α -helices [Standfuss *et al.* (2) nomenclature], numbers indicate the PROXYL-labeled amino-acid residues, dotted traces show the intramolecular distances measured. Light gray colored protein domains reside inside the detergent micelle.

The labeled apoproteins were reconstituted with pigments according to the standard procedure, and the complexes were compared to those reconstituted with the non-labeled WT protein. Neither

CD spectra in the visible range nor the intramolecular energy transfer from Chl *b* to Chl *a* (24) showed any difference between the two, demonstrating that spin labeling did not affect the structure or function of LHCII (*SI Text*).

The spin-labeled isolated LHCII was used to measure distance distributions by pulse EPR as shown in Fig. 2. The original data shown in Fig. 2A (90/196, solid black trace) were obtained by a four pulse DEER experiment monitoring the time evolution of a spin echo intensity (10). To be sure to measure intramolecular distances within the same molecule rather than intermolecular distances between two labeled monomers, a control experiment with a 1:1 mixture of singly spin-labeled mutant 90 and mutant 196 (dots in Fig. 2A) at the same total spin label concentration was performed. In contrast to the doubly spin-labeled mutant no appreciable DEER signal was detected resulting from dipole-dipole interaction between electron spins. Therefore the background-corrected data for the mutant 90/196 in Fig. 2B originate from two electron spins within the same macromolecule. The corrected data were used to calculate via Fourier transformation the dipolar spectra shown in Fig. 2C and via Tikhonov regularization the distance distribution (Fig. 2D) between two labels within one protein molecule (11).

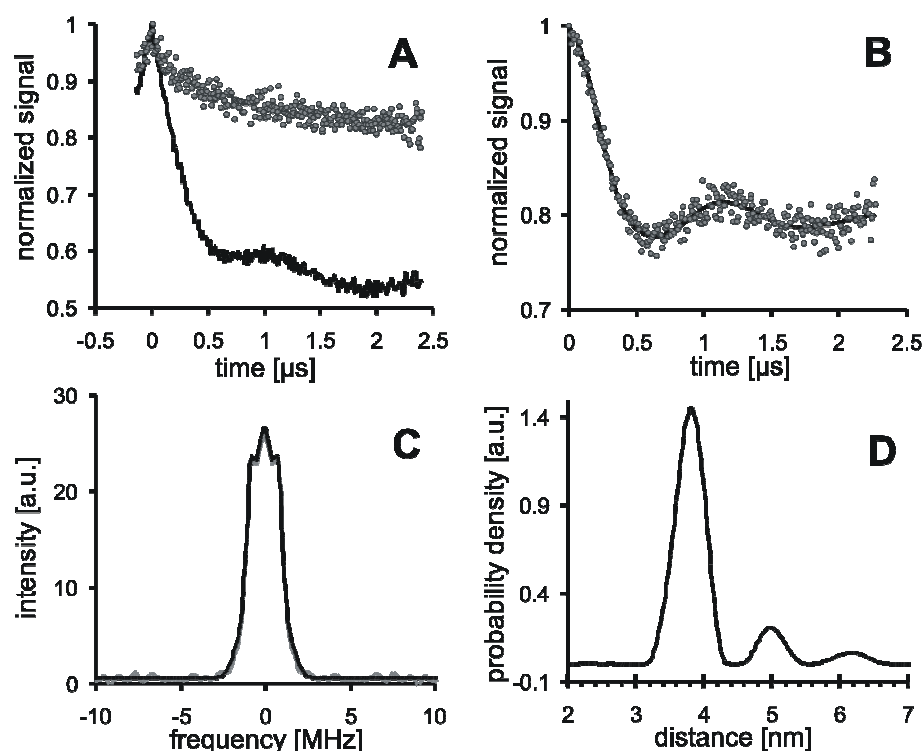


Fig. 2. DEER data analysis for LHCII double mutant 90/196. Monomeric LHCII was purified by ultracentrifugation and checked by CD and fluorescence measurements. DEER spectra were scanned with a dipolar evolution time of 2500 ns, the background correction parameter was 224 ns. **A** original data (solid black trace) and control experiment with a mixture of singly spin-labeled mutants 90 and 196 (gray dots). **B** data after background correction (gray dots) and best fit (solid black trace), **C** dipolar spectrum (gray trace) and best fit (black trace). **D** distance distribution obtained with a regularization parameter $\alpha = 100$.

Protein folding was monitored by measuring distance distributions between spin pairs at different time points. Labeling sites were preferred (i) where PROXYL labels would face the protein surface to avoid their interference with the pigment-protein structure, and (ii) in protein domains of restricted mobility to keep the expected distance distributions narrow and well reproducible. A number of double mutants carrying pairs of spin labels were screened by producing independent preparations of EPR samples for each mutant and testing their reproducibility by superimposing the DEER dipolar spectra for each mutant. Dipolar spectra for LHCII double mutants were generally well reproducible; only modulation depths sometimes varied and the shapes of broad distance distributions in some cases were not well reproducible. As shown in Fig. S1 two independent dipolar data sets each of the monomeric 90/196 (panel A) and 106/160 (panel B) mutants were matching very well; therefore, these two mutants were chosen for protein folding kinetics.

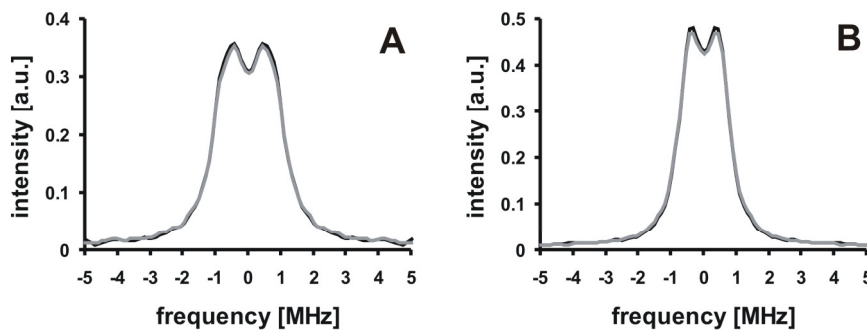


Fig. S1. Check of the reproducibility of DEER dipolar data of different LHCII double mutants. Monomeric LHCII samples were purified by ultracentrifugation and checked by CD measurements. DEER spectra were scanned with a dipolar evolution time of 2500 ns, the background correction starting time for A and B was 224 ns and 320 ns, respectively. **A** comparison of two separately reconstituted LHCII samples of the double mutant 90/196 (grey and black trace), in **B** double mutant 106/160 (grey and black trace).

Time-dependent changes of EPR signals during LHCII assembly.

In a first, stationary DEER experiment both the LDS-denatured apoprotein and the isolated pigment-protein complex of mutants 90/196 and 106/160 were measured with a long evolution time of 2500 ns to obtain distance distributions over the entire range of 1.5 to 6.5 nm.

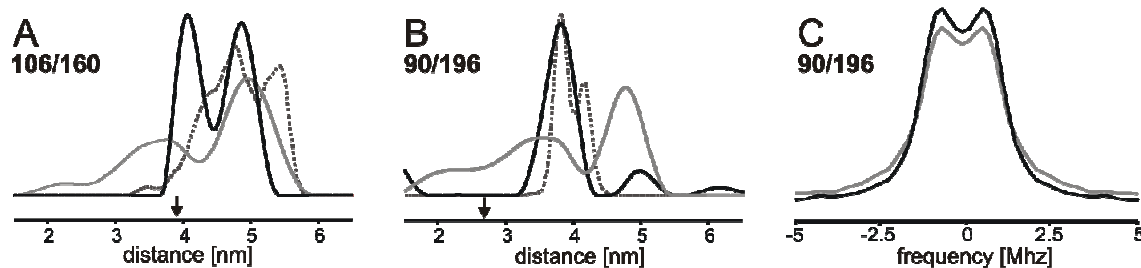


Fig. 3. Distance distributions of LDS-denatured apoprotein and upon LHCII-assembly. Data were acquired with a maximum dipolar evolution time of 2500 ns, the background correction time for 106/160 and 90/196 was 632 ns and 396 ns, respectively. Panels **A** and **B**: changes in distance distribution for mutants 106/160 and 90/196, respectively. Panel **C**: the dipolar spectra for 90/196 obtained from data cut off at a dipolar evolution time of 1400 ns and using exponential background correction as in analyzing folding kinetics (vide infra). Gray lines represent the LDS-denatured apoprotein and black lines isolated pigment-protein complexes. The dotted gray traces (A, B) show distance distributions determined from a rotamer library-based simulation. Black arrows (A, B) indicate the distances taken from the crystal structure of trimeric LHCII (2) between the C_{α} atoms in the labeling positions.

The denatured samples of both mutants (Fig. 3A and B, gray trace), expected to adopt a random coiled conformation with some α -helical structure (9), yielded distance distributions covering the range of 1.5 to 6 nm. The individual peaks in these distributions may not be significant but rather result from the ill-posedness of converting primary DEER data to distance distributions. While the denatured samples exhibited broad dis-

tributions, the fully folded and pigmented proteins showed significant narrowing of their distance distributions and a change in the mean distance. For the span between the stromal and luminal loops in 106/160 the obtained broad peak at 4.1 nm is near the distance between the C_{α} atoms in the crystal structure (3.9 nm, indicated by the black arrow) of trimeric LHCII (2). In contrast, the second peak at 4.9 nm as well as the distances between the labels at the luminal ends of helices H1 and H4 (3.85 nm) were all larger than the distance measured between C_{α} atoms in the crystal structure of LHCII trimers (2.8 nm for mutant 90/196). As seen in the distance distributions determined from a rotamer library-based simulation of both mutants, this deviation disappears when the labeled sidegroups point away from one another and the distances are measured between midpoints of the N-O bonds at the sidegroup termini.

In kinetic EPR measurements of LHCII protein folding, the protein concentration was reduced by a factor of 7.5 compared to the steady-state measurements described above. Thus it was necessary to shorten the dipolar evolution times from 2500 ns to 1500 ns. This partially suppresses long distances due to imperfect background correction. Therefore, protein folding was monitored by focussing on the distance distribution at short distances, where both spin pairs show differences between the unfolded and folded states. In dipolar spectra this corresponds to the large dipolar frequencies, which can be reliably detected even at short evolution times. DEER measurements of the folded double mutants 106/160 and 90/196 measured with dipolar evolution times of 2500 ns and 1500 ns resulted in virtually identical dipolar spectra (data not shown). Furthermore, unlike computation of distance distributions, the computation of dipolar spectra is not an ill-posed problem, so that the results are less influenced by noise, and the remaining influence of noise can be precisely estimated.

Therefore the change in the EPR dipolar spectra was measured during assembly of LHCII. The folding process was triggered by manually mixing the protein and pigment solutions. The reaction was quenched by shock freezing after the desired reaction times in the range between 40 s and 15 min. As shown for both mutants in Fig. 4A and B (106/160 and 90/196, respectively), the normalized dipolar spectra exhibit an increase of low-frequency contributions in the center and a decrease of high frequencies of approximately ± 1.5 to ± 5 MHz in the flanks corresponding to the narrowing of their distance distributions and the increase in the mean distance as seen before (Fig.3).

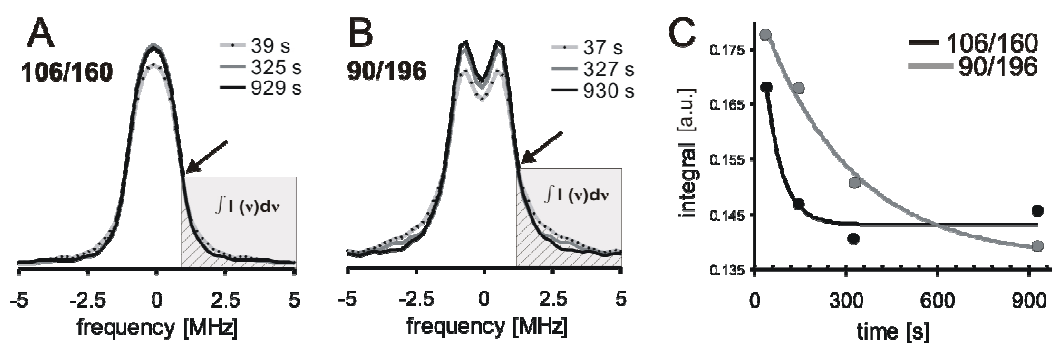


Fig. 4. Assembly of LHCII as monitored by the change in DEER dipolar spectra for different LHCII mutants (A 106/160 and B 90/196). Spectra were scanned with a dipolar evolution time of 2500 ns. Processing parameters were a 404 ns starting time for background correction and 1400 ns cut off time for mutant 106/160 and a 184 ns starting time for background correction and 1400 ns cut off time for mutant 90/196. Panel **A** and **B**: DEER-dipolar spectra at 3 different folding times. The isosbestic points are marked by arrows, frequencies higher than that at the isosbestic point are shaded and the integrated areas hatched. Panel **C**: time-dependent decrease of the high-frequency integral in dipolar spectra obtained at four different folding times for each mutant (106/160 and 90/196, black and gray line, respectively). Lines are exponential fits of the experimentally determined data points.

Upon superimposing the dipolar spectra obtained for different time points, isosbestic points (black arrows in Fig. 4) became visible for both mutants at approximately 1 MHz. The appearance of isosbestic points confirms the expectation that Fourier analysis of the data is a robust approach and indicates that folding can be described as a two-state process. The integral intensity in the dipolar spectra at frequencies higher than the one of the isosbestic point is a measure for the conformations with short distances in the unfolded ensemble that are depopulated during folding. Thus progress of the protein folding process was quantified by plotting the integral area (hatched area in Fig. 4) versus the folding time. The right-hand panel in Fig. 4 (C) shows fits of the kinetic data shown in Fig. 4 (A and B) to be single-exponential. With four data points this cannot be strictly proven. However, apparent first order kinetics is consistent with a two-state process suggested by the occurrence of isosbestic points. Furthermore, single-exponential fits allow for a rough comparison of the time scales of structure generation between the two spin-labeled residues. For mutant 106/160 (Fig. 4C, black line) in which the distance was measured along the transmembrane helix H3, the fit yielded a time constant τ_{H3} of about 54 s. However, this time constant is only an upper limit since within experimental uncertainty the dipolar spectrum already corresponds to the folded state at the second time point of 146 s. The formation of the superhelical structure defined by the juxtaposition of the luminal ends of helices H1 and H4 (90/196) displayed a slower kinetics with a time constant $\tau_{H1/H4}$ of about 300 s (Fig. 4C, gray line). Both time constants were in the same range as those seen in time-resolved fluorescence measurements for pigment binding during LHCII assembly (Table S1, ref. 8, 25).

To obtain information within the dead time of about 40 s of the manual mixing procedure, a sample of double mutant 90/196 with a folding time of 1 s was prepared with a rapid freeze-quench apparatus. Due to the unavoidable dead volume of the apparatus and losses in transferring the sample from the cold brass funnel into the EPR tube, such experiments require a much larger amount of protein and pigments. Furthermore, at the same concentration the protein density in the active volume of the EPR resonator is significantly lower due to voids in packing the small shock-frozen particles. Although the ESE spectrum indicated good sample quality, the sample could thus be measured only with a dipolar evolution time of 800 ns.

However, within these 800 ns the modulation-depth scaled primary time-domain data superimpose almost perfectly with both the data for the unfolded double mutant 90/196 and the data measured after 37 s (see Fig. S2). As this indicates no substantial structural changes of the unfolded protein due to the detergent replacement, no further material-intensive experiments were performed with the rapid freeze-quench setup.

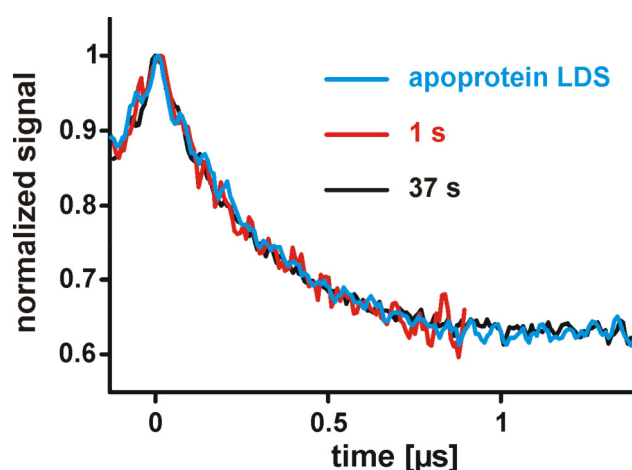


Fig. S2. Primary DEER EPR data of the LHCII mutant 90/196. The blue line represents the apoprotein in LDS micelles, the red line a sample shock frozen immediately after mixing the protein and pigment solutions (rapid freeze quench), and the black line a sample shock frozen 37 s after mixing (manual freeze quench). Data traces are normalized to the intensity at zero time and vertically scaled to match modulation depths. Modulation depth differences were smaller than 5% of the normalized maximum echo amplitude.

DISCUSSION

DEER as a monitor in membrane protein-folding analysis.

In this work we employed the techniques of SDSL and DEER distance mapping to study apoprotein folding during the assembly of LHCII. SDSL in combination with CW EPR had been used to measure the kinetics of structural changes in membrane and water-soluble proteins (17, 19, 20). Time-resolved studies on LHCII assembly had yielded information about the kinetics of pigment binding by measuring energy transfer between Chls (5), and about the kinetics of global secondary structure formation in the

apoprotein by measuring CD spectra in the UV domain (9). By using pulsed EPR combined with SDSL in the present study, we were able for the first time to monitor individual LHCII protein domains during the folding process by assessing distances between these domains.

Two intramolecular distances were defined by the labeling positions in two double-labeled LHCII derivatives, one along the axis of the middle transmembrane helix H3 (106/160) and one between the luminal ends of the two intertwined helices H1/H4 (90/196). The labeled LHCII versions were carefully checked and found to exhibit the same stability as native LHCII.

Recombinant LHCII forms 2D crystals very similar to those from native LHCII (26). DEER (12) and ESEEM (16) measurements of spin-labeled LHCII mutants indicated a similar structure for monomeric LHCII, solubilized in detergent micelles, permitting us to compare intramolecular distances measured by EPR with those predicted from the crystal structure. The distance distribution measured for the 106/160 label pair in isolated labeled LHCII was rather broad with peaks at 4.1 and 4.9 nm (Fig. 3). The distance between C_{α} atoms taken from the crystal structure (2) is 3.9 nm. PROXYL spin labels modelled into the crystal structure by using a rotamer library predicted a distance distribution between 3 and 5 nm, in agreement with the measured distribution. In the rotamer model the PROXYL label in position 106 has a substantial amount of motional freedom whereas the one in position 160 is partially restricted in its mobility by its close vicinity to Chl 11. This notion is supported by recent ESEEM measurements, indicating that the label in position 160 is buried in the micellar phase (16). The distance peaks at 4.1 and 4.9 nm are consistent with preferred label orientations parallel to or away from another, respectively. The DEER-measured distance distribution in the 90/196 derivative is remarkably narrow, peaking at 3.85 nm. This is in good agreement with the distance range between 3.6 and 4.2 nm predicted by a rotamer library approach. Both label positions are crowded by protein side chains (position 90) or pigments (Chls 3, 4, and 12 in position 196), forcing the labels to point away from each other. This explains both the narrow distance distribution and its deviation from the distance between C_{α} atoms taken from the crystal structure (2.8 nm).

In LDS-denatured LHCII apoprotein, DEER-measured distance distributions were broad and quite different from those in the isolated pigment-protein complex (Fig. 3), making DEER a useful monitor for protein folding. The distance distribution for the 90/196 spin pair has a somewhat shorter mean distance compared to the one of the 106/160 pair while the opposite may be expected in a random coil because of the larger separation of the 90/196 pair in the primary protein sequence. Most likely, the assumption of a random coil structure is an over-simplification since hydrophobic stretches of the protein presumably are expected to be sequestered in the hydrophobic interior of detergent micelles (27). Moreover, it is known that dodecyl sulfate-dissolved LHCII apoprotein exhibits about half of the α -helical structure seen in the fully folded

protein (9). The same has been observed in other proteins such as bacteriorhodopsin, leading to the proposal that dodecyl sulfate stabilizes a folding intermediate of membrane proteins (28). It should be noted, however, that LHCII protein can also be refolded from a guanidinium hydrochloride (Gnd) solution in which no α -helical structure is seen; the latter therefore is no prerequisite for successfully folding this protein (29). In this work, we chose the dodecyl sulfate solution of the protein as a starting condition since folding yields are considerably higher compared to experiments starting from the Gnd-solubilized protein.

Events during the first 30 s of LHCII apoprotein folding.

In mock reconstitution experiments that involved the same detergent exchange as during proper reconstitution in the absence of pigments very short T_2 (spin-spin) relaxation times were observed. This effect could be traced back to protein aggregation, with high local spin concentrations of such aggregates being verified by instantaneous diffusion measurements and distortions in the line shape of the ESE spectrum (Fig. S3). However, these aggregates formed in the absence of pigments clearly constitute a kinetic trap, since subsequent addition of pigments never induced any detectable protein folding. For double mutant 90/196 a refolding experiment under standard conditions with rapid freeze quench after about 1 s, led to an undistorted ESE spectrum and to a DEER decay function that matched both the decay function of LDS-denatured apoprotein and the one observed after 37 s of folding within the first 800 ns where data were observable with the rapid freeze-quenching technique. This virtual coincidence of all three data sets is consistent with the folding time constant of 300 s observed for this mutant. The data indicate that mere detergent exchange, which is expected to be faster than 1 s, does not cause significant changes in the random coil ensemble of unfolded LHCII protein. In the presence of pigments, folding is induced and changes occur on the time scales observed with manual freeze quench. In the absence of pigments, unfolded apoprotein is not well solubilized by the detergent mixture used for reconstitution and aggregates, probably on a time scale comparable to the folding time scale.

LHCII protein folds in two apparent phases in the range of less than 1 min and several min.

Following the dead time of manual freeze-quench experiments of about 30 s, the folding of the LHCII apoprotein was traced by DEER measurements at various time points. While at optimum spin concentrations (Fig. 3) the ill-posed problem of Tikhonov regularization can be minimized (and thus reliable distance distributions obtained), under the non-ideal conditions of refolding experiments (Fig. 4) the dipolar evolution time had to be shortened, resulting in suppression of longer distances. In LHCII this problem is not serious as maximum distances measured in the denatured state and the compact intermediate were shorter than 6 nm. As a consequence of the low signal-to-noise ratio

in such samples, now the ill-posedness complicates the computation of reliable distance distributions. This problem is not encountered in computing dipolar spectra from the primary data, because here the influence of noise can be estimated precisely. The integrated area under dipolar spectra at high frequencies declined during LHCII assembly, reflecting the diminishment of very short distances in the distance distribution. These integrals were used as a monitor for assessing the kinetics of LHCII protein folding (Fig. 4).

The two spin label pairs yielded distinctly different kinetics. The distance distribution between positions 106/160, spanning the length of the middle helix (H3), changed between time points 40 s and 150 s and remained unchanged thereafter, defining a maximum for the apparent time constant of 54 s (Fig. 4). The data points for the distance distribution between positions 90/196 (H1/H4), describing the distance between the two intertwined transmembrane helices, could be fitted with a single exponential yielding an apparent time constant of 294 s. These two time windows correspond to the ones seen in time-resolved fluorescence measurements of LHCII assembly, monitoring the assembly of Chls into the complex. Under the reaction conditions used for the EPR measurements, apparent time constants were obtained of (26 ± 11) and (178 ± 114) s (*SI Text*, Fig. S4 and Table S1). Earlier experiments had shown that the faster phase represents the binding mostly of Chl *a*, whereas the slower one reflects the binding of Chl *b* exclusively. The former phase leads to an unstable intermediate that dissociates upon dilution while the slower Chl *b* binding coincides with the final stabilization of the complex (7). We cannot at this point prove that the similar kinetic phases detected by EPR and fluorescence reflect the same molecular events. However, it would be conceivable if the slow juxtaposition of the two intertwined helices is connected with Chl *b* binding and the stabilization of the LHCII structure (Fig. 5). The faster positioning of the labels on either end of helix H3 then coincides with the faster binding step in which the Chl *a* binding sites are filled. The distance between these two labels (106/160) is probably defined by the formation (or completion) of helix H3. Earlier CD measurements had revealed that α -helix formation in LHCII apoprotein (beyond the helical structure pre-formed in dodecyl sulfate solution) is dependent on pigment binding (22) and that most but not all of it happens during the faster reaction phase in the range of 10 s to 1 min. The helix formation positioning labels 106/160 is not likely to be triggered by Chls binding locally to this helical domain, since these are all Chl *b* binding sites whose occupation takes place during the slower kinetic phase of several min. The nearest Chl *a* binding site is that of Chl 6. Although its central Mg^{2+} binds to Gly 78 in H1, Chl 6 is also close to a short β -sheet and the short amphiphilic helix H2 in the luminal loop. This interaction could trigger the formation of secondary and tertiary structure in the luminal loop and, thus, promote the completion of helix H3.

The juxtaposition of the intertwined helices during the slower phase of LHCII formation corresponds to stage 2, the positioning of transmembrane helices, in the 2-

stage model proposed by Popot and Engelman (30) as a general folding scheme of α -helical membrane proteins. Stage 1 in this model is the faster formation of α -helices. In the case of LHCII protein folding, α -helix formation extends to later stages; this may be attributed to the unusually large number of more than 15 pigments as cofactors (31, 32) which make up roughly one third of the total mass of the final LHCII structure and clearly play a pivotal role in its formation. Folding analysis by DEER gives a view on the structural behavior of individual protein domains and thus opens up the possibility to analyze how individual groups of pigments modulate the folding procedure. In combination with time-resolved ESEEM measurements of singly spin-labeled domains as well as reconstitution studies using various pigment stoichiometries, DEER has the capability to resolve the assembly process of LHCII *in vitro* in a detailed manner. Furthermore, if spin label positions and measurement conditions are carefully chosen, the analysis of structural changes by DEER may become sensitive enough as to study the folding of LHCII protein or other proteins in an environment more similar to their native ones such as lipid vesicles, the thylakoid, or other biological membranes.

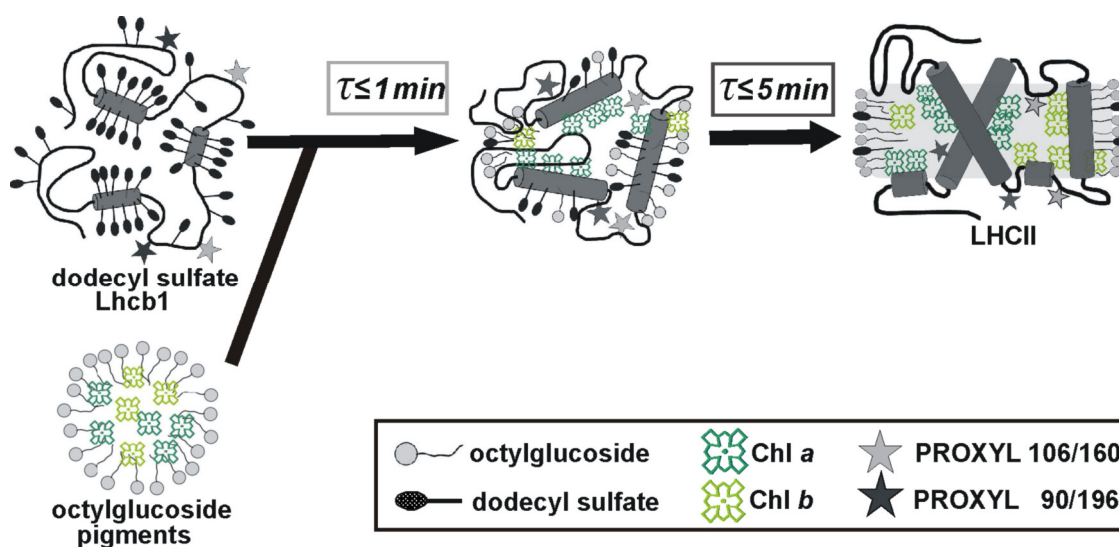


Fig. 5. Proposed folding model for LHCII *in vitro*. After mixing the LDS-denatured spin-labeled Lhcb1 with pigments, DEER revealed a folding process with two apparent phases in the range of less than 1 min and several min. Formation of secondary and tertiary structure are assigned to the first and second phase, respectively, both triggered by cofactor binding.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Hans Wolfgang Spiess for providing access to a pulsed EPR spectrometer and Götz Grundmann for performing time-resolved fluorescence measurements. This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB 625/TP B10 (to G.J. and H.P.) and by SNF grant 200021_121579 (to Y.P.).

REFERENCES

1. Matile P, Hörtensteiner S, Thomas H, Kräutler B (1996) Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiol* 112:1403-1409.
2. Standfuss J, Terwisscha van Scheltinga AC, Lamborghini M, Kühlbrandt W (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J* 24:919-928.
3. Paulsen H, Rüdiger 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.
4. Plumley, FG, Schmidt GW (1987) Reconstitution of chlorophyll *a/b* light-harvesting complexes: Xanthophyll-dependent assembly and energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:146-150.
5. Booth PJ, Paulsen H (1996) Assembly of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex in vitro. Time-resolved fluorescence measurements. *Biochemistry* 35:5103-5108.
6. Reinsberg D, Ottmann K, Booth PJ, Paulsen H (2001) Effects of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and xanthophylls on the in vitro assembly kinetics of the major light harvesting chlorophyll *a/b* complex, LHCIIb. *J Mol Biol* 308:59-67.
7. Horn R, Paulsen H (2004) Early steps in the assembly of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *J Biol Chem* 279:44400-44406.
8. Horn R, Grundmann G, Paulsen H (2007) Consecutive binding of chlorophylls *a* and *b* during the assembly in vitro of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein (LHCIIb). *J Mol Biol* 366:1045-1054.
9. Horn R, Paulsen H (2002) Folding in vitro of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein is coupled with pigment binding. *J Mol Biol* 318: 547-556.
10. Pannier M, Veit S, Godt A, Jeschke G, Spiess HW (2000) Dead-time free measurement of dipole-dipole interactions between electron spins. *J Magn Reso* 142:331-40.
11. Jeschke G, Polyhach Y (2007) Distance measurements on spin-labelled biomacromolecules by pulsed electron paramagnetic resonance. *Phys Chem Chem Phys* 9: 1895-1910.
12. Jeschke G, *et al.* (2005) Localization of the N-terminal domain in light-harvesting chlorophyll *a/b* protein by EPR measurements. *J Biol Chem* 280:18623-18630.
13. Hilger D, Polyhach Y, Jung H, Jeschke G (2009) Backbone structure of transmembrane domain IX of the Na⁺/Proline Transporter PutP of *Escherichia coli*. *Biophys J* 96:217-225.
14. Altenbach C, Kusnetzow AK, Ernst OP, Hofmann KP, Hubbell WL (2008) High-resolution distance mapping in rhodopsin reveals the pattern of helix movement due to activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:7439-7444.
15. Klein JC, *et al.* (2008) Actin-binding cleft closure in myosin II probed by site-directed spin labeling and pulsed EPR. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:12867-12872.
16. Volkov A, Dockter C, Bund T, Paulsen H, Jeschke G (2009) Pulsed EPR determination of water accessibility to spin-labeled amino acid residues in LHCIIb. *Biophys J* 96:1124-1141.

17. Farahbakhsh ZT, Hideg K, Hubbell WL (1993) Photoactivated conformational changes in rhodopsin: A time-resolved spin label study. *Science* 262:1416-1419.
18. Shin YK, Levinthal C, Levinthal F, Hubbell WL (1993) Colicin E1 binding to membranes: Time-resolved studies of spin-labeled mutants. *Science* 259:960-963.
19. Steinhoff HJ, *et al.* (1994) Time-resolved detection of structural changes during the photocycle of spin-labeled bacteriorhodopsin. *Science* 266:105-107.
20. DeWeerd K, Grigoryants V, Sun Y, Fetrow JS, Scholes CP (2001) EPR-detected folding kinetics of externally located cysteine-directed spin-labeled mutants of iso-1-cytochrome *c*. *Biochemistry* 40:15846-15855.
21. Cashmore AR (1984). Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a chlorophyll *a/b*-binding polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2960-2964.
22. Paulsen H, Finkenzeller B, Kühlein N (1993) Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur J Biochem* 215:809-816.
23. Jeschke G, *et al.* (2006) DeerAnalysis2006- A Comprehensive Software Package for Analyzing Pulsed ELDOR Data. *Appl Magn Reson* 30:473-498.
24. 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* 267:616-24.
25. Reinsberg D, Booth PJ, Jegerschoeld C, Khoo BJ, Paulsen H (2000) Folding, assembly, and stability of the major light-harvesting complex of higher plants, LHCII, in the presence of native lipids. *Biochemistry* 39:14305-14313.
26. 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.
27. Ibel K, *et al.* (1994) Structure of dodecyl sulfate-protein complexes at subsaturating concentrations of free detergent. *Biophys Chem* 53:77-84.
28. Booth PJ, Curnow P (2006) Membrane proteins shape up: understanding in vitro folding. *Curr Opin Struct Biol* 16:480-488.
29. Yang C, Horn R, Paulsen H (2003) The light-harvesting chlorophyll *a/b* complex can be reconstituted in vitro from its completely unfolded apoprotein. *Biochemistry* 42:4527-4533.
30. Popot JL, Engelman DM (1990) Membrane protein folding and oligomerization: The two-stage model. *Biochemistry* 29:4031-4037.
31. Popot JL, Engelman DM (2000) Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu Rev Biochem* 69:881-922.
32. Engelman DM, *et al.* (2003) Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Letters* 555:122-125.

SUPPORTING INFORMATION

SI TEXT

Site-directed spin labeling (SDSL) of LHCII.

The spin label used in SDSL was PROXYL, which we found advantageous compared to TEMPO used earlier (1). Besides their smaller size with lower internal dynamics, their chemical stability was higher, particularly towards low pH and reductants. TEMPO spin labels reacted quite sensitive towards chemicals such as trichloroacetic acid, DTT or β -mercaptoethanol (β -Me). The latter are thought to reduce the paramagnetic nitroxyl group to the nonparamagnetic hydroxylamine form (2-4). As reductants are an essential component in the reconstitution of Lhcb1, the use of PROXYL was preferable, yielding an acceptable signal-to-noise ratio at lower protein concentrations.

The efficiency of spin labeling was quantified by subsequent fluorescence labeling with a 50-fold molar excess of BODIPY 507/545 IA [N-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-2-yl)iodoacetamide] as described previously (1) and found to be higher than 90% for mutants containing a singular Cys, indicating that more than 80% of the mutants used for distance measurements carried two labels (not shown). An Lhcb1 mutant possessing no Cys did not give any EPR signal after the spin labeling reaction (not shown) indicating that labels were specifically attached to sulfhydryl groups.

The labeled apoproteins were reconstituted with pigments according to the standard procedure as described in (5) with the exception that 10 mM β -Me was used as reductant. Purification of LHCII and preparation of EPR samples are described in (1). Purified complexes were compared to those reconstituted with the non-labeled WT protein. Neither CD spectra in the visible range nor the intramolecular energy transfer from chlorophyll (Chl) *b* to Chl *a* (6) showed any difference between the two, demonstrating that spin labeling did not affect the structure or function of LHCII (not shown).

Folding and characterisation of recombinant spin-labeled LHCII using a modified reconstitution protocol for EPR kinetic measurements.

For measuring the kinetics of Lhcb1 folding by time-resolved EPR measurements (mutants 106/160 and 90/196) we used the well-established reconstitution in vitro of LHCII from its protein and pigment compounds. However, in order to meet the demands of required spin label concentrations for a good signal-to-noise ratio in EPR (7), the reconstitution procedure had to be modified substantially, raising protein and pigment concentrations by a factor of 20 as compared to earlier time-resolved fluorescence measurements of LHCII assembly (8). A ternary mixture of detergents was necessary to avoid Chl aggregation during the experiments.

Pigments were extracted as described in (9) except that the extraction step with diethyl ether was omitted. Freeze-dried pigments [threefold molar excess of total Chl

over protein] were dissolved in ethanol (20 mg/ml) and mixed by vortex with reconstitution buffer 1 containing 100 mM lithium borate (pH 8.1), 12.5% (w/v) sucrose, 6% (w/v) n-octyl- β -D-glucoside (OG), 1% (v/v) Triton X-100 (Tx-100), 0.26% (w/v) 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol (PG), 0.02% (w/v) deoxycholic acid and 10 mM β -Me. The protein solution contained 160 μ M spin-labeled Lhcb1 and 1% (w/v) lithium dodecyl sulfate (LDS) in reconstitution buffer 2 [10 mM β -Me, 100 mM lithium borate (pH 8.1) and 12.5% (w/v) sucrose].

Reconstitution was initiated by manually mixing the protein and pigment solutions at a ratio of 1:1 in a 1.5 ml reaction tube by using a vortex mixer at room temperature ("reconstitution for EPR measurements"). After the reaction times given the samples were mixed at a 1:1 volume ratio with 80% glycerol as a cryoprotectant immediately before loading them to EPR tubes and were flash-frozen in liquid nitrogen. This manual freeze-quench procedure took (10 ± 1) s. Each data point in the EPR-kinetic measurements represents an independently mixed protein sample exhibiting a final protein concentration of about 40 μ M LHCII. To check that all labeled versions of the various Lhcb1 mutants had folded into a functional structure, 50 μ l of the EPR sample of each mutant were diluted with 100 mM lithium borate (pH 8.1, 100 μ l) lacking sucrose and concentrated at 3000 g in a 30 kDa Centricon filter unit (Millipore) at 4°C. After repeating this step twice, samples were purified via ultracentrifugation as reported before (1) to compare them with complexes reconstituted by standard reconstitution procedure that have lower protein and pigment concentrations. Fluorescence emission spectroscopy (6) and CD spectroscopy in the visible domain (10) were performed as described elsewhere.

As shown for spin-labeled mutant 106/160 in Fig. S5 the complexes folded via the modified method exhibited the expected separation into free pigment (FP), folded protein-pigment complexes (LHCII) and aggregated Chls (aChls).

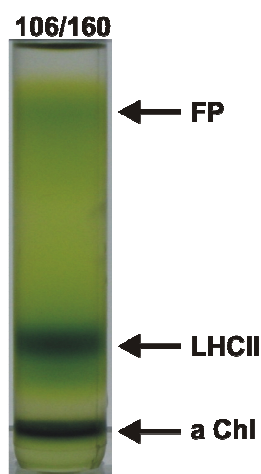


Fig. S5. Purification of reconstituted LHCII mutant 106/160 via sucrose gradient ultracentrifugation. After centrifugation in a Beckman SW 60 Ti rotor for 17h at 230000 x g and at 4°C, three bands were distinguished. FP is free pigment, aChl are aggregated Chls and LHCII is reconstituted and spin-labeled LHCII.

The isolated monomeric LHCII complexes were checked for their functionality measuring the molecular energy transfer from Chl *b* to Chl *a* and for their correct assembly using CD spectroscopy in the visible range (Fig. S6, trace b). The CD showed the characteristic "fingerprint" signals of native LHCII or recombinant LHCII containing the WT protein sequence reconstituted according to the standard protocol (Fig. S6, trace a) indicating the pigments to be correctly arranged in the complexes.

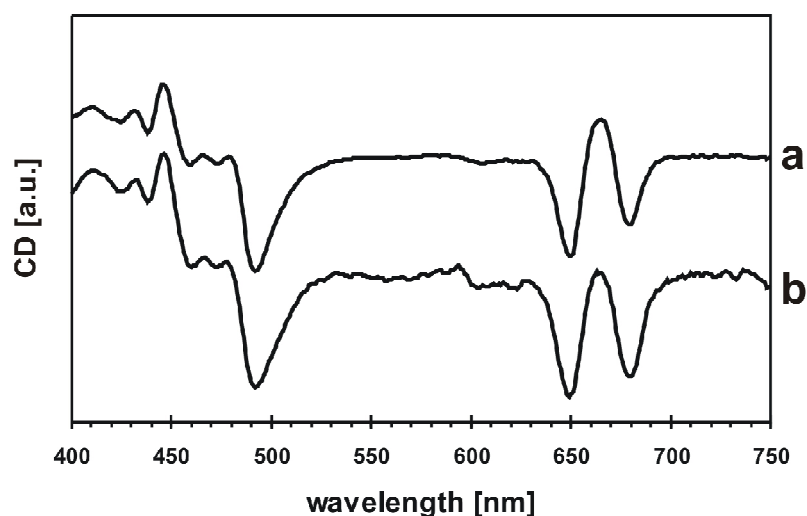


Fig. S6. CD spectra of LHCII after purification via sucrose gradient ultracentrifugation, (a) non-labeled LHCII apoprotein (WT protein sequence) reconstituted by standard reconstitution and (b) spin-labeled mutant 106/160 reconstituted for kinetic measurements (reconstitution for EPR measurements).

Spin-labeled LHCII was further characterized by comparing the DEER dipolar spectra (Fig. S4) of isolated monomeric complexes reconstituted by the standard method with non-isolated complexes folded by the new, modified method for EPR measurements. As shown for the mutants 106/160 (Fig. S4A) and 90/196 (Fig. S4B), the different reconstitution procedures yield identical folding products.

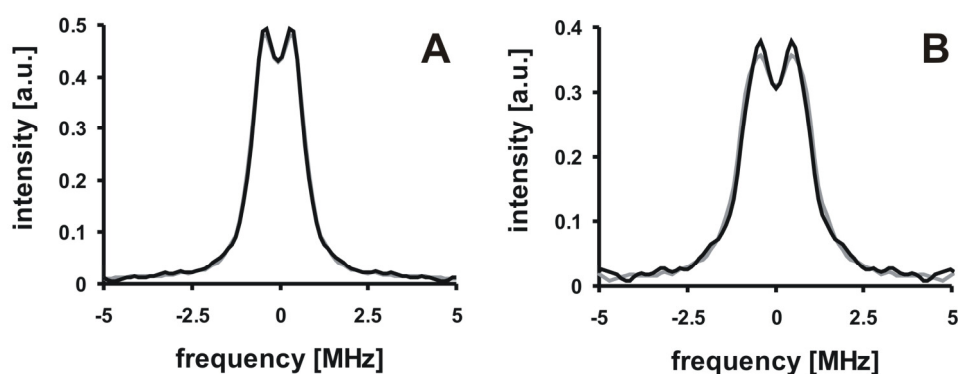


Fig. S4. Comparison of DEER dipolar spectra of the spin-labeled LHCII mutants 106/160 (A) and 90/196 (B) reconstituted by different protocols. Gray traces are monomeric LHCII samples reconstituted by the standard procedure and purified by ultracentrifugation, black traces are monomeric LHCII samples reconstituted by the protocol for EPR measurements without purification (approximately 930 s folding time). Spectra were scanned with a dipolar evolution time of 2500 ns, the background correction time for A and B was 320 ns and 224 ns, respectively.

Time-resolved fluorescence measurements using the modified reconstitution protocol for EPR measurements.

Although the modified reconstitution procedure for EPR measurements yields the same complexes, the kinetics of complex formation by the new and the standard reconstitution procedure still had to be compared. In this experiment an acceptor fluorophore (DY731, Dyomics) was covalently attached to a single Cys in the stromal loop domain in LHCII (mutant 160, single Ser replaced by Cys) and time-resolved fluorescence measurements were performed according to Horn *et al.* (9) using excitation and emission wavelengths of 470 nm and 759 nm, respectively.

Purified dye-labeled LHCII exhibited a high Förster-type energy transfer efficiency showing that both Chl *a* and *b* are energy donors to the attached fluorophore. Measurements of the energy transfer during LHCII assembly resulted in an increase of the acceptor dye's fluorescence emission due to Chl binding in dependency on the folding time. The data revealed two apparent kinetic phases for the binding of the pigments (Table S1, standard reconstitution), a faster one (τ_1) in the range of seconds to 1 min and a slower one (τ_2) in the range of several minutes. This experiment was repeated (Fig. S7) by using the reconstitution protocol for EPR measurements with high protein and pigment concentrations.

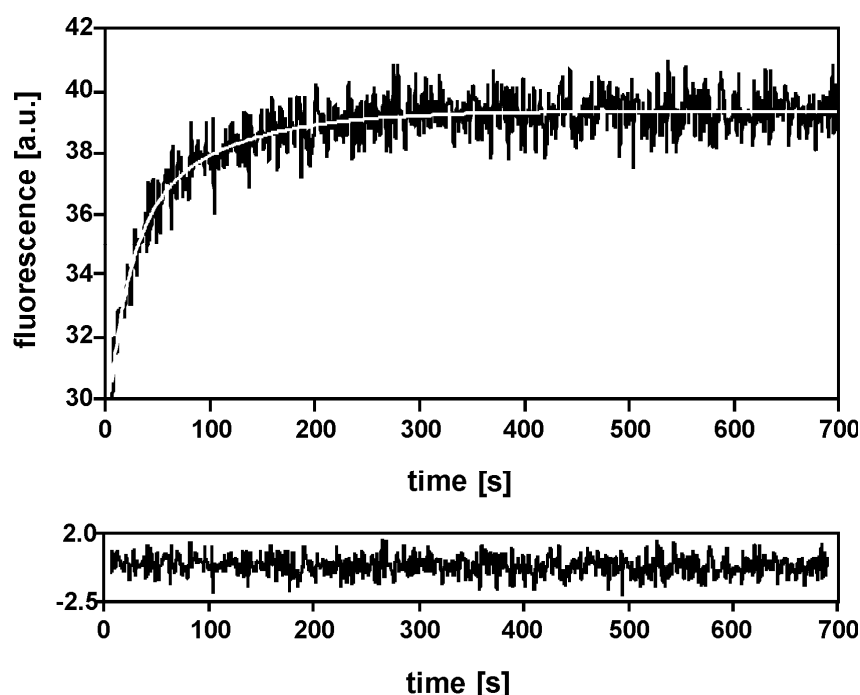


Fig. S7. Folding of LHCII as monitored by the rise of Chl-stimulated acceptor dye (DY731) fluorescence at 759 nm. Reconstitution was performed by using the EPR reconstitution procedure. The white line in the trace represents the biexponential fit in Table S1 (EPR reconstitution). Residuals, i.e. kinetic trace minus fitted curve, are given in the lower panel.

The analysis of this kinetic trace yielded two time constants of about 26 s (τ_1) and 178 s (τ_2) as shown in Table S1. Both apparent reaction phases are somewhat faster than seen in the earlier measurements, as is expected because of the higher concentrations of reactants (11). This shows that the modified reconstitution procedure does not substantially alter the kinetics of LHCII assembly as compared to the standard procedure.

Table S1. Kinetic data extracted from time-resolved fluorescence measurements of LHCII assembly. Standard reconstitution is described in (9).

Experiments	Conc. ^a	τ_1 (s) \pm SD ^b	τ_2 (s) \pm SD	A1/A2 \pm SD
standard reconstitution	3.9 μ M	41 \pm 9	260 \pm 53	0.9 \pm 0.08
EPR reconstitution	78 μ M	26 \pm 11	178 \pm 114	3.1 \pm 1.84

^a Protein concentration after reconstitution.
^b SD, standard deviation.

Rapid freeze-quench of samples for DEER experiments.

Samples were prepared by a two-step mixing of LDS-denatured apoprotein first with the pigment solution and then with 80% glycerol as a cryoprotectant. An Update Instrument System 1000 rapid mixer (Update Instruments Inc, Wisconsin, MA, USA) with four independent syringe shafts was used for this purpose. Three syringes were filled with apoprotein solution, pigment solution, and 80% glycerol as a cryoprotectant. The protein and pigment solutions were combined in a first grid mixer and this mixture was then combined with glycerol in a second grid mixer. All tubes connecting the syringe outlets and grid mixers were kept as short as possible to avoid unnecessary dead volume. From the output of the second mixer the solution was sprayed onto a brass funnel cooled with liquid nitrogen. A dry nitrogen gas stream was directed to the funnel parallel to the mixture to stop recoiling sample droplets and lead them back to the funnel. This stream also minimized water condensation on the funnel and the sample particles. Sample particles were transferred to the sample tube by manually scraping them from the brass surface into an EPR tube attached to the lower end of the funnel.

In a control experiment, the protein/pigment mixture was extracted from the outlet of the first mixer before glycerol addition, was allowed to fold for 30 min in the dark, and the extent of folding was checked by denaturing LDS-PAGE (vide infra).

Check of samples for correct protein folding using partially denaturing LDS-PAGE, ESE EPR and T_2 relaxation measurements.

Kinetic EPR experiments with shorter folding times yielded only partially assembled LHCII. To verify that all these samples had the same competence for folding and resulted in the same fraction of unfolded protein, an aliquot was taken from each EPR sample at the end of the reaction time, before adding glycerol, and folding was completed for 30 min at room temperature. The aliquots were then run on a partially denaturing LDS-PAGE (12). Only samples that exhibited a strong green band of folded complex (Fig. S8A) and that displayed around 50% of folded LHCII after Coomassie Brilliant Blue-staining (Fig. S8B) were used for evaluating the EPR data. Hence, unfolded protein adds a constant offset to the high-frequency integral used in evaluating folding kinetics, so that the time-dependence is not influenced.

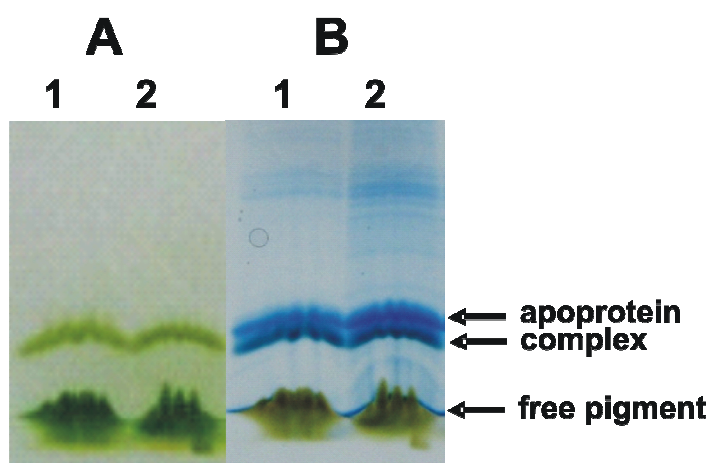


Fig. S8. PAGE analysis of reconstituted LHCII (reconstitution for EPR measurements). Partially denaturing LDS-PAGE on 10% polyacrylamide gel at 4°C and 80 V, (A) unstained, (B) Coomassie Brilliant Blue-stained. (1) Spin-labeled double mutant 106/160, (2) spin-labeled double mutant 90/196.

Samples that passed this first check were subjected to ESE EPR and T_2 relaxation measurements (13). EPR spectra were measured with field-swept echo detected EPR using a Hahn echo sequence $\pi/2-\tau-\pi-\tau$ -echo and a 15 mT field sweep. The inter-pulse delay time τ was 200 ns and the pulse lengths were 16 ns for $\pi/2$ pulse and 32 ns for π pulse and the integration gate length was 200 ns.

The effect of short distances in unfolded or partially folded LHCII on transverse relaxation time T_2 was estimated by instantaneous diffusion measurements using a two-pulse ESE sequence. The flip angle β of the second pulse was varied by reducing microwave power with the main attenuator, and phase memory times $T_m(\beta)$ were obtained by fitting exponentials to the ESE decays measured as a function of the inter-pulse delay. The slope of linear fits to plots of $1/T_m$ as a function of $\sin^2(\beta/2)$ is a measure for local spin concentration. A significant increase of $1/T_m$ with $\sin^2(\beta/2)$ thus indi-

icates either aggregation of spin-labeled molecules or a high prevalence of short intramolecular distances in a broad conformational ensemble of structures.

As shown in Fig. S3, aggregated Lhcb1 apoprotein (90/196) folded in mock reconstitutions lacking pigments (gray line), resulted in a characteristic ESE spectra showing only slight differences in the intensity of the major peak at 329 mT and the side peaks at 326 mT and at 332 mT. In comparison, LHCII folded by the reconstitution procedure for EPR measurements resulted in characteristic ESE spectra with a distinct major peak at 329 mT indicating that no protein aggregates were formed (Fig. S3, black line). At the same time such samples displayed relaxation times T_2 longer than 2000 ns (not shown) also indicating the absence of protein aggregates. Only samples that passed these criteria were used for time-resolved DEER measurements.

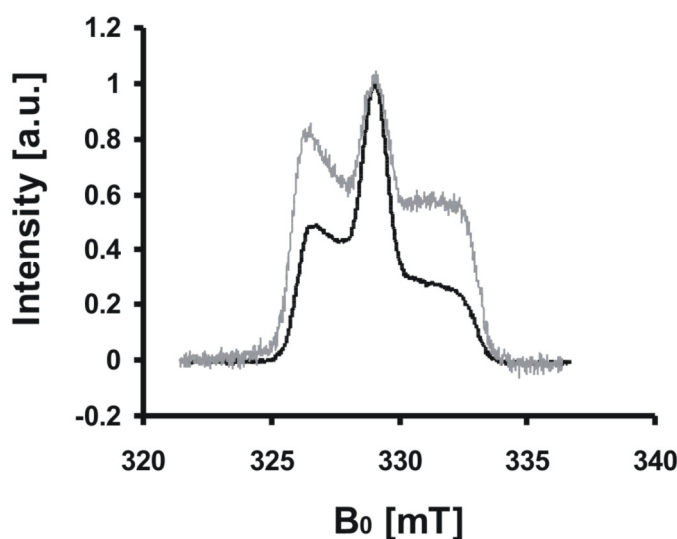


Fig. S3. ESE EPR spectra of two samples of the LHCII mutant 90/196. The black line represents folded complexes (reconstitution for EPR measurements); the gray line represents aggregated Lhcb1 apoprotein obtained by a mock reconstitution containing no pigments. Spectra are B_0 field-shifted and normalized on the intensity of the central peak.

Processing parameters in DEER data analysis.

For measurements with $\tau_2 = 1500$ ns, data after a maximum evolution time of 1400 ns were cut off. This cut-off time was set to 2400 ns for $\tau_2 = 2500$ ns and to 800 ns for the kinetic measurements with the unfolded protein in buffer 1.

A background function was fitted to the data at dipolar evolution times $t > t_b$. Starting time t_b was determined automatically as described in Jeschke *et al.* (14) and is given explicitly in the results section. For measurements with unfolded and completely folded samples experimental background functions were determined from data of mixtures of the two corresponding singly spin-labeled proteins by fitting a 5th order polynomial. For measurements with partially folded samples an exponential decay function corresponding to a three-dimensional homogeneous distribution of spins was used.

After background correction of the data the distance distribution was determined by Tikhonov regularization with a regularization parameter $\alpha=1000$, except for the folded double mutant 90/196, where $\alpha=1000$ lead to overdamping and $\alpha=100$ was used. Dipolar spectra were normalized to their integral.

SI REFERENCES

1. Jeschke G, *et al.* (2005) Localization of the N-terminal domain in light-harvesting chlorophyll *a/b* protein by EPR measurements. *J Biol Chem* 280:18623-18630.
2. Burmeister Getz E, Xiao M, Chakrabarty T, Cooke R, Selvin PR (1999) A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Anal Biochem* 273:73-80.
3. Shafer DE, Inman JK, 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.
4. Manda S, *et al.* (2007) Nitroxyl radicals: electrochemical redox behaviour and structure-activity relationships. *Org Biomol Chem* 5:3877-4024.
5. Paulsen H, Finkenzeller B, Kühlein N (1993) Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur J Biochem* 215:809-816.
6. 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* 267:616-24.
7. Jeschke G, Polyhach Y (2007) Distance measurements on spin-labelled biomacromolecules by pulsed electron paramagnetic resonance. *Phys Chem Chem Phys* 9: 1895-1910.
8. Horn R, Grundmann G, Paulsen H (2007) Consecutive binding of chlorophylls *a* and *b* during the assembly in vitro of light-harvesting chlorophyll-*a/b* protein (LHCIIb). *J Mol Biol* 366:1045-1054.
9. 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.
10. 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.
11. Reinsberg D, Booth PJ, Jegerschoeld C, Khoo BJ, Paulsen H (2000) Folding, assembly, and stability of the major light-harvesting complex of higher plants, LHCII, in the presence of native lipids. *Biochemistry* 39:14305-14313.
12. Mick V, Geister S, Paulsen H (2004) The folding state of the lumenal loop determines the thermal stability of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. *Biochemistry* 43:14704-14711.
13. Volkov A, Dockter C, Bund T, Paulsen H, Jeschke G (2009) Pulsed EPR determination of water accessibility to spin-labeled amino acid residues in LHCIIb *Biophys J* 96:1124-1141.
14. Jeschke G, *et al.* (2006) DeerAnalysis2006- A Comprehensive Software Package for Analyzing Pulsed ELDOR Data. *Appl Magn Reson* 30:473-498.

4 Diskussion

4.1 Strukturaufklärung an rekombinantem LHCII in Lösung mittels Puls-EPR-Spektroskopie

Die Strukturaufklärung von Membranproteinen erweist sich bis heute als schwierig. Gängige Methoden wie die Kristallographie scheitern oftmals an der schwierigen und langwierigen Präparation von Kristallen. Nachteil ist zudem das Unvermögen dieser Technik Proteindynamik nachzuweisen. In der NMR-Spektroskopie stellt entweder die wegen der mit einzubeziehenden Detergenzhülle meist erhebliche Größe von solubilisierten Membranproteinen oder die benötigte Proteinmenge ein Problem dar. Die eng verwandte EPR-Spektroskopie stellt eine alternative Technik zur Untersuchung von Proteinstrukturen in Lösung dar. Hauptvorteil der Methode gegenüber der NMR-Spektroskopie ist die höhere Empfindlichkeit und das geringe erforderliche Probenvolumen (Jeschke *et al.*, 2007). Die Methode des „site-directed spin labeling“ (SDSL), die das grundlegende Einbringen von Spinmarkern in diamagnetische Proteine gewährleistet, ist seit über 30 Jahren etabliert (Berliner, 1976; Altenbach *et al.*, 1989; Hubbell *et al.*, 1998) und konnte erfolgreich auf den rekombinanten LHCII übertragen werden (Bender, 2004). Durch Verbesserung der Mutagenese- und Markierungstechnik konnte eine große Zahl funktionaler, spinmarkierter Mutanten des monomeren und trimeren LHCII hergestellt (Kap. I) und EPR-spektroskopisch untersucht werden.

Der Vergleich der etablierten CW-EPR-Technik mit verschiedenen Puls-EPR-Techniken zur Bestimmung der Lösungsmittel-Zugänglichkeit einzelner Aminosäuren-Seitenreste von Membranproteinen wurde bereits ausführlich in Volkov *et al.* (2009) dargestellt und diskutiert. Identische Ergebnisse aus CW- und Puls-EPR-Messungen verifizierten insbesondere das enorme Potential von ESEEM-EPR zur Detektion lokaler Strukturinformation in Membranproteinen. Mit Ausnahme der luminalen Mutante 106 und einiger N-terminaler Mutanten (Müller, 2008) besaßen alle vermessenen Aminosäuren-Seitenreste des monomeren LHCII, solubilisiert in LM-Mizellen, die aus Kristalldaten erwartete Zugänglichkeit zum Lösungsmittel. Die in Barros & Kühlbrandt (2009) diskutierte rigide Struktur des LHCII-Kernbereichs ist gemäß diesen ESEEM-Daten auch für rekombinanten LHCII in Detergenzlösung gültig.

Durch Erstellung einer „Abstandskarte“ mittels DEER-EPR sollte dieses Ergebnis weiter untermauert werden. Das große Potential dieser Methode hinsichtlich der Aufklärung von Proteinstruktur konnte bereits vielfach verifiziert werden (Jeschke *et al.*, 2005; Altenbach *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2008; Jao *et al.*, 2008; Hilger *et al.*, 2009). Um zuvor ermittelte Abstandsdaten des rekombinanten LHCII in Lösung (Jeschke *et al.*, 2005) zu erweitern, wurden zunächst kristallographisch erfasste Domänen des mo-

nomeren LHCII in Detergenzlösung abstandsvermessen und mit einer optimierten, Kristallstruktur-basierten Rotamer-Datenbank verglichen (Polyhach, unveröffentlicht). Auch diese Messungen zeigten in rekombinanten Monomeren, solubilisiert in Detergenz, für den Kernbereich eine identische Struktur mit der in kristallinen Trimeren. Bedenkt man die extrem hohe Dichte an gebundenen Kofaktoren, peripher eingerahmt durch 3 transmembrane Helices, ist dies kaum anders zu erwarten. Laut Barros & Kühlbrandt (2009) ist dies aus dem Vergleich ermittelter Kristalldaten des LHCII aus Erbse (Standfuss *et al.*, 2005) mit denen aus Spinat (Liu *et al.*, 2004) ersichtlich. Die Überlagerung zeigt, dass beide Strukturmodelle für Position 14 bis 220 praktisch deckungsgleich sind, die „root mean square (rms) deviation“ liegt lediglich bei 0,4 Å, der größte detektierte Unterschied zwischen zwei identischen Atomen bei 1,2 Å. Insbesondere die zentralen Bereiche des LHCII, also die transmembranen Helices sowie die gebundenen Pigmente, zeigen in beiden Analysen identische Strukturen. Signifikante Abweichungen sind lediglich in membranoberflächen-exponierten Schleifenregionen zu finden. Gleiches gilt für die Berechnung des B-Faktors. Dieser kristallographische Temperatur-Faktor definiert die interne Flexibilität eines Proteins. Auch hier sind zentrale Bereiche des LHCII rigide, Schleifenregionen, die ins umliegende Lösungsmittel ragen, etwas flexibler.

Neben diesem Ergebnis zeigte der Vergleich der DEER-Daten mit Abstandsverteilungen der Kristallstruktur-basierten Rotamer-Datenbank zudem das Auftreten von Abstandsartefakten, die nicht mit der Kristallstruktur zu vereinbaren sind. Dass es sich bei den meist deutlich zu kurzen oder deutlich zu langen Abständen um eine Strukturänderungen innerhalb des Kernbereichs handelt, ist wie zuvor diskutiert eher unwahrscheinlich. Die Auswertung der primären DEER-Daten durch Prof. Dr. G. Jeschke und Dr. A. Volkov zeigte, dass solche LHCII-Proben bei Verringerung der Modulationstiefe ähnliche Modulationen wie Trimere entsprechender Einzelmutanten besitzen. Zudem war es möglich, durch Anwendung einer experimentellen Hintergrundkorrektur, solche Nebenmaxima deutlich zu reduzieren, während Hauptmaxima wenig beeinflusst wurden (Volkov, 2008). Auffällig war zudem die verstärkte Detektion solcher Nebenmaxima in „monomeren“ LHCII-Proben, trimere Proben zeigten dieses Problem nicht. Diese Befunde müssen als starker Hinweis auf eine Verunreinigung monomerer Proben mit nachträglich trimerisiertem LHCII gewertet werden. Untersuchungen von Bender (2004) zeigten, dass aufgereinigte, monomere LHCII-Proben während der Aufkonzentration in Filtereinheiten zu geschätzten 5 bis 10 % trimerisieren können (was 1,65 % bis 3,3 % an Trimeren entspricht). Dieses Ergebnis konnte durch CD-spektroskopische Untersuchung einzelner Proben zu Beginn der Dissertation zunächst nicht bestätigt werden. Wie in Bender zudem argumentiert wurde, wäre das durch die geringe Zahl der Trimere entstehende Signal vernachlässigbar klein und würde demnach im Hintergrund-Rauschen verloren gehen.

Dass diese Argumentation allerdings nicht allgemein gültig ist, soll am Beispiel der Mutante 90/123 gezeigt werden. Die entsprechende „monomere“ Probe zeigt in der DEER-Abstandsverteilung (Abb. 3.3.7) neben dem erwarteten Hauptmaximum um 3,45 nm noch ein Nebenmaximum um 5 nm. Letzteres Maximum ist identisch zu DEER-Daten der Trimere 123 und somit ein recht sicheres Indiz für eine Trimer-Verunreinigung. Insgesamt können in einer angenommenen Mischprobe aus zweifach markierten Monomeren und homogen sechsfach markierten Trimeren der Mutante 90/123 fünf unterschiedliche Abstandskombinationen erwartet werden. Neben dem intramolekularen Abstand von 3,45 nm, sind intermolekulare C_{α} -Abständen von ca. 4 und 5 sowie zweimal 6 nm möglich. Diese „Artefakt“-Abstände wären also nicht breit verteilt, sondern würden zu einem Nebenmaximum langer Abstände addiert werden, was an folgendem Rechenbeispiel kurz dargelegt werden soll. Man nehme eine vollständig spinmarkierte Probe an, die 3,3 % Trimere enthält (was umgekehrt 96,7 % Monomerabstände bedeutet, da sowohl Monomere als auch Trimere den intramolekularen Abstand zeigen). Diese intramolekularen Abstände ergeben eine Modulationstiefe von $0,967 \cdot 0,4$ (entspricht 0,387), wobei 0,4 die Modulationstiefe für einen benachbarten Spin ist. Im Trimer sieht der Spinmarker nicht einen Nachbarn, sondern fünf. Die Modulationstiefe ist dann $1 - (1 - 0,4)^5$, was einem Wert von 0,92 entspricht. Wenn alle Abstände im beobachtbaren Bereich zwischen 2 und 6 nm liegen, ergibt dies einen Beitrag von $0,033 \cdot 0,92$ (entspricht 0,0304) zur Modulationstiefe. Damit stammen 92,7 % des Signals aus dem Monomer, 7,3 % aus dem Trimer (G. Jeschke, schriftliche Mitteilung). Sind die intermolekularen Abstände wie im gewählten Beispiel (Mutante 90/123) einander ähnlich, ist also die Entstehung signifikanter Nebenmaxima möglich.

Die Detektion solcher Störsignale bestätigt auf der einen Seite die hohe Empfindlichkeit der Methode, andererseits wird die Wertigkeit der ermittelten DEER-Daten von LHCII-Monomeren verringert, da im Nachhinein nicht mehr geprüft werden kann, wie stark der Grad der Verunreinigung einzelner Proben war. Dies gilt insbesondere für kristallographisch nicht erfasste Markierungspositionen, wie später diskutiert werden soll. Zwar ist es bis zu einem gewissen Grad möglich mittels experimenteller Hintergrund-Korrektur Artefakt-Abstände von realen Abstandsdaten zu trennen (Volkov, 2008), in Zukunft sollte aber versucht werden, die nachträgliche Trimerisierung in der Proben-Präparation von Beginn an zu vermeiden. Hierzu sollte untersucht werden, ob das Phospholipid PG, welches im nativen Totalpigmentextrakt in der Rekonstitution zu variierenden Konzentrationen enthalten ist, Einfluss auf den Grad der Trimerbildung hat. Ein guter Ansatz wäre sicherlich die Rekonstitution mit lipidfreien Einzelpigmenten, wegen des hohen Pigmentverbrauchs in EPR-Präparationen stellt dies auf Dauer aufgrund des erheblichen Arbeitsaufwandes keine Lösung dar. Weniger arbeitsintensiv wäre der Verdau des PG in der Rekonstitutionslösung durch Inkubation mit Phospholipase A2 (Nussberger *et al.*, 1993) mit nachfolgender Aufreinigung durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vorgestellten Puls-EPR-Methoden sich hervorragend zur Untersuchung der Struktur von Membranproteinen in Lösung eignen. Während die Stärke der ESEEM-Spektroskopie in der Detektion der lokalen Wasserzugänglichkeit liegt, ermöglicht DEER-EPR die Erstellung von Domänen- „Abstandskarten“. Monomere LHCII-Proben in Detergenzlösung zeigen in Puls-EPR-Messreihen, dass der membranständige Kernbereich der transmembranen Helices identisch zur Kristallstruktur nativer Trimere ist. Durch die tertiäre Struktur des Helixkreuzes und durch die Bindung zahlreicher Kofaktoren in diesem Bereich war dies zu erwarten (Barros & Kühlbrandt, 2009). In weiterführenden Versuchsreihen sollte die ungewollte Trimerisierung in monomeren Proben verhindert werden. So kann das Potential der DEER-Spektroskopie, welche durch ihre hohe Empfindlichkeit selbst Präparationsartefakte detektiert, besser genutzt und ermittelte Daten bezüglich der LHCII-Struktur verifiziert werden. In diesem Zusammenhang wären zudem Versuche mit heterogen markierten Trimeren (Kap. II) sinnvoll, um zum einen den direkten Vergleich zwischen Monomer und Trimer in Detergenz-Mizelle und zum anderen zu kristallinen Trimeren anstellen zu können.

4.2 Strukturodynamik der luminalen Schleifenregion in rekombinantem LHCII

Puls-EPR-spektroskopische Messungen belegen, dass rekombinanter LHCII im Kernbereich eine identische Struktur zu kristallinem LHCII besitzt. Inwiefern dieser Kernbereich des LHCII Strukturodynamik zeigen kann, ist umstritten und wird derzeit kontrovers diskutiert (Liu *et al.*, 2004; Standfuss *et al.*, 2005; Ruban *et al.*, 2007; Barros & Kühlbrandt, 2009). Da der zentrale Bereich von den transmembranen Helices gebildet und äußerst dicht mit Pigmenten besetzt ist, bleibt hier eine Strukturflexibilität fraglich. Wahrscheinlicher wäre eine Strukturänderung des Proteinerückgrates in Schleifenregionen, wie aus dem Vergleich der Kristallstrukturen hervorgeht (Barros & Kühlbrandt, 2009). Abschnitte stromaler oder luminaler Schleifenregionen ragen zudem in das Lösungsmittel (Liu *et al.*, 2004), wodurch sie zugänglich sind für physiologische Vorgänge wie beispielsweise die Veränderung des pH-Wertes (Yang *et al.*, 2008). Ein direkter Nachweis einer Strukturänderung existiert bis dato jedoch nicht.

Einen möglichen Hinweis auf Strukturodynamik im LHCII bietet die CD-Spektroskopie in der Soret-Region. Während rekombinante Trimere, solubilisiert in LM, ein signifikantes Minimum bei 473 nm zeigen, ist dies in rekombinantem Monomer (in LM) nicht ausgeprägt (Hobe *et al.*, 1994). Ähnliche Effekte können auch durch Variation des Neoxanthin-Gehalts (Hobe *et al.*, 2006), durch Veränderungen im Peptidrückgrat zwischen Position 106 und 123 (Christian, 2008; Dietz, 2008; Liu *et al.*, 2008) sowie durch Wechsel des Detergenz zu α -DM (Georgakopoulou *et al.*, 2007) oder TX (Boggasch, 2006) detektiert werden. Letzterem Anhaltspunkt folgend wurden spinmar-

kierte Monomere und Trimere des rekombinanten LHCII in den Detergenzien LM oder TX solubilisiert und mittels DEER-EPR abstandsvermessen.

Der Vergleich der Abstandsdaten des LHCII in unterschiedlichen Detergenz-Mizellen lieferte innerhalb des Kernbereichs keine signifikanten Strukturunterschiede, auch in TX-Mizellen scheint der Kernbereich des monomeren LHCII baugleich zu dem der kristallinen Trimere (Kap. III, 4.1) zu sein. Wie zuvor diskutiert, sind auch in TX neben den erwarteten Hauptmaxima teilweise deutliche Nebenmaxima zu detektieren. Diese sind in einzelnen Proben unterschiedlich stark ausgeprägt, zeigen aber stets identische Abstände zu LM-Proben und deuten auf die Verunreinigung mit nachgebildeten Trimeren hin. Dieses Problem erschwert erneut die Interpretation der Ergebnisse. Ohne das Wissen über den Grad der Verunreinigung erhält die nachfolgende Diskussion spekulativen Charakter, eine gesicherte Interpretation ist nur durch weitere Versuchsreihen möglich. Auffällig ist zweifellos die variable Intensität der detektierten Nebenmaxima unabhängig vom verwendeten Detergenz, was gegen eine bevorzugte Oligomerisierung in einem der Detergenzien spricht. In TX-solubilisierter Mutante 90/123 (Abb. 3.3.9 A) beispielsweise nehmen die Intensitäten der Nebenmaxima im Vergleich zum Hauptmaximum (3,45 nm) deutlich zu, was mit einer Erhöhung des Oligomerisierungsgrades gleichzusetzen ist. Umgekehrt bestätigt dies die Annahme, dass es sich bei den Abständen um 3,45 nm, die in ihrer Häufigkeit nicht zunehmen, um die intramolekulare Spin-Spin-Distanz handelt.

Insbesondere diese lumenale Mutante liefert weitere interessante Erkenntnisse. Wie zuvor angesprochen, zeigt Mutante 90/123 eine deutliche Abweichung der gemessenen zu theoretisch erwarteten Abständen. Ähnliches kann für die Trimere der Position 123 detektiert werden. Die ermittelten Abstände sind signifikant kürzer als in der Rotamer-Simulation erwartet, in LM sind Abstände zudem breit verteilt, in TX dagegen ausgesprochen schmal. Dies deutet auf eine gewisse Variabilität der Position 123 hin, wie in Abb. 3.4.1 schematisch dargestellt ist. Die lumenale LHCII-Aufsicht zeigt die Positionen 90, 123 und 196 eines Monomers sowie alle Positionen 123 des Trimers rot markiert. Der orange-farbene Kreis stellt schematisch das Hauptmaximum der DEER-Abstandsverteilung der Trimere 123 dar, der Kreisradius wurde entsprechend aus der Abstandsverteilung berechnet (Triangulation). Unterschiedlich zu den Markierungspositionen in der Kristallstruktur müssen in rekombinantem LHCII die drei Spinmarkierungen auf dieser Kreisbahn (symmetrisch verteilt) liegen. Die Abstandsdaten der Monomere 90/123 (blauer Halbkreis ausgehend von Position 90) sind etwas länger als erwartet, die der Monomere 123/196 (grüner Halbkreis ausgehend von Position 196) entsprechen der theoretischen Erwartung. Grundvoraussetzung für diese Art der Darstellung ist die rigide Lage der Positionen 90 und 196, was durch die schmale Abstandsverteilung der entsprechenden Doppelmutante anzunehmen (Abb. 3.3.6) und durch den schwarzen Balken gekennzeichnet ist. Weiterhin gilt zu beachten, dass es sich lediglich um eine schematische, zweidimensionale Abbildung handelt. Zwar liegen

alle Spinmarker etwa in gleicher Ebene (196 liegt etwas tiefer innerhalb der Membran; Standfuss *et al.*, 2005), eine sphärische Abbildung oder Modellierung wäre aber in jedem Fall genauer.

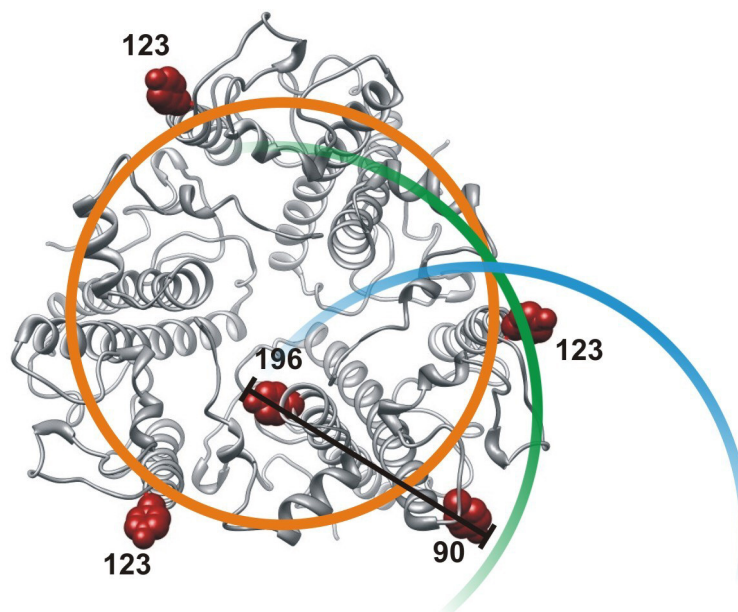


Abb. 3.4.1: DEER-spektroskopische Analyse der lumenalen Schleifenregion. Das Peptidrückgrat ist grau in lumenaler Aufsicht dargestellt (PDB-Eintrag 2BHW), die Positionen der Aminosäure 123 im Trimer sowie 90 und 196 im Monomer sind dunkelrot hervorgehoben. Die Abbildung wurde mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004). Der orange-farbene Kreis markiert das Maximum der DEER-Abstandsverteilung im Trimer 123, der schwarze Balken das Maximum der signifikant schmalen Abstandsverteilung 90/196. Der Radius des blauen Halbkreises entspricht dem Hauptmaximum der Abstandsverteilung 90/123 mit Position 90 als Mittelpunkt, der grüne Halbkreis entsprechend 123/196 mit 196 als Mittelpunkt.

Trotz der vereinfachten Darstellung ist ersichtlich, dass die Lage des Nitroxidmarkers der Detergenz-solubilierten Probe gegenüber der Kristallstruktur in Richtung des C-Terminus des gegenüberliegenden Monomers versetzt liegen muss (Schnittpunkt der Kreisbahnen) und damit auf eine Strukturänderung hindeutet. Tatsache ist zudem, dass ausgerechnet diese Region in der Überlagerung der bekannten Kristalldaten in ihrer Struktur leicht voneinander abweicht, gekennzeichnet durch eine entsprechend höhere „rms deviation“ (Barros & Kühlbrandt, 2009). Wichtig ist hierbei zu erwähnen, dass der leichte Strukturunterschied in den Kristallen aber in der Bindung des peripheren DGDG in Liu *et al.* (2004) begründet sein kann. Außerdem gilt zu bedenken, dass beide Strukturmodelle (Liu *et al.*, 2004; Standfuss *et al.*, 2005) anhand nativer LHCII-Proben erstellt wurden. Wie zuvor beschrieben, sind native LHCII-Trimere heterogen aus den Genprodukten Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 aufgebaut, welche in ihrer Aminosäuresequenz, insbesondere innerhalb der lumenalen Schleife, voneinander abweichen und dadurch eine höhere „rms deviation“ bewirken können. Inwiefern der hier detektier-

te Unterschied der Strukturdaten des rekombinanten zu kristallinem LHCII Grundlage einer physiologischen Reaktion sein kann oder ob es sich hierbei um ein Artefakt der Probenpräparation handelt, darüber kann im Folgenden lediglich spekuliert werden.

Mögliche physiologische Strukturänderungen des LHCII werden derzeit vor allem im Zusammenhang mit dem Prozess des „non photochemical quenching“ (NPQ) genannt. Einer Hypothese von Pascal *et al.* (2005) zufolge ist die Bildung von Chl-Dimeren innerhalb des monomeren LHCII ein Möglichkeit, Energie effizient als Wärme zu dissipieren. Bezogen auf seiner Sterik zählt das Chl *b*-Pärchen Chl10 und Chl13 (Abb. 3.4.2) zu möglichen Kandidaten für diesen Prozess, der zur Wahrung einer effizienten Photosynthese physiologisch genau reguliert sein muss. Diese beiden Chl *b*-Moleküle eignen sich energetisch zwar weniger gut zur Energie-Dissipation als Chl *a*-Moleküle, zeichnen sich aber durch ihre Lage aus. In der trimeren Kristallstruktur sind sie in räumlicher Nähe zur lumenalen Schleife H2 des Monomer A sowie zum C-Terminus des Monomer B positioniert und werden zudem von DGDG und Neoxanthin (nicht dargestellt) eingerahmt. Wie für effizientes NPQ gefordert, liegen beide Chlorophylle dicht zusammen (Novoderezhkin *et al.*, 2005), die Distanz zwischen der Formylgruppe des Chl13 zum Tetrapyrrol des Chl10 in der Kristallstruktur des Erbsen-LHCII (3,8 Å; Standfuss *et al.*, 2005) ist aber länger als die des Spinat-LHCII (3,4 Å; Liu *et al.*, 2004) und deutet auf eine variierende Position hin.

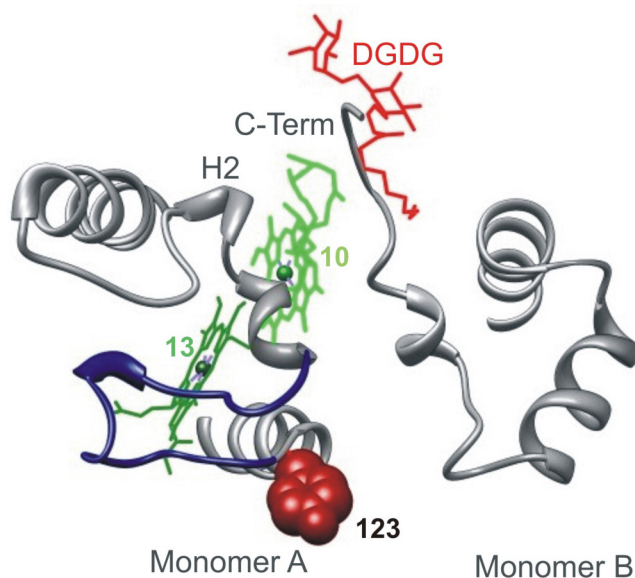


Abb. 3.4.2: Ausschnitt aus der Kristallstruktur des LHCII-Trimers (PDB-Eintrag 2BHW) zur Verdeutlichung der Bindung von DGDG (rot) und dem Chl *b*-Dimer aus Chl10 (hellgrün) und Chl13 (dunkelgrün) als lumenale Aufsicht. Das Peptidrückgrat der lumenalen Schleifenregion des Monomer A und der C-Terminus des Monomer B sind grau dargestellt, das β -Faltblatt der lumenalen Schleife ist blau und die Position der Aminosäure 123 dunkelrot hervorgehoben. Die Abbildung wurde mit Chimera erstellt (Pettersen *et al.*, 2004).

Die unterschiedliche Lage dieser Chlorophylle in den Kristallstrukturen in Verbindung mit der in dieser Arbeit ermittelten veränderten Lage des Nitroxidmarkers an Position 123, wirft die Frage auf, ob eine Strukturänderung der lumenalen Schleife, beispielweise innerhalb des β -Faltblattes (Abb. 3.4.2, blau hervorgehoben) in Abhängigkeit vom pH-Wert (Yang *et al.*, 2008), den Abstand zwischen diesem Chl-Dimer steuern kann, um so NPQ zum Schutz der Photosysteme zu regulieren. Diese Überlegung bleibt rein

hypothetisch, da die in dieser Versuchreihe durchgeführte Änderung der Mizellen-Zusammensetzung physiologisch keine Relevanz hat, sondern lediglich einen präparationsbedingten Kompromiss darstellt, um Hinweise auf flexible Regionen des LHCII zu finden. Einen physiologischen Zustand wie die Senkung des lumenalen pH-Wertes *in vitro* zu simulieren, ist derzeit in EPR-Versuchen noch nicht möglich.

Einen weiteren hypothetischen Diskussionsansatz bietet die zuvor angesprochene Belegung der DGDG-Bindestelle in rekombinanten LHCII-Trimeren (Kap. II). Viele der genannten Modifikationen, die zu einer Änderung der CD-Absorption führen, sollten durch ihre räumliche Nähe einen Eingriff in die Umgebung des Chl-Dimers 10/13 darstellen. Dies betrifft sowohl Aminosäure-Austausche innerhalb der lumenalen Schleife, LHCII-Proben mit variierendem Neoxanthin-Gehalt, als auch die Lage des C-Terminus des gegenüberliegenden Monomers (in Abb. 3.4.2 Monomer B) sowie die Belegung der DGDG-Bindestelle. Wie zuvor spekuliert (Kap. II), könnte durch eine Nichtbesetzung dieser Bindestelle oder durch die Belegung mit Detergenz die Konformation des C-Terminus B im rekombinanten Trimer von den Kristalldaten abweichen. Dadurch könnte die sterische Umgebung der Position 123 verändert werden und es könnten, ohne das sich die Struktur der Schleifenregion A ändert, andere Nitroxid-Rotamere bevorzugt werden als aus Kristalldaten vorhergesagt. Dies gilt ebenfalls für LHCII-Monomere, da hier die Interaktion mit einem benachbarten Monomer gänzlich fehlt. Dieser Ansatz ist wie ersterer spekulativ, kann aber unter moderatem Arbeitsaufwand weiter untersucht werden.

In diesem Zusammenhang wäre es sicherlich interessant, das spektroskopische Verhalten trimerer Mutanten der existierenden Klone 90, 106, 123, 223 (Werwie, 2009) und 229 (Huschenbett, 2001) in Abhängigkeit der DGDG-Bindung weiter zu analysieren. Bei letzteren beiden Klonen, die mit guter Ausbeute trimerisieren und mit C_{α} -Abständen von 3,4 (Position 223) und 2 nm (Position 229) DEER-spektroskopisch gut erfassbar sein sollten, muss zuvor jedoch die Lage des „His₆ tag“ kritisch geprüft werden. Während Klon 223 einen C-terminalen „His₆ tag“ trägt, welcher theoretisch die Lage der C-terminalen Domäne beeinflussen kann, besitzt Klon 229 einen „His₆ tag“ innerhalb der Sequenz des N-Terminus. Hier wäre zu überlegen auf Basis des von C. Dietz (unveröffentlicht) konstruierten Cys-Nullklons hnC79S mit N-terminalem „His₆ tag“ (also vor Position 1 liegend) neue Mutanten herzustellen, um Messreihen unter gleichen Ausgangsbedingungen und ohne potentielle Störung der Sterik durchführen zu können. Entsprechende EPR- und CD-spektroskopische Experimente mit Komplexen, welche mit einem Überschuss an nativem DGDG trimerisiert wurden, könnten weiter Aufschluss über die Struktur von lumenaler Schleife und gegenüberliegendem C-Terminus liefern. Die hypothetische Besetzung der DGDG-Bindetasche durch Detergentien könnte mittels ESEEM-EPR unter Verwendung deuterierter Detergentien nachgewiesen werden. Die Bindung des kommerziell erhältlichen LM (mit deuterierter

Kopfgruppe) in die Bindetasche A des DGDG könnte durch die spinmarkierte Mutante 229 (Monomer B) demonstriert werden.

Bevor eine mögliche Strukturänderung des LHCII als Folge des NPQ nachgewiesen werden kann, sollte die strukturelle Ausgangsposition der lumenalen Schleifenregion in Detergenz-Mizellen jedoch weiter verifiziert werden. Um sich physiologischen Bedingungen weiter anzunähern, sollte zudem versucht werden, spinmarkierten LHCII mit der zuvor vorgeschlagenen Methode (Kap. II) gerichtet in Liposomen zu inserieren. Durch den zu erwartenden deutlichen Verlust an Signalintensität, müssten diese Versuchsreihe mit einer Erhöhung der EPR-Empfindlichkeit beispielsweise durch Wechsel vom X- ins Q-Band kombiniert werden. Bei Erfüllung dieser Bedingungen wären Experimente mit unterschiedlichem pH-Wert oder unter variierendem Xanthophyll-Angebot vorstellbar.

4.3 Lokalisierung der N-terminalen Domäne des LHCII in Detergenzlösung

Die EPR-Ergebnisse zur Untersuchung der Positionierung der N-terminalen Domäne wurden bereits in Müller (2008) gründlich diskutiert. Dortige Schlussfolgerung der ermittelten DEER-Distanzen in rekombinanten Monomeren war eine unterschiedliche Konformation der N-terminalen Domäne in monomeren und trimeren LHCII, was konform ist zu vorherigen Ergebnissen von Jeschke *et al.* (2005). Da auch bei Müller (2008) aufgrund der identischen Probenpräparation eine Verunreinigung monomerer Proben durch nachträglich trimerisierten LHCII nicht ausgeschlossen werden kann, sollte diese Schlussfolgerung anhand der neuen Erkenntnisse überdacht werden. Im Unterschied zu allen vorangegangenen Messungen (ausgenommen Position 123), können den N-terminalen Monomer-Proben von Müller DEER-Abstandsdaten entsprechender Trimere gegenüber gestellt werden. Diesem Vergleich zufolge sollte man die Nebenmaxima der Mutanten 29/59, 14/29 und 3/14 sicherlich kritisch betrachten, hier kann zum jetzigen Zeitpunkt ein Hintergrundsignal durch Trimere nicht ausgeschlossen werden. Dieser Argumentation folgend ist eine konkrete Aussage zur Lage der N-terminalen Aminosäuren 29 bis 59 in rekombinanten Monomeren schwierig. Sicher ist lediglich, dass Position 34 wie in rekombinanten Trimeren und wie in der Kristallstruktur gezeigt weit in das Lösungsmittel ragt.

Starkes Argument für die Interpretation von Müller (2008) sind dagegen die sehr breiten Abstandsverteilungen der monomeren Mutanten 3/59 und 3/29 in Verbindung mit den deutlichen höheren ESEEM-Zugänglichkeitsparametern der monomeren Mutanten 22, 11 und 4 im Vergleich zu entsprechenden Trimeren. Dies sind eindeutige Indizien für eine deutlich höhere Flexibilität der N-terminalen Domäne in monomeren LHCII, wenn auch bisher nur für den Bereich der ersten 29 Aminosäuren. Wie zuvor angedeutet, taucht in kristallinen Trimeren die N-terminale Domäne im Bereich der Aminosäuren Gly 30 bis Asp 20 in Form einer Peptid-Schleife in die Membranebene

hinein. Hier liegt auch die Bindestelle des Chl9 (an Tyr 24) sowie das zur Trimerisierung essentielle Lipid PG (Hobe *et al.*, 1995), welche die Schleife in Trimeren höchstwahrscheinlich in ihrer Position fixieren. Deutlich wird dies beispielsweise in der geringen „rms deviation“ bei Überlagerung der Kristallstrukturen von Erbse und Spinat. Während die N-Termini an sich einen eher niedrigen Grad an Ähnlichkeit aufweisen, überlappt dieser Bereich fast perfekt (Barros & Kühlbrandt, 2009). Inwiefern rekombinante Monomere dieses Lipid gebunden haben, konnte bisher nicht quantifiziert werden (Bender, 2004). Sicher ist aber, dass PG im Totalpigmentextrakt in der Rekonstitution vorhanden ist und auch zu LHCII-Monomeren eine hohe Affinität besitzt (Nussberger *et al.*, 1993). Tatsache ist zudem, dass PG als „molekularer Kleber“ in den Zwischenraum zweier Monomere bindet, wodurch in Trimeren die transmembrane Helix H3 in direkte räumliche Nachbarschaft zu der angesprochenen Schleifenregion rückt (Standfuss *et al.*, 2005). Im Monomer hingegen fällt diese „sterische Behinderung“ durch die gegenüberliegende Helix H3 weg, wodurch der N-Terminus offensichtlich flexibel wird und vom Helixkreuz in die Peripherie wandern kann. Dies ist konform mit früheren DEER-Messungen in Jeschke *et al.* (2005). Um diese Ergebnisse weiter zu verifizieren, werden derzeit die Mutanten 3/34, 7/34, 11/34, 7/59 und 11/59 durch C. Dietz hergestellt. In Verbindung mit der zuvor diskutierten Verbesserung der Probenpräparation sollte durch Erstellung einer DEER-„Abstandskarte“ die Lage des N-Terminus in monomerem LHCII in naher Zukunft sehr genau modelliert werden können.

Im Gegensatz hierzu sind die Puls-EPR-Daten N-terminaler Trimere eindeutig und wurden im Ergebnisteil schon eingehend mit den Daten der Kristallstruktur verglichen sowie in Müller (2008) gründlich diskutiert. Sowohl ESEEM- als auch DEER-Daten legen nahe, dass der N-Terminus des rekombinanten LHCII von Position 12 bis 59 eine Struktur identisch der Kristallstruktur nativer Trimere besitzt. Die kristallographisch nicht aufgelösten ersten 9 Aminosäuren besitzen eine äußerst hohe Flexibilität, ihre Lage kann aber bereits, konform zu Jeschke *et al.* (2005), auf den Bereich oberhalb des Helixkreuzes eingeschränkt werden (Kreisbahnen in Abb. 3.3.14). Durch weitere DEER-Abstandsmessungen mit heterogen markierten Trimeren (Kap. II) verschiedener N-terminaler Doppelmутanten, sollte die Lage der N-terminalen Domäne in rekombinanten LHCII-Trimeren ebenfalls sehr genau modelliert werden können. Entsprechende Präparationen sind derzeit in Vorbereitung (C. Dietz).

Insbesondere der EPR-Datensatz der N-terminalen Trimere illustriert noch einmal sehr deutlich die Vorteile der Puls-EPR-Spektroskopie gegenüber kristallographischen Methoden zur Klärung von Proteinstrukturen. Die Vermutung von Standfuss *et al.* (2005), dass die ersten 9 Aminosäuren der N-terminalen Domäne aufgrund von Strukturdynamik kristallographisch schwer erfassbar sind, bestätigt sich. Da die Herstellung von Membranprotein-Kristallen im Allgemeinen eine schwierige und langwierige Prozedur darstellt, ist das Potential der Puls-EPR-Spektroskopie zur Aufklärung

unbekannter Membran-Proteinstrukturen enorm und kann in naher Zukunft mit großer Sicherheit dazu beitragen, physiologische Strukturänderungen, falls überhaupt existierend, in LHCII nachzuweisen.

Inwiefern die hier ermittelten unterschiedlichen Konformationen der N-terminalen Domäne des monomeren und trimeren LHCII solchen physiologischen Zuständen entsprechen, darüber kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Neben der Tatsache, dass dem N-Terminus eine entscheidende Rolle in der Oligomerisierung zufällt (Hobe *et al.*, 1995), werden dieser Domäne Funktionen in der Ausbildung der Grana-Stapel sowie im Prozess der „state transitions“ nach Phosphorylierung zugesprochen (Allen & Forsberg, 2001). Die Nachahmung physiologischer Bedingungen *in vitro* in Verbindung mit DEER-EPR brachten hierzu bisher keine Erkenntnisse. In Anlehnung an die von Bender (2004) durchgeführten Experimente zur Auslösung einer Konformationsänderung des N-Terminus durch Belichtung (Paulsen *et al.*, 1993; Zer *et al.*, 1999; Ohad *et al.*, 2001) scheiterten bereits im Versuchsaufbau (Daten nicht gezeigt). Auch die von Müller (2008) untersuchte Imitierung der N-terminalen Phosphorylierung durch Austausch des Thr 5 durch Glu zeigte weder in monomerem noch in trimerem LHCII eine Änderung der N-terminalen Struktur, eine Interpretation der Daten war folglich nicht möglich. Um physiologische Strukturänderung nachzuweisen, wäre es, wie zuvor diskutiert, sinnvoll, DEER-Abstandsmessungen des LHCII in Liposomen zu etablieren, sowie eine geeignete Kinase zur Phosphorylierung des LHCII in quantitativem Maßstab zu finden (Gorleku, 2007; Schneider, 2008). Unter diesen Voraussetzungen wäre der Nachweis von Strukturänderung, induziert durch Phosphorylierung und detektiert durch DEER-EPR, von höchstem Interesse.

4.4 Zeitaufgelöste Messung der LHCII-Faltung mittels Puls-EPR-Spektroskopie

Puls-EPR-Daten zur zeitaufgelösten Detektion der LHCII-Faltung wurden bereits in Dockter *et al.* (Kap. III, 3.2.3; eingereichtes Manuskript) gründlich diskutiert. In Ergänzung soll hier das Potential von ESEEM-EPR in zeitaufgelösten Messungen separat kurz angesprochen werden (Publikation in Bearbeitung). Wie zuvor diskutiert, geschah die Herstellung von LHCII-Proben für zeitaufgelöste EPR-Messungen größtenteils durch manuelles Mischen mit einer präparationsbedingten „Totzeit“ von über 30 s. Kürzere Faltungszeiten in DEER-Experimenten (1 s Faltung) konnten durch den Einsatz einer „freeze-quench“-Apparatur erreicht werden. Hierbei zeigten die DEER-Daten der 1 s-Probe der Mutante 90/196 aber weder signifikante Unterschiede zu den Primärdaten der LDS-solubilisierten Probe, noch zu einer Probe mit 37 s Faltungszeit. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass durch den Detergenzwechsel die „random coil“-Struktur des ungefalteten Proteins zunächst wenig verändert wird oder mittels DEER-EPR eine Änderung nicht detektierbar ist. Aufgrund des hohen Aufwands der Probenpräparation mittels „freeze-quench“-Apparatur (hoher Protein- und Pigmentverlust

durch große „Totvolumina“) wurden daher keine weiteren DEER-Proben mit kurzen Faltungszeiten gemischt. In Konsistenz zu den DEER-Daten sowie aus zeitlichen Gründen wurde im Zuge dieser Dissertationsschrift darauf verzichtet, ESEEM-Proben mit kürzeren Faltungszeiten zu mischen oder Faltungskinetiken anderer LHCI-Mutanten mittels ESEEM-EPR zu erstellen.

Interessant in den ESEEM-Faltungsdaten ist aber, dass im Unterschied zu den zeitaufgelösten DEER-Messungen auch zu Beginn des Faltungsprozesses (zumindest im Falle der Mutante 196) eine deutliche Strukturänderung detektierbar ist. Dies wird aus der beachtlichen Abnahme der Wasserzugänglichkeit innerhalb der ersten 40 s des Assemblierungsprozesses deutlich und ist sicherlich weitere Untersuchungen wert. Außerdem kann allgemein spekuliert werden, dass ESEEM-EPR in der Erstellung von Faltungskinetiken von Membranproteinen einen Vorteil gegenüber DEER haben könnte. Der in vielen Proteinen vermutete hydrophobe Kollaps zu Beginn des Faltungsprozesses (Fink, 1995) kann in zeitaufgelösten DEER-Messungen zu dem Problem führen, dass sich die beiden Spinmarker räumlich sehr nahe kommen. Dies würde, analog zu Aggregationsversuchen des LHCI (Kap. III, 3.2.3; eingereichtes Manuskript), in einer effizienten, intramolekularen Spin-Spin-Relaxation mit sehr kurzen T_2 -Relaxationszeiten resultieren, welche eine Auswertung der DEER-Daten unmöglich macht. Durch die einfache Spin-Markierung in ESEEM-Experimenten sollte dieser Kollaps prinzipiell kein Problem darstellen, da durch das Vorhandensein lediglich eines Spinmarkers, eine T_2 -Relaxation zwischen Elektronenspins nicht möglich ist (einen ausreichenden Abstand zwischen den Proteinen vorausgesetzt). Dies sollte es folglich ermöglichen, verschiedene Phasen der Assemblierung rekombinanter Proteine *in vitro* mittels ESEEM-EPR auch in frühen Faltungsstadien verfolgen zu können.

Zur Durchführung weiterer ESEEM-Faltungskinetiken des rekombinanten LHCI ist es wichtig, zwei grundlegende Voraussetzungen zu beachten. Zum einen müssen sich, wie anhand Mutante 196 vorgeführt (Abb. 3.3.15), denaturierte und gefaltete Proben des LHCI in ihrer Wasserzugänglichkeit deutlich unterscheiden. Da Position 196 die bisher am wenigsten zugängliche Mutante stellt, müssten für eine Faltungsanalyse des LHCI mittels ESEEM-EPR zunächst weitere Mutanten mit ähnlich geringem Wasserzugänglichkeits-Parameter gesucht werden, welche sich am ehesten an Positionen innerhalb der Membran finden lassen. Der zweite wichtige Punkt betrifft die Lage der spinmarkierten Aminosäure bezüglich einer engen Packung des Proteins beispielsweise während und nach einem prinzipiell möglichen hydrophoben Kollaps. Sollte zum Beispiel eine sehr gut wasserzugängliche Position durch den Kollaps sofort in das hydrophobe Innere des kollabierten Proteins gezogen werden, sinkt die Wasserzugänglichkeit rapide, was ebenfalls zu einer „blinden“, wenig interpretierbaren Phase in der Kinetik der Proteinfaltung führen würde. Andererseits könnten solche Markierungspositionen, sofern sie nach einem hydrophoben Kollaps wieder ins wässrige Milieu eintauchen, sehr detaillierte Informationen bezüglich intermediärer Faltungszustände liefern.

Werden zudem Positionen wie 196 in unterschiedlichen Domänen gefunden, die gleichmäßig an Wasserzugänglichkeit verlieren, besitzt ESEEM-EPR ein hohes Potential zur zeitaufgelösten Detektion von Membranprotein-Faltung. In diesem Zusammenhang wären Faltungsexperimente mit variierendem Pigmentangebot oder mit Chlorophyll-Bindungsmutanten denkbar, um die Assemblierung des LHCII und deren Abhängigkeit von der Pigmentbindung weiter zu verstehen.

5 Schlussfolgerungen

Primäre Ziele dieses Kapitels waren die Weiterentwicklung der EPR-Messmethodik sowie deren Anwendung zur Untersuchung der Struktur und Funktion des LHCII. Durch Anwendung standardisierter CW-EPR-Techniken, im Vergleich zu Puls-EPR-Experimenten, konnten verschiedene hochempfindliche Methoden verifiziert werden, um lokale Aminosäure-Umgebungen in Membranproteinen zu untersuchen. Gleichzeitig konnte mit der etablierten DEER-Spektroskopie eine umfassende „Abstandskarte“ des LHCII in Lösung erstellt werden und mit aktuellen Daten der Kristallstruktur verglichen werden. Diese hochempfindlichen Puls-EPR-Methoden konnten in einem zweiten Schritt angewendet werden, um Strukturodynamik in Detergenz-solubiliertem LHCII zu ermitteln. Während die Flexibilität der lumenalen Schleife bzw. der C-terminalen Domäne unbedingt erst durch weitere Versuchsreihen noch verifiziert werden muss, konnten eindeutige Unterschiede in der Struktur der N-terminalen Domäne des monomeren LHCII zu trimerem LHCII nachgewiesen werden. Des Weiteren war es möglich neue Strukturinformationen zur Konformation der kristallographisch teilweise überhaupt nicht erfassten N-terminale Domäne in LHCII-Trimeren zu ermitteln. Beide Ergebnisse bestätigen frühere Messreihen und erlauben in naher Zukunft eine detailliertere Modellierung der N-terminalen Domäne in monomerem und trimerem LHCII. Durch Modifizierung des Rekonstitutionsprotokolls des LHCII konnte in einem abschließenden Schritt die Strukturodynamik des LHCII-Apoproteins während des Faltungsprozesses mittels verschiedener zeitaufgelöster Puls-EPR-Monitore nachgewiesen werden. Die ermittelten Daten geben zum ersten Mal detaillierten Einblick in die Entstehung von Sekundär- und Tertiärstruktur während der Faltung des rekombinanten LHCII.

Kapitel IV

Experimente zur Insertion nativer LHCII-Trimere in artifizelle Vesikel aus Diblockcopolymeren.

1 Einleitung

1.1 Amphiphile Diblockcopolymer: Aufbau und spontane Selbstorganisation

Der Begriff Diblockcopolymer bezeichnet in den chemischen Wissenschaften artifizell hergestellte Polymere, die aus zwei unterschiedlichen Polymerblöcken zusammengesetzt sind. Jeder der beiden Blöcke besteht seinerseits aus einer variablen Anzahl von Einheiten eines hydrophilen oder hydrophoben Monomers. Durch Verbindung eines hydrophilen Teilblocks, beispielsweise bestehend aus Polyethylenoxid (PEO), mit einem hydrophoben Teilblock, beispielsweise bestehend aus Polybutadien (PB), entstehen amphiphile Diblockcopolymer mit charakteristischem Löslichkeitsverhalten. Je nach chemischer Zusammensetzung der verwendeten Monomere und deren Löslichkeiten in unterschiedlichen Lösungsmitteln, dem relativen Verhältnis der Blocklängen zueinander und der daraus resultierenden Molmasse sind amphiphile Diblockcopolymer in der Lage, sich in Lösung spontan selbst zu supramolekularen Strukturen zu organisieren. Neben sphärischen oder wurmartigen Mizellen können sich in Abhängigkeit vom Lösungsmittel auch sogenannte Polymersomen bilden (Discher & Eisenberg, 2002). In solchen Vesikeln, bestehend aus einer Doppelschicht des Diblockcopolymer, zeigen in wässriger Lösung (analog zu Phospholipiden in Liposomen) die polaren Teilpolymere zum Lösungsmittel, die unpolaren Teilpolymere bilden dagegen nach Innen eine hydrophobe Doppelschicht.

Insbesondere solche artifizellen Vesikelstrukturen bieten in den Biowissenschaften interessante Möglichkeiten, da sie eine Art „Biomembran-Mimikry“ darstellen und durch ihre hohe chemische Stabilität auch unter *in vivo*-Versuchsbedingungen lange stabil bestehen bleiben. Zudem zeigen viele Arten von Polymersomen eine gute Kompatibilität mit biologisch aktiven Molekülen und sind außerdem, beispielsweise nach der Beladung mit Medikamenten oder Botenstoffen, als Transportcontainer einsetzbar. Auch die leichte chemische Modifizierbarkeit der Polymere zur Produktion oberflächen-funktionalisierter Vesikel ist zu beachten (Mecke *et al.*, 2006).

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Diblockcopolymer, handelt es sich um das amphiphile Polybutadien-b-polyethylenoxid (PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK), welches sich aus einem 130 Einheiten umfassenden, hydrophoben Poly-(1,2) Butadien-Block (Abb. 4.1.1 A, rot) und einem 66 Einheiten umfassenden hydrophilen Poly-Ethylenoxid-Block zusammensetzt (Abb. 4.1.1 A, blau). Die durchschnittlichen Faden-Enden-Abstände für

ungestörte Knäuel des hydrophoben Homopolymer-Blocks liegen bei ca. 7 nm, die des hydrophilen bei ca. 4 nm (Abb. 4.1.1 B).

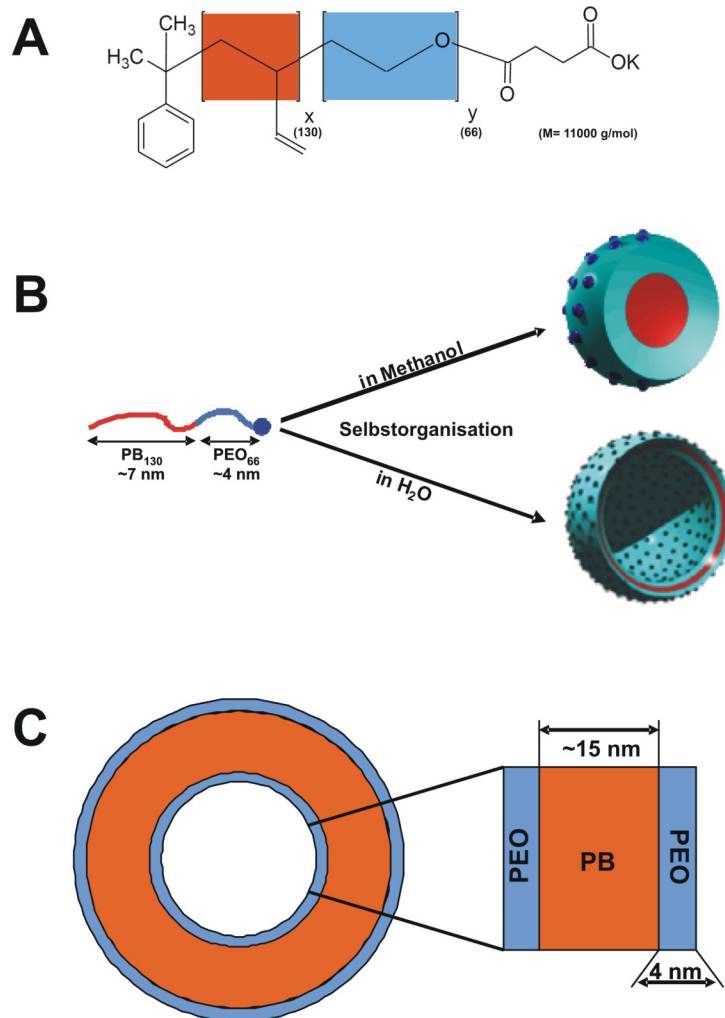


Abb. 4.1.1: Chemische Struktur des Diblockcopolymers PB_x -b- PEO_y -COOK und Selbstorganisation in unterschiedlichen Lösungsmitteln. **(A)** Strukturformel des amphiphilen PB_x -b- PEO_y -COOK. Das in diesem Experiment verwendete Polymer besitzt 130 Wiederholungseinheiten des hydrophoben Poly-(1,2) Butadien-Blocks (rot) und 66 Wiederholungseinheiten des hydrophilen Poly-Ethylenoxid-Blocks (blau) bei einer durchschnittlichen molaren Masse von 11000 g/mol. **(B)** zeigt die Selbstorganisation des PB_{130} -b- PEO_{66} -COOK in Abhängigkeit des Lösungsmittels zu sphärischen Mizellen (in Methanol) oder doppelschichtigen Vesikeln (in Wasser). In **(C)** ist die PB_{130} -b- PEO_{66} -COOK-Vesikelstruktur schematisch dargestellt, der Ausschnitt rechts verdeutlicht den durchschnittlichen Durchmesser der einzelnen Schichten (abgeändert nach Müller, 2006).

Abhängig vom verwendeten Lösungsmittel ordnen sich die PB_{130} -b- PEO_{66} -COOK-Polymere durch Selbstorganisation zu unterschiedlichen Strukturen zusammen. In Methanol gelöst, formen sich sphärische Mizellen mit Polybutadien-Kern (B, rot) und äußerer Polyethylenoxid-Hülle (B, blau). In wässriger Lösung dagegen bilden sich stabile

Vesikel aus Copolymer-Doppelschichten, wobei die durch Transmissionselektronenmikroskopie ermittelte Dicke der einzelnen Schichten bei jeweils 4 nm für die äußeren PEO-Einzelschichten und ca. 15 nm für die innere PB-Doppelschicht liegt (C). Ein weiterer Vorteil dieser Polymersomen besteht in der Möglichkeit den Radius der Vesikel mittels Extrusion in Abhängigkeit der Blocklängen auf eine gewünschte Größe zu trimmen (Müller, 2006).

1.2 Insertion von Membranproteinen in artifizielle Polymersomen

Neben ihrer Anwendbarkeit als Transportcontainer (Kataoka *et al.*, 2001; Borchert *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2009), sind artifizielle Polymersomen interessant hinsichtlich ihrer Nutzbarkeit als Nanoreaktoren. Wie in biologischen Systemen *in vivo*, können mit Hilfe der Polymersomen *in vitro* stabile Räume geschaffen werden, in denen einzelne Reaktionen in einem unterschiedlichen Milieu zum Außenmedium ablaufen können. Hierfür ist es vorteilhaft, die künstliche Polymerschicht durch Insertion von speziellen Membranproteinen selektiv permeabel zu gestalten. Diese könnten wie *in vivo* in ihren Funktionen als beispielsweise Carrier oder Kanalproteine den Ein- oder Ausfluss von Reaktanden in die Polymersomen gezielt regulieren. Weiterhin könnte durch die hohe Stabilität der Polymersomen, im Vergleich zu natürlichen Lipidmembranen, die Lebensdauer instabiler Membranproteine verlängert werden, was wiederum die Präparation von Proben beispielsweise für die Kristallographie vereinfachen würde (Mecke *et al.*, 2006).

Ein Problem für die Insertion von Membranproteinen stellt bisher der Durchmesser der Diblockcopolymer-Doppelschicht dar. Während Membranproteine *in vivo* mittels α -helikalen Strukturen oder β -Faltblättern hydrophobe Membranbereiche von 3 bis 4 nm durchspannen, müssen in Polymersomen 10 oder mehr Nanometer überbrückt werden. Versuche mit OmpF (Meier *et al.*, 2000) oder Bacteriorhodopsin (Ho *et al.*, 2004) zeigten, dass es möglich ist, sogenannte Triblockcopolymere, bestehend aus zwei äußeren hydrophilen und einem inneren hydrophoben Teilblock bei einer lipophilen Schichtdicke von bis zu 10 nm, zu durchspannen, ohne die Proteinstruktur zu beeinflussen. Dies ist dann möglich, wenn das Protein es schafft, die flexible, hydrophobe Mittelschicht auf eine Dicke von ca. 4 nm zu stauchen (Abb. 4.1.2).

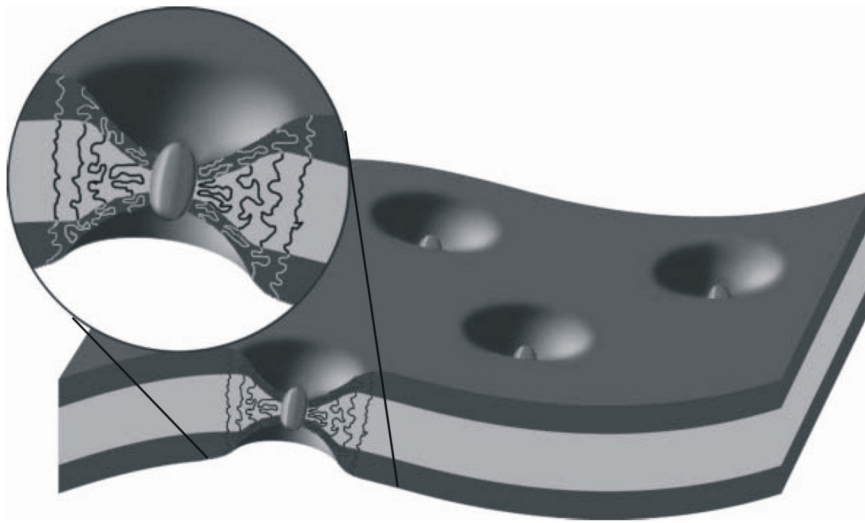


Abb. 4.1.2: Schematische Darstellung der Insertion von Membranproteinen in artifizielle Copolymerschichten mit einem Durchmesser über 4 nm. Das Membranprotein (eiförmige Struktur) staucht den flexiblen, hydrophoben Kern (hellgrau) der Polymerschicht von schätzungsweise 10 nm auf 4 nm Dicke und wird dadurch stabil inseriert. In Aufsicht entstehen dadurch trichterförmige Vertiefungen in der Polymeroberfläche (abgeändert nach Mecke *et al.*, 2006).

Ob solch eine Insertion von Membranproteinen auch in Doppelschichten aus amphiphilen Diblockcopolymeren möglich ist, sollte im folgenden Versuchansatz, der Insertion des nativen, trimeren LHCII in Polymersomen bestehend aus $PB_{130}\text{-b-PEO}_{66}\text{-COOK}$, untersucht werden. Nativer LHCII erschien hierfür ein geeignetes Modell-Protein zu sein, da der Pigment-Protein-Komplex mit wenig Aufwand in größeren Mengen gewonnen und aufgereinigt werden kann und zudem in hohem Maße in Lipiddoppelschichten rück-inseriert werden kann. Außerdem besitzt trimere LHCII unter geeigneten Versuchsbedingungen (ohne direkten Licht- oder Hitzeeinfluss) sowohl in Detergenzien als auch in Doppelmembranen eine recht hohe Stabilität. In wässriger Lösung dagegen aggregiert das Protein in Anwesenheit von Salzen oder es denaturiert und zerfällt in seine Bestandteile. Durch die Bindung von 14 Chlorophyllen und 4 Carotinoiden ist der Komplex spektroskopisch sehr gut charakterisierbar, so dass der Zustand des Proteins leicht hinsichtlich Funktionalität und Oligomerisierungsgrad überprüft werden kann. Nicht zuletzt ist es von proteinbiochemischer und Anwendungs-technischer Seite interessant, ob eine Insertion des LHCII in artifizielle Polymersomen dessen Stabilität gegenüber Hitze, Starklicht oder extremen pH-Werten erhöht, bzw. ob durch chemische Modifizierung der Polymere eine Funktionalisierung des LHCII beispielsweise an Oberflächen möglich ist.

2 Material und Methode

2.1 Aufreinigung des trimeren LHCII aus Erbse durch sukzessive Fällung (nach Krupa *et al.*, 1987; modifiziert nach Rühle & Paulsen, 2004)

Erbsenpflanzen, welche 10 Tage unter Standard-Bedingungen (16 h Belichtung/Tag) angezogen wurden, wurden geerntet und das Blattmaterial (junge Blätter, 1 kg) in 3 l eiskaltem Homogenisierungspuffer im „Waring Blender“ zerkleinert. Nach der Filtration durch 4 Lagen Baumwoll-Gaze, wurde der Durchfluss 5 min bei 7000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 600 ml Waschpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 10000 g). Die pelletierten Thylakoide wurden in kaltem Aqua dest. (100 ml) vereinigt, mittels Photometrie die Chl-Konzentration ermittelt (Verdünnung eines 5 µl Pigment-Aliquots in 80 % Aceton, siehe Kap. I, 2.7.1.3) und durch weitere Aqua dest.-Zugabe auf eine Gesamtchlorophyll-Konzentration von 0,8 mg/ml eingestellt. Zur Dokumentation der Aufreinigung wurde zudem ein Aliquot (A1) auf Eis aufbewahrt.

Durch Zugabe von TX (Endkonzentration 0,67 %) wurden die Photosynthesekomplexe aus der Thylakoidmembran gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur abgedunkelt gerührt. Die solubilisierten Komplexe wurden bei 4 °C und 30000 g für 40 min zentrifugiert und das Pellet entsorgt. Die im Überstand befindlichen Pigment-Protein-Komplexe wurden sukzessive durch schrittweise Salzzugabe (100 mmol/l KCl und 20 mmol/l MgCl₂) 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln unter langsamem Rühren gefällt. Jeweils 10 ml der gefällten Suspension wurden auf je 30 ml einer Saccharoselösung (0,5 mol/l) geschichtet und in einem Festwinkelrotor bei 4 °C 10 min bei 10000 g zentrifugiert. Die pelletierten Komplexe wurden in Resuspensionspuffer resuspendiert und wie zuvor photometrisch auf eine Chl-Konzentration von 0,8 mg/ml eingestellt.

Nach erneuter Solubilisierung in TX (10fach molarer Detergenzüberschuss über Chl; 116 µl 5 % TX pro 1 ml Suspension) bei Raumtemperatur (10 min, dunkel, langsam gerührt), wurden die Komplexe wie zuvor durch Zugabe von Salz gefällt und erneut mittels Zentrifugation durch eine Saccharoselösung pelletiert. Das Pellet wurde in einem kleinen Volumen Resuspensionspuffer aufgenommen und mittels Photometrie das molare Chl a zu Chl b- Verhältnis bestimmt. Lag dies oberhalb des Wertes 1,4 wurden erneut Komplexe in TX resuspendiert und mit Salz gefällt. Bei niedrigerem Wert wurde die Suspension wieder auf eine Chlorophyll-Konzentration von 0,8 mg/ml eingestellt, ein Aliquot (A2) abgenommen und die Komplexe ohne vorherige Detergenz-Solubilisierung mittels Salzzugabe gefällt und in Saccharose zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 2 ml Aqua dest. resuspendiert und sofort bei 4 °C für 3 min

bei 5000 g zentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung von Detergenz und Salz wurde der letzte Schritt wiederholt. Das gereinigte Pellet wurde in einer geringen Menge Aqua dest. aufgenommen, photometrisch die Konzentration bestimmt, auf eine Gesamtchlorophyll-Konzentration von 0,8 mg/ml eingestellt und wieder ein Aliquot (A3) zur Analyse aufgehoben. Die restlichen Komplexe wurden portioniert und bei -20 °C eingefroren. Zur Kontrolle der Isolierung wurden die Aliquots einzelner Aufreinigungsschritte auf einer 15%igen denaturierenden SDS-PAGE (Kap. I, 2.8.1.1) analysiert (je ein 10 µl Aliquot mit 1x Sparmix denaturiert), sowie ein Aliquot der aufgereinigten Trimere in 0,1 % LM auf Eis gelöst und CD-spektroskopisch (Kap. I, 2.8.2.3) ohne weitere Aufreinigung untersucht.

Material:

Pisum sativum var. Lisa

Vermiculit (Härte 4, Firma Klein Dämmstoffe, Zellertal)

Homogenisierungspuffer: 50 mmol/l Tricine/NaOH (pH 7,8)
0,4 mol/l Sorbitol

Waschpuffer: 5 mmol/l EDTA/NaOH (pH 7,8)
50 mmol/l Sorbitol

5 % TX

1 mol/l KCl

1 mol/l MgCl₂

0,5 mol/l Saccharose

Resuspensionspuffer: 50 mmol/l Tricine/NaOH (pH 7,8)
100 mmol/l Sorbitol

2.2 Synthese des amphiphilen Diblockcopolymeres Polybutadien-b-polyethylenoxid und spontane Selbstorganisation zu Vesikeln

Die Synthese der amphiphilen Diblockcopolymeren geschah durch Dr. Michael Maskos, die Präparation der Polymersomen durch W. Müller (AK HD Dr. M. Maskos, Institut für Physikalische Chemie, Universität Mainz).

Amphiphile Diblockcopolymeren, wie das in diesem Experiment verwendete Polybutadien-b-polyethylenoxid (PB_x-b-PEO_y-COOK), bestehen aus einem hydrophoben Poly-(1,2) Butadien-Block (PB) und einem hydrophilen Poly-Ethylenoxid-Block (PEO). Die Länge der einzelnen Blöcke ist variabel und kann beispielweise für PB (x in Abb. 4.1.1 A) zwischen 32 und 130 Einheiten bestehen, bei PEO (y in Abb. 4.1.1 A) zwischen 29 und 177. Die Bildung von stabilen Vesikeln in wässriger Lösung ist hierbei stark von der Länge der einzelnen Blöcke abhängig und konnte für das Copolymer PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK, welches auf Seiten des PB durch ein Cumyl-Anion initiiert und auf Seiten des PEO durch eine Carbonsäuregruppe terminiert wird, gezeigt werden

(Maskos, 2006). Dieses Blockcopolymer mit durchschnittlich 130 Wiederholungseinheiten des PB und 66 Wiederholungseinheiten des PEO wird nach anionischer Polymerisation des Polybutadien-Blocks und direkter Weiterpolymerisation des Polyethylenoxid-Blocks erhalten (Abb. 4.1.1 in Klammern). Der mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie ermittelte Poly-Dispersitäts-Index (PDI) von 1,05 bestätigte eine enge Verteilung der Kettenlängen. Das Molekulargewicht des Copolymers lag bei 11000 g/mol bei einem PEO-Anteil von 29 % (w/w).

Die Herstellung entsprechender PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikel erfolgte wie in Müller *et al.* (2009) beschrieben. Hierzu wurden zu 10 mg PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK, gelöst in 2,1 ml Tetrahydrofuran (THF, dest.), unter ständigem Rühren 10 ml Aqua dest. (reinst; Waters MilliQ-system) zugetropft (9,9 ml/h). Bei einem THF-Gehalt von etwa 17 % wurde die Wasserzugabe gestoppt und das restliche THF in einem Zeitraum von 2 bis 3 Tagen evaporiert. Durch das langsame Abdampfen des organischen Lösungsmittels kommt es durch die Zunahme der Hydrophilie der Lösung zur spontanen Selbstorganisation der Copolymere zu kleinen Vesikeln mit einer engen Größenverteilung. Die Dicke der hydrophoben PB-Doppelschicht betrug hierbei 15 bis 16 nm, die der hydrophilen PEO-Einzelschichten jeweils 3,5 bis 4 nm (Müller, 2006). Fertige Vesikellösungen wurden vor Verwendung durch Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert und bis zur eigentlichen Insertion nativer LHCII-Komplexe dunkel bei Raumtemperatur in Aqua reinst mit einer Konzentration von 1 g/l gelagert. Die Bestimmung von Form und Größe der Blockcopolymer-Vesikel geschah mittels dynamischer Lichtstreuung und Transmissionselektronenmikroskopie wie in Müller (2006) beschrieben.

Material:

Polybutadien-b-polyethylenoxid (PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK)

THF (destabilisiert durch Destillation)

Aqua dest. (reinst)

2.3 Ansatz zur Insertion von nativen LHCII-Trimeren in PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikel

Der Ansatz zur Insertion des nativen LHCII in PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikel basierte auf der Methode von Boggasch (2006) zur Insertion des trimeren LHCII in Liposomen. Nach diesem Prinzip werden die ausgefällten nativen Komplexe in den Detergenzien TX oder LM solubilisiert und mit Liposomen gemischt. Durch langsamen Entzug des Detergenz durch Behandlung mit „Bio Beads“ werden die Komplexe „gezwungen“ in die Doppelmembran der Vesikel zu inserieren. Im folgenden Versuchsansatz wurden statt der Liposomen, bestehend aus den Lipiden DGDG, PG und SQDG, artifizielle Vesikel aus PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Polymeren (Kap. IV, 2.2) mit einem gemittelten Radius von 31 bis 35 nm verwendet. Im Unterschied zu Boggasch (2006) wurde zudem eine höhere Konzentration an LHCII eingesetzt. Für einen Ansatz mit 1800 µl Endvo-

lumen, wurde nativer LHCII in einfachem Liposomenpuffer (Endkonzentration 4,16 $\mu\text{mol/l}$), mit Detergenz (jeweils ein Ansatz mit 0,05 % TX, bzw. ein Ansatz mit 0,1 % LM) versetzt und 30 min dunkel auf Eis solubilisiert. Hierbei gingen die zuvor pelletierbaren Aggregate in Lösung, kurzes Zentrifugieren zeigte keine Komplex-Sedimentation. Die gelösten Komplexe wurden langsam mit $\text{PB}_{130}\text{-b-PEO}_{66}\text{-COOK}$ -Vesikeln (Endkonzentration 54.5 $\mu\text{mol/l}$; entspricht etwa 15 $\text{PB}_{130}\text{-b-PEO}_{66}\text{-COOK}$ -Polymeren pro LHCII) in einfachem Liposomenpuffer, 0,1 % Detergenz (TX bzw. LM) und 10 mM DTT versetzt, auf Eis gemischt und für 3 h dunkel inkubiert. Nach Zugabe von 36 mg entgasten „Bio Beads“ (siehe Boggasch, 2006; Punkt 2.3.11.4), wurden die Lösungen über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad zur Entfernung des Detergenz inkubiert und die „Bio Beads“ am darauffolgenden Tag dreimal gewechselt (je 2-3 h Inkubation). Die letztendlich eingesetzte „Bio Beads“-Menge war ausreichend, um etwa die 20fache Menge an Detergenz zu adsorbieren.

Neben den beiden beschriebenen Ansätzen zur Insertion des LHCII, wurden verschiedene Referenz-Ansätze gemischt. Zum einen wurde, wie in den beiden Hauptansätzen, 4,16 $\mu\text{mol/l}$ LHCII jeweils einmal in TX bzw. einmal in LM solubilisiert, dann aber in Liposomenpuffer (versetzt mit Detergenz und DTT) ohne Polymersomen überführt und mit „Bio Beads“ behandelt. Außerdem wurde in einem weiteren Ansatz (entsprechend dem Hauptansatz mit TX) anstatt 4,16 $\mu\text{mol/l}$ nativem LHCII das molare Äquivalent an Totalpigmentextrakt (Kap. I, 2.7.1.2) eingesetzt. Letztlich wurde noch ein Ansatz ohne LHCII und ohne Pigment gemischt, um das Verhalten der Blockcopolymeren nach Detergenz- und „Bio Beads“-Behandlung zu dokumentieren. Die einzelnen Ansätze wurden sowohl spektroskopisch [Absorption (Kap. IV, 2.4), CD (Kap. I, 2.8.2.3 und Kap. IV, 2.4), als auch biochemisch (Kap. I, 2.8.1.1) charakterisiert.

Material:

Liposomenpuffer (1x):	10 mmol/l Tris/HCl (pH 7,5)
	0,1 mmol/l EDTA
	50 mmol/l NaCl
10 % LM	
10 % TX	
1 mol/l DTT	
ddH ₂ O	
$\text{PB}_{130}\text{-b-PEO}_{66}\text{-COOK}$	
entgaste „Bio Beads“	

2.4 Spektroskopische Charakterisierung des LHCII nach Insertionsversuch

Alle Ansätze zur Insertion nativer LHCII-Trimere in $\text{PB}_{130}\text{-b-PEO}_{66}\text{-COOK}$ -Vesikel wurden spektroskopisch untersucht. Absorptionsmessungen fanden an einem Shimadzu

MPS-2000 statt, da in dieser alten Baureihe die Küvette unmittelbar vor dem Detektor sitzt und so Effekte der Lichtstreuung minimiert werden. Alle Proben wurden im Wellenlängenbereich von 250 bis 750 nm in 1 mm Quarz-Küvetten vermessen. Die Messung der Basislinie erfolgte in leeren Küvetten, als Proben-Referenz diente Liposomenpuffer (1x) ohne „Bio Bead“-Behandlung. Die Messung der Fluoreszenz-Emission (Kap. I, 2.8.2.2) und der CD-Absorption (Kap. I, 2.8.2.3) erfolgte wie zuvor beschrieben. CD-Stabilitätsmessungen orientierten sich an der Versuchsvorschrift von Yang *et al.* (2006) und wurden genau wie Standardmessungen an einem Jasco J-810 CD-Spektrometer unter folgenden Einstellungen durchgeführt:

data pitch: 1 nm
response time: 2 s
band width: 2 nm
scanning speed 500 nm/min.

Proben wurden in 1 mm Küvetten gefüllt und einem Temperaturgradienten von 20 bis 85 °C (1 °C/min) ausgesetzt. Während des Temperaturanstiegs wurde permanent die CD-Absorption der Trimere bei 473 nm in einem Zeitintervall von 0,2 s gemessen. Bei jeweils 5 °C Temperaturerhöhung wurde ein CD-Spektrum im Wellenlängenbereich von 400 bis 750 nm aufgenommen, was zur Unterbrechung des Gradienten für ca. 45 s führte. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm „Table Curve 2D 4.0“ (SPSS Inc, Chicago, USA) gefittet.

2.5 Dynamische Lichtstreuung

Die Versuche zur dynamischen Lichtstreuung der einzelnen Versuchsansätze wurden durch W. Müller (AK HD Dr. M. Maskos, Institut für Physikalische Chemie, Universität Mainz) vor und nach Insertion des LHCII durchgeführt. Eine genaue Beschreibung der Methode und der verwendeten Materialien findet sich in Müller (2006).

Bei Insertionsansätzen, die Aggregationsverhalten zeigten, wurde durch Extrusion der Lösung, analog zur Präparation von Liposomen (Boggasch, 2006), versucht den Durchmesser der Vesikel wieder zu vereinheitlichen. Hierzu wurde 1 ml Vesikellösung in eine gasdichte Glasspritze des Extruders [Avestin (Kanada), Liposo Fast Pneumatic Actuator] geladen und unter konstantem Stickstoff-Druck mehrmals durch eine Polycarbonat-Membran definierter Porengröße gepresst. Durch die entstehenden Scherkräfte werden Vesikel, welche größer als der Porendurchmesser sind, aufgebrochen, die entstehenden Bruchstücke bilden neue, entsprechend kleinere Vesikel (Müller, 2006).

2.6 Atomare Kraftmikroskopie zur Erstellung eines Höhenprofils von PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikeln

Alle Untersuchungen zur Oberflächencharakterisierung mittels Atomarer Kraftmikroskopie („atomic force microscopy“, AFM) wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Janshoff (Institut für Physikalische Chemie, Universität Mainz) durch Dr. M. Janke durchgeführt. Die kraftmikroskopischen Experimente sollten Aufschluss über den Erfolg der Insertion von LHCII-Trimeren bzw. über deren Anordnung in den artifiziellen PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikeln geben. Hierzu wurden die Vesikel ohne Zugabe von CaCl₂ auf ein frisch gespaltenes Stück Glimmer gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Die gespreiteten Vesikel wurden anschließend kräftig mit Liposomenpuffer B (1x, ohne EDTA) gespült, hierbei konnte der Spülstrahl sogar direkt auf die Probe gehalten werden. Anschließend wurden die Proben im „tapping mode“ bei 0,8 bis 1 Hz an einem MFP 3D (Asylum Research) mit den „cantilevers“ Olympus PSA 400 oder Mini-Biolever kraftmikroskopisch untersucht. Zur Bestimmung der Schichtdicke wurden mit Hilfe des „cantilever“ Löcher in die PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK Oberfläche gekratzt. Mit entsprechenden Programmen der AK Janshoff konnten durch Linienanalysen die Höhenprofile verschiedener Insertionsansätze untersucht werden.

Material:

Liposomenpuffer B (1x):	10 mmol/l Tris/HCl (pH 7,5) 50 mmol/l NaCl
-------------------------	---

2.7 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Präparation der Probe für die Fluoreszenz-Mikroskopie erfolgte aus messtechnischen Gründen erst ca. 3 Monate nach den Insertionsversuchen. Zwischenzeitlich wurde die Probe dunkel bei 4 °C in Liposomenpuffer gelagert, ein Aliquot der Probe wurde am Versuchstag fluoreszenz- (Kap. I, 2.8.2.2) und CD-spektroskopisch (Kap. I, 2.8.2.3) untersucht, wie zuvor beschrieben auf Glimmer gespreitet (Kap. IV, 2.6) und kraftmikroskopisch untersucht. Die auf Glimmer gespreiteten Proben wurden nachfolgend mittels Fluoreszenz-Mikroskopie unter Verwendung des Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate (TRITC)-Filtersets charakterisiert. Die gewählten Filter erlauben eine Anregung mit Licht der Wellenlänge 545 nm und die Detektion emittierten Lichts der Wellenlänge 620 nm. Alle Photographien erfolgten mit einer hochempfindlichen Schwarz/Weiß-Kamera mit Belichtungszeiten von 5 bzw. 10 s. Alle Photographien wurden nachträglich eingefärbt.

2.8 Verdau von Insertionsansätzen mit der Protease Thermolysin

Thermolysin ist eine hitzestabile Metallopeptidase, die aus dem grampositiven Bakterium *Bacillus thermoproteolyticus* isoliert werden konnte. Das Enzym baut als Peptidase

Proteine, von der N-terminalen Seite ausgehend, durch Hydrolyse ab. Die Spaltungen erfolgen nach großen, hydrophoben Aminosäuren wie Phenylalanin oder Isoleucin. Der N-Terminus des gefalteten LHCII wird je nach Oligomerisierungsgrad unterschiedlich stark verdaut, der ungefaltete Lhcb1 wird komplett verdaut (Kuttkatt *et al.*, 1995).

Zum Verdau unterschiedlicher Insertionsansätze des LHCII wurde eine 20 µl Proteinprobe mit 2,5 µl 10x Thermolysinpuffer und 2,5 µl Thermolysin versetzt, 30 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert, danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 3,5 µl EDTA (100 mmol/l) gestoppt. Ein Probenvolumen von 20 µl wurde in Sparmix (1x) für 2 min bei 100 °C denaturiert und dann via SDS-PAGE (Kap. I, 2.8.1.1) analysiert.

Material:

1 mg/ml Thermolysin in 1x Thermolysinpuffer (Sigma Aldrich)

100 mmol/l EDTA

10x Thermolysinpuffer:

100 mmol/l HEPES-KOH (pH 8)

5 mmol/l CaCl₂

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung nativer LHCII-Trimere aus Erbse durch sukzessive Fällung mit Salz

Die für das Insertionsexperiment erforderlichen trimeren LHCII-Komplexe wurden nach dem Protokoll von Krupa *et al.* (1987), modifiziert von Rühle & Paulsen (2004), durch sukzessives Solubilisieren und Fällen aus frischen Erbsenblättern isoliert. Die während der Isolierung durchgeführten Absorptionsbestimmungen zeigten die erwartete Abnahme des Verhältnisses von Chl *a* zu Chl *b* von ca. 3,2 nach Isolierung der Thylakoide auf 1,35 nach dem dritten und letzten Fällschritt durch die erfolgreiche Anreicherung des nativen LHCII. Dieses Ergebnis konnte durch die SDS-PAGE (Abb. 4.3.1) bestätigt werden.

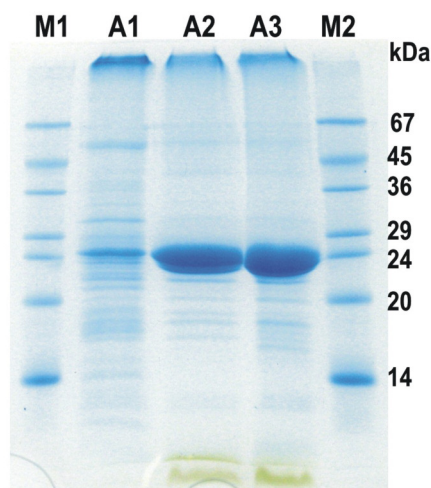


Abb. 4.3.1: Denaturierendes Polyacrylamid-Gel (15 %) zur Überprüfung der Aufreinigung und der Masse der isolierten nativen LHCII-Komplexe nach Coomassie-Blau-Färbung. In den Spuren M1 und M2 wurden jeweils 3 µl bzw. 5 µl SDS7-Marker aufgetragen, auf die mittleren Spuren isolierte Thylakoide (**A1**), Protein-Pigment-Komplexe nach zweimaligem Fällen (**A2**), sowie Komplexe nach dem letzten Fällen (**A3**).

Während die isolierten Thylakoide (A1) in Abb. 4.3.1 neben der Bande des LHCII bei 25 kDa noch zahlreiche Banden weiterer Proteine des Photosyntheseapparates aufweisen, zeigt sich in den Spuren A2 nach zweimaligem Fällen und A3 nach dreimaligem Fällen ein deutlicher Aufreinigungs- und Anreicherungseffekt (Rühle & Paulsen, 2004). In beiden Spuren überwiegt der LHCII deutlich die Überreste einzelner verschleppter Thylakoid-Proteine. Hierbei ist zwischen A2 und A3 kein sichtbarer Unterschied erkennlich, der dritte Fällungsschritt wurde im Unterschied zu den vorherigen Fällungen ohne die Solubilisierung der Komplexe in TX durchgeführt, wodurch auch keine zusätzlichen kontaminierenden Komplexe in Lösung gehen konnten. Dieser letzte Waschschrift diente vielmehr der Detergenzentfernung zur Lagerung der Komplexe.

Zusätzlich zur denaturierenden PAGE wurde ein LHCII-Aliquot in 0,1 % LM solubilisiert und, ohne weitere Aufreinigung, CD-spektroskopisch untersucht (Abb. 4.3.2).

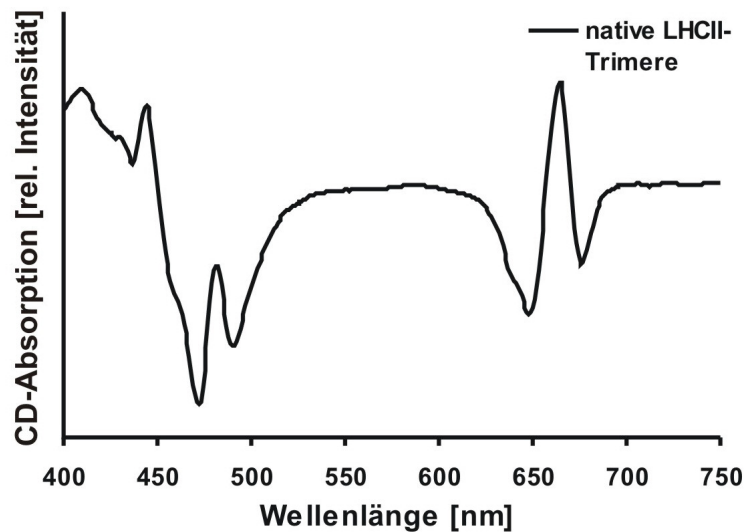


Abb. 4.3.2: CD-spektroskopische Charakterisierung nativer, solubilisierter (0,1 % LM) LHCII-Komplexe nach Isolierung mittels sukzessiver Salzfällung.

Wie erwartet zeigen die isolierten Komplexe das wildtypische CD-Absorptionsspektrum des trimeren LHCII. Neben den für monomeren LHCII charakteristischen Minima bei 491, 650 und 678, tauchen zusätzlich das prominente Minimum bei 473 nm und die Schulter bei 642 nm auf, die die Probe eindeutig als reine LHCII-Trimere charakterisieren (Hobe *et al.*, 1994; Rühle & Paulsen, 2004).

3.2 Photometrische Untersuchung zur Entfernung des Detergenz TX aus Insertionsansätzen durch die Behandlung mit „Bio Beads“

Eine grundlegende Voraussetzung für eine erfolgreiche Insertion von trimeren LHCII-Komplexen in Vesikel, ist die quantitative Entfernung des Detergenz. Erst wenn die Konzentration des Detergenz unter die jeweils spezifische kritische Mizellenkonzentration sinkt, inserieren die Komplexe in Lipiddoppelschichten (Boggasch, 2006). Misslingt diese Insertion, können sich mehrere Komplexe, ein entsprechender Salzgehalt vorausgesetzt, zu großen Aggregaten verbünden, um ihre hydrophoben Protein-Domänen gegenseitig zu schützen. Dabei fallen sie aus der Lösung aus. Fehlt das Salz dagegen, werden die Komplexe innerhalb kürzester Zeit instabil und zerfallen (Hobe, 1995).

Eine Möglichkeit, die Entfernung des Detergenz TX nachzuweisen, bietet die spektrale Untersuchung im UV-Bereich. TX absorbiert aufgrund seiner Phenylgruppe bei 275 nm, wie bei der Probe mit 0,05 % TX in Abb. 4.3.3 (linke Seite, dunkelgrüne Line) deutlich ersichtlich ist. Nach dreimaliger Behandlung mit „Bio Beads“ ändert sich das Absorptionsverhalten (linke Seite, hellgrüne Linie) drastisch, statt der erwarteten Verringerung der Absorption im UV-Bereich, wird sogar eine stark ‚negative‘ Absorption

detektiert. Da als Referenz unbehandelter Liposomenpuffer eingesetzt wurde, kann dies nur heißen, dass es durch die „Bio Beads“ Behandlung neben der Detergenzentfernung weitere absorbierende Substanzen entfernt oder in ihrem Absorptionsverhalten verändert wurden. Hierbei fällt der Verdacht auf die Blockcopolymeren, die eine absorbierende Phenylgruppe besitzen und zu einem geringen Teil durch „Bio Bead“-Behandlung verloren gingen. Die maximale Absorption des Benzolringes liegt bei 184 und 200 nm, zudem tritt ein schwächerer „peak“ zwischen 230 und 260 nm auf. Unklar bleibt allerdings, warum die Absorptionsunterschiede so drastisch sind und warum die Absorption letztendlich negativ wird. Läge es nur an der leichten Adsorption von Blockcopolymeren, so hätte bei einer Probe ohne „Bio Bead“-Behandlung und mit Liposomenpuffer als Referenz, ein zusätzliches deutliches Maximum bei 250 nm erscheinen müssen, welcher dann nach „Bio Beads“-Behandlung an Intensität verloren hätte.

Es bleibt festzuhalten, dass dieses Ergebnis die Methode deutlich abwertet. In den entscheidenden Proben lässt sie aber dennoch ausreichende Schlüsse zu. Vergleicht man die Absorptionsspektren der beiden eigentlichen Insertionsansätze vor „Bio Beads“-Behandlung (Abb. 4.3.3, rechte Seite; TX Ansatz schwarz, LM-Ansatz blau), so ist ein deutlicher Unterschied in der Absorption bei 275 nm sichtbar.

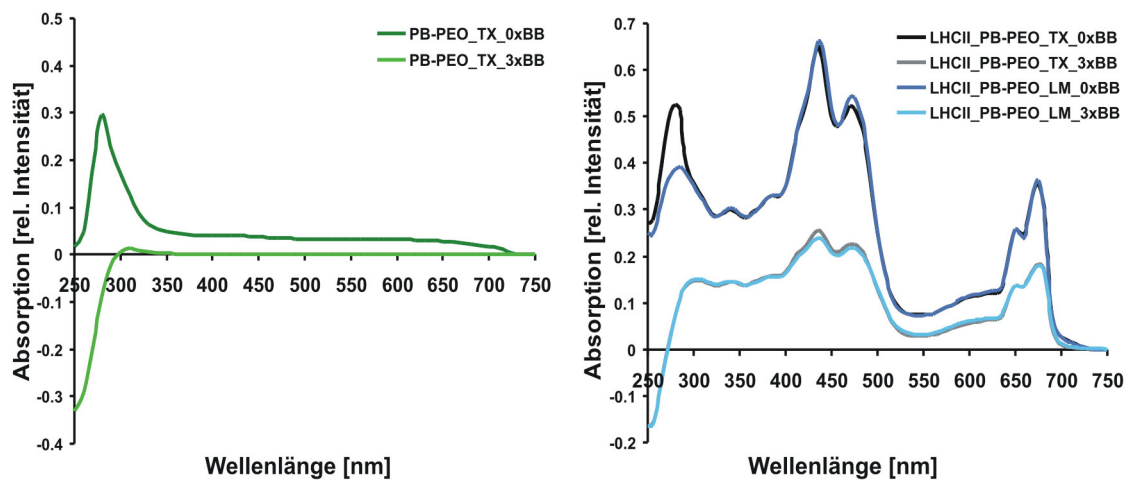


Abb. 4.3.3 : Photometrische Untersuchung der Entfernung des Detergenz durch Behandlung mit „Bio Beads“ aus PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikellösungen. Die linke Seite zeigt den Kontrollansatz mit Vesikeln, TX (0,05 %), aber ohne LHCII, vor (dunkelgrüne Linie) und nach „Bio Beads“-Behandlung (hellgrüne Linie). Die rechte Seite zeigt die beiden Hauptansätze mit TX-solubiliertem (schwarze Linie) und LM-solubiliertem LHCII (dunkelblaue Linie) vor Behandlung mit „Bio Beads“ und nach dreimaliger Behandlung mit „Bio Beads“ (TX-solubiliert grau, LM-solubiliert petrol) im Wellenlängenbereich von 250 bis 750 nm. Die Messung erfolgte in 1 mm Quarz-Küvetten, als Basislinie wurden beide Küvetten leer gemessen, als Referenz diente Liposomenpuffer (1x) ohne „Bio Bead“-Behandlung. Die Spektren sind nicht normiert.

Während beide Proben im sichtbaren Bereich das wildtypische Raumtemperatur-Spektrum für native LHCII-Trimere zeigen (Rühle & Paulsen, 2004), ist in der TX-Probe

(schwarz) ein deutliches Absorptionsmaximum bei 275 nm sichtbar. Das im LM-Ansatz verwendete Detergenz absorbiert dagegen fast gar nicht im UV-Bereich (Quelle: Pierce), entsprechend niedriger fällt die Absorption in diesem Bereich aus. Nach Behandlung mit „Bio Beads“ zeigen beide Proben, wie zuvor gesehen, die nicht erklärbare Abnahme der UV-Absorption bis zu negativen Werten. Die entscheidende Beobachtung ist allerdings, dass das Absorptionsspektrum beider Proben nach Behandlung mit „Bio Beads“ absolut identisch ist. Bei unvollständiger Entfernung des TX wären im UV-Bereich voneinander abweichende Spektren erwartet worden.

Neben dieser Beobachtung fällt auf, dass nach „Bio Beads“ Behandlung die Absorption durch LHCII im sichtbaren Bereich deutlich nachgelassen hat. Zudem war bei LHCII-haltigen Proben (sowohl Ansätze mit als auch ohne Vesikellösung, unabhängig vom verwendeten Detergenz) nach „Bio Bead“-Behandlung eine deutlich Trübung der Proben wahrnehmbar, während Proben mit Vesikeln, Detergenz und Pigment oder nur Vesikeln und Detergenz klar blieben. Um die durch die Trübung entstandene Lichtstreuung zu minimieren, wurden die UV-Küvetten in allen Messungen direkt vor dem Detektor des Photometers platziert. Bei den Referenzproben mit LHCII aber ohne Vesikellösung, war mit der Entfernung der Detergenzien TX oder LM eine sehr starke Abnahme der Absorption im sichtbaren Bereich wahrnehmbar (Daten nicht gezeigt). In Ansätzen mit freien Chlorophyllen und Vesikellösung aggregierte der Großteil der Pigmente, ein geringer Anteil war aber auch nach Entfernung des Detergenz in Lösung stabilisiert (Daten nicht gezeigt).

3.3 Spektroskopische Charakterisierung des LHCII nach Insertionsversuchen

Die spektroskopische Charakterisierung des LHCII mittels Detektion der Fluoreszenz-Emission nach selektiver Chl *b*-Anregung zeigte, dass beide Insertionsansätze mit LHCII (solubilisiert in TX oder LM) sowohl vor als auch nach Entfernung des Detergenz intakte LHCII-Komplexe enthielten. Alle Proben zeigen ein Fluoreszenzmaximum des Chl *a* bei 680 nm und damit den erwarteten Energietransfer intakter Komplexe (Abb. 4.3.4 linke Seite; Spektren normiert auf Emissionsmaximum). Die gleichen Spektren unnormiert (Abb. 4.3.4, rechte Seite) zeigen ein leichtes „Quenchen“ der Chlorophyll-Fluoreszenz in TX-solubilierten LHCII-Trimeren (schwarze Linie) gegenüber LM-solubilierten (blaue Linie). Obwohl die LHCII-Konzentration beider Proben identisch ist (Abb. 4.3.3), zeigt die TX-Probe eine leicht schwächere Emission.

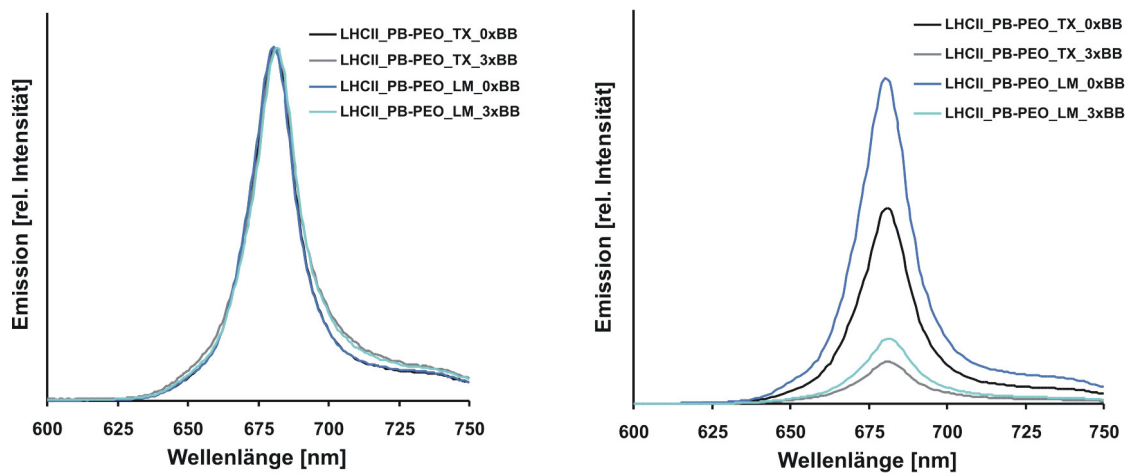


Abb. 4.3.4: Unterschiede in der Fluoreszenz-Emission („front face“-Messungen) des LHCII in PB-PEO-Vesikellösungen vor und nach Detergenzentzug. Dargestellt sind der Vesikel-Ansatz mit TX-solubilisiertem LHCII vor (schwarze Linie) und nach (graue Linie) Detergenzentzug, so wie der Vesikel-Ansatz mit LM-solubilisiertem LHCII vor (dunkelblaue Linie) und nach (hellblaue Linie) Detergenzentzug. In allen Proben wurde selektiv Chl *b* bei 470 nm angeregt, Spektren links wurden auf die maximale Emission normiert, die Spektren rechts sind nicht normiert.

Durch Entfernung des Detergenz sinkt die Fluoreszenz-Emission beider Proben, wie zuvor in der Absorption beobachtet (Abb. 4.3.3), deutlich ab. Ob dieser Effekt alleine in einer Abnahme intakter Komplexe oder in der zusätzlichen Entstehung von Aggregaten mit entsprechendem „Quench“-Verhalten begründet liegt, kann durch die bei Raumtemperatur aufgenommenen Spektren nicht unterschieden werden. Hierzu hätten Tieftemperaturspektren gemessen werden müssen, die bei Aggregation des LHCII eine deutliche Fluoreszenz bei 700 nm aufweisen (Vasilev *et al.*, 1997; Barros *et al.*, 2009). Die Referenz-Ansätze mit LHCII ohne Vesikellösung zeigten mit Entfernung des Detergenz eine deutliche stärkere Abnahme der Fluoreszenz. Nach dreimaligem Wechsel der „Bio Beads“ war praktisch keine Fluoreszenz des LHCII mehr detektierbar, die schwach grünen Lösungen zeigten lediglich Fluoreszenzmaxima bei 675 nm, typisch für aggregierte Chlorophylle. Reine PB-PEO-Lösungen zeigten dagegen gar keine Fluoreszenz (Daten nicht gezeigt).

CD-Absorptionsmessungen der Insertionsansätze zeigten deutliche Abweichungen zu den Standard-Spektren des LM-solubilisierten trimeren LHCII. Diese Probe besitzt, wie zuvor beschrieben, charakteristische Minima bei 473, 491, 650 und 678 nm, sowie eine Schulter bei 642 nm (Abb. 4.3.2). Die LM-solubilisierten LHCII-Trimere in PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikellösung zeigen ebenfalls dieses Absorptionsmuster, was für eine normale Solubilisierung spricht (Abb. 4.3.5, blaue Kurve). Wird das Detergenz entfernt, ändert sich die Intensität einzelner „peaks“ drastisch (hellblaue Kurve). Während die Absorption im roten Wellenlängen-Bereich wenig beeinflusst wird, ändern

sich im Soret-Absorptionsbereich die Intensitäten einzelner Minima und ähneln in ihrer Absorption rekombinanten Trimeren aus TX-Saccharose-Gradienten (Boggasch, 2006), beziehungsweise Trimeren in Liposomen (Boggasch, 2006; Yang *et al.*, 2006) oder Thylakoidmembranen (Dobrikova *et al.*, 2003). Insbesondere das Minimum bei 491 nm geht deutlich zurück, die Minima bei 471, 457 und 434 nm verändern sich wenig. Insgesamt nimmt die Absorption durch die „Bio Beads“- Behandlung wie vorher schon beobachtet ab.

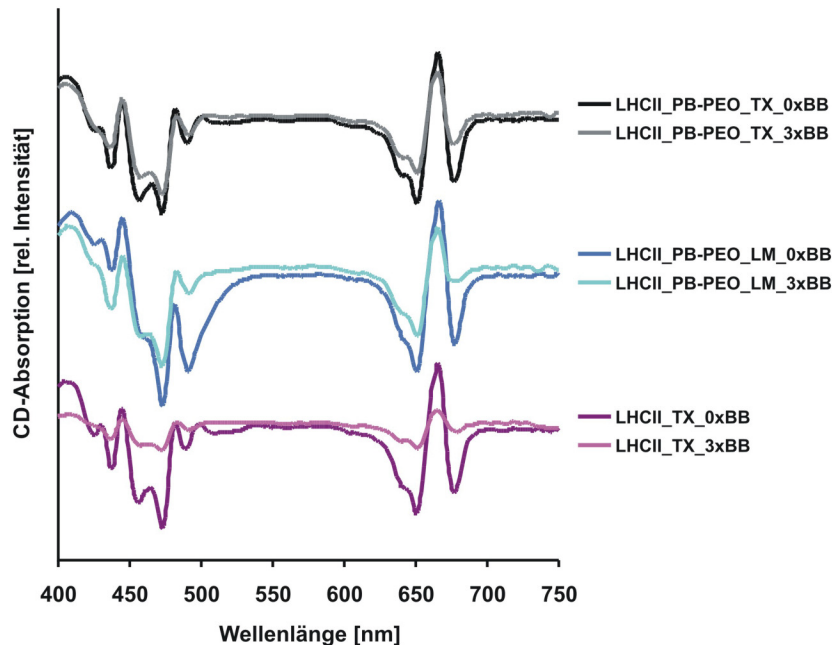


Abb. 4.3.5: Unterschiede in der CD-Absorption des LHCII in Detergenz- und PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK -Vesikellösungen vor und nach Detergenzentzug durch dreimalige „Bio Beads“- Behandlung. Dargestellt sind der Vesikel-Ansatz mit TX-solubiliertem LHCII vor (schwarze Linie) und nach (graue Linie) Detergenzentzug, der Vesikel-Ansatz mit LM-solubiliertem LHCII vor (blaue Linie) und nach (petrol) Detergenzentzug, sowie der Ansatz ohne Vesikellösung mit TX-solubiliertem LHCII vor (lila Linie) und nach (rosa Linie) Detergenzentzug. Die Spektren sind nicht normiert.

Werden die nativen Trimere dagegen in TX gelöst (schwarze Linie), zeigen sie von Beginn an das eben beschriebene Absorptionsverhalten und sind identisch zu LHCII in PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikellösung, denen LM entzogen wurde (hellblaue Linie). Wird das TX entfernt, ändert sich das Absorptionsverhalten nicht, lediglich die Intensität nimmt ab. LHCII, solubiliert in TX ohne Vesikel (lila Kurve), absorbiert ebenfalls identisch, durch Entzug des Detergenz nimmt die Intensität der Absorption drastisch ab, was auf einen Rückgang intakter Komplexe zurückgeführt werden kann. Wie zuvor zeigen Kontroll-Ansätze mit Pigment sowohl vor als auch nach Detergenzentfernung eine schwache Absorption, reine Vesikel-Ansätze dagegen kein Signal (Daten nicht gezeigt).

3.4 Messung der Hitzestabilität des LHCII in PB-PEO-Vesikellösung mittels CD-Absorption

Die Messung der Stabilität des LHCII in PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK -Vesikellösung erfolgte, wie in Yang *et al.* (2006) für Liposomen- und Detergenz-solubilisierten LHCII beschrieben, durch Messung der CD-Absorption im Temperaturgradienten.

Entsprechende Messungen zeigten, dass auch LHCII-Trimere in PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK -Vesikellösung mit ansteigender Temperatur instabil werden und zerfallen. Wie in Abb. 4.3.6 A deutlich erkennbar ist, verlieren die zuvor beschriebenen Absorptionsminima des LHCII-Trimers mit steigender Temperatur an Intensität und sind bei 80 °C komplett verschwunden. Der permanente Intensitätsverlust des prominenten Minimum bei 473 nm ist in Abb. 4.3.6 B in Abhängigkeit zum Temperaturanstieg dargestellt. Bei einer Temperatur von 71,5 °C besitzt das Minimum nur noch halbe Intensität (T_m), die Hälfte der trimeren Komplexe ist denaturiert.

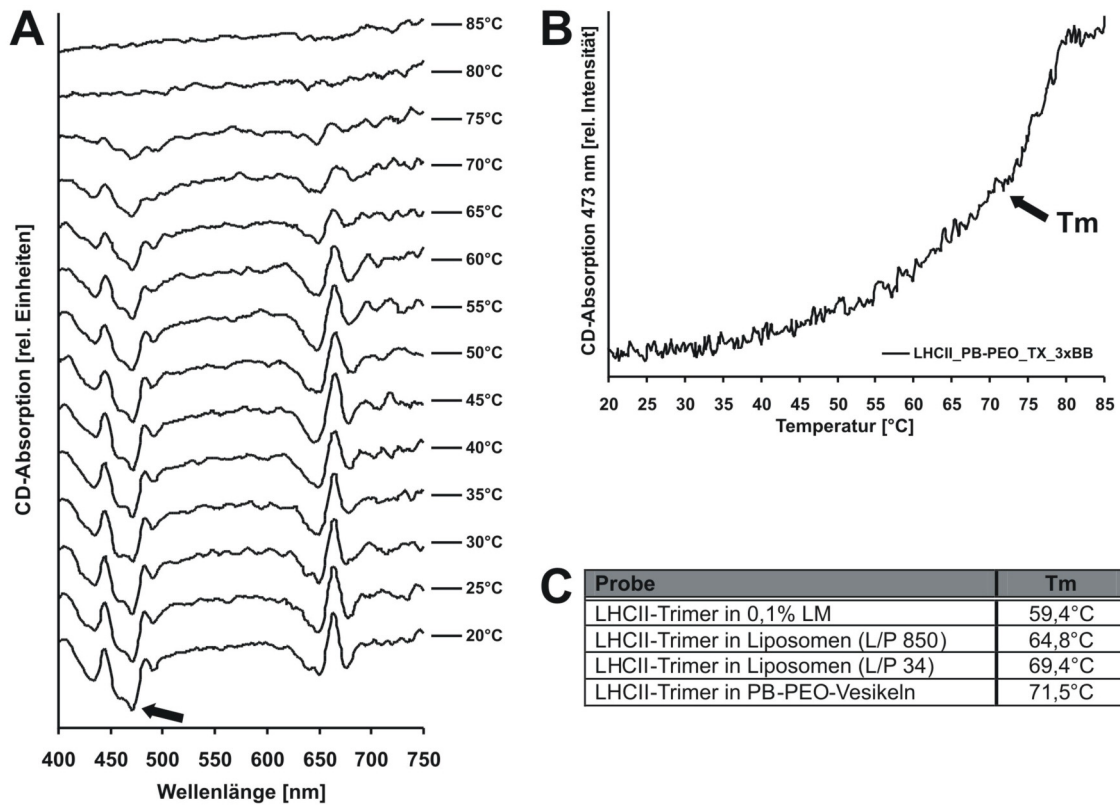


Abb. 4.3.6: Charakterisierung der Stabilität des LHCII in PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikellösung durch Messung der CD-Absorption im Temperaturgradienten. **(A)** zeigt die Änderung der CD-Absorption einer LHCII-PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikellösung nach Entfernung des TX in Abhängigkeit zu Temperaturerhöhungen um jeweils 5 °C. Die permanente Änderung des Minimums bei 473 nm (Pfeil in A) wird in **(B)** dargestellt. Die markierte Temperatur T_m (Pfeil in B) stellt die Temperatur dar, bei der die Hälfte der Komplexe zerfallen ist. In **(C)** werden die T_m-Werte verschiedener Ansätze von Yang *et al.* (2006) mit dem T_m des LHCII in PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikeln (2 Messreihen) verglichen. L/P meint Lipid/ Protein-Verhältnis.

Vergleicht man in Abb. 4.3.6 C den aus zwei unabhängigen Messungen ermittelten T_m des trimeren LHCII in PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK -Vesikellösung mit Vergleichswerten aus der Literatur (Yang *et al.*, 2006), so besitzt die Probe eine deutlich höhere Hitzestabilität als der Detergenz-solubilisierter LHCII in LM und eine leicht höhere Stabilität als LHCII in Liposomen mit einem niedrigen Lipid/Protein-Verhältnis (L/P 34). Hierbei gilt zu beachten, dass die Werte aus Yang *et al.* (2006) aus 3 bis 7 Einzelmessungen gemittelt wurden und dadurch besser gesichert sind.

3.5 Dynamische Lichtstreuung

Mit Hilfe der Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS) kann, durch Analyse des Streulichts eines auf die Lösung gerichteten Lasers, der gemittelte hydrodynamische Radius (R_h) von Polymeren in verdünnter Lösung, sowie ein Maß für die Radien-Polydispersität (μ_2) der Polymere bestimmt werden (Schmidt, 1993). So erhält man im Falle einer Vesikelsuspension Auskunft über den mittleren Durchmesser der Vesikel und die Breite der Vesikel-Größenverteilung. Einzelne Präparationen von PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikeln (Tab. 4.3.1: Vesikellösung I, II, III) wurden mittels DLS charakterisiert. Die Vesikel der einzelnen Präparationen in Wasser zeigen sehr einheitliche Radien von 31 (Lösung II) bzw. 35 nm (Lösung I und III). Wie die niedrigen μ_2 -Werte unterhalb 0,1 zeigen, sind die Vesikelgrößen zudem sehr eng verteilt. Die Behandlung der Vesikel mit den Detergenz-adsorbierenden „Bio Beads“ beeinflusste weder den Vesikelradius, noch die Größenverteilung. Im Gegensatz zu den Detergenzien TX oder LM wird nur eine geringe Menge der Blockcopolymeren adsorbiert, der ermittelte Konzentrationsverlust liegt bei ca. 5 % je „Bio Bead“-Behandlung (Daten nicht gezeigt). Wie aus Tab. 4.3.1 (oberer Block) ersichtlich wird, hat weder eine Änderung des Lösungsmittels, noch die gleichzeitige Zugabe des Reduktionsmittels DTT einen Einfluss auf Größe oder Größenverteilung der Vesikel. Durch die Zugabe des Detergenz TX verändert sich die Größe der Vesikel deutlich, der mittlere Radius wird annähernd verdoppelt und die Größenverteilung der Vesikel wird recht breit. Durch Entfernung des Detergenz mittels „Bio Beads“-Behandlung ist der beobachtete Effekt nicht rückgängig zu machen. Noch drastischer ist der Effekt bei den Insertionsversuchen mit LHCII (mittlerer und unterer Block).

Tabelle 4.3.1: Mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelte Größe und Größenverteilung von PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikeln in Abhängigkeit von Lösungsmitteln, von Chemikalien, sowie nach Insertion von nativem LHCII. R_h ist der gemittelte hydrodynamische Radius und wurde mittels biexponentiellem Fit ausgewertet (Extrapolation: $q=0$). μ_2 ist ein Maß für die Radien-Polydispersität und wurde mittels Cumulant-Fit bei 90° ausgewertet (für eng verteilte Proben gilt $0,05 < \mu_2 < 0,1$). Alle Proben wurden vor Messung durch einen Filter mit einer Porengröße von 450 nm filtriert, eine Probe der LHCII-Insertion zunächst nur durch einen Filter der Porengröße von 5 μm (Filter B). Werte in eckigen Klammern sind aufgrund der geringen Güte des Fit lediglich als Richtwerte einzustufen. Die Vesikellösungen I (Müller PV47), II (Müller PV36) und III (Müller PV50) stammen jeweils aus einzelnen Präparationen. Die Probe LHCII_PB-PEO_TX_3xBB ist der Insertionsansatz des TX-solubilisierten LHCII nach dreimaliger „Bio Beads“- Behandlung.

Ansätze	$\langle R_h \rangle$ / nm	μ_2
Vesikellösung I in ddH ₂ O	35	0,06
Vesikel mit Liposomenpuffer (1x)	35	0,06
Vesikel mit Liposomenpuffer und DTT (10 mmol/l)	36	0,08
Vesikel mit Liposomenpuffer, DTT und Triton X-100 (0,05%)	66	0,11
Vesikel mit Liposomenpuffer, DTT, Triton X-100 und Bio Beads	61	0,13
Vesikellösung II in ddH ₂ O	31	0,08
LHCII_PB-PEO_TX_3xBB	[146]	[0,19]
LHCII_PB-PEO_LM_3xBB	[143]	[0,21]
Vesikellösung III in ddH ₂ O	35	0,06
LHCII_PB-PEO_TX_3xBB Filter B	[538]	[0,39]
LHCII_PB-PEO_TX_3xBB	[94]	[0,17]

Unabhängig vom verwendeten Detergenz zeigen alle LHCII-Vesikel-Proben nach Entfernung des Detergenz sehr große Vesikelradien gepaart mit einer beträchtlichen Größenverteilung. Aufgrund der Verteilungsbreite und der damit verbundenen schlechten Fit-Güte sind die Ergebnisse für R_h und μ_2 nur als Richtwerte anzusehen und daher in Klammern gesetzt. Verwendet man in der Präparation für die DLS Filter mit größeren Porenweiten, tritt der Effekt noch deutlicher auf. Werden die Lösungen extrudiert, so entstehen bei 100 nm Porengröße Partikel mit einem R_h von 100 nm und breiter Verteilung. 50 nm Poren dagegen verstopfen, es bleibt eine farblose, klare Lösung. Letztendlich bleibt festzuhalten, dass sowohl die Behandlung mit TX, aber noch mehr die gleichzeitige Zugabe des LHCII, zur Auflösung der definierten Vesikelstrukturen führen und die mittels DLS detektierten Partikel zudem zur Aggregation neigen.

3.6 Erstellung eines Höhenprofils von PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikeln mittels AFM

Die Ansätze zur Insertion des LHCII in PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Vesikeln wurden durch Dr. M. Janke (AK Janshoff, Mainz) kraftmikroskopisch untersucht. Ziel war es festzustellen, ob LHCII-Trimere, welche *in vivo* die Thylakoidmembran mit 3 bis 4 nm Durchmesser durchspannen, in artifizielle Vesikel mit deutlich größerer lipophiler Schichtdicke (~15 nm) inseriert werden können und dabei, wie in Abb. 4.1.2 dargestellt, trichterförmige Oberflächenstrukturen ausgebildet werden. Außerdem war von Interesse, ob

inserierte Komplexe gleichmäßig über das Vesikel verteilt vorliegen oder als Aggregate größere Protein-Cluster bilden.

Hierzu wurden verschiedene Vesikel-Ansätze auf Glimmer-Oberflächen gespreitet, kräftig mit Pufferlösung gespült und in Lösemittel durch eine AFM-Tastfeder („cantilever“, Abb. 4.3.7) im „tapping mode“ abgerastert. Hierbei handelt es sich um einen dynamische Modus, bei der der „cantilever“ in seiner Resonanzfrequenz zur Schwingung angeregt wird und die zu untersuchende Oberfläche periodisch mit konstanter Amplitude abtastet. Erhebungen in der Oberfläche, werden durch einen Laser detektiert, welcher, auf den „cantilever“ gerichtet, je nach Ausrichtung der Tastfeder in unterschiedlichem Winkel reflektiert wird (Abb. 4.3.7).

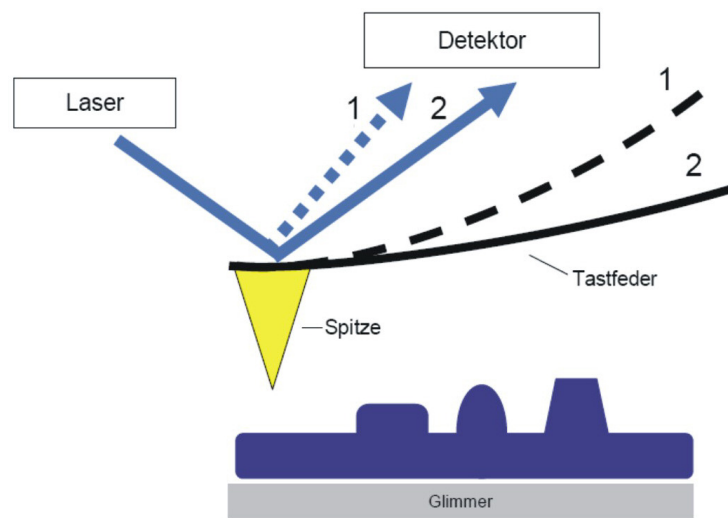


Abb. 4.3.7: Schematische Darstellung der Erstellung eines Höhenprofils mittels AFM. Die „cantilever“-Spitze (gelb) tastet eine Oberfläche eines Vesikels, bestückt mit unterschiedlichen Partikeln (lila) und gespreitet auf einer Glimmeroberfläche (grau) ab. Je nach Höhe und Härte der Partikel ändert sich der Auslenkungswinkel der Spitze (schwarz 1 und 2), woraufhin ein auf den „cantilever“ gerichteter Laserstrahl unterschiedlich reflektiert wird (blau 1 und 2). Mit entsprechender Computer Software des AK Janshoff wird die Änderung in ein zweidimensionales Höhenprofil umgerechnet. Aus Boggasch (2006).

Die reine Vesikellösung in Liposomenpuffer lässt sich sehr gut auf Glimmer spreiten, ein Zusatz von CaCl_2 , notwendig zum Spreiten von LHCII beladenen Liposomen (Boggasch, 2006), ist nicht notwendig. Nach der Lagerung über Nacht bei Raumtemperatur und mehrmaligem, kräftigen Spülen mit Puffer erhält man einen Vesikelfilm, welcher, mit Ausnahme weniger defekter Stellen (Abb. 4.3.8 A, helle Fläche unten links), einen gleichmäßigen Film bildet. Abb. 4.3.8 A zeigt die Aufsicht auf eine mit Vesikel belegte Glimmerfläche von $16 \mu\text{m}^2$. Die Fläche ist, bis auf wenige Ausnahmen, gleichmäßig gefärbt, was für eine Fläche ohne Unebenheiten spricht. Dies ist auch im „line scan“ und dem entsprechenden Höhenprofil ersichtlich (Abb. 4.3.8 B). Kratzt man mit dem Cantilever auf der Oberfläche (schwarzes Rechteck), wird der Glimmer freigelegt und

es entsteht ein Loch einer Tiefe von ca. 12 nm. Die erwartete Schichtdicke für den hydrophoben Kern des Polymerfilms liegt bei ca. 15 nm, was im Toleranzbereich dieser Kratzmethode liegt. Die hydrophile Schicht aus PEO ist mittels AFM nicht darstellbar. Da die Messung in wässriger Lösung erfolgt, bleibt diese Schicht gequollen und damit zu flexibel für eine Detektion mittels AFM.

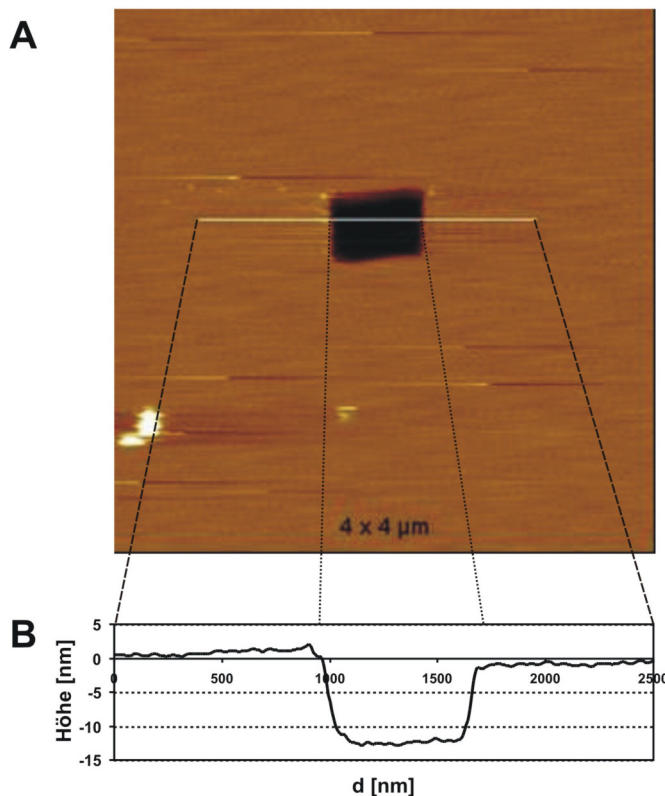


Abb. 4.3.8: (A) zeigt eine AFM-Aufnahme der gespreiteten Vesikellösung auf Glimmer sowie die Darstellung des Höhenprofils (B) zum „line scan“. Die obere Aufnahme (Fläche: 4 x 4 μm) stellt eine Aufsicht dar, Bereiche, die aus der Ebene herausstehen, werden farblich heller, Bereiche, die in die Ebene einsinken, dunkler wiedergegeben. Bei dem ca. 0,7 x 0,7 μm großen dunklen Bereich handelt es sich um eine ausgekrazte Vesikelfläche, die weiße Linie oberhalb der Bildmitte zeigt den Weg des „line scan“. Als Probe wurde Vesikellösung ohne LHCII in Liposomenpuffer B gespreitet. Das untere Diagramm (B) stellt das seitliche Höhenprofil des „line scan“ dar.

Auch die Blockcopolymeren des LHCII- PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK-Insertionsansatzes (Abb. 4.3.9 A

und C) lassen sich ohne weitere Probleme auf Glimmer spreiten. Die gemessene Schichtdicke des Polymerfilms beträgt je nach Messort zwischen 8 und 12 nm, die Beschichtung des Glimmers ist durchgehend und gleichmäßig. Im Unterschied zur LHCII-freien Probe ist hier aber eine Vielzahl von Partikeln erkennbar, die aus dem Polymerfilm ca. 4 bis 5 nm herausstehen. Die Partikel, bei denen es sich um den LHCII handelt (siehe folgendes Kap. IV, 3.7), bilden in Abb. 4.3.9 A und C unterschiedlich große „Cluster“, welche über die Fläche verteilt vorliegen. Die „Cluster“ in Abb. 4.3.9 A sind zum überwiegenden Anteil deutlich kleiner als in Abb. 4.3.9 C, übertreffen aber deutlich die erwartete Breite von LHCII-Trimeren. Interessanterweise kann in A auch ein „Cluster“ mit geringerer Höhe und sehr homogener Oberfläche detektiert werden (linke Seite des „line scan“). Einzelne Partikel, die deutlich höher aus der Ebene hervorstehen, konnten teilweise durch erneutes Spülen entfernt werden.

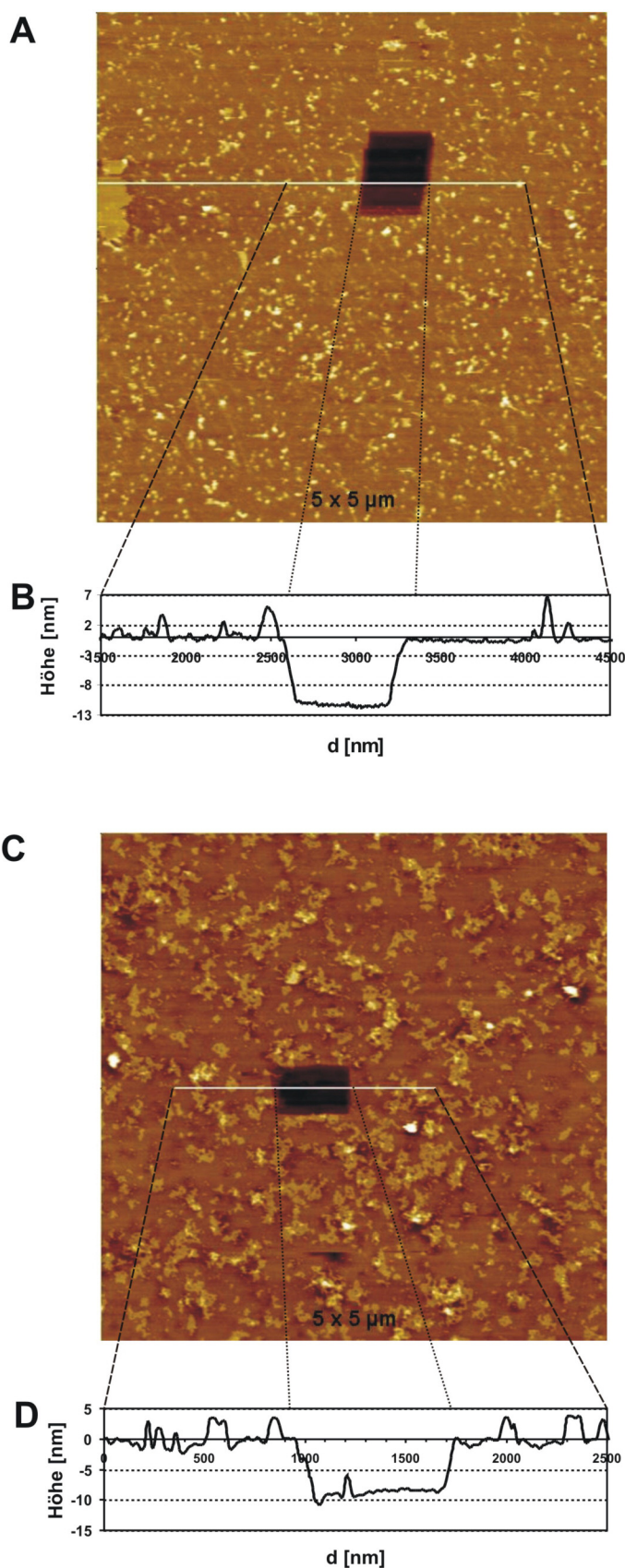


Abb. 4.3.9: AFM-Aufnahmen (**A**, **C**) der gespreiteten Vesikellösung mit LHCII auf Glimmer sowie Darstellung der Höhenprofile der „line scans“ (**B**, **D**). Die Aufnahmen (**A**) und (**C**) (Fläche je $25 \mu\text{m}^2$) stellen Aufsichten dar, Bereiche, die aus der Ebene herausstehen, werden farblich heller, Bereiche, die in die Ebene einsinken, dunkler dargestellt. Bei den ca. $0,7 \times 0,7 \mu\text{m}$ großen dunklen Bereichen handelt es sich um ausgekrazte Vesikelflächen, die weißen Linien oberhalb der Bildmitte (**A**) beziehungsweise in der Bildmitte (**C**) zeigen die Wege der „line scans“. Als Probe wurden Vesikellösung mit LHCII (LHCII_PB-PEO_TX_3xBB) in Liposomenpuffer B gespreitet. Die Diagramme (**B**) und (**D**) stellen die seitlichen Höhenprofile der jeweiligen „line scans“ dar. (**A**) und (**C**) zeigen Ausschnitte derselben Präparation, aufgenommen an verschiedenen Glimmer-Stellen. Aufnahme (**C**) wurde 24 h nach Aufnahme (**A**) gemessen.

Bei der in Abb. 4.3.9 C dargestellten Probe handelt es sich um die gleiche Probe wie in A, allerdings wurde die Probe nach der ersten Messung weitere 24 h inkubiert und an anderer Stelle neu vermessen. Die hier detektierten „Cluster“ sind deutlich größer, es kann aber nicht gesagt werden, ob der Grund für dieses Ergebnis in der verlängerten Inkubationsdauer oder dem gewechselten Messort liegt. Genaue Angaben zur flächenmäßigen Ausdehnung solcher „Cluster“ sind nicht machbar, da es in AFM-Aufnahmen aufgrund der Spitzengeometrie und des

Abtastvorgangs zur Verfälschung der Messbreite kommt. Wie schon zuvor bemerkt, zeigten Filtrationsversuche aber, dass die Proben ohne weiteres durch Poren eines Durchmessers von 100 nm filtriert werden können. 50 nm Poren wurden dagegen durch die „Cluster“ verstopft.

3.7 Charakterisierung der Partikel in gespreiteten Polymerschichten mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Fluoreszenz-Mikroskopie bietet einen Ansatz die mittels AFM detektierten Partikel in gespreiteten Polymerschichten zu charakterisieren. Das in Insertionsversuchen verwendete Membranprotein LHCII bindet als Monomer 14 Chlorophylle als Cofaktoren, die durch Licht angeregt werden können und je nach Belichtungsintensität und Oligomerisierungsgrad Energie in Form von Fluoreszenzlicht wieder abgeben können. Der in der Fluoreszenzspektroskopie (Kap. IV, 3.3) gewählte Versuchsaufbau erlaubt es beispielsweise spezifisch Chl *b* bei 470 nm anzuregen und die Fluoreszenzintensität zwischen 600 und 750 nm zu messen. Das in der Fluoreszenz-Mikroskopie verfügbare TRITC-Filterset mit einer Anregungswellenlänge von 545 nm und einem Emissions-Bandpassfilter von 620 nm stellt lediglich einem Kompromiss dar. Wie in Abb. 4.3.3 ersichtlich, absorbiert der LHCII bei 545 nm im Verhältnis zum blauen oder roten Wellenlängenbereich des Lichts vergleichsweise schwach. Lediglich die gebundenen Xanthophylle absorbieren noch ein wenig. Zudem sind die Fluoreszenzen von Chl *a* und *b* bei 620 nm ebenfalls nur schwach ausgeprägt. Die zur Verfügung stehenden Möglichkeiten sollten aber ausreichen, um die in der AFM detektierten Partikel als fluoreszierende LHCII-Komplexe zu identifizieren. Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der gespreiteten Vesikellösung ohne LHCII zeigen, wie zuvor in der spektralen Untersuchung, keinerlei Fluoreszenz. Auch längere Belichtungszeiten führten zu keinerlei Emission bei 620 nm (Daten nicht gezeigt), so dass eine Emission durch Blockcopolymer ausgeschlossen werden kann. Gespreitete Insertionsansätze mit LHCII zeigten dagegen bei längeren Belichtungszeiten von 5 und 10 s eine deutliche Emission, dargestellt in Abb. 4.3.10 als rot-fluoreszierende Punkte unterschiedlicher Größe. Wie schon zuvor im AFM gesehen, sind auch die fluoreszierenden LHCII-Komplexe über die ganze Fläche in Form unterschiedlich großer „Cluster“ verteilt, der homogen verteilte Polymerfilm entspricht hierbei dem dunklen Hintergrund. Wegen der geringen Auflösung des Mikroskops und der diffusen Emission ist eine exakte laterale Ausmessung der Partikel nicht möglich.

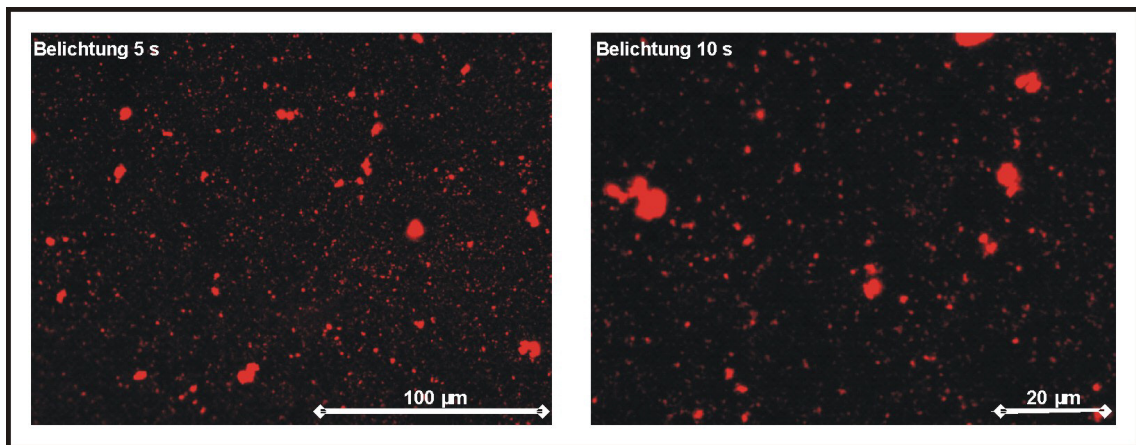


Abb. 4.3.10: Charakterisierung der Partikel in gespreiteten Polymerschichten mittels Fluoreszenz-Mikroskopie. Die zuvor mittels AFM untersuchten Glimmerstücke mit gespreiteten Polymerschichten aus Insertionsansätzen mit LHCII wurden mit Licht der Wellenlänge 545 nm angeregt und die Emission bei 620 nm mit einer hochempfindlichen Schwarz/Weiß-Kamera fotografiert. Die linke Abbildung wurde 5 s belichtet, rechts ist eine Vergrößerung mit einer Belichtungszeit von 10 s dargestellt. Beide Abbildungen wurden nachträglich eingefärbt.

3.8 Verdau von Insertionsansätzen mit der Protease Thermolysin

Eine Möglichkeit, die Intaktheit und das Insertionsverhalten des LHCII in Vesikel weiter zu charakterisieren, bietet der Verdau des Proteins mit der Endopeptidase Thermolysin, welche den gefalteten LHCII nur am N-Terminus, den ungefalteten dagegen komplett hydrolysieren kann. Wird nur der N-Terminus verdaut, wird die Masse des monomeren Proteins von ca. 25,5 kDa auf 24 kDa verringert (Kuttkatt *et al.*, 1995). Bei Zugabe des Thermolysin zu einer Suspension von intakten Vesikeln mit inserierten Membranproteinen kann man annehmen, dass für die Protease lediglich die N-Termini von Proteinen zugänglich sind, die aus dem Vesikel in das umgebende Lösungsmittel schauen. Befindet sich ein Protein innerhalb des Vesikellumens oder ist es so inseriert, dass der N-Terminus in das Vesikellumen zeigt, sollte kein Verdau stattfinden.

In Abb. 4.3.11 ist das Laufverhalten im SDS-Gel verschiedener Insertionsansätze und deren Kontrollen nach Thermolysin-Verdau dargestellt. Während das unverdaute native Protein (Spur 1 und 8) erwartungsgemäß eine Bande von ca. 25 kDa, leicht oberhalb der 24 kDa-Markerbande (Spur 2 und 7), besitzt, laufen die verdauten Proben der Insertionsansätze in Spur 3 (LHCII_PB-PEO_TX_3xBB) und 4 (LHCII_PB-PEO_LM_3xBB) minimal weiter bis ca. 24 kDa (*). Eine zweite Bande auf Höhe des unverdauten LHCII ist nicht erkennbar.

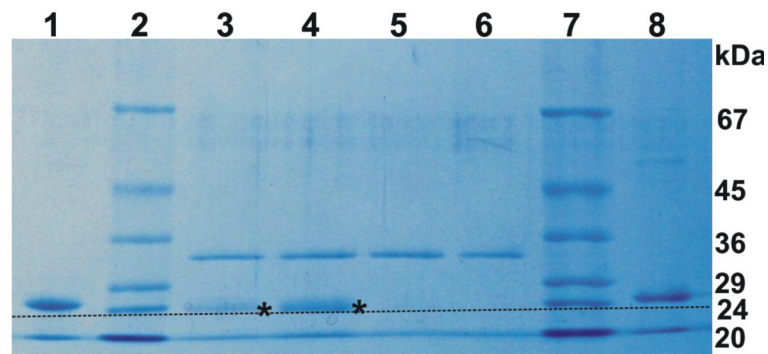


Abb. 4.3.11: Denaturierende SDS-PAGE nach Coomassie-Blau-Färbung zur Analyse des Verdauens verschiedener Insertionsansätze durch die Endopeptidase Thermolysin. Auf Spur 1 und 8 wurden jeweils 2 μg des unverdauten murenen Lhcb1 aufgetragen, auf Spur 2 und 7 jeweils 5 μl des SDS7-Marker, auf Spur 3 und 4 jeweils 20 μl der verdauten Insertionsansätze mit LHCII und Vesikeln nach Detergenzentzug (Spur 3 LHCII_PB-PEO_TX_3xBB, Spur 4 LHCII_PB-PEO_LM_3xBB), auf Spur 5 und 6 die entsprechenden, verdauten Kontrollansätze ohne Vesikel nach Detergenzentzug (Spur 5 LHCII_TX_3xBB, Spur 6 LHCII_LM_3xBB).

In den Spuren 5 (LHCII_TX_3xBB) und 6 (LHCII_LM_3xBB) der Kontrollansätze ohne Polymere ist der LHCII komplett verdaut. Alle verdauten Proben (Spur 3 bis 6) zeigen zudem die Bande des Thermolysin bei 34 kDa. Die in allen Ansätzen vorkommende leichte Bande bei 20 kDa kennzeichnet die Lauffront.

4 Diskussion

4.1 Überprüfung der Ausgangsbedingungen für Insertionsversuche

Eine grundlegende Voraussetzung für die Durchführung des Insertionsexperiments von LHCII in Polymersomen sind optimale Ausgangsbedingungen, beziehungsweise die optimale Beschaffenheit der entsprechenden Materialien. Die Isolierung und Aufreinigung der nativen Trimere des LHCII aus Erbse nach Standardprotokoll (Rühle & Paulsen, 2004) brachte den erwarteten Erfolg. Sowohl die gelelektrophoretische, wie auch die spektroskopische Charakterisierung mittels Absorptions- und CD-Spektroskopie oder Energietransfer bei Raumtemperatur sind identisch zu den publizierten Daten.

Die Herstellung der Polymersomen mit dem Diblockcopolymer PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK als Grundbaustein erfolgte ebenfalls nach standardisierten Methoden (Müller *et al.*, 2009), der gewünschte Durchmesser und die enge Größenverteilung der Vesikel konnte mittels dynamischer Lichtstreuung durch W. Müller bestätigt werden. Auch eine Spreitung der Vesikellösung auf Glimmer, analog zu früheren Versuchen mit Liposomen (Boggasch, 2006), funktionierte problemlos. Das Abtasten der Vesikeloberfläche mittels Kraftmikroskopie durch Dr. M. Janke bestätigte die erwartete Schichtdicke der hydrophoben PB-Doppelschicht (Müller, 2006). Hiermit waren auch die Vorbedingungen in Bezug der Polymersomen-Qualität erfüllt.

4.2 Entfernung der Detergenzien aus den Insertionsansätzen

Der Versuch der Insertion des LHCII in die artifiziellen Polymersomen erfolgte analog dem standardisierten Protokoll der Insertion des LHCII in Liposomen (Boggasch, 2006). Der dort erbrachte direkte spektroskopische Nachweis der Detergenzentfernung mittels UV-Absorptionsspektren wurde in diesem Insertionsexperiment erschwert durch die starke Trübung der Lösung infolge der Bildung von Polymersomen- und Protein-Aggregaten. Die dadurch entstehende Lichtstreuung in den Absorptionmessungen konnte durch die Wahl eines Photometers, in welchem Probe und Detektor räumlich nahe angeordnet sind, minimiert werden.

Ein zweites auftretendes Problem, die Existenz eines störenden negativen Absorptionssignals nach „Bio Beads“- Behandlung, konnte nicht geklärt werden. Die Tatsache allerdings, dass die Absorptionsspektren der Insertionsansätze mit TX beziehungsweise mit LM im UV-Bereich deutlich unterschiedlich sind, nach Detergenzentzug aber einander identisch sind, spricht für die erfolgreiche Entfernung des TX. Die Entfernung des LM aus dem LM-Ansatz konnte bereits durch die charakteristische Änderung des CD-Signals belegt werden. Weiter kann argumentiert werden, dass die „Bio Beads“ nur gering zur Adsorption des PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK tendieren, also nicht durch

eine ungewollte Adsorption belegt sind, und zudem die eingesetzte Menge laut Hersteller zur Entfernung der 20fachen Menge an Detergenz ausreichend sein sollte. Dass die Entfernung der Detergenzien an sich gut funktioniert, wurde an den LHCII-Kontrollansätzen ohne Polymersomen ersichtlich. Hier zerfallen die Komplexe in der wässrigen Lösung, verlieren ihre spektralen Eigenschaften und werden, wie für ungefalteten LHCII erwartet (Kuttkatt *et al.*, 1995), durch Thermolysin hydrolysiert.

Es kann also festgehalten werden, dass im durchgeführten Experiment, analog zur Insertion in Liposomen, dem Detergenz-solubilisierten LHCII mittels „Bio Beads“ das Detergenz langsam entzogen werden kann und somit, durch Zunahme der Polarität der Umgebung, der LHCII gezwungen wird, eine neue hydrophobe Umgebung zum Schutz der transmembranen Domänen aufzusuchen.

4.3 Stabile Einlagerung des LHCII in die hydrophile PEO-Schicht von Polymersomen unter Ausbildung von Protein-Aggregaten

Anders als im Liposomenexperiment (Boggasch, 2006), führte die Zugabe von LHCII mit nachfolgendem Detergenzentzug zu einer deutlichen Trübung der Polymersomenlösung und ähnelte der LHCII-Aggregatbildung in Fällungsversuchen. Ursache der Trübung scheint, neben einer tatsächlich detektierten Ausbildung von Protein-„Clustern“, vor allem auch die Aufhebung der geordneten Vesikelstrukturen zu sein. Aus einheitlich verteilten Polymersomen eines gleichen Durchmessers werden Vesikel oder Membranbruchstücke unterschiedlichster Größen, die auch durch mehrmalige Extrusion nicht mehr auf einheitliche Größe gebracht werden können. Dass die doppelschichtigen Membranen nicht komplett aufgelöst werden und beispielsweise zu Mizellenstrukturen übergehen, beweist die unveränderte Schichtdicke der hydrophoben PB-Doppelschicht in AFM-Aufnahmen.

Auch die Tatsache, dass das Protein in der AFM-Probenpräparation nicht von der Polymerschicht abwaschbar ist, spricht für die Interaktion mit den Polymersomen, genau wie die Stabilisierung der Proteine nach Entfernung des Detergenz. Der vollständige Verdau der N-Termini aller LHCII-Proteine spricht für die gute Zugänglichkeit des N-Terminus zur wässrigen Umgebung. Entgegen der erwünschten Insertion des Proteins in die hydrophobe Doppelschicht aus Poly-Butadien, zeigen die AFM-Aufnahmen lediglich eine Interaktion des LHCII mit der hydrophilen Poly-Ethylenoxid-Schicht. Im AFM-Höhenprofil liegt der LHCII flach auf der PB-Schicht auf und führt nicht, wie erhofft, durch Insertion zum Zusammenstauchen der PB-Schicht und den dadurch erwarteten trichterförmigen Oberflächenstrukturen (Abb. 4.1.2; Mecke *et al.*, 2006). Ein Grund für die fehlgeschlagene Insertion könnte im chemischen Aufbau der eingesetzten Copolymere liegen (Abb. 4.4.1 B). Genau wie bei dem verwendeten Detergenz TX (Abb. 4.4.1 A) besteht der hydrophile Teilblock des Copolymers aus Poly-Ethylenoxid, lediglich die Zahl der Wiederholungseinheiten ist in den Polymersomen mit 66 Einheiten deutlich häufiger als im TX (9 bis 10 Einheiten). In TX lässt sich LHCII

sehr gut solubilisieren. Mit hoher Wahrscheinlichkeit schirmt die unpolare Kopfgruppe des TX die hydrophoben Bereiche des Membranproteins ab, während der hydrophile Polyethylen-Schwanz ins wässrige Medium ragt. Im Beisein der Blockcopolymeren wird der LHCII zumindest teilweise stabilisiert, tendiert aber dazu zu aggregieren, da die Diblockcopolymeren statt einer hydrophoben Kopfgruppe den Proteinen die hydrophile COOK-Gruppe entgegenstrecken. Durch Aggregation können die Proteine gegenseitig ihre transmembranen Domänen mittels Protein-Protein-Interaktion vor der wässrigen Lösung abschirmen (Vasilev *et al.*, 1997). Die PEO-Schicht muss hierbei aber stabilisierend wirken, sonst würden die Proteine wie in der Vesikel-freien Lösung zerfallen.

Interessanterweise scheint durch diese Interaktion mit Poly-Ethylenoxid das charakteristische CD-Spektrum des TX-solubilierten LHCII im Soret-Bereich durch leichte Änderungen der Chl-Dipolmomente zu entstehen (Boggasch, 2006). Sicherlich könnte argumentiert werden, dass durch unzureichende „Bio Beads“- Behandlung Reste des TX in der Probe verblieben sind. Dies würde aber nicht erklären, warum der LM-solubilierte Komplex nach Entfernung des LM auch dieses spezifische TX-Spektrum zeigt. Hierfür kann nur die Interaktion des LHCII mit dem Poly-Ethylenoxid des Copolymeren verantwortlich sein.

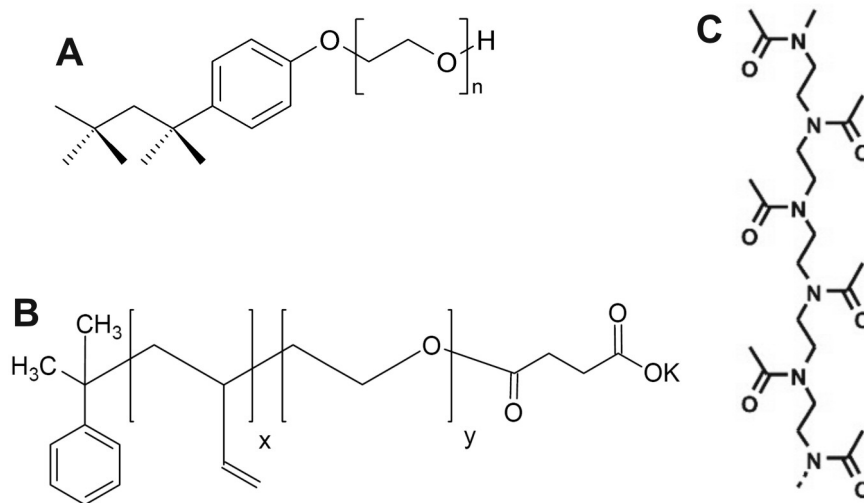


Abb. 4.4.1: Strukturformel des Detergenz TX (A), des Diblockcopolymeren PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK (B, abgeändert nach Maskos, 2006) und ein Ausschnitt des Polymeren Poly(2-methyloxazoline) (C) mit 6 Wiederholungseinheiten.

Diese Feststellung erklärt allerdings nicht das eigentliche Problem der fehlgeschlagenen Insertion in die hydrophobe PB-Schicht. In Insertionsversuchen der Membranproteine OmpF (Meier *et al.*, 2000) oder des TX-solubilierten Bacteriorhodopsin (Ho *et al.*, 2004) in unilamellare Triblockcopolymeren wurde als hydrophiler Teilblock stets das, gegenüber PEO, deutlich polarere Polymer Poly(2-methyloxazoline) verwendet (Abb. 4.4.1 C). Durch die Vielzahl an Oxogruppen in diesem Polymer können Membranprote-

ine in solchen Schichten nicht stabilisiert werden und werden dadurch in die hydrophobe Phase der Schicht „gezwungen“. Im Falle der PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK Diblockcopolymeren ist die Polarität des PEO wahrscheinlich nicht ausreichend, um den LHCII in die lipophile Schicht zu zwingen. Stattdessen verbleiben die Proteine in der PEO-Schicht und aggregieren. Der Grund für die Tendenz des LHCII „Cluster“ zu bilden wird der energetisch günstige Zustand dieses Oligomerisierungsgrads in Bedingungen der unzureichenden Lipid- bzw. Detergenz-Versorgung sein. Von Insertionsversuchen in Liposomen ist bekannt, dass LHCII dort ebenfalls in niedrigen Lipid-zu-Proteinverhältnissen dazu tendiert „Cluster“-artige Strukturen auszubilden (Boggasch, 2006).

Nebeneffekt der Aggregatbildung des LHCII in der PEO-Schicht der Polymersomen ist die deutliche Erhöhung der thermischen Stabilität gegenüber dem detergenz-solubilierten LHCII, sowie eine leicht erhöhte Stabilität gegenüber dem trimeren LHCII in Liposomen (Yang *et al.*, 2006). Hierbei muss aber darauf hingewiesen werden, dass dieses Ergebnis durch lediglich zwei Messreihen statistisch nicht abgesichert ist und daher nur einen Trend darstellt. Zudem konnte nicht gezeigt werden, ob diese Eigenschaft in der hohen lokalen LHCII-Konzentration innerhalb der „Cluster“ oder in den chemischen Eigenschaften der Polymersomen begründet liegt.

5 Schlussfolgerung

Der Versuch native LHCII-Trimere aus Erbse in die lipophile Doppelschicht artifizierender Polymersomen, bestehend aus Diblockcopolymeren des Typs PB₁₃₀-b-PEO₆₆-COOK, zu inserieren schlug fehl. Stattdessen lagerten sich LHCII-Aggregate stabil in die hydrophile Polyethylenoxid-Schicht der Polymersomen ein und waren unter Standardbedingungen dauerhaft haltbar. Die Interaktion mit der hydrophilen PEO-Schicht bewirkte zudem eine Änderung in spektralen Eigenschaften der CD-Absorption, identisch zu denen, die aus der Interaktion mit dem Tensid TX bekannt sind. Nebeneffekte der ungewollten Einlagerung in die hydrophile PEO-Schicht waren eine starke Tendenz des Proteins zur Aggregation und damit verbunden eine erhöhte thermische Stabilität des LHCII gegenüber Detergenz-solubiliertem LHCII. In zukünftigen Insertionsversuchen in artifizierender Polymersomen sollte der hydrophile Teilblock der Copolymeren deutlich polarer sein, um den „hydrophoben Druck“ auf den LHCII und damit die Chance auf eine Insertion in den lipophilen Bereich der Doppelschicht zu erhöhen. Weiterhin sollte eine deutliche Erniedrigung der Proteinkonzentration in Erwägung gezogen werden, um der Entstehung von Protein-Aggregaten vorzubeugen.

III Zusammenfassung

Der Haupt-Lichtsammelkomplex (LHCII) des Photosyntheseapparates höherer Pflanzen gehört zu den häufigsten Membranproteinen der Erde. Seine Kristallstruktur ist bekannt. Das Apoprotein kann rekombinant in *Escherichia coli* überexprimiert und somit molekularbiologisch vielfältig verändert werden. In Detergenzlösung besitzt das denaturierte Protein die erstaunliche Fähigkeit, sich spontan zu funktionalen Protein-Pigment-Komplexen zu organisieren, welche strukturell nahezu identisch sind mit nativem LHCII. Der Faltungsprozess findet *in vitro* im Zeitbereich von Sekunden bis Minuten statt und ist abhängig von der Bindung der Cofaktoren Chlorophyll *a* und *b* sowie verschiedenen Carotinoiden.

Diese Eigenschaften machen LHCII besonders geeignet für Strukturuntersuchungen mittels der elektronenparamagnetischen Resonanz (EPR)-Spektroskopie. Diese setzt eine punktspezifische Spinmarkierung des LHCII voraus, die in dieser Arbeit zunächst optimiert wurde. Einschließlich der Beiträge Anderer stand eine breite Auswahl von über 40 spinmarkierten Mutanten des LHCII bereit, einen N-terminalen „Cys-walk“ eingeschlossen. Weder der hierfür notwendige Austausch einzelner Aminosäuren noch die Anknüpfung des Spinmarkers beeinträchtigten die Funktion des LHCII. Zudem konnte ein Protokoll zur Präparation heterogen spinmarkierter LHCII-Trimere entwickelt werden, also von Trimeren, die jeweils nur ein Monomer mit einer Spinmarkierung enthalten.

Spinmarkierte Proben des Detergenz-solubilisierten LHCII wurden unter Verwendung verschiedener EPR-Techniken strukturell analysiert. Als besonders aussagekräftig erwies sich die Messung der Wasserzugänglichkeit einzelner Aminosäurepositionen anhand der Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM). In Kombination mit der etablierten Double Electron-Electron Resonance (DEER)-Technik zur Detektion von Abständen zwischen zwei Spinmarkern wurde der membranständige Kernbereich des LHCII in Lösung eingehend untersucht und strukturell der Kristallstruktur für sehr ähnlich befunden. Die Vermessung kristallographisch nicht erfasster Bereiche nahe dem N-Terminus offenbarte die schon früher detektierte Struktur- und Dynamik der Domäne in Abhängigkeit des Oligomerisierungsgrades. Der neue, noch zu vervollständigende Datensatz aus Abstandsverteilungen und ESEEM-Wasserzugänglichkeiten monomerer wie trimerer Proben sollte in naher Zukunft die sehr genaue Modellierung der N-terminalen Domäne des LHCII ermöglichen.

In einem weiteren Abschnitt der Arbeit wurde die Faltung des LHCII-Apoproteins bei der LHCII-Assemblierung *in vitro* untersucht. Vorausgegangene fluoreszenzspektroskopische Arbeiten hatten gezeigt, dass die Bindung von Chlorophyll *a* und *b* in aufeinanderfolgenden Schritten im Zeitbereich von weniger als einer Minute bzw. mehreren Minuten erfolgten. Sowohl die Wasserzugänglichkeit einzelner Aminosäurepositionen als auch Spin-Spin-Abstände änderten sich in ähnlichen Zeitbereichen. Die Daten deuten darauf hin, dass die Ausbildung der mittleren Transmembran-Helix mit der schnelleren Chlorophyll-*a*-Bindung einhergeht, während sich die Superhelix aus den beiden anderen Transmembranhelices erst im langsameren Schritt, zusammen mit der Chlorophyll-*b*-Bindung, ausbildet.

IV Literaturverzeichnis

- Allen, J. F., Forsberg, J. (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.*, 6, 317-326.
- Allen, J. F. (2003) State transitions – a question of balance. *Science*, 299, 1530-1532.
- Altenbach, C., Flitsch, S. L., Khorana, H. G., Hubbel, W. L. (1989) Structural studies on transmembrane proteins. 2. Spin labeling of bacteriorhodopsin mutants at unique cysteines. *Biochemistry*, 28, 7806-7812.
- Altenbach, C., Klein-Seetharaman, J., Cai, K., Khorana, H. G., Hubbell, W. L. (2001) Structure and function in rhodopsin: Mapping light-dependent changes in distance between residue 316 in helix 8 and residues in the Sequence 60–75, covering the cytoplasmic end of helices TM1 and TM2 and their connection loop CL1. *Biochemistry*, 40, 15493-15500.
- Andersson, J., Wentworth, M., Walters, R. G., Howard, C. A., Ruban, A. V., Horton, P., Jansson, S. (2003) Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II - effects on photosynthesis, grana stacking and fitness. *Plant J.*, 35, 350-361.
- Barber, J. (2009) Photosynthetic energy conversion: Natural and artificial. *Chem. Soc. Rev.*, 38, 185-196.
- Baroli, I., Niyogi, K. (2000) Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 355, 1385-1394.
- Barros, T., Royant, A., Standfuss, J., Dreuw, A., Kühlbrandt, W. (2009) Crystal structure of plant light-harvesting complex shows the active, energy-transmitting state. *EMBO J.*, 28, 298-306.
- Barros, T., Kühlbrandt, W. (2009) Crystallisation, structure and function of plant Light-Harvesting Complex II, *Biochim. Biophys. Acta*, 1787, 753-772.
- Beddard, G. S., Porter, G. (1976) Concentration quenching in chlorophyll. *Nature*, 260, 366-367.
- Bender, A. (2004) Konformationsanalyse und Lipidbindung am rekombinanten Lichtsammelprotein LHCIIB höherer Pflanzen. Dissertation am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Bergantino, E., Segalla, A., Brunetta, A., Teardo, E., Rigoni, F., Giacometti, G. M., Szabo, I. (2003) Light- and pH-dependent structural changes in the PsbS subunit of photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 15265-15270.
- Berliner, L. J. (1976) Spin labeling theory and applications. Academic Press. New York.
- Boekema, E. J., van Roon, H., van Breemen, J. F., Dekker, J. P. (1999) Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Eur. J. Biochem.*, 266, 444-452.
- Boggasch, S. (2006) Immobilisierung von rekombinantem Haupt-Lichtsammelkomplex LHCIIB in Liposomen, an Affinitätsmaterialien und Nanokristallen - biochemische und einzeilmolekülspektroskopische Untersuchungen. Dissertation am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

- Booth, P. J., Paulsen, H. (1996) Assembly of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex in vitro. Time-resolved fluorescence measurements. *Biochemistry*, 35, 5103-5108.
- Booth, P. J., Curnow, P. (2006) Membrane proteins shape up: understanding in vitro folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 16, 480-488.
- Borchert, U., Lippbrandt, U., Bilanz, M., Kimpfler, A., Rank, A., Pescka-Süss, R., Schubert, R., Lindner, P., Förster, S. (2006) pH-induced release from P2VP-PEO block copolymer vesicles. *Langmuir*, 22, 5843-5847.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Hauptle, M. T., Doberstein, B. (1987) A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of protein in vivo and in vitro. *Meth. Enzymol.*, 155, 416-433.
- Burmeister Getz, E., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R., Selvin, P. R. (1999) A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Anal Biochem* 273, 73-80.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3797-3801.
- Canfield, D. E., Rosing, M. T., Bjerrum, C. (2006) Early anaerobic metabolisms. *Phil. Trans. R. Soc.*, 361, 1819-1836.
- Cashmore, A. R. (1984). Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a chlorophyll *a/b*-binding polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 2960-2964.
- Christian, D. (2008) Mehrfachmarkierung von *in vitro* hergestellten LHCIIb-Trimeren mit einem SH-reaktiven Farbstoff. Staatsexamensarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Corbet, D. (2004) Mutationsanalyse zur Untersuchung der Interaktionen des heterodimeren Lichtsammelkomplexes LHCI-730. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Chen, B., Przybyla, A. E. (1994) An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *Biotechniques*, 17, 657-659.
- Dainese, P., Bassi, R. (1991) Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem II antenna system and aggregation state of the component chlorophyll *a/b* binding proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 8136-8142.
- Day, D. A., Ryrie, I. J., Fuad, N. (1984) Investigations of the role of the main light-harvesting chlorophyll-protein complex in thylakoid membranes. Reconstitution of depleted membranes from intermittent-light-grown plants with the isolated complex. *J. Cell. Biol.*, 97, 163-172.
- Dekker, J. P., Boekema, E. J. (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1706, 12-39.

Dietz, C. (2008) Konformationsuntersuchungen am rekombinanten LHCII mittels NMR- und EPR-Spektroskopie. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Discher, D. E., Eisenberg, A. (2002) Polymer vesicles. *Science*, 297, 967–973.

Dobrikova, A. G., Varkonyi, Z., Krumova, S. B., Kovacs, L., Kostov, G. K., Todinova, S. J., Busheva, M. C., Taneva, S. G., Garab, G. (2003) Structural rearrangements in chloroplast thylakoid membranes revealed by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy. Thermo-optic effect. *Biochemistry*, 42, 11272-11280.

Dockter, C. (2005) Konformationsuntersuchungen an rekombinantem Lichtsammlerprotein (LHCII) mittels elektronenparamagnetischer Resonanz (EPR). Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Farahbakhsh, Z. T., Hideg, K., Hubbell, W. L. (1993) Photoactivated conformational changes in rhodopsin: A time-resolved spin label study. *Science*, 262, 1416-1419.

Fink, A. L. (1995) Compact intermediate states in protein folding. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24:495-522.

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

Georgakopoulou, S., van der Zwan, G., Bassi, R., van Grondelle, R., van Amerongen, H., Croce, R. (2007) Understanding the changes in the Circular dichroism of light-harvesting complex II upon varying its pigment composition and organization. *Biochemistry*, 46, 4745-4754.

Gorleku, O. (2007) Trennung und Charakterisierung von phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem LHCII. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Green, B.R., Pichersky, E., Klopstech, K. (1991) Chlorophyll *a/b*-binding proteins: an extended family. *Trends Biol. Sci.*, 16, 181-185.

Green, B.R., Dunford, D. G. (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 685-714.

Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M.; Zouni, A., Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16, 334-42.

Hankamer, B., Barber, J., Boekema, E.J. (1997) Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.*, 48, 641-671.

Hanson, S. M., Van Eps, N., Francis, D. J., Altenbach, C., Vishnivetskiy, S. A., Arshavsky, V. Y., Klug, C. S., Hubbell, W. L., Gurevich, V. V. (2007) Structure and function of the visual arrestin oligomer. *EMBO J.*, 26, 1726–1736.

Hebel, M. (2007) Untersuchung der Struktur- und Dynamik des rekombinanten LHCIIb mittels ESR-Spektroskopie. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

- Heddad, M., Adamska, I. (2002) The evolution of light stress proteins in photosynthetic organisms. *Comp. Funct. Genomics*, 3, 504-510.
- Heinemann, B. (1999) Random mutations directed to trans-membrane and loop domains of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein: Impact on complex formation and pigment binding. Dissertation. Institut für Allgemeine Botanik. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Hilger, D., Polyhach, Y., Padan, E., Jung, H., Jeschke, G. (2007) High-resolution structure of a Na⁺/H⁺ antiporter dimer obtained by pulsed electron paramagnetic distance measurements. *Biophys. J.*, 93, 3675-3683.
- Hilger, D., Polyhach, Y., Jung, H., Jeschke, G. (2009) Backbone structure of transmembrane domain IX of the Na⁺/Proline Transporter PutP of *Escherichia coli*. *Biophys. J.*, 96, 217-225.
- Ho, D., Chu, B., Lee, H., Montemagno, C. D. (2004) Protein-driven energy transduction across polymeric biomembranes. *Nanotechnology*, 15, 1084-1094.
- Hobe, S., Prytella, S., Kühlbrandt, W., Paulsen, H. (1994) Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *EMBO J.*, 13, 3423-3429
- Hobe, S. (1995) Trimerisierung des in-vitro-rekonstituierten Lichtsammelkomplexes höherer Pflanzen und spektroskopische Untersuchungen zur Pigmentorganisation. 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., Trostmann, I., Raunser, S., Paulsen, H. (2006) Assembly of the major light-harvesting chlorophyll-*a/b* complex. Thermodynamics and kinetics of neoxanthin binding. *J. Biol. Chem.*, 281, 25156-25166.
- Hörnemann, J. (2005) Untersuchungen zur rekombinanten Expression und Faltung pflanzlicher Tyrosinasen. Dissertation am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Horn, R., Paulsen, H. (2002) Folding in vitro of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein is coupled with pigment binding. *J. Mol. Biol.*, 318, 547-556.
- Horn, R., Paulsen, H. (2004) Early steps in the assembly of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *J. Biol. Chem.*, 279, 44400-44406.
- Horn, R., Grundmann, G., Paulsen, H. (2007) Consecutive binding of chlorophylls *a* and *b* during the assembly in vitro of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein (LHCIIb). *J. Mol. Biol.*, 366, 1045-1054.
- Hubbell, W.L., Gross, A., Langen, R., Lietzow, M. A. (1998) Recent advances in site-directed spin labeling of proteins. *Curr. Opin. in Struct. Biol.*, 8, 649-656.
- Huschenbett, C. (2001) Zugänglichkeit einzelner Domänen des Lichtsammelkomplexes LHCII: ein Vergleich zwischen Monomeren und Trimeren. Dissertation am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-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 (LHC II). *Biochim. Biophys. Acta*, 1504, 340–345.
- Jahns, P., Latowski, D., Strzalka, K. (2009) Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1787, 3–14.
- 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 in Plant Science*, 4, 236–240.
- Jao, C. C., Hegde, B. G., Chen, J., Haworth, I. S., Langen, R. (2008) Structure of membrane-bound α -synuclein from site-directed spin labeling and computational refinement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 19666–19671.
- Jensen, P. E., Bassi, R., Boekema, E. J., Dekker, J. P., Jansson, S., Leister, D., Robinson, C., Scheller, H. V. (2007) Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta*, 1767, 335–352.
- Jeschke, G., Bender, A., Schweikardt, T., Panek, G., Decker, H., Paulsen, H. (2005) Localization of the N-terminal domain in light-harvesting chlorophyll-*a/b*-protein by electron paramagnetic resonance measurements. *J. Biol. Chem.*, 280, 18623–18630.
- Jeschke, G. (2006) Einführung in die ESR-Spektroskopie. Skript zur Vorlesung von H. W. Spiess.
- Jeschke, G., Polyhach, Y. (2007) Distance measurements on spin-labelled biomacromolecules by pulsed electron paramagnetic resonance. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9, 1895–1910.
- Kargul, J., Barber, J. (2008) Photosynthetic acclimation: Structural reorganisation of light harvesting antenna – role of redox-dependent phosphorylation of major and minor chlorophyll *a/b* binding proteins. *FEBS J.*, 275, 1056–1068.
- Katakoa, K., Harada, A., Nagasaki, Y. (2001) Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 47, 113–131.
- Klein, J. C., Burr, A. R., Svensson, B., Kennedy, D. J., Allingham, J., Titus, M. A., Rayment, I., Thomas, D. D. (2008) Actin-binding cleft closure in myosin II probed by site-directed spin labeling and pulsed EPR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 12867–12872.
- Kosemund, K. (1999) Die Biogenese von Chlorophyll-*a/b*-bindenden Lichtsammelkomplexen: Topographie des Apoproteins bei der Thylakoidinsertion. Dissertation am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Kroll, C. (1999) Analytik, Stabilität und Biotransformation von Spinsonden sowie deren Einsatz im Rahmen pharmazeutisch-technologischer und biopharmazeutischer Untersuchungen. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin.
- Krupa, Z., Huner, N. P. A., Williams, J. P., Maissan, E., James, D. (1987) Development at cold-hardening temperatures. *Plant Physiol.*, 84, 19–24.

Kühlbrandt, W., Wang, D. N., Fujiyoshi, Y. (1994) Atomic model of plant light harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, 367, 614-621.

Kunkel, T. A., Roberts, J. D., Zakour, R. A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.*, 154, 367-382.

Kuttkatt, 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, 1267-1276.

Kuttkat, A., Hartmann, A., Hobe, S., Paulsen, H. (1996) The C-terminal domain of light-harvesting-*a/b*-binding protein is involved in the stabilisation of trimeric light-harvesting complex. *Eur. J. Biochem.*, 242, 288-292.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Lima, J. C., Vautier-Giongo, C., Lopes, A., Melo E., Quina, F. H., Maanita, A. L. (2002) Color stabilization of anthocyanins: Effect of SDS micelles on the acid-base and hydration kinetics of malvidin 3-glucoside (Oenin) *J. Phys. Chem. A.*, 106, 5851-5859.

Liu, Z., Yan, H., Kuang, T., Zhuang, J., Bui, L., Chang, W. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, 428, 287-292.

Liu, C., Zhang, Y., Cao, D., He, Y., Kuang, T., Yang, C. (2008) Structural and functional analysis of the antiparallel strands in the lumenal loop of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex of photosystem II (LHCIIb) by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 283, 487-495.

Lottspeich, F., Zorbas, H.: Bioanalytik (1998) 1.Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag*.

Mao, Q., Schleidt, S., Zimmermann, H., Jeschke, G. (2008) A pulsed EPR study of surfactant layer structure in composites of a synthetic layered silicate with polystyrene and polycaprolactone. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 10, 1156-1167.

Martinson, T. A., Plumley, F.G. (1995) One step extraction and concentration of pigments and acyl lipids by *sec*-Butanol from *in vitro* and *in vivo* samples. *Anal. Biochem.*, 228, 123-130.

Maskos, M. (2006) Influence of the solvent and the end groups on the morphology of cross-linked amphiphilic poly(1,2-butadiene)-*b*-poly(ethylene oxide) nanoparticles. *Polymer*, 47, 1172-1178.

Matile, P., Hörtensteiner, S., Thomas, H., Kräutler, B. (1996) Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiol.*, 112, 1403-1409.

Mecke, A., Dittrich, C., Meier, W. (2006) Biomimetic membranes designed from amphiphilic block copolymers. *Soft Matter*, 2, 751-759.

Meier, W., Nardin, C., Winterhalter, W. (2000) Reconstitution of channel proteins in (polymerized) ABA triblock copolymer membranes. *Angew. Chem.*, 39, 4599-4602.

- Mick, V., Geister, S., Paulsen, H. (2004) The folding state of the lumenal loop determines the thermal stability of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. *Biochemistry*, 43, 14704-14711.
- Montane, M. H., Kloppstech, K. (2000) The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): Was the harvesting of light their primary function? *Gene*, 258, 1-8.
- Müller, P., Li, X. P., Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.*, 125, 1558-1566.
- Müller, W. (2006) Polymere Hohlkugeln mit synthetischen Poren. Diplomarbeit am Fachbereich Chemie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Müller, A. (2008) Strukturelle Charakterisierung des N-Terminus des LHCII durch EPR und Untersuchung des Einflusses der Phosphorylierung auf die Konformation. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Müller, W., Koynov, K., Fischer, K., Hartmann, S., Pierrat, S., Basché, T., Maskos, M. (2009) Hydrophobic shell loading of PB-b-PEO vesicles. *Macromolecules*, 42, 357-361.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155, 335-50.
- Murata, N. (2009) The discovery of state transitions in photosynthesis 40 years ago. *Photosynth. Res.*, 99, 155-160.
- 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.
- Novoderezhkin, V. I.; Palacios, M. A.; van Amerongen, H., van Grondelle, R. (2005). Excitation dynamics in the LHCII complex of higher plants: Modeling based on the 2,72 Å crystal structure. *J. Phys. Chem. B*, 109, 10493-10504.
- Nußberger, S., Dörr, K., Wang, D. N., Kühlbrandt, W. (1993) Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J. Mol. Biol.*, 234, 347-356.
- Ohad, I., Vink, M., Zer, H., Herrmann, R.G., Andersson, B. (2001) Novel aspects on the regulation of the thylakoid protein phosphorylation. In: *Advances in photosynthesis and respiration*. Vol. 11: Regulation of Photosynthesis. Aro, E.M., Andersson, Bertil (Eds.). 419ff.
- Pascal, A. A., Liu, Z., Broess, K., van Oort, B., van Amerongen, H., Wang, C., Horton, P., Robert, B., Chang, W., Ruban, A. (2005) Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting. *Nature*, 436, 134-137.
- Pannier, M., Veit, S., Godt, A., Jeschke, G., Spiess H. W. (2000) Dead-Time Free Measurement of Dipole-Dipole Interactions between Electron Spins. *J. Magn. Res.*, 142, 331-340.

Paulsen, H., Rümmler, U., Rüdiger, W. (1990) Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein over expressed in *Escherichia coli*. *Planta*, 181, 204-211.

Paulsen, H., Kuttkat, A. (1993) Pigment complexes of light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein are stabilized by a segment in the carboxyterminal hydrophilic domain of the protein. *Photochem. Photobiol.*, 57, 139-142.

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. *Methods in plant biochemistry*, 5, 195-210.

Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E. (2004) UCSF chimera –A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25, 1605–1612.

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.

Plunger, M. (2007) Herstellung heterogener Trimere des rekombinanten Lichtsammelproteins (LHCII). Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

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.

Qiagen (2003) *The QIAexpressionist*, Hilden.

Reinsberg, D., Booth, P. J., Jegerschoeld, C., Khoo, B. J., Paulsen, H. (2000) Folding, assembly, and stability of the major light-harvesting complex of higher plants, LHCII, in the presence of native lipids. *Biochemistry*, 39, 14305-14313.

Rigaud, J. L., Levy, D., Mosser, G., Lambert, O. (1998) Detergent removal by non-polar polystyrene beads. Applications to membrane protein reconstitution and two-dimensional crystallization. *Eur. Biophys. J.*, 27, 305–319.

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.

Ruban, A.V., Lee, P.J., Wentworth, M., Young, A.J., Horton, P. (1999) Determination of the stoichiometry and the strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes. *J. Biol. Chem.*, 274, 10458-10465.

Ruban, A. V., Berera, R., Iliaia, C., van Sokkum, I. H. M., Kennis, J. T. M., Pascal, A. A., van Amerongen, H., Robert, B., Horton, P., van Grondelle, R. (2007) Identification of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature*, 450, 575-579.

Rühle, W., Paulsen, H. (2004) Preparation of native and recombinant light-harvesting chlorophyll-*a/b* complex, *Methods in Molecular Biology*, 274, *Photosynthesis Research Protocols*.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulsen, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.

Schmid, V. H. R. (2008) Light-harvesting complexes of vascular plants. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 65, 3619-3639.

Schmidt, M. (1993) Simultaneous static and dynamic light scattering: Application to polymer structure analysis. Dynamic light scattering, the method and some applications, W. Brown Ed., Clarendon Press, Oxford.

Schneider, K. (2008) Trennung und Charakterisierung von phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem LHCII. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Schubert, W. D., Klukas, O., Saenger, W., Witt, H. T. Fromme, P., Krauß, N. (1998) A common ancestor for oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems: A comparison based on the structural model of photosystem I. *J. Mol. Biol.*, 280, 297-314.

Schweiger, A., Jeschke, G. (2001) Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance. Oxford University Press, Oxford.

Scoville, D., Stamm, J. D., Altenbach, C., Shvetsov, A., Kokabi, K., Rubenstein, P. A., Hubbell, W. L., Reisler, E. (2009) Effects of binding factors on structural elements in F-Actin. *Biochemistry*, 48, 370-378.

Seimetz, M. (2004) Abstandsmessungen am rekombinanten Lichtsammlerprotein mittels elektromagnetischer Resonanz (EPR). Einfluss von Xanthophyllen auf die Konformation des LHCIIb. Staatsexamensarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Standfuss, J., Kühlbrandt, W. (2004) The three isoforms of the light-harvesting complex II. Spectroscopic features, trimer formation, and functional roles. *J. Biol. Chem.*, 279, 35, 36884-36891.

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

Steinhoff, H. J., Mollaaghababa, R., Altenbach, C., Hideg, K., Krebs, M., Khorana, H.G., Hubbell, W. L. (1994) Time-resolved detection of structural changes during the photocycle of spin-labeled bacteriorhodopsin. *Science*, 266, 105-107.

Storf, S. (2001) Ortspezifische Markierung hydrophiler Bereiche des rekombinanten Chl *a/b*-Lichtsammlerkomplexes. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Takahashi, S., Murata, N. (2008) How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends plant Sci.*, 13, 178-182.

Teardo, E., Polverino de Laureto, P., Bergantino, E., Dalla Vecchia, F., Rigoni, F., Szabò, I., Giacometti, G. M. (2007) Evidences for interaction of PsbS with photosynthetic complexes in maize thylakoids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1767, 703-711.

Várkonyi, Z., Nagy, G., Lambrev, P., Kiss, A. Z., Székely, N., Rosta, L., Garab, G. (2008) Effect of phosphorylation on the thermal and light stability of the thylakoid membranes. *Photosynth. Res.*, 99, 161-171.

Vasilev, S., Irrgang, K. D., Schrötter, T., Bergmann, A., Eichler, H. J., Renger, G. (1997) Quenching of chlorophyll *a* fluorescence in the aggregates of LHCII: Steady state fluorescence and picosecond relaxation kinetics. *Biochemistry*, 36, 7503-7512.

Volkov, A. (2008) EPR spectroscopic investigation of membrane protein structure and folding on light harvesting complex LHCIIb. Dissertation am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Volkov, A., Dockter, C., Bund, T., Paulsen, H., Jeschke, G. (2009) Pulsed EPR determination of water accessibility to spin-labeled amino acid residues in LHCIIb. *Biophys. J.*, 96, 1124-1141.

Werwie, M. (2009) Markierung von LHCII-Mehrfachcysteinmutanten mit Donorfarbstoffen. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Wiegand, S. (2008) Herstellung von Mehrfach-Cystein-Mutanten des Light Harvesting Complex II und ihre Markierung mit SH-reaktivem Farbstoff. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Yang, C., Kosemund, K., Cornet, C., Paulsen, H. (1999) Exchange of pigment-binding amino acids in light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. *Biochemistry*, 38, 16205-16213.

Yang, C., Boggasch, S., Haase, W., Paulsen, H. (2006) Thermal stability of trimeric light-harvesting Chlorophyll *a/b* complex (LHCIIb) in liposomes of thylakoid lipids. *Biochem. Biophys. Acta* 1757, 1642-1648.

Yang, C., Lambrev, P., Chen, Z., Jávorfí, T., Kiss, A., Paulsen, H., Garab, G. (2008) The negatively charged amino acids in the lumenal loop influence the pigment binding and conformation of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1777, 1463–1470.

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.

Zhang, S., Scheller, H. V. (2004) Light-harvesting complex II binds to several small subunits of photosystem I, *J. Biol. Chem.*, 279, 3180–3187.

V Anhang

1 Sequenzen

1.1 Klon C3.2h (Kosemund, 1999)

Reihe 1: Nukleotid-Sequenz des Klons C3.2h

Reihe 2: Primärstruktur des Apoproteins (grau hinterlegt)

Reihe 3: Basenaustausche einzelner Cys-Klone (bzw. des Ser-Klon C79S)

Reihe 4: resultierende Aminosäureaustausche

1 ATG CGT AAA TCT GCT ACC ACC AAG AAA GTA GCG AGC TCT GGA AGC

1 Start R K S A T T K K V A S S G S

TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT
S3C A4C K7C V9C A10C S11C S12C

46 CCA TGG TAC GGA CCA GAC CGT GTT AAG TAC TTA GGC CCA TTC TCC

15 P W Y G P D R V K Y L G P F S

TGT
V22C

91 GGT GAG TCT CCA TCC TAC TTG ACT GGA GAG TTC CCC GGT GAC TAC

30 G E S P S Y L T G E F P G D Y

TGC TGC
S34C F40C

136 GGT TGG GAC ACT GCC GGA CTC TCT GCT GAC CCA GAG ACA TTC TCC

45 G W D T A G L S A D P E T F S

TGC TGT
A49C S52C

181 AAG AAC CGT GAG CTT GAA GTC ATC CAC TCC AGA TGG GCT ATG TTG

60 K N R E L E V I H S R W A M L

226 GGT GCT TTG GGA TGT GTC TTC CCA GAG CTT TTG TCT CGC AAC GGT

75 G A L G C V F P E L L S R N G

TCT
C79S

271 GTT AAA TTC GGC GAA GCT GTG TGG TTC AAG GCA GGA TCT CAA ATC

90 V K F G E A V W F K A G S Q I

TGT
V90C

316 TTT AGT GAG GGT GGA CTT GAT TAC TTG GGC AAC CCA AGC TTG GTC
 105 F S E G G L D Y L G N P S L V
 TGT
 S106C

361 CAT GCT CAA AGC ATC CTT GCC ATA TGG GCC ACT CAG GTT ATC TTG
 120 H A Q S I L A I W A T Q V I L
 TGC
 S123C

406 ATG GGA GCT GTC GAA GGT TAC CGT ATT GCC GGT GGG CCT CTC GGT
 135 M G A V E G Y R I A G G P L G

451 GAG GTG GTT GAT CCA CTT TAC CCA GGT GGA AGC TTT GAT CCA TTG
 150 E V V D P L Y P G G S F D P L
 TGC
 S160C

496 GGC TTA GCT GAT GAT CCA GAA GCA TTC GCA GAA TTG AAG GTG AAG
 165 G L A D D P E A F A E L K V K

541 GAA CTC AAG AAC GGT AGA TTA GCC ATG TTC TCA ATG TTT GGA TTC
 180 E L K N G R L A M F S M F G F

586 TTC GTT CAA GCT ATT GTA ACT GGA AAG GGT CCT TTG GAG AAC CTT
 195 F V Q A I V T G K G P L E N L
 TGT
 V196C

631 GCT GAT CAT CTT GCA GAC CCA GTC AAC AAC AAT GCA TGG TCA TAT
 210 A D H L A D P V N N N A W S Y

676 GCC ACC AAC TTT GTT CCC GGA AAA CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAA
 225 A T N F V P G K H H H H H H Stop

1.2 Klone mit N-terminalem „Strep tag“

Reihe 1: N-terminale Nukleotid-Sequenz der Klone stC79Sh und st106/160h, die Sequenz des „Strep tag“ ist unterstrichen, das ursprüngliche Start-Codon des LHCII dunkelgrau hinterlegt. Die restliche Sequenz ist in V.1.1 dargestellt.

Reihe 2: Primärstruktur des Apoproteins (grau hinterlegt), das „Strep tag“-Motiv ist unterstrichen.

1 ATG TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GCC **ATG** CGT AAA TCT GCT
 1 Start W S H P Q F E K A M R K S A

2 Abkürzungsverzeichnis

A₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
AFM	atomare Kraftmikroskopie/„atomic force microscopy“
AG	Arbeitsgruppe
AK	Arbeitskreis
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asp	Asparagin
ATP	Adenosin-Triphosphat
BODIPY-IA	N-(4,4-difluoro- 1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3,4-diaza-s-indacene-2-yl) iodoacetamide]
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
CAB	Chl <i>a/b</i> -bindende Proteine
CD	Circular-Dichroismus
Chl	Chlorophyll
CP	Chlorophyll-Bindungsprotein
CrOx	Kalium-tris(oxalato)chromat
CW	“continuous wave”
Cys	Cystein
Da	Dalton
DEER	“double electron-electron resonance”
dest.	destilliert
DGDG	Digalaktosyldiacylglycerin
DLS	dynamischen Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid
DTT	1,4-Dithiotreitol
DY731-Mal/DY731	DY731-Maleimide

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELIPs	“early light-inducible proteins“
EPR	Elektronenparamagnetische Resonanz
ESEEM	„electron spin echo envelope modulation“
ESR	Elektronenspinresonanz
<i>et al.</i>	und Andere
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HABA	4-Hydroxy-Azobenzen-2-Carboxylsäure
His	Histidin
“His ₆ tag“	Hexahistidyl-Rest
HPLC	„high performance liquid chromatography“
IA	Iodacetamid
IB	Einschlusskörperchen/„inclusion body“
IBs	Einschlusskörperchen/„inclusion bodies“
IDA	Iminodiessigsäure/„iminodiacetic acid“
Ile	Isoleucin
I-PCR	Insertions-Polymerase-Kettenreaktion
IPTG	Isopropyl- β -thiogalaktosid
K	Kelvin
Kap.	Kapitel
kb	Kilo-Basenpaar
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani
LDS	Lithiumdodecylsulfat
Leu	Leucin
LHC	Lichtsammelkomplex/„light harvesting complex“
LHCII	Lichtsammelkomplex II/„light harvesting complex II“
LHCIIb	LHCII
LHCP	Apoprotein des LHCII
LM	n-Dodecyl- β -D-Maltosid

L/P	Lipid/Protein-Verhältnis
Lut	Lutein
Lys	Lysin
max.	maximal
MCS	“multiple cloning site”
β-Me	β-Mercaptoethanol
MGDG	Monogalaktosyldiacylglycerol
NADP⁺	Nicotinamid-Adenindinucleotid-Phospat
NEB	New England Biolabs
Neo	Neoxanthin
Ni	Nickel
NMR	Kernspinresonanz
NOE	“nuclear Overhauser effect”
NPQ	„non-photochemical quenching“
Nt	Nukleotide
NTA	Nitriloessigsäure
OD	Optische Dichte
OG	n-Octyl-β-D-Glucopyranosid
p.A.	per Analysis
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	Polybutadien
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Poly-Dispersitäts-Index
PEO	Polyethylenoxid
PG	Dipalmitoyl-Phosphatidylglycerin
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
PROXYL-IA	3-(2-Iodoacetamido)-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy, free radical
PS	Photosystem
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
PSM	punktspezifische Mutagenese

R_h	gemittelter hydrodynamischer Radius
R+L	Restriktion und Ligation
rms	„root mean square“
RP-HPLC	„reversed phase high performance liquid chromatography“
SDS	Natriumdodecylsulfat/„sodium dodecylsulfate“
SDSL	punktspezifische Spinmarkierung/„site-directed spin labeling“
Ser	Serin
SH	Sulhydrylrest
S _N 2	Nucleophile Substitution zweiten Grades
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerol
SV	Säulenvolumen
TCA	Trichloressigsäure
TCP	Tris-(2-cyanoethyl)phosphin
TEMED	N,N,N,N-tetramethylethylendiamin
TEMPO-IA	(2-Iodoacetamido)-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy, free radical
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
TX	Triton X-100
Tyr	Tyrosin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
UZ	Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation
Val	Valin
Vio	Violaxanthin
v/v	Volumenprozent („volume per volume“)
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent („weight per volume“)

3 Erklärung

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

Mainz,

Christoph Dockter