

**Einzelmolekül-Untersuchungen  
Zu Faltung und Zusammenbau  
des Lichtsammelkomplexes LHCI**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Ulrich Gerlach**

geb. am 31. August 1976 in Würzburg

Mainz, 2010



**Dekan:**

**1. Berichterstatter:**

**2. Berichterstatter:**

**Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2010**



---

# Inhalt

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Die Photosynthese</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.2 Aufbau des PS II und seiner Lichtsammelantennen</b>                               | <b>3</b>  |
| <b>1.3 Der LHCII</b>   | <b>4</b>  |
| 1.3.1 Aufbau und Struktur des LHCII  | 4         |
| 1.3.2 Biogenese des LHCII <i>in vivo</i>   | 6         |
| 1.3.3 <i>In-vitro</i> Rekonstitution des LHCII   | 7         |
| <b>1.4 Spektroskopische Eigenschaften des LHCII</b>                                      | <b>7</b>  |
| 1.4.1 Energietransferprozesse innerhalb des LHCII  | 7         |
| 1.4.2 Die Fluoreszenzemission einzelner LHCII Komplexe                                   | 10        |
| <b>1.5 Die Faltung des LHCII-Apoproteins</b>   | <b>12</b> |
| <b>1.6 Zielsetzung dieser Arbeit</b>   | <b>14</b> |
| <br>   |           |
| <b>2 Material</b>  | <b>16</b> |
| <b>2.1 Verwendete Geräte</b>   | <b>16</b> |
| <b>2.2 Chemikalien</b>   | <b>19</b> |
| 2.2.1 Lösungsmittel  | 19        |
| 2.2.2 Gase   | 19        |
| 2.2.3 Weitere Chemikalien  | 19        |
| 2.2.4 Protein-Längenstandards  | 20        |
| <b>2.3 Fluoreszenzfarbstoffe</b>   | <b>20</b> |
| <br>   |           |
| <b>3 Methoden</b>  | <b>22</b> |
| <b>3.1 Proteinbiochemische Methoden</b>  | <b>22</b> |
| 3.1.1 Überexpression und Isolierung von Einschluß-<br>Körpern aus <i>Eschericia coli</i> | 22        |
| 3.1.2 Konzentrationsbestimmung der isolierten<br>IBs bzw. Proteinlösungen                | 23        |
| 3.1.3 Markierung von LHCII-Apoprotein  | 24        |
| 3.1.4 Proteinfällung   | 26        |
| 3.1.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese  | 26        |
| 3.1.6 Coomassie-Färbung  | 30        |
| 3.1.7 Eintrocknen von Polyacrylamid-Gelen  | 30        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.2 Pigmente und Farbstoffe</b>  | <b>31</b> |
| 3.2.1 Anzucht von <i>Pisum sativum</i>  | 31        |
| 3.2.2 Isolierung von Blattmaterial aus <i>Pisum sativum</i>   | 31        |
| 3.2.3 Quantifizierung der Pigmente über Absorptions-<br>Spektroskopie   | 32        |
| 3.2.4 Charakterisierung der Pigmente über analytische HPLC  | 32        |
| 3.2.5 Herstellung von Farbstoff-Stammlösungen   | 34        |
| <b>3.3 Oberflächenchemie</b>  | <b>35</b> |
| 3.3.1 Reinigung von Glasoberflächen<br>zur anschließenden Funktionalisierung  | 35        |
| 3.3.2 Vorbereitung von Glimmeroberflächen<br>zur anschließenden Funktionalisierung                                    | 35        |
| 3.3.3 Aminofunktionalisierung der gereinigten Glas-<br>bzw. Glimmeroberflächen mit Aminosilanen                       | 36        |
| 3.3.4 Biotinylierung der aminosilanisierten Glas-<br>bzw. Glimmer-Oberflächen   | 37        |
| 3.3.5 Neutravidin-Bindung an biotinylierte Glas-<br>bzw. Glimmer-Oberflächen  | 37        |
| 3.3.6 Bindung von LHCII-Apoprotein an Neutravidin-<br>beschichtete Oberflächen zur Messung im Fluoromax2              | 38        |
| 3.3.7 Bindung von LHCII-Apoprotein an Neutravidin-<br>beschichtete Oberflächen zur Messung im<br>Einzelmolekül-Aufbau | 38        |
| 3.3.8 Bindung von LHCII-Komplexen an Neutravidin-<br>beschichtete Oberflächen zur Messung im Fluoromax2               | 39        |
| 3.3.9 Bindung von LHCII-Komplexen an Neutravidin-<br>beschichtete Oberflächen zur Messung im<br>Einzelmolekül-Aufbau  | 39        |
| <b>3.4 Rekonstitution von rekombinantem LHCII</b>   | <b>40</b> |
| 3.4.1 Rekonstitution von rekombinantem LHCII in Lösung  | 40        |
| 3.4.2 Rekonstitution von LHCII auf einer Nickelsäule  | 40        |
| 3.4.3 Rekonstitution von oberflächenimmobilisiertem<br>LHCII Apoprotein   | 42        |
| 3.4.4 Denaturierung von immobilisierten LHCII Komplexen   | 43        |
| 3.4.5 Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation   | 43        |
| 3.4.6 Quantifizierung von aufgereinigten Komplexen  | 44        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.5 Oberflächenanalytik</b>   | <b>44</b> |
| 3.5.1 Rasterkraftmikroskopie<br>( <i>atomic force microscopy</i> (AFM))  | 44        |
| 3.5.2 Evaneszenz-Feld-Resonanz-Messungen   | 46        |
| <b>3.6 Spektroskopische Methoden</b>   | <b>48</b> |
| 3.6.1 Absorptionsspektroskopie   | 48        |
| 3.6.2 Fluoreszenzspektroskopie   | 48        |
| - Ensemble-Messungen   | 49        |
| - Einzelmolekül-Messungen  | 50        |
| <br>   |           |
| <b>4 Ergebnisse</b>  | <b>54</b> |
| <b>4.1 Rekonstitution von auf einer Nickel.Säule immobilisiertem<br/>        LHCII Apoprotein</b>                                      | <b>55</b> |
| <b>4.2 Immobilisierung von LHCII auf Ni<sup>2+</sup>-Glasoberflächen</b>   | <b>56</b> |
| <b>4.3 Immobilisierung von LHCII über einen heterobi-<br/>        funktionellen Linker</b>   | <b>58</b> |
| 4.3.1 LHCII Komplexbindung   | 59        |
| 4.3.2 LHCII Apoprotein-Bindung   | 60        |
| 4.3.3 Untersuchung der Funktionalität der Silanisierung  | 61        |
| 4.3.4 Untersuchung der Linkerbindung an<br>Silanisierte Glasoberflächen  | 63        |
| 4.3.5 Immobilisierung von R-ITC-markiertem LHCII<br>Apoprotein auf Linkeroberflächen   | 64        |
| <b>4.4 Immobilisierung von LHCII über das Biotin / Avidin-System</b>   | <b>66</b> |
| 4.4.1 Evaneszenz-Feld-Resonanz-Messungen zur Immo-<br>bilisierung von LHCII Apoprotein über das<br>Neutravidin / Biotin-Bindungssystem | 67        |
| 4.4.2 Kontrolle auf Eigenfluoreszenz der bei der Oberflächen-<br>modifikation verwendeten Komponenten                                  | 68        |
| 4.4.3 Immobilisierung von LHCII Apoprotein nach dem aus<br>den vorhergehenden Versuchen entwickelten Protokoll                         | 70        |
| 4.4.4 Immobilisierung von fluoreszenzfarbstoffmarkiertem<br>Neutravidin  | 72        |
| 4.4.5 Rasterkraft-Mikroskop-Aufnahmen zur Immobilisierung<br>von LHCII Apoprotein  | 73        |
| 4.4.6 Nachweis der spezifischen Immobilisierung von farbstoff-   | 79        |

|   |            |
|---|------------|
| Markiertem biotinyliertem bzw. nicht-biotinyliertem LHCII Apoprotein                                      |            |
| 4.4.7 Immobilisierung und Denaturierung von rekonstituierten LHCII-Komplexen im Fluorimeter               | 82         |
| 4.4.8 Immobilisierung und Denaturierung von rekonstituierten LHCII-Komplexen im Einzelmolekül-TIRF-Aufbau | 83         |
| 4.4.9 Rekonstitution von oberflächenimmobilisierten LHCII Apoproteinen im Fluoreszenzspektrometer         | 89         |
| <b>5 Diskussion</b>   | <b>102</b> |
| <b>5.1 Die Immobilisierung des LHCII</b>  | <b>102</b> |
| 5.1.1 Die Oberflächenfunktionalisierung   | 103        |
| - Immobilisierung über eine unspezifische Adsorption an die Glasoberfläche                                | 103        |
| - Immobilisierung über eine spezifische Bindung an die Glasoberfläche                                     | 104        |
| 5.1.2 Die Koppelung des LHCII an funktionalisierte Glasoberflächen  | 107        |
| <b>5.2 Denaturierung immobilisierter LHCII Komplexe</b>   | <b>108</b> |
| <b>5.3 Rekonstitution immobilisierter LHCII Apoproteine</b>   | <b>110</b> |
| <b>5.4 Technische Aspekte</b>   | <b>115</b> |
| <b>5.5 Ausblick</b>   | <b>118</b> |
| <b>6 Zusammenfassung / Summary</b>  | <b>122</b> |
| <b>7 Literatur</b>  | <b>126</b> |
| <b>8 Anhang</b>   | <b>136</b> |
| - Anhang I – Abkürzungsverzeichnis  | 136        |





# 1. Einleitung

## 1.1 Die Photosynthese

Die Photosynthese photoautotropher Organismen macht sich die Energie des Sonnenlichtes zu Nutze, um organisches Material aufzubauen. Hierbei unterscheidet man zwischen einer Lichtreaktion, die der Herstellung von Reduktionsäquivalenten und Energie in Form von  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  und ATP dient, und einer Dunkelreaktion, in der unter Verwendung der Produkte der Lichtreaktion  $\text{CO}_2$  fixiert und zum Aufbau von Kohlehydraten verwendet wird.

Der Ort der Photosynthese ist dabei in allen grünen Pflanzen der Chloroplast, eine von zwei Hüllmembranen umgebene Organelle. Im Inneren des Chloroplasten, dem Stroma, befindet sich ein komplexes lamellar organisiertes Membransystem mit einer stark ausgeprägten lateralen Heterogenität, die Thylakoide. Deren Innenraum, das Thylakoidlumen, stellt einen vom Stroma abgetrennten Reaktionsraum dar. Die Enzyme der Lichtreaktion sind dabei in Komplexen innerhalb der Thylakoidmembran lokalisiert, die Dunkelreaktion findet dagegen im Stroma statt.

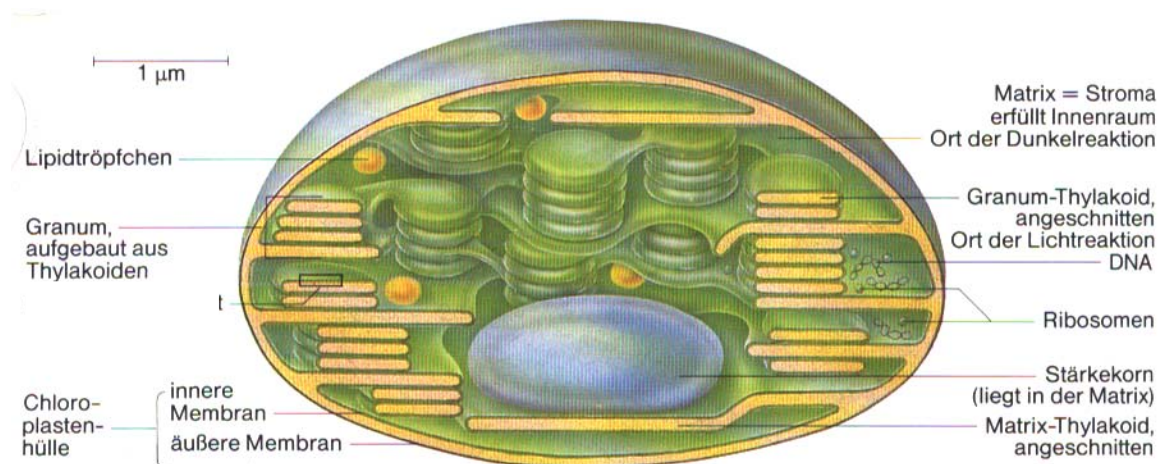


Abb. 1.1: Schnittschema eines Chloroplasten. (nach: Linder: Biologie, 20. Auflage 1989)

Das Sonnenlicht als Motor der Lichtreaktion (und damit der gesamten Photosynthese) wird dabei durch proteingebundene Pigmente – Chlorophyll (Chl) a und b sowie verschiedene Carotinoide – absorbiert. Die eigentliche Umsetzung der so gewonnenen Energie erfolgt in den Reaktionszentren (RC) des Photosyntheseapparates. Hierbei wird am PSII Wasser gespalten und es entsteht das typische Nebenprodukt der pflanzlichen Photosynthese, Sauerstoff. Die aus dem Wasser stammenden Elektronen werden mit Hilfe des

## 1 Einleitung

eingefangenen Lichtes auf  $\text{NADP}^+$  übertragen, das dadurch zu  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  reduziert wird. In weiteren Reaktionsschritten wird ein Teil der Energie aus dem Licht für die Synthese von energiereichem Adenosintriphosphat (ATP) verwendet, womit die Energie für die Pflanze nutzbar ist. In der daran angeschlossenen Dunkelreaktion werden die gewonnenen energiereichen Verbindungen dazu eingesetzt, aus  $\text{CO}_2$  Kohlehydrate zu synthetisieren.

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass ein Reaktionszentrum (RC) ein Photon absorbiert, sind an die RCs sogenannte Lichtsammelantennen (light-harvesting-complexes = LHCs) angelagert, die die Aufgabe haben, Photonen einzusammeln und deren Energie als Anregungsenergie an das RC weiterzuleiten. Den gesamten Komplex aus Reaktionszentren und den daran angelagerten Lichtsammelantennen bezeichnet man als Photosystem (PS). In höheren Pflanzen arbeiten zwei unterschiedliche Photosysteme (PS I und PS II) mit jeweils unterschiedlichen Lichtsammelantennen (LHCI und LHCII) in Reihe. Die beiden Photosysteme sind dabei heterogen über die Thylakoidmembran verteilt. Das PS I und die ATP-Synthase sind fast ausschließlich in den ungestapelten Stromathylakoiden vertreten, wohingegen das PS II in den gestapelten Granathylakoiden lokalisiert ist (Abb. 1.2).

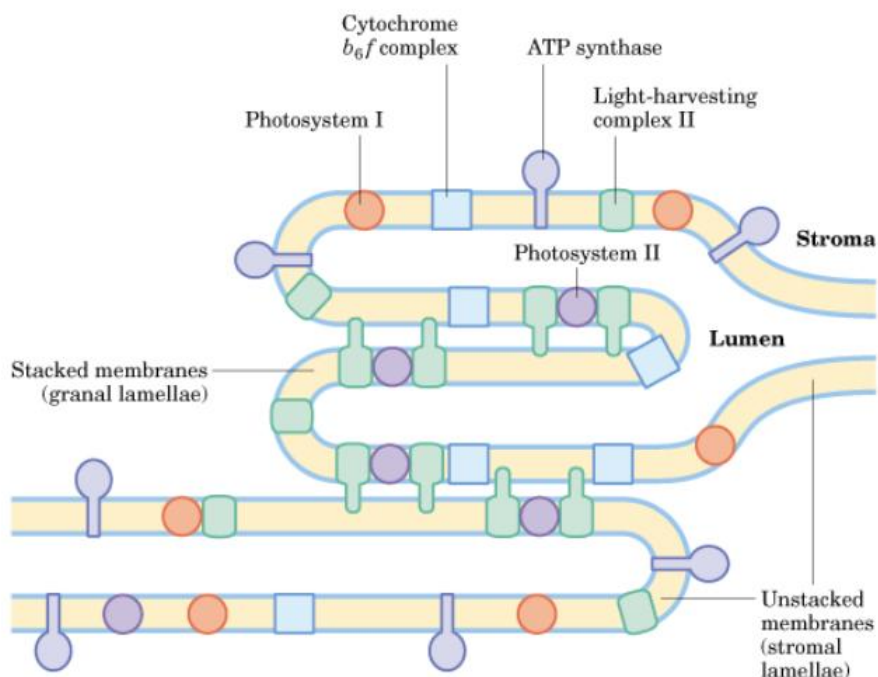


Abb. 1.2: Schematischer Aufbau der Thylakoidmembran. Die Photosysteme (PS) sind heterogen über die Stroma- bzw. Granabereiche verteilt, PS I kommt fast ausschließlich in den Stromathylakoiden vor, während PS II in den Granathylakoiden lokalisiert ist.

[<http://courses.cm.utexas.edu/emarcotte/ch339k/fall2005/Lecture-Ch19-3/Slide14.jpg>]

## 1.2 Aufbau des PS II und seiner Lichtsammelantennen

Das PS II beinhaltet in seinem Kern-Komplex (*core complex*) die das Reaktionszentrum bildenden Core-Proteine D1 und D2 sowie die beiden Kern-Antennen CP 47 und CP 43. Angelagert an den Kern-Komplex befinden sich die sogenannten peripheren Lichtsammelantennen. Am stärksten vertreten sind hierbei die Produkte der Gene *Lhcb1* und *Lhcb2*, die zusammen mit dem nur gering exprimierten *Lhcb3* die Proteine des homo- oder heterotrimeren majoren Lichtsammelkomplexes des PS II, den LHCII, codieren (Jansson 1994; Jackowski *et al.*, 2001). Der LHCII stellt etwa 1/3 des Gesamtproteins der Thylakoidmembran und bindet ca. 50% des in Pflanzen vorkommenden Chlorophylls. Er dürfte damit das häufigste Membranprotein der Erde darstellen. Darüber hinaus umfassen die peripheren Lichtsammelantennen des PS II auch noch die sogenannten Minoren Lichtsammelkomplexe, die als Monomer vorliegenden Lichtsammelproteine CP29, CP26 und CP24 (*Lhcb4-6*). Das PS II mit seiner Garnitur aus Lichtsammelproteinen liegt in der Thylakoidmembran als Dimer vor, wobei pro PS II-Dimer jeweils mindestens 2-4 LHCII-Trimere gebunden sind (Boekema *et al.*, 1999; Yakushevskaja *et al.*, 2001; Dekker & Boekema, 2005; Schmid, 2008) (Abb. 1.3).

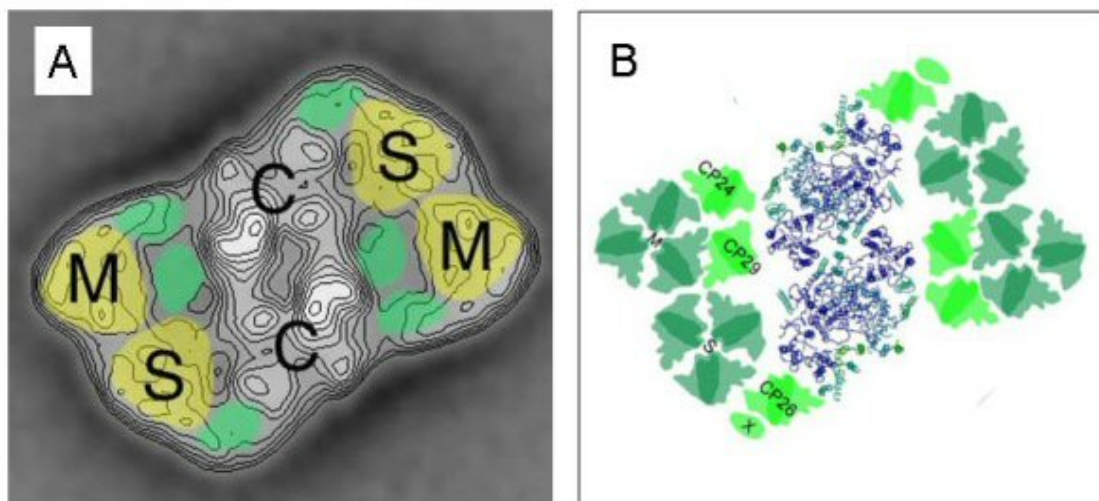


Abb. 1.3: (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme des PS II Superkomplexes. (B) Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahme aus (A) modelliertes Modell des PS II Superkomplexes. C = PS II Kernkomplex, M = moderat gebundener LHCII, S = stark gebundener LHCII. In den hellgrünen Bereichen sind die minoren Antennenkomplexe (CP24, CP26, CP29) lokalisiert. (nach Ruban *et al.*, 2003)

(Zusätzlich zu den dargestellten stark und moderat an das PSII assoziierten LHCII-Komplexen sind am PSII auch noch schwach gebundene LHCII Trimere lokalisiert, die im Verlauf der Präparation verloren gehen, somit liegt die Zahl der tatsächlich am PSII gebundenen LHCII Trimere deutlich höher (Schmid, 2008).

### 1.3 Der LHCII

Die Hauptaufgabe dieses in trimerer Form in der Pflanze vorliegenden Proteins besteht darin, einfallendes Licht zu sammeln und an die Reaktionszentren der Photosysteme weiterzuleiten. Diese herausragenden Eigenschaften haben dazu geführt, dass der LHCII das bislang am besten untersuchte Lichtsammelprotein aus höheren Pflanzen ist.

Der LHCII wird von drei kerncodierten Genen exprimiert, die mit *Lhcb1* – *Lhcb3* bezeichnet werden (Jansson 1994). Das am stärksten in der Pflanze auftretende Protein ist der *Lhcb1*; aufgrund hoher Sequenzhomologien zu *Lhcb2* und *Lhcb3* können sowohl Homo- als auch Heterotrimere gebildet werden (Jansson 1994; Jackowski *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem *Lhcb1* gearbeitet.

#### 1.3.1 Aufbau und Struktur des LHCII

Pro Monomer besteht der *Lhcb1* aus 232 Aminosäuren (AS) sowie 14 Chlorophyllen, 2 Luteinen und jeweils einem Neoxanthin und Violaxanthin (Yang *et al.*, 1999; Hobe *et al.*, 2003). Neben detaillierten Informationen über den Pigmentgehalt dieses *in vivo* als Trimer vorliegenden Komplexes wurde von Kühlbrand *et al.* 1994 erstmals eine Elektronenkrystalstruktur des LHCII mit einer Auflösung von 3,4 Å veröffentlicht. Hierbei wurden ca. 80% der Struktur erfasst. Liu *et al.* publizierten 2004 eine deutlich feiner aufgelöste Struktur auf Basis röntgenkristallographischer Untersuchungen (2,72 Å Auflösung), mit der ca. 94% der Proteinstruktur dargestellt werden konnten. 2005 konnte die Auflösung durch elektronenkristallographische Studien auf 2,5 Å gesteigert werden (Standfuss *et al.*, 2005), wobei in beiden Veröffentlichungen im Wesentlichen die bereits von Kühlbrand *et al.* gezeigten Strukturen bestätigt werden konnten. Eine neun Aminosäuren lange Struktur unmittelbar am N-Terminus konnte bislang nicht aufgelöst werden, hier scheint eine sehr große Flexibilität in der Struktur des LHCII zu bestehen (Jeschke *et al.*, 2005).

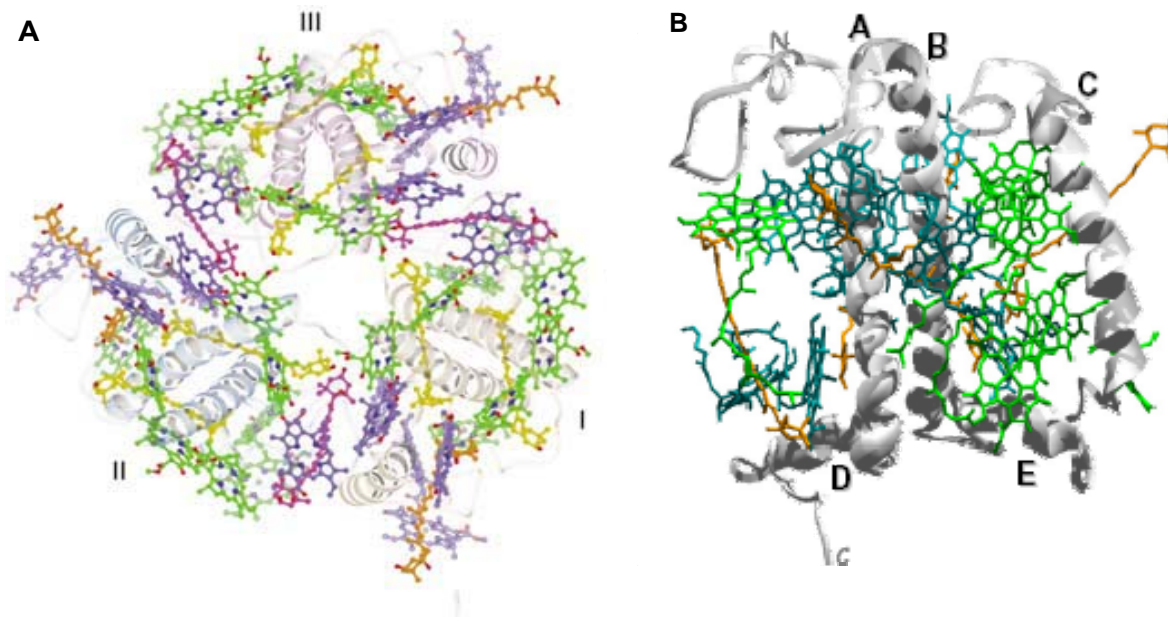


Abb. 1.4: Struktur des LHCII. (A) Ansicht eines Trimers, die einzelnen Monomere sind mit I – III bezeichnet. Grün = Chlorophyll, Gelb = Lutein, Orange = Violaxanthin, Lila = Neoxanthin. (B) Strukturansicht eines LHCII Monomers. Die  $\alpha$ -Helices sind mit A – E bezeichnet. Hellgrün = Chlorophyll b, Dunkelgrün = Chlorophyll a, Orange = Xanthophylle. (nach Liu *et al.*, 2004)

Danach weist jedes LHCII-Monomer drei transmembrane Helices (Helix A, B und C) sowie die Helix D nahe des C-Terminus und eine kurze Helix E auf der luminalen Membranseite auf. Die überkreuz liegenden Helices A (Länge 5,1 nm) und B (Länge 3,1 nm, Kreuzungswinkel  $32^\circ$ ) werden von zwei zentral angeordneten Lutein-Molekülen stabilisiert. Die senkrecht zur Membranebene stehende Helix C hat eine Länge von 2,9 nm. Nicht exakt bestimmt werden konnte dagegen in beiden Kristallstrukturen der N-Terminus bis zur Aminosäure 14, wofür vermutlich dessen konformative Flexibilität verantwortlich ist, die eine genaue Darstellung erschwert. Im nativen Trimer konnte darüber hinaus auch ein Molekül Phosphatidylglycerol identifiziert werden, das für die Bildung von Trimeren essentiell ist und für den Zusammenhalt der drei Monomere sorgt.

Darüber hinaus konnte in der Kristallstruktur die Lage der 14 am Komplex gebundenen Chlorophylle (8 Chl a und 6 Chl b) sowie die Position von jeweils einem Violaxanthin und Neoxanthin identifiziert werden. Die Chlorophylle sind dabei in zwei Schichten auf der stromalen (5 Chl a und 3 Chl b) bzw. der luminalen Seite (3 Chl a und 3 Chl b) des Komplexes angeordnet (Abb. 1.5, S. 9). Während alle Chlorophylle auf der stromalen Seite in nur einem Cluster organisiert sind, sind die Chlorophylle auf der luminalen Seite in zwei Gruppen zu 2 Chl a bzw. 1 Chl a und 3 Chl b aufgeteilt.

### 1.3.2 Biogenese des LHCII *in vivo*

Wie einige weitere Proteine des Photosyntheseapparates ist der LHCII kerncodiert und muss nach der Translation in die Chloroplasten importiert werden. Der Transfer in die Chloroplasten wird über eine im Vorläuferprotein (pLhcb) vorhandene Transitsequenz organisiert, mit deren Hilfe das Protein unter Aufwendung von ATP über den aus den Transportkomplexen TOC (*translocon at the outer membrane of the chloroplast*) und TIC (*translocon at the inner membrane of the chloroplast*) bestehenden Translokationsapparat die Hüllmembranen passieren kann. Nach Passage der Hüllmembranen wird die Transitsequenz abgespalten (Bauer *et al.*, 2001; Vothknecht & Soll, 2006).

Für die anschließende Komplexbildung aus dem importierten Apoprotein und Pigmenten werden zwei verschiedene Wege diskutiert, die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

Ein möglicher Weg geht von Assemblierung des LHCII in der Thylakoidmembran aus, wozu das Protein nach der Passage der Chloroplastenhüllmembranen dorthin transportiert werden muss. Am Einbau des LHCII in die Thylakoidmembran ist cpSRP beteiligt, der plastidäre *signal recognition particle*. Die Insertion findet unter Beteiligung weiterer Faktoren (cpFtsY, cpSRP-Rezeptor, Tu *et al.*, 1999, Schünemann, 2007) statt. Wann im Verlauf dieses Assemblierungsweges die Bindung der Pigmente stattfindet, konnte bislang nicht geklärt werden. Eine stabile Insertion ist allerdings nur in Anwesenheit von Chlorophyllen bzw. Analoga dazu (Zn-Pheophytin) beobachtet worden (Kuttkat *et al.*, 1997).

Eine zweite Theorie geht von einer Assemblierung des LHCII bereits direkt nach der Translokation über die Chloroplasten-Hüllmembranen aus (Hooper & Eggink, 1999). Direkt nach dem Eintritt des Proteins in das Stroma findet die Bindung der Pigmente statt. Gestützt wird diese Theorie von der Tatsache, dass ein Import unterbleibt, wenn kein Chlorophyll bereitgestellt wird (Park & Hooper, 1997; Hooper *et al.*, 2007), das unpigmentierte Protein akkumuliert dann in der Vakuole.

In beiden Theorien spielt die Bindung speziell von Chl b eine zentrale Rolle, da bei alleiniger Anwesenheit von Chl a keine stabilen LHCII Komplexe gefunden wurden (Kuttkat *et al.*, 1997; Hooper & Eggink, 2001). Welcher der beiden vorgeschlagenen Wege tatsächlich *in vivo* beschritten wird oder ob beide parallel ablaufen, ist derzeit noch nicht geklärt.

### 1.3.3 *In-vitro* Rekonstitution des LHCII

Bereits seit Plumley und Schmidt (1987) ist die Fähigkeit des LHCII, sich unter Anwesenheit von Pigmenten spontan selbst zu falten – zu rekonstituieren – bekannt. Drei Jahre später konnten Paulsen *et al.* zeigen, dass dies auch mit in *Escherichia coli* (*E.coli*) überexprimierten Apoproteinen möglich ist, und dass die dabei hergestellten rekombinanten Komplexe sehr ähnliche spektrale Eigenschaften besitzen wie isolierter nativer LHCII (Plumley & Schmidt, 1987; Paulsen *et al.*, 1990; Hobe *et al.*, 1994). 1993 wurde von Paulsen *et al.* zur Rekonstitution des LHCII die Detergenz-Wechsel-Methode vorgestellt. Hierbei wird zu SDS-solubilisiertem LHCII-Apoprotein Pigment hinzugegeben und die Komplexbildung durch einen Detergenzwechsel induziert. Die Zugabe von Pigmenten ist essentiell für die Bildung von LHCII Komplexen (Paulsen *et al.*, 1993). Einhergehend mit der Faltung erhöht sich auch der  $\alpha$ -helikale Anteil von ca. 27% im SDS-solubilierten Apoprotein auf ca. 41% im gefalteten Komplex (Horn & Paulsen, 2002). Die Faltung des Komplexes ist aber auch vom vollständig entfalteten, in Guanidiniumhydrochlorid solubilisiertem Apoprotein aus möglich (Yang *et al.*, 2003), die  $\alpha$ -helikalen Anteile stellen also keine unbedingte Voraussetzung für die Rekonstitution des LHCII dar.

1998 konnten Rogl *et al.* zeigen, dass der LHCII seine Fähigkeit zur spontanen Selbstfaltung auch nach einer Immobilisierung an einer  $\text{Ni}^{2+}$ -Säule nicht verliert. Hierzu wurde an die Aminosäurekette des Proteins molekularbiologisch ein His<sub>6</sub>-tag angefügt, der über ein  $\text{Ni}^{2+}$  an einer Sepharose-Säule komplexiert werden kann. Erst im Anschluss an die Immobilisierung des Apoproteins wurden die Pigmente auf die Säule gegeben. Die Rekonstitution findet auch hier über einen Detergenzwechsel statt. Trotz der Immobilisierung konnten nach Abschluß des Experimentes im Säuleneluat gefaltete Komplexe nachgewiesen werden.

## 1.4 Spektroskopische Eigenschaften des LHCII

### 1.4.1 Energietransferprozesse innerhalb des LHCII

Mit der Möglichkeit zur Rekonstitution *in vitro* und der damit sehr einfachen Herstellung von größeren Probenmengen bot sich der LHCII für eingehende Studien zu den optischen und biochemischen Eigenschaften an. Im Mittelpunkt vieler Studien stand dabei vor allem die hocheffiziente Koppelung der am Proteingerüst gebundenen Chlorophylle, durch die sich der LHCII auszeichnet und die für seine Funktion in der Pflanze als Lichtsammelprotein

## 1 Einleitung

---

unabdingbar ist. Das Licht wird dabei zunächst von den am Komplex gebundenen Pigmenten absorbiert, dann von Pigment zu Pigment und schließlich von Komplex zu Komplex transferiert. Die Fähigkeit zur Absorption von sichtbarem Licht durch Pigmente ist auf ein ausgedehntes System von konjugierten Doppelbindungen zurückzuführen. Ist die Energie des Anregungslichtes hoch genug, so wird ein Elektron des Moleküls aus dem Grundzustand in ein höheres Orbital angehoben (= angeregter Singulettzustand). Die Chlorophylle besitzen analog zu ihren beiden Absorptionsmaxima im roten und im blauen Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichtes zwei solche Hauptanregungszustände, die als  $S_1$  und  $S_2$  bezeichnet werden. Um von diesem angeregten in den Grundzustand zurückzugelangen, muss die Anregungsenergie wieder abgegeben werden, wofür verschiedene Wege zur Verfügung stehen. Der Übergang vom kurzlebigen  $S_2$ -Zustand in den  $S_1$ -Zustand erfolgt sehr schnell unter Abgabe von Wärme. Für den Übergang vom  $S_1$ -Zustand in den Grundzustand kann die Energie sowohl in Form von Fluoreszenzlicht als auch in Form von Wärme abgegeben werden. Darüber hinaus besteht für ein angeregtes Pigment innerhalb des LHCII auch die Möglichkeit, seine Anregungsenergie auf Akzeptor-Pigmente mit einem etwas niedrigeren Energieniveau abzugeben, wodurch das Donor-Pigment in den Grundzustand zurückfällt, das Akzeptor-Pigment dagegen angeregt wird. Dieser Vorgang kann aber nur dann stattfinden, wenn sich das Fluoreszenzemissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überschneidet und die beteiligten Pigmente räumlich benachbart angeordnet sind. Scheer (1999) vermutet diese Art der Energieübertragung bei der Weiterleitung der Anregungsenergie zwischen den verschiedenen Lichtsammelantennen und den Reaktionszentren der Photosysteme. Innerhalb des LHCII findet diese Form der Energieübertragung wahrscheinlich zwischen den Xanthophyllen und den Chlorophyllen statt (van Amerongen und van Grondelle, 2001). Man spricht in diesem Fall von Förster- bzw. Resonanzenergietransfer. Der Abstand, bei dem zwischen zwei benachbarten Farbstoffen die Anregungsenergie mit einer Effizienz von 50% über einen solchen strahlungsfreien Energietransfer übertragen wird, wird als Försterradius  $R_0$  bezeichnet und kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$R_0 = 0,211 \sqrt{J * \kappa^2 * \Phi_D * n^{-4}}$$

$J$  = Überlappungsintegral der Donorfluoreszenz und der Akzeptorabsorption,  $\kappa$  = Faktor, der die relative Orientierung der Dipolmomente beschreibt;  $\Phi_D$  = Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors,  $n$  = Brechungsindex der Umgebung.

Betrachtet man einen einzelnen Lichtsammelkomplex, so stellt Chl a gegenüber Chl b den Energieakzeptor dar. Spektroskopisch äußert sich dieser komplexinterne Energietransfer zwischen den Pigmenten in einer für den LHCII typischen Eigenschaft: Nach selektiver Anregung von Chl b bei 470 nm erhält man in intakten Komplexen ein reines Chl a-Fluoreszenz-Emissionsspektrum mit einem Maximum bei 680 nm, was eine Übertragung der Anregungsenergie von Chl b auf Chl a belegt. Durch kovalente Koppelung eines Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoffes an das Proteingerüst des LHCII kann Chl a nach dem gleichen Mechanismus auch in die Rolle eines Donors schlüpfen. Somit kann diese Form der Energieübertragung direkt fluoreszenzspektroskopisch sichtbar gemacht werden.

Der Abstand einiger komplexgebundener Pigmente ist so gering, dass aufgrund von Wechselwirkungen der Chlorophyll-Anregungszustände zwischen benachbarten Chlorophyllen für den Energietransfer auch eine excitonische Koppelung nach dem Dexter-Mechanismus in Frage kommt. Die Anregungsenergie verteilt sich in diesem Fall über mehrere excitonisch gekoppelte Pigmente (van Amerongen & van Grondelle, 2001).

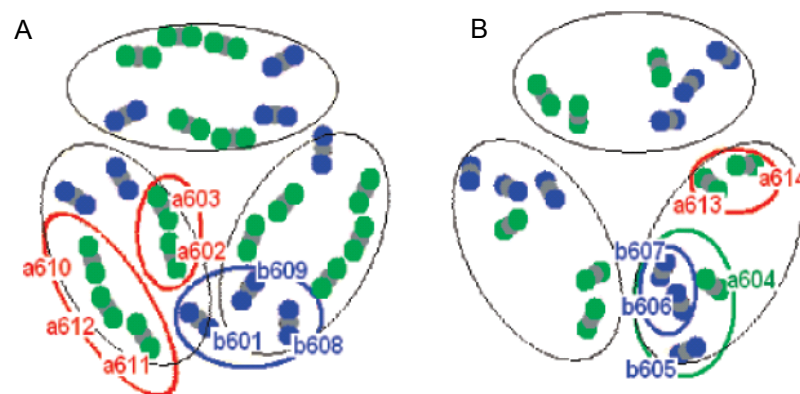


Abb. 1.5: Schematische Anordnung der Chlorophylle auf der stromalen (A) bzw. luminalen (B) Seite eines LHCII Trimers. Die Chlorophylle sind durch das Zentralatom Mg (grau) und die benachbarten Stickstoffatome (N, grün = Chl a, blau = Chl b) dargestellt. Gekoppelte Chlorophylle sind umrandet. (nach Novoderezhkin *et al.*, 2005)

Vermutlich wird die von den beiden Chl-Clustern (Abb. 1.5) auf der luminalen Seite absorbierte Anregungsenergie zum Chl-Cluster auf der stromalen Seite weitergeleitet und von dort lokalisierten Chl a-Molekülen an benachbarte Lichtsammler bzw. RC abgegeben (Liu *et al.*, 2004). Auf Basis dieser Strukturdaten wurde der komplexinterne Energietransfer zwischen den Chlorophyllen durch Computerberechnungen simuliert (Van Grondelle & Novoderezhkin, 2005). Hierbei wurden schnelle Energietransferzeiten (im Bereich von fs) von den Chl b auf Chl a errechnet. Deutlich langsamere Transferzeiten im Bereich einiger ps werden durch ein einzelnes Chl a (Chl a604) verursacht, das die Weiterleitung der Energie mehrerer Chl b (Chl b605 – b607) auf der luminalen Seite des Komplexes zu den anderen

Chlorophyllen a auf der stromalen Seite zur Aufgabe hat. Letztlich wird die Energie zu den stromalen Chl a610 a612 übertragen.

Da diese Berechnungen auf Computersimulationen beruhen und bislang nicht experimentell bestätigt werden konnten, kann nicht endgültig gesagt werden, ob die Energietransferprozesse innerhalb des LHCII tatsächlich auf die beschriebene Art und Weise stattfinden. Möglicherweise stehen für den Energietransfer alternative Wege zur Verfügung. Dass als komplexinterner Endakzeptor wie in diesem Modell vorgeschlagen ein Chl a dient, zeigt sich in Fluoreszenzspektren nach Anregung von Chl b (s.o.), letztendlich wurde bei einzelmolekularen Untersuchungen des LHCII eine Polarisierung des emittierten Fluoreszenzlichtes gezeigt, was auf nur ein einziges fluoreszierendes Chl a hindeutet (siehe nächster Abschnitt).

### 1.4.2 Die Fluoreszenzemission einzelner LHCII Komplexe

Für eine nähere Betrachtung der Komplexeigenschaften des LHCII wurde von Tietz *et al.* (2001) und Gerken *et al.* (2002) einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen mit dem Verfahren der *total internal reflection fluorescence* (TIRF) durchgeführt. Dieses Verfahren wurde zuvor beispielsweise auch schon für den LH2, den Lichtsammler der Purpurbakterien, erfolgreich angewendet (Bopp *et al.*, 1997; van Oijen *et al.*, 1999). Im Gegensatz zur klassischen Fluoreszenzmikroskopie, bei der die gesamte innerhalb des Anregungslichtstrahls gelegene Probe beleuchtet (und damit angeregt) wird, macht man sich hier die Effekte der Totalreflexion des Anregungslichtes am Objektträger zu nutze (Abb. 1.6). Der anregende Lichtstrahl wird so durch das Objektiv auf die Probe gelenkt, dass er aufgrund der Brechung schräg auf den Objektträger trifft und dort, wenn der Einfallswinkel den kritischen Winkel übersteigt, vollständig reflektiert wird. Aufgrund der Totalreflexion bildet sich auf der Oberseite des brechenden Mediums eine sogenannte evaneszente Welle, die mit steigender Entfernung exponentiell abnimmt. Die Eindringtiefe solcher Wellen beträgt typischerweise 100 – 400 nm. Diese Technik hat den Vorteil, dass ausschließlich nahe an der Oberfläche bzw. auf der Oberfläche lokalisierte Objekte angeregt werden und damit im Vergleich zur klassischen Fluoreszenzmikroskopie das angeregte Volumen sehr klein ist und daher nur sehr geringe Hintergrundfluoreszenzen erwartet werden. Durch die Möglichkeit zur Beobachtung einzelner Moleküle können außerdem Effekte durch Überlagerungen der Signale vieler verschiedener Moleküle ausgeschlossen werden.

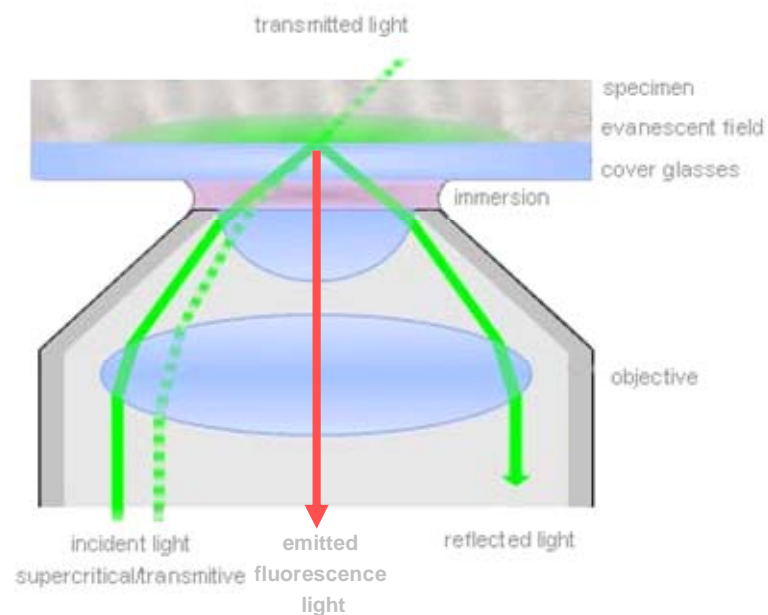


Abb. 1.6 Funktionsprinzip der TIRF-Spektroskopie. Wird das Anregungslicht unterhalb der kritischen Winkels eingestrahlt (gestrichelte grüne Linie), so wird es an der Oberfläche des Probenträgers nicht reflektiert. Der gesamte belichtete Teil der probe wird angeregt. Oberhalb des kritischen Winkels (durchgezogene grüne Linie) findet eine Total-Reflexion des Anregungslichtes statt, und auf der Oberseite des Probenträgers bildet sich ein evaneszentes Feld. Nur Objekte innerhalb des evaneszenten Feldes werden angeregt. Die von Objekt emittierte Fluoreszenz wird über einen Filter vom reflektierten Anregungslicht getrennt. [<http://objects.olympus-europa.com/micro/uploads/tirf.jpg>, verändert]

Für Fluoreszenzmessungen nach dem TIRF-Verfahren muss daher dafür Sorge getragen werden, dass sich das zu untersuchende Objekt nahe der Oberfläche aufhält. Bei Messungen in Lösung besteht außerdem das Problem, dass die Objekte nicht fixiert sind und sich daher aus dem Fokus des Fluoreszenzmikroskopes bewegen können. Für die meisten Anwendungen ist daher eine Immobilisierung des Objektes notwendig. Die einfachste Form der Immobilisierung stellt dabei das Einfrieren der Lösung mit den Untersuchungsobjekten dar. Auch kann das Objekt in Poly-Vinyl-Alkohol (PVA) eingebettet und in einem dünnen Film auf die Oberfläche aufgebracht werden („spin coating“; Tietz *et al.*, 2001). Gerken *et al.* (2002) immobilisierten den LHCII, indem dieser – ähnlich der bereits von Rogl *et al.* (1998) durchgeführten Immobilisierung an einer  $\text{Ni}^{2+}$ -Sephrose-Säule - über einen His<sub>6</sub>-Tag an ein Meerrettich-Peroxidase- $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Konjugat gekoppelt wurde. Die Meerrettichperoxidase besitzt die Eigenschaft, spontan an Glasoberflächen zu adsorbieren. Durch diese Immobilisierung wurde eine orientierte Ausrichtung der Komplexe auf der Oberfläche gewährleistet. In diesen Experimenten wurde gezeigt, dass das von einzelnen immobilisierten monomeren Komplexen emittierte Fluoreszenzlicht eine gerichtete

Polarisation aufweist, was auf nur ein einziges fluoreszierendes Chlorophyll a-Molekül hindeutet (Gerken *et al.* 2002). Somit konnte experimentell die interne Energieweiterleitung zwischen den Chlorophyllen nach dem Förster-Mechanismus nachgewiesen werden. Zudem wurde die prinzipielle Machbarkeit von Einzelmolekülstudien am LHCII gezeigt.

### 1.5 Die Faltung des LHCII-Apoproteins

Ein Protein kann seine native Funktion nur dann erfüllen, wenn es in einer ganz bestimmten Art und Weise gefaltet in der Zelle vorliegt. Diese Form wird vorgegeben durch die Abfolge der einzelnen Aminosäuren (Primärstruktur), durch die auch die Sekundärstruktur ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt oder Zufallsknäuel (*random coil*)) definiert wird. Die Anordnung dieser Strukturen im Raum wird als Tertiärstruktur bezeichnet (z.B. die Lage verschiedener Helices zueinander). Übergeordnete Strukturen – beispielsweise die Bildung von Oligomeren – werden unter dem Begriff Quartärstruktur zusammengefasst.

Um vom neu synthetisierten Protein zum funktionell gefalteten Komplex zu gelangen, stehen objektiv gesehen unendlich viele verschiedene Wege zur Verfügung – der fertig gefaltete Zustand ist dabei prinzipiell der energetisch günstigste (Dobson, 2003). Wenn dieser Zustand während der Faltung durch zufälliges „ausprobieren“ verschiedener Konformationskombinationen erreicht werden sollte, so wäre zu erwarten, dass dieser Prozess einige Zeit in Anspruch nehmen sollte, in der Realität ist dies aber nicht der Fall (Heldt, 2000). Daher wird angenommen, dass im Verlauf der Proteinfaltung ein definierter Weg beschritten wird, der die strukturellen Möglichkeiten zunehmend weiter einschränkt. Der Faltungsweg folgt dabei dem Weg zum energetischen Minimum – man spricht hier auch vom „Faltungstrichter“ (*folding funnel*) (Bowie, 2005). Im Verlauf der Faltung können dabei auch stabile Intermediate entstehen, die noch nicht den energetisch günstigsten Zustand repräsentieren – hier muss Energie aufgewendet werden, um den Faltungsweg aus diesem energetischen Loch heraus fortsetzen zu können – in diesem Falle hat der Faltungstrichter keine glatte Oberfläche, sondern weist verschiedene „Dellen“ und Erhebungen auf. Experimentell kann sich das Vorhandensein von solchen Zwischenstufen dadurch äußern, dass in Faltungsexperimenten mehrere Reaktionszeiten identifiziert werden können. Allerdings ist es ebenso möglich, dass unterschiedliche Faltungswege entlang des Faltungstrichters unterschiedlich lange dauern – auch so können unterschiedliche Reaktionszeiten zustande kommen.

Eine wichtige begleitende Rolle während der Faltung vieler wasserlöslicher Proteine

spielen *in vivo* die Chaperone („Anstandsdamen“), sie sorgen dafür, dass während der Synthese am Ribosom oder auch während der Membranpassage – wenn das Protein im allgemeinen vollständig entfaltet vorliegt – keine Fehlerhaften inter- oder intramolekularen Assoziationen entstehen. Auch nach der Proteinfaltung spielen diese Chaperone eine wichtige Rolle, um die Entfaltung von Proteinen unter ungünstigen äußeren Bedingungen – beispielsweise hohen Temperaturen – zu vermeiden.

Im Unterschied zu löslichen Proteinen unterstehen Membranproteine weiteren Zwängen, die in den hydrophoben, im gefalteten Zustand innerhalb der Membran liegenden Bereichen begründet liegen (Bowie, 2005). Während die *in vitro*-Rekonstitution bei löslichen Proteinen relativ gut beschrieben ist, sorgt diese zusätzliche Hürde dafür, dass im Verhältnis zu löslichen Proteinen nur für relativ wenige Membranproteine eine *in vitro*-Rekonstitution beschrieben wurde – als Beispiele seien hier Bakteriorhodopsin (bR) (das erste Membranprotein, das *in vitro* rückgefaltet werden konnte; Huang *et al.*, 1981; London & Khorana, 1982), OmpA (*Escherichia coli* K-12 outer membrane protein A; Surrey & Jähnig, 1992), KcsA (Kaliumkanalprotein aus *Sacharomyces cerevisiae*; Valiyaveetil *et al.*, 2002), und der LHCII (Plumley und Schmidt, 1987, Paulsen *et al.*, 1990) genannt. Im Unterschied zu löslichen Proteinen herrscht in SDS- oder Harnstoff-solubilisierten denaturierten Membranproteinen von vornherein ein höherer Grad an Strukturierung, von der aus die Faltung starten kann (Booth & Curnow 2006). Dennoch ist auch vom vollständig entfalteten LHCII-Apoprotein aus eine Rückfaltung möglich (Yang *et al.*, 2003).

Ein Großteil des aktuellen Wissens über den Faltungsmechanismus von Membranproteinen stammt aus Untersuchungen zur Faltung von Bakteriorhodopsin (bR). Für dieses Protein wird eine Faltung in drei Phasen postuliert (Engelmann *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu wurde für den Komplexbildungsprozess des LHCII zunächst eine Faltung in einem Schritt mit einer Dauer von einigen Minuten detektiert (Booth & Paulsen, 1996). In späteren Messungen konnte ein zweiter, schnellerer Faltungsschritt aufgelöst werden. Als Monitor in diesen Experimenten diente der Aufbau eines Energietransfers von Chlorophyll (Chl) b auf Chl a (Reinsberg *et al.*, 2000 und 2001; siehe auch Abschnitt 1.3). Anhand der in diesen Experimenten aufgenommenen Fluoreszenzsignale konnten durch mathematische Funktionsanpassung den Kurven zwei Faltungsphasen zugeordnet werden, die sich abhängig von den Rekonstitutionsbedingungen in einem Zeitrahmen von 10-30 s bzw. 50–300 s bewegten. Horn und Paulsen (2002) beobachteten die Komplexbildung, indem die Bildung  $\alpha$ -helikaler Bereiche des Proteingerüsts als Monitor diente. Hierzu wurden zu solubilisiertem Apoprotein gelöste Pigmente zugegeben und die Komplexbildung fluoreszenzspektroskopisch und CD-spektroskopisch anhand der Änderungen in den

Spektren verfolgt. In diesen Messungen wurde der Zeitrahmen, in dem sich die zwei Faltungsphasen bewegten, bestätigt. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass die Bindung von Pigmenten eng mit der Bildung von Sekundärstrukturen gekoppelt ist. Weiterführende Experimente von Horn und Paulsen (2004) mit farbstoffmarkiertem LHCII Apoprotein konnten zeigen, dass während der Komplexbildung Chl a vor Chl b gebunden wird. Wird für die Faltungsexperimente zunächst nur Chl a zur Verfügung gestellt, so kann ein teilweise gefaltetes Intermediat detektiert werden, das sich erst nach Zugabe von Chl b in einen funktionellen Zustand weiterfaltet (Horn *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang konnte die oben beschriebene schnelle Phase der LHCII-Komplexbildung der Bindung von Chl a zugeschrieben werden, die Bindung von Chl b erfolgt in einem zweiten, langsameren Schritt. Die Beobachtung der schrittweisen Komplexierung der beiden unterschiedlichen Chlorophyll-Typen deckt sich mit Untersuchungen zur Faltung des LHCII *in vivo*, hier ist die Anwesenheit von Chl b ebenfalls unabdingbar für die Entstehung von funktionalem LHCII (Kuttkat *et al.*, 1997; Hooper & Eggink, 2001; siehe auch Abschnitt 1.3.2). Möglicherweise spielt die Fähigkeit des LHCII zur spontanen Selbstorganisation auch *in vivo* eine Rolle, mit hoher Wahrscheinlichkeit sind hier aber auch noch andere Faktoren beteiligt – ein möglicher Kandidat ist hier ALB3, das an der Integration des LHCII in die Thylakoidmembran beteiligt ist (Moore *et al.*, 2000, Gerdes *et al.*, 2006). In ALB3<sup>-</sup> Mutanten kann kein funktioneller LHCII gefunden werden.

### 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob den von Horn und Paulsen 2002 und 2004 beschriebenen zwei Faltungsphasen des LHCII während der Rekonstitution tatsächlich eine zweistufige Faltungskinetik zu Grunde liegt, oder ob es sich vielmehr um zwei unterschiedliche Wege vom entfalteten Protein zum funktionelle Komplex handelt, die sich überlagern und im Resultat der Ensemble-Fluoreszenzaufnahmen zur gleichen Beobachtung führen. Im Gegensatz zu früheren Experimenten sollten daher in dieser Arbeit einzelmolekulare Messungen zur Faltung und Entfaltung des LHCII durchgeführt und über die Änderung der Fluoreszenz aufgezeichnet werden. Solche Untersuchungen zur Faltung einzelner Moleküle sind in der Literatur mittlerweile beschrieben (Schuler & Eaton, 2008). Im Falle eines einzigen Faltungsweges sollte dann bezüglich der Faltungskinetik eine Gauß-Verteilung beobachtet werden, im Falle von zwei von der Geschwindigkeit her unterschiedlichen Faltungswegen sollten zwei (möglicherweise überlappende) unterscheidbare Zeiten gemessen werden können. Die Faltung einzelner LHCII Proteine

sollte anhand eines sich während der Faltung aufbauenden Energietransfers von den Komplexen auf einen daran gekoppelten Akzeptorfarbstoff aufgezeichnet werden, wie dies auch schon von Horn und Paulsen (2004) im Ensemble durchgeführt wurde. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, Informationen über die Bindungsreihenfolge der verschiedenen im Komplex gebundenen Pigmentspezies während der Komplexbildung zu erhalten. Parallel zu diesen Experimenten sollten auch Untersuchungen zur gezielten Denaturierung einzelner LHCII Komplexe erfolgen, um festzustellen, ob sich diese in einem ähnlichen Zeitrahmen bewegt wie die Bildung von Komplexen während der Rekonstitution.

Zur Durchführung solcher einzelmolekularer Faltungskinetiken muss der LHCII so fixiert werden, dass er für weitere experimentelle Schritte wie beispielsweise die Rekonstitution zugänglich ist. Daher sollte zunächst eine solche Methode zur Immobilisierung von LHCII Apoproteinen und Komplexen auf Glasoberflächen etabliert werden. Die Fähigkeit des LHCII, auch in immobilisiertem Zustand noch rückfalten zu können, wurde bereits von Rogl *et al.* (1998) gezeigt. Da die bereits zur einzelmolekularen Beobachtung gefalteter LHCII Komplexe veröffentlichte Methode (Gerken *et al.*, 2002) auf einer relativ schwachen Bindung zwischen einem am Protein angebrachten His<sub>6</sub>-Tag mit Ni<sup>2+</sup> auf der Glasoberfläche beruhte, sollten im Verlauf dieser Arbeit Immobilisierungen entwickelt werden, die stringenteren Bedingungen, wie sie während der Rekonstitution des LHCII herrschen, standhalten können. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit bestand die Aufgabe darin, ein Protokoll zur Rekonstitution der immobilisierten LHCII Apoproteine zu etablieren, sowie dessen Anpassung an die Anforderungen der Einzelmolekülspektroskopie.

## 2 Material

### 2.1 Verwendete Geräte

#### Absorptionsspektrometer:

- UV-2101PC, UV-VIS-scanning spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan

#### Evaneszenz-Feld-Resonanz-Gerät:

- IAsys Affinity sensor, Thermo labsystems, Cambridge
- Software Version 4.0

#### Fluoreszenzspektrophotometer:

- FluoroMax-2, Jobin Yvon Spex, Grasbrunn, Deutschland mit R928 Photomultiplier, Hamatsu Photonics Deutschland, GMBH, Herrsching
- Software: Datamax Software Version 2.24/ Grams 32
- Front-Face Apparatur
- Kühlung: Digital Thermostat Ministat Compatible Control, Huber Kältemaschinen Bau GMBH, Offenburg-Elgersweiler, Deutschland

#### Gelelektrophorese, analytisch:

- Hoefer® Mighty Small®, Hoefer Pharmacia, San Francisco, CA, USA
- Digitalisierung: ScanJet 4c, Hewlett Packard Instruments, Oregon, USA
- Gel Trocknung: Slab Gel Dryer LKB, Bromma, Schweden
- Gelgießapparatur: Hoefer® Multiple Gel Caster, Hoefer Pharmacia, San Francisco, CA, USA

**HPLC-Anlage, analytisch:**

- Detektor: MD 1515, Jasco Labor und Datentechnik GmbH, Deutschland
- Pumpe: PU 1580, Jasco Labor und Datentechnik GmbH, Deutschland  
Gradientenmischer: LG-1580-04, Jasco Labor und Datentechnik GmbH, Deutschland
- Spannungsgeber: LC-Net II/ADC, Jasco Labor und Datentechnik GmbH, Deutschland
- Säule: Chromolith Speed ROD, RP 18e-50-4.6, Jasco Labor und Datentechnik GmbH, Deutschland
- Degasser: DG-1580-53, 3-Line-Degasser, Jasco Labor und Datentechnik GmbH, Deutschland
- Software: Jasco-PDA, Borwin, Version 1.5

**HPLC-Anlage, präparativ:**

- Gradientenmischer 510, Waters Millipore GmbH (Eschborn)
- Pumpe 501, Waters Millipore GmbH (Eschborn)
- Detektoren GAT LCD 500,  $\gamma$ -Analysen Technik (Bremerhaven)
- RF 535, Shimadzu (Kyoto, Japan)
- Vorsäule LiCrosphere RP 8,5  $\mu$ m, 20 x 4,6 mm, Mainzer Analysentechnik (Mainz)
- Säule Waters Bondapak C18, 125A, 10  $\mu$ m, 30 • 300 mm
- Software Max 820, Waters Millipore GmbH (Eschborn)

**Mikrotiterplattenreader:**

- SPECTRAMaxPLUS, Molecular Devices, Sunnyvale, California
- Software: SOFTmax<sup>®</sup> PRO

**Vortexer:**

- Vortex-Genie 2, Scientific Industries
- MS2 Minishaker IKA<sup>®</sup> Labortechnik

### Zentrifugen:

- Kühlzentrifugen:
  - o Beckman CH-J2 HS, USA mit Rotoren JA 20 und JLA-10500
  - o Universal 30 RF, Hettich, Tuttlingen, Deutschland mit zugehörigen Rotoren
  - o Mikro 22 R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland mit zugehörigen Rotoren
  
- Tischzentrifuge:
  - o Hettich Mikroliter Typ 220, Tuttlingen, Deutschland
  
- Ultrazentrifugen:
  - o Beckman Coulter XL 100K Ultracentrifuge, USA, mit Rotor SW 60Ti
  - o Beckman Coulter LE 80K Ultracentrifuge, USA, mit Rotor SW 60Ti

### Sonstige Geräte :

- **Rotationsverdampfer:** VV2000, Heidloph
- **Speed-Vac:** Vakuum Concentrator, Bachofer, Reutlingen, Deutschland
- **Ultraschallbad:** SONOREX super, RK102H, Bandelin, Berlin, Deutschland
- **French press:** Cell Press, SLM Aminco, SLM Instruments, Inc.
- **Blattmaterialaufschluss:** Waring heavy duty blender CB 6 2 T und Zubehör
- **Heizbad:** HB4 Basie Heizbad, IKA ® Labortechnik
- **Digitalkamera:** Olympus Camedia Digital Camera C-3040Zoom mit 3,3 Megapixel
- **Trockenschrank:** Typ U30, Memmert, Schwabach, Deutschland
- **Brutschrank:** Typ B50, Memmert, Schwabach, Deutschland
- **Sterilbank:** Laminar Flow SLEE Semiconductor Technik GmbH, Mainz
- **Autoklav:** Varioklav Typ 500 H-P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, München
- **pH-Meter:** Serie 500 Krick Elektronische Messgeräte, Berlin und InoLab pH Level 2  
WTW GmbH, Weilheim

## 2.2 Chemikalien

### **2.2.1 Lösungsmittel**

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungsmittel stammen von den Firmen Merck (Darmstadt), Riedel de Häen (Hannover) und Carl Roth (Karlsruhe).

Um eine höhere Reinheit zu erreichen, wurde technisches Aceton einmal destilliert.

Diethylether für die Pigmentextraktion wurde unter Zugabe von KOH zwei Stunden unter Rückfluss zur Beseitigung von Peroxiden aufgekocht 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 trocknen der modifizierten Glasoberflächen im Rahmen der Silanisierung verwendet.

### **2.2.3 Weitere Chemikalien**

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

ABCR, Karlsruhe

Alfa Aesar, USA

Biomol, Hamburg

Bio-Rad, USA

Boehringer, Mannheim

Dyomics, Jena

Greiner Bio-One, Kremsmünster

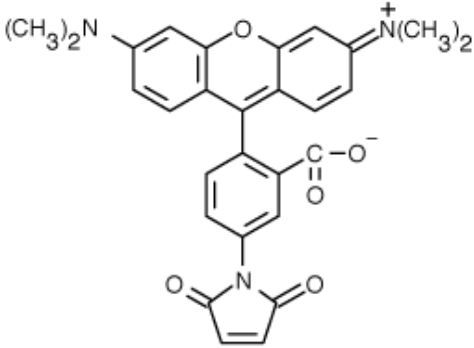
MobiTec, Göttingen

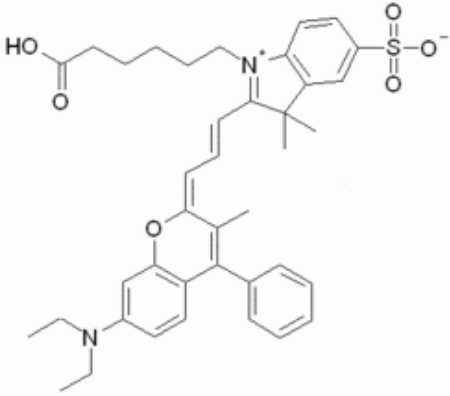
Molecular Probes, USA

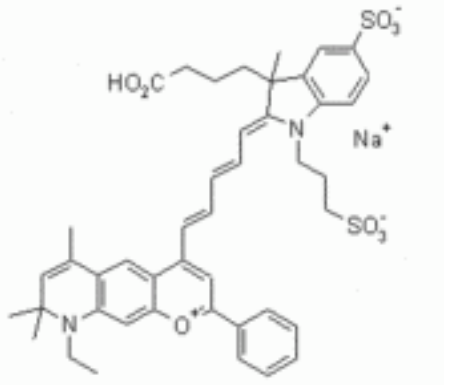
Serva, Heidelberg

Sigma-Aldrich, Deisenhofen



|  |  |
|--|--|
| <b>TMR</b>   |  |
| <p>Hersteller: Molecular Probes, USA</p> <p>Formel: <math>C_{28}H_{23}N_3O_5</math></p> <p>Molekulargewicht: 481,51 g/mol</p> <p>max. Absorption (Methanol): 541 nm</p> <p>max. Emission (Methanol): 567 nm</p> <p>molarer Extinktionskoeffizient: <math>95000 \text{ [cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}]</math></p> <p>Löslich in: DMSO, Methanol</p> |  |

|  |   |
|--|---|
| <b>DY700</b>   |  |
| <p>Hersteller: DYOMICS, Jena</p> <p>Formel: <math>C_{39}H_{44}N_2O_6S</math></p> <p>Molekulargewicht: 668,86 g/mol</p> <p>max. Absorption (Ethanol): 707 nm</p> <p>max. Emission (Ethanol): 730 nm</p> <p>molarer Extinktionskoeffizient: <math>140000 \text{ [cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}]</math></p> <p>Löslich in: Methanol, Ethanol, DMF, DMSO</p> |   |

|  |  |
|--|--|
| <b>DY776</b>   |  |
| <p>Hersteller: DYOMICS, Jena</p> <p>Formel: <math>C_{44}H_{47}N_2O_9S_2Na</math></p> <p>Molekulargewicht: 834,98 g/mol</p> <p>max. Absorption (Ethanol): 771 nm</p> <p>max. Emission (Ethanol): 793 nm</p> <p>molarer Extinktionskoeffizient: <math>240000 \text{ [cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}]</math></p> <p>Löslich in: Methanol, Ethanol, DMF, DMSO</p> |  |

## 3 Methoden

### 3.1 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.1.1 Überexpression und Isolierung von Einschlusskörpern aus *Escherichia coli*

Zur Herstellung von LHC Apoprotein wird das Lhcb1-Gen in *E. coli* überexprimiert. Hierfür tragen die Bakterien das cab-Gen AB80 oder Derivate davon in einem Expressionvektor der pDS12-Reihe (Bujard *et al.*, 1987). Bei der Isolierung der überexprimierten Lhcb1-Proteine in *E. coli* – Bakterien macht man es sich zu nutze, dass die Proteine in den Bakterien in Form von unlöslichen Einschlusskörpern (*inclusion bodies* = IBs) vorliegen. Diese lassen sich auf relativ einfache Weise aus *E. coli* – Kulturen isolieren.

In dieser Arbeit wurden die in Tab 3.1 aufgeführten IBs verwendet:

| Bezeichnung | Eigenschaften  | Hergestellt von   |
|-------------|--|-------------------|
| V229C       | Lhcb1 mit singulärem Cys nahe des C-Terminus   | Huschenbett, 2001 |
| V229Ch      | Lhcb1 mit singulärem Cys nahe des C-Terminus und His <sub>6</sub> -Motiv am N-Terminus   | Huschenbett, 2001 |
| S3CΔ49      | Lhcb1 mit singulärem Cys nahe des N-Terminus und C-terminaler Deletion von 49 AS, dadurch Verlust der Fähigkeit zur Rekonstitution | Horn, 2004        |
| S3Ch        | Lhcb1 mit singulärem Cys nahe des N-Terminus und His <sub>6</sub> -Motiv am C-Terminus   | Huschenbett, 2001 |
| S3C         | Lhcb1 mit singulärem Cys nahe des N-Terminus   | Huschenbett, 2001 |

Tab 3.1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten IBs.

Zunächst ist für die Herstellung der eigentlichen großvolumigen Anzuchtkulturen die Herstellung von Übernachtskulturen (ÜK) notwendig. Hierbei werden je 50 ml Luria-Bertani-Medium (LB-Medium), das mit 100 µg/ml Ampicillin (Amp) versetzt wurde (= LB<sub>Amp</sub>), mit einer kleinen Menge der entsprechenden Dauerkulturen der gewünschten Klone angeimpft. Die ÜK werden über Nacht auf dem Schüttler bei 190 Upm bei 37 °C angezogen.

Am nächsten Morgen werden die eigentlichen Anzuchtkulturen mit einem Volumen von 400 ml LB<sub>Amp</sub> mit jeweils 25 ml der ÜK angeimpft. Die Kulturen werden bei 37 °C auf dem

Schüttler (190 Upm) angezogen, und zunächst 1 h wachsen gelassen. Anschließend wird die Expression des unter dem lac-Operon stehenden Lhcb1-Gens durch Zugabe des Laktose-Analogons Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) zu einer Endkonzentration von 1 mM in der Kultur induziert und die Bakterien weitere 4-5 Stunden bei 37 °C wachsen gelassen. Danach werden die Kulturen bei 9000 Upm (JLA 10.500, Beckmann) für 6 min abzentrifugiert und das Pellet in 30 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> resuspendiert und 24 mg DTT sowie 83  $\mu$ l DNase I-Lösung zugegeben und die Suspension 3 min sonifiziert und anschließend auf Eis gelagert. Danach werden die Bakterien mit Hilfe der „French press“ unter hohem Druck aufgeschlossen. Nach Abnahme eines kleinen Aliquots (= Gesamtprotein) werden durch erneutes Zentrifugieren (6 min, 9000 Upm, 4 °C, JA20, Beckmann) die löslichen bakteriellen Proteine, die sich im Zentrifugationsüberstand befinden, abgetrennt und das Pellet in 8 ml Detergenz-Puffer resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (6 min, 9000 Upm, 4 °C, JA20, Beckmann) wird das Pellet in 8 ml Triton-Puffer resuspendiert und über Nacht am Drehrad bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen werden die IBs durch Zentrifugation (6 min, 9000 Upm, 15 °C, JA20, Beckmann) pelletiert, das Pellet sollte jetzt weiß sein. Andernfalls wird erneut in 8 ml Detergenz-Puffer resuspendiert und wie beschrieben verfahren. Ist das Pellet rein weiß, so wird es zunächst in 8 ml Tris-Puffer resuspendiert, erneut pelletiert (6 min, 9000 Upm, 4 °C, JA20, Beckmann) und in 1-2 ml Tris-Puffer resuspendiert. Die Qualität der so gewonnenen IBs wurde über eine denaturierende Gelelektrophorese untersucht, die Quantität wurde Absorptionsphotometrisch bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die IBs bei -20 °C eingefroren.

#### Material:

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| LB-Medium, steril                  | [0,5% Hefeextrakt; 1% Trypton; 1% NaCl; pH 7,5 (NaOH)]  |
| Amp                                | [100 mg/ml]   |
| DNase I-Lösung                     | [1 mg/ml DNase in 29 mM Tris/HCL pH 8,0; 50 mM NaCl; 1 mM DTE;<br>1 mM DTT; BSA (0,1 mg/ml); 50% Glycerin]    |
| Detergenz-Puffer                   | [200 mM NaCl; 1% Desoxycholsäure; 20 mM Tris pH 7,5; 2 mM EDTA;<br>10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 1% Triton] |
| Triton-Puffer                      | [0,5% Triton X-100; 1 mM EDTA; 20 mM Tris pH 7,5]   |
| Tris-Puffer                        | [20 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA]  |
| IPTG                               | [1 M]   |
| MgCl <sub>2</sub>                  | [1 M]   |
| MnCl <sub>2</sub>                  | [1 M]   |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> . |   |
| DTT                                |   |

### 3.1.2 Konzentrationsbestimmung der isolierten IBs bzw. Proteinlösungen

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen in wässrigen Lösungen kann man sich die Absorption von aromatischen Aminosäuren bei 280 nm Wellenlänge zu nutze machen. Die

### 3 Methoden

---

jeweiligen Umrechnungsfaktoren für die unterschiedlichen Lhcb1-Klone (Hobe 1995 für alle Lhcb1-Klone außer S3CΔ49 bzw. Horn 2004 für die Mutante S3CΔ49 ) sind dabei von der AS-Sequenz abhängig.

Lhcb1: 0,1 OD<sub>280 nm, 1 cm</sub> = 53 µg/ml

S3CΔ49: 0,1 OD<sub>280 nm, 1 cm</sub> = 49 µg/ml

Zur Bestimmung der Absorption wird dazu zunächst eine geeignete Verdünnung der Proteinsuspension mit A<sub>280</sub>-Puffer hergestellt und diese für 3 min gekocht. Zur besseren statistischen Absicherung werden dabei von jeder Probe je drei unabhängige Meßansätze durchgeführt, als Referenz dient eine Verdünnung der jeweiligen Puffer – bzw. Detergenzlösung mit A<sub>280</sub>-Puffer. Vor der Messung müssen die Proben noch abgekühlt werden. Eventuelle DNA-Verunreinigungen können durch Aufnahme eines Spektrums von 200 – 300 nm erkannt werden.

Material:

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Protein                   | [IBs in Trispuffer oder gelöst in 1% SDS]                   |
| Tris-Puffer               | [20 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA]                              |
| SDS                       | [1%]  |
| A <sub>280</sub> - Puffer | [10 mM Tris- HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 1 mM β- Mercaptoethanol] |
| H <sub>2</sub> O dest.    |   |

#### 3.1.3 Markierung von LHCII-Apoprotein

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Arbeiten war eine Markierung der eingesetzten Proteine zwingend notwendig, um einerseits den Erfolg der Oberflächenimmobilisierung von LHCII Apoprotein nachweisen zu können, andererseits als Monitor für eine erfolgreiche Rekonstitution der immobilisierten Proteine. Zusätzlich war eine Biotinylierung der Proteine zur Koppelung an Neutravidin-Oberflächen notwendig.

Prinzipiell stehen für eine Markierung bzw. Biotinylierung verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: Zum einen kann bei Proteinen prinzipiell der N-Terminus für eine Markierung herangezogen werden, wobei hier allerdings genau auf den pH-Wert während der Reaktion geachtet werden muss, um eine spezifische Markierung ausschließlich am N-Terminus zu erreichen und nicht ungewollte zusätzliche Markierungen an Aminosäuren mit sekundären Aminogruppen zu erhalten. Zum anderen können für eine Markierung auch in der Aminosäuresequenz vorhandenen Cysteine herangezogen werden. Hier erhält man eine hochspezifische, ortsgerechte Markierung, wobei der Ort der Markierung dank einer großen

Anzahl an zur Verfügung stehender Lhcb1-Mutanten relativ frei wählbar ist. Da in den in dieser Arbeit verwendeten LHCII-Mutanten stets nur ein Cystein in der Aminosäurekette vorhanden ist, kann daher von einer singulären Markierung ausgegangen werden.

In dieser Arbeit wurden zur Markierung der N-Terminus Isothiocyanat- (ITC-) bzw. N-Hydroxy-Succinimid-(NHS-)funktionalisierte Fluoreszenzfarbstoffe bzw. Biotin-Derivate eingesetzt, zur Cysteinmarkierung stets Maleimid-funktionalisierte Agentien.

#### Markierung des Lhcb1 am N-Terminus

Bei der Markierung des N-Terminus mit Fluoreszenzfarbstoffen wurde stets ein 15-facher molarer Überschuss an Farbstoff im Verhältnis zur eingesetzten Proteinmenge verwendet.

100 µg Lhcb1 IBs wurden zunächst abzentrifugiert und das Pellet mit 500 µl ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach erneutem pelletieren wurde das Protein in 32 µl 1% SDS aufgenommen, für 2 min gekocht und nach Abkühlen mit 10 mM Na-P pH 6,5 auf 320 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz mit 6 µl der jeweiligen Farbstofflösung [10mM in DMSO] bzw. Biotinlösung [5 µg/ml in DMSO] versetzt und für 2 – 4 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 µl Aminoethanol gestoppt und das Protein zur weiteren Aufarbeitung aus dem Markierungsansatz ausgefällt.

Material:

|                    |                   |
|--------------------|-------------------|
| SDS                | [1%]              |
| Na-P               | [10 mM pH 6,5]    |
| Farbstofflösung    | [10 mM in DMSO]   |
| Biotinlösung       | [5 mg/ml in DMSO] |
| Aminoethanol       |                   |
| ddH <sub>2</sub> O |                   |

#### Markierung des Lhcb1 am Cystein

Bei der Markierung des Cysteins wurden die gleichen Verhältnisse der beiden Reaktanden zueinander eingehalten wie auch bei der Markierung des N-Terminus. Allerdings muß hier das Cystein zunächst reduziert werden, um eventuell vorhandene Schwefelbrücken zwischen 2 Proteinen aufzulösen. Daher wurden 100 µg Lhcb1 nach dem Lösen in 40 µl 1% SDS zunächst für 2 min gekocht, anschließend mit 360 µl 10 mM Na-P pH 7,4 und mit 16 µl Tris-Cyano-Ethinphosphine (TCP) zur Reduktion versetzt. Die Reduktion erfolgte dann für 30 min bei 37 °C auf dem Drehrad. Vor der Zugabe des Farbstoffes wurde der Markierungsansatz auf Eis abgekühlt, danach 6 µl der Farbstoff- bzw. Biotin-Lösung zugegeben und für mindestens 4 h, meist aber üN auf dem Drehrad bei 37 °C inkubiert.

### 3 Methoden

---

Danach wurde die Markierungsreaktion durch Zugabe von 20 µl DTT gestoppt und das Protein ebenfalls ausgefällt.

Material:

|                 |                   |
|-----------------|-------------------|
| SDS             | [1%]              |
| Na-P            | [10 mM pH 7,4]    |
| TCP             | [100 mM in DMF]   |
| Farbstofflösung | [10 mM in DMSO]   |
| Biotinlösung    | [5 mg/ml in DMSO] |
| DTT             | [1 M]             |

#### 3.1.4 Proteinfällung

Nach der Markierung wurde das Protein durch Zugabe von 0,1 Volumen (Vol) Essigsäure und 2,3 Vol Aceton für Pigmente ausgefällt. Der mit Aceton und Essigsäure versetzte Markierungsansatz wurde dazu für mind. 2 h, meist aber üN bei -20 °C aufbewahrt. Anschließend wurde das gefällte Protein durch Zentrifugation (14000 UpM / 20 min / 4 °C in der Hettich Kühlzentrifuge) pelletiert und das zweimal zur Abtrennung von freiem Farbstoff bzw. Biotin in 70% Ethanol resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Schließlich wurde das Protein mit 100% Ethanol überschichtet und pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet für 15 min in der SpeedVac getrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte bis zur Quantifizierung und Markierungseffizienzbestimmung über denaturierende Gelelektrophorese (3.1.2) getrocknet bei -20 °C.

Material:

|                   |                     |
|-------------------|---------------------|
| Aceton            | [100% für Pigmente] |
| Essigsäure        | [100 mM]            |
| Ethanol technisch | [70%] ; [100%]      |

#### 3.1.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Eine gängige Methode zur Auftrennung von Proteingemischen stellt die von Laemmli (1970) entwickelte Methode der Gelelektrophorese dar. Hierbei werden die Proteine mit einem geladenen Detergenz – meist SDS – solubilisiert und dann in einem elektrischen Feld auf einer Gelmatrix anhand ihrer Ladung – die im Idealfall analog der Proteingröße ist – aufgetrennt. Der Laufweg im Gel ist dabei in ein Sammelgel, in dem die Fokussierung der

Proteine erfolgt, und ein Trenngel, in dem die eigentliche Größenauftrennung geschieht, unterteilt.

In dieser Arbeit wurde die denaturierende Gelelektrophorese zum einen zur Qualitativen Untersuchung isolierter IBs, vor allem aber zur Kontrolle der Proteinmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen eingesetzt. Eine Variante dazu sind schwach denaturierende Gele, die zur Auftrennung intakter Komplexe eingesetzt wurden.

#### Herstellung von Polyacrylamid-Gelen (PAA-Gelen)

Die Herstellung von Polyacrylamidgelen beruht auf der Kopolymerisierung Acrylamid und dem Vernetzer Bisacrylamid, wodurch ein klares Gel entsteht. Die Porengröße wird dabei zum Einen von der Gesamtkonzentration an Acrylamid, zum Anderen aus dem Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid bestimmt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Gele waren jeweils 0,75 mm dick und bestanden aus einem 4,5%igen Sammelgel und einem 10%igen bzw. 15%igen Trenngel. Für die Gele wurde das Hoefer® Multiple Gel Caster Gelkammersystem eingesetzt, in das die Aluminiumoxid- und Glasplatten sowie die 0,75 mm-Spacer eingelegt wurden. Die Glas- und Aluminiumoxidplatten wurden zuvor mit Ethanol abgewischt, um fettfreie Oberflächen zu erhalten.

Zum Gießen der Gele wurden zunächst die Lösungen für das Sammel- bzw. Trenngel in eine Saugflasche zusammenpipettiert (Tab. 3.2). Die Mengenangaben beziehen sich dabei auf eine Gelgießkammer zur Herstellung von 5 Gelen. Vor der Zugabe von APS und TEMED werden die Lösungen an der Wasserstrahlpumpe für ca. 15 min entgast, um die Entstehung von Blasen in den Gelen zu vermeiden.

| Stammlösungen   | 4,5 % Sammelgel | 10% Trenngel | 15% Trenngel |
|---|-----------------|--------------|--------------|
| 1 M Tris/HCl pH 6,8   | 2,6 ml          | -            | -            |
| 1 M Tris/HCl pH 8,8   | -               | 11,3 ml      | 11,3 ml      |
| 80% Glycerin  | 2,5 ml          | 1,7 ml       | 1,7 ml       |
| dH <sub>2</sub> O   | 11,8 ml         | 5,6 ml       | 0,9 ml       |
| 30% Acrylamid/<br>1% Bisacrylamid   | 3,0 ml          | 9 ml         | 13,7 ml      |
| <b>Die Lösungen müssen vor Zugabe von APS und TEMED zunächst entgast werden!<br/>Die Zugabe von APS und TEMED erfolgt erst kurz vor der Verwendung!</b> |                 |              |              |
| TEMED   | 10 µl           | 13 µl        | 13 µl        |
| APS   | 100 µl          | 200 µl       | 200 µl       |

Tab. 3.2: Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamid-Gele

### 3 Methoden

---

Nach dem Entgasen wird die Polymerisierung der Trenngels durch Zugabe von APS und TEMED gestartet und die Lösung bis ca. 3 cm unter den Rand in die Gießapparatur gegossen. Anschließend wird jedes Gel vorsichtig mit ca. 200 µl dH<sub>2</sub>O überschichtet, um Luftsauerstoff von der Polymerisation auszuschließen und eine glatte Geloberfläche zu erhalten. Nach ca. 45-60 min ist das Trenngel auspolymerisiert und das dH<sub>2</sub>O kann mit Hilfe von Filterpapier abgesaugt werden. Nun wird auch die Sammelgellösung mit APS und TEMED versetzt und in die Gießkammer auf das Trenngel gegeben. Anschließend wird zügig in jedes Gel ein Gelkamm mit 10 bzw. 15 Zinken eingesteckt, um die Taschen für den Probenauftrag zu erhalten. Nach weiteren 45-60 min ist auch das Sammelgel auspolymerisiert, und die Gele können aus der Gelgießkammer entnommen, von Acrylamidresten gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in Klarsichtfolie verpackt ca. 2 Wochen aufbewahrt werden.

Material:

|                   |                                   |
|-------------------|-----------------------------------|
| Tris/HCl          | [1 M pH 6,8] [1 M pH 8,8]         |
| Glycerin          | [80%]                             |
| dH <sub>2</sub> O |                                   |
| Acrylamid         | [30% Acrylamid / 1% Bisacrylamid] |
| APS               | [10%]                             |
| TEMED             |                                   |
| dH <sub>2</sub> O |                                   |

#### *Volldenaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) („blaue Gele“)*

Die denaturierende SDS-Gelelektrophorese beruht auf dem von Laemlli 1970 entwickelten System mit unterschiedlichen pH-Werten in Sammel- (pH 6,8) und Trenngel (pH 8,8). Das Sammelgel dient dabei zur Fokussierung der Proteine, das Trenngel zur Größenauftrennung. Beim Auftrag ist darauf zu achten, dass eine Proteinmenge von 4 µg pro Tasche nicht überschritten wird, da ansonsten keine klare Bandenbildung mehr erreicht werden kann. Das Probenvolumen sollte dabei zwischen 10 und 20 µl liegen (für ein Gel mit 10 Taschen), wobei sich jede Probe aus 2/3 Volumen der Proteinlösung und 1/3 Volumen 3x Sparmix zusammensetzt. Vor dem Auftrag auf das Gel wird diese Mischung noch für 2 min gekocht. Das im Sparmix enthaltene SDS lagert sich dabei anlog zur Proteingröße an die Proteine an, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel im Idealfall nur von der Größe und nicht von der Aminosäuresequenz abhängt.

Nach Einsetzen des 15%igen Gels in die Laufkammer und der Zugabe von SDS-Elektrophoresepuffer können die Geltaschen mit den vorbereiteten Proben beladen werden.

Zur Bestimmung der Proteingrößen wird eine Tasche mit einem Größenstandard-Marker beladen, in dieser Arbeit wurde stets SDS7-Marker (Sigma) verwendet.

Der Lauf wird bis zum Erreichen der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel zunächst mit 80 V gestartet, danach wird die Spannung auf 180 V erhöht. Nach ca. 1,5 h erreicht die Laufmittelfront den unteren Rand des Gels und der Lauf wird beendet. Zur Anfärbung der Proteinbanden wird das Gel anschließend in eine Coomassie-Färbelösung eingelegt.

Material:

|                          |   |
|--------------------------|---|
| 15% Polyacrylamidgele    |   |
| 3x Sparmix               | [100 mM Tris/HCl pH 6,8 / 1,4 M $\beta$ -Mercaptoethanol / 4% SDS / 24% Glycerin / 0,4 mM Bromphenolblau] |
| SDS-Elektrophoresepuffer | [25 Tris Base / 192 mM Glycerin / 0,1% SDS / 0,5 mM EDTA]   |

#### Schwach denaturierende Gelelektrophorese („grüne Gele“)

Im Unterschied zur SDS-Page, bei der alle in den Proben enthaltenen Proteinen vollständig denaturiert werden, können bei der schwach denaturierenden Gelelektrophorese auch intakte Pigment-Protein-Komplexe augetrennt werden. Aufgrund der fehlenden Denaturierung durch SDS gehen allerdings die Größentrennungseigenschaften der SDS-PAGE verloren, da hier auch die Eigenladung und die Konformation das Laufverhalten beeinflussen. Den Proben wird vor dem Auftragen auf das Gel noch 1/3 Volumen Saccharose zugesetzt, um der Probe die nötige Dicht zu verleihen, um in die Geltaschen einzusinken.

Die Gelkammer wird nach Einsetzen des 10%igen Gels mit LDS-Elektrophoresepuffer befüllt und mit Hilfe eines Durchflusskühlers auf 4 °C vortemperiert, um ein Denaturieren der Proben zu vermeiden. Nach dem Probenauftrag wird das Gel zunächst mit 40 V gestartet und die Spannung nach Erreichen der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel auf 80 V erhöht. Nach ca. 3 h wird die Elektrophorese abgebrochen und das Ergebnis mit der Digitalkamera dokumentiert.

Um die in den Komplexbanden enthaltenen Proteine sichtbar zu machen, kann das Gel anschließend mit Coomassie angefärbt und erneut fotografiert werden.

Material:

|                          |  |
|--------------------------|--|
| 10% Polyacrylamidgele    |  |
| LDS-Elektrophoresepuffer | [25 mM Tris Base / 192 mM Glycin / 0,1% LDS / 5 mM EDTA] |
| Saccharose               | [2 M]  |

### 3.1.6 Coomassie-Färbung

Um die Proteinbanden nach einer Gelelektrophorese sichtbar zu machen, ist eine Färbung mit einem Proteinspezifischen Farbstoff notwendig. Eine Möglichkeit dazu ist die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue.

Das Gel wird dazu für 30 min in Coomassie-Lösung eingelegt und dabei auf dem Gelschüttler ständig in Bewegung gehalten. Anschließend muß durch Zugabe von 1. Entfärber und 30 min. schütteln der Überschuß an Farbstoff wieder entfernt werden. Danach wird, um die Proteinbanden nicht ebenfalls wieder zu entfärben, das Gel in den 2. Entfärber überführt, in dem es auch für längere Zeit aufbewahrt werden kann. Die Dokumentation erfolgte durch fotografieren mit der Digitalkamera.

Material:

|                  |   |
|------------------|---|
| Coomassie-Lösung | [175 mg Serva Blue; 50% Ethanol; 7% Essigsäure] |
| 1. Entfärber     | [10% Ethanol / 7% Essigsäure]                   |
| 2. Entfärber     | [10% Essigsäure]                                |

### 3.1.7 Eintrocknen von Polyacrylamid-Gelen

Bevor die angefärbten Gele eingetrocknet werden können, muss die Essigsäure aus den Färbe- bzw. Entfärbelösungen aus dem Gel entfernt werden. Dies geschieht durch mehrmaliges gründliches Waschen mit dH<sub>2</sub>O, bis kein Essiggeruch mehr wahrnehmbar ist. Zum Trocknen wird das Gel luftblasenfrei zwischen zwei Cellophanfolien gelegt und unter Vakuum und Erwärmen für ca. 1 h getrocknet.

Material:

dH<sub>2</sub>O  
Cellophanfolie

## 3.2 Pigmente und Farbstoffe

### 3.2.1 Anzucht von *Pisum sativum*

Zur Anzucht von *Pisum sativum* (Erbsen) wurden getrocknete Samen für 24 h unter gründlicher Belüftung quellen gelassen und anschließend in Vermiculit ausgesät. Die Anzucht erfolgte dann für 12- 14 Tage bei 16 h Belichtung und 22 °C im Klimaraum.

### 3.2.2 Isolierung von Pigmenten aus Blattmaterial von *Pisum sativum*

Von ca. 14 Tage alten *Pisum sativum*-Pflanzen wurde die oberen Blätter mit einer Schere so abgeschnitten, dass der Anteil an Blattfläche zum Stielanteil möglichst groß ist. Das Frischgewicht betrug dabei meist etwa 1000 g. Anschließend wurde das Blattmaterial zusammen mit ca. 2 l kaltem Aufschlußpuffer im Waring Blendor zu einem flüssigen Brei zerkleinert, der dann durch 3 Lagen Baumwollgaze in 500 ml Zentrifugenbecher abfiltriert wurde. Hierbei ist wie auch bei allen weiteren Schritten darauf zu achten, dass alle pigmenthaltigen Produkte stets kalt und dunkel verwahrt werden. Nach Zentrifugation des Filtrates (10 min, 4 °C, 9000 UpM, Beckmann JLA 10.500) wird der Überstand verworfen und das Pellet mit den Zelltrümmern in insgesamt 500 ml Aceton resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wird der pigmenthaltige acetonische Überstand bis zur weiteren Verarbeitung in einem verschlossenen Gefäß dunkel und auf Eis gelagert, das Pellet wird verworfen. Neben den Pigmenten Chlorophyll a und b, Neoxanthin, Violaxanthin, Lutein und  $\beta$ -Carotin sind in diesem Totalextrakt auch pflanzliche Lipide enthalten.

Um den acetonischen Extrakt zu trocknen, wird dieser mit peroxidfreiem Diethylether und 2M NaCl im Verhältnis 2:2:1 in einem Scheidetrichter ausgeschüttelt, wobei die Pigmente und Lipide aus der wässrigen Acetonphase in die weitgehend wasserfreie Etherphase übergehen. Nach Abtrennung der wässrigen Acetonphase wird die Etherphase auf Eis gesammelt und zum Ausfrieren von Restwasser bei -45 °C für mind. 2 h oder über Nacht eingefroren. Anschließend wurde das nun auskristallisierte Wasser mit Hilfe eines kalten Porzellantrichters mit Faltenfilter und einer Saugflasche an der Wasserstrahlpumpe abfiltriert und die nun wasserfreie Etherphase am Rotationsverdampfer eingetrocknet. Die eingetrockneten Pigmente wurden mit Stickstoff überschichtet und bei -20 °C eingelagert.

Material:

|                 |   |
|-----------------|---|
| Pisum sativum   | Ca. 14 Tage alte Pflanzen   |
| Aufschlußpuffer | [25 mM Tris (pH 7.5) / 1 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT) / 330 mM Sorbitol] |
| Aceton          | [100%]  |

#### 3.2.3 Quantifizierung der Pigmente über Absorptionsspektroskopie

Die Quantifizierung des Isolierten Totalextraktes erfolgte absorptionsspektroskopisch anhand des Chlorophyllgehaltes. Dazu wurde der Pigmenttotalextrakt in 100% Aceton gelöst und ein Aliquot davon mit 80% Aceton so verdünnt, dass die Absorptionswerte in der Größenordnung von 0,1 – 1 lagen. Aus der Absorption von in 80% Aceton gelöstem Totalextrakt kann mit Hilfe der von Porra *et al.* (1989) veröffentlichten Formel die Chlorophyllkonzentration bestimmt werden:

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

$$[\text{Chl b}] = 20,3 \cdot A_{646,6} - 4,8 \cdot A_{663,6} \text{ } [\mu\text{g/ml}]$$

Anhand der errechneten Konzentration wurden die Pigmente in Aliquots zu 0,2, 1 und 5 mg aufgeteilt und unter stetigem Stickstoffstrom eingetrocknet. Die mit Stickstoff überschichteten Pigmentaliquots wurden bei – 20 °C im dunklen gelagert.

Material:

|                     |                |
|---------------------|----------------|
| Pigmenttotalextrakt |                |
| Aceton              | [100%] ; [80%] |
| Stickstoff          |                |

#### 3.2.4 Charakterisierung der Pigmente über analytische HPLC

Zur Bestimmung der Reinheit wird der zuvor isolierte Totalextrakt mittels analytischer HPLC untersucht. Hierbei werden die Pigmente in einem geeigneten Lösemittel auf eine Reversed-Phase- (RP-) Säule aufgetragen und mit einem Acetongradienten anhand ihrer Hydrophobizität aufgetrennt.

##### Probenvorbereitung

Zur Untersuchung wurde ein kleines Aliquot getrockneter Pigmente in 80% Aceton aufgenommen, wobei die Menge an Aceton so gewählt wurde, dass die resultierende Lösung nur noch schwach gefärbt war. Vor dem Einspritzen in die analytische HPLC wurde die Lösung noch für 1 min bei 14 000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um eventuell vorhandene Schwebstoffe nicht auf die Säule der HPLC aufzutragen.

Probenauftrag und Funktion der analytischen HPLC

Die analytische HPLC wurde mit dem Gradientenprogramm „ChromolithA“ betrieben, der dabei erzeugte Acetongradient ist in Abb. 3.1 dargestellt.

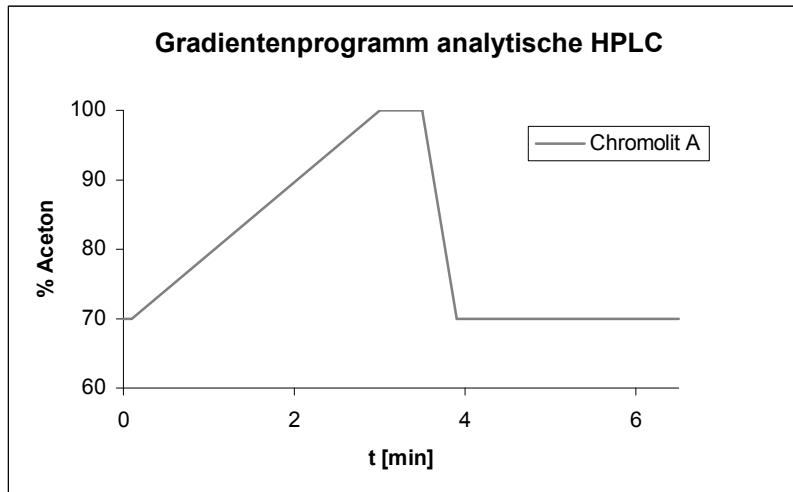


Abb. 3.1: Gradientenverlauf des Programmes „ChromolithA“ der analytischen HPLC

Zur Trennung der verschiedenen Pigmente macht man sich die unterschiedliche Löslichkeit in Aceton zunutze, um diese nacheinander durch einen geeigneten Acetongradienten von der HPLC-Säule zu eluieren. Die von der Säule eluierenden Pigmente werden mit Hilfe eines Durchfluß-Dioden-Array-Detektors erfasst und mit Hilfe der Steuerungssoftware „Borwin PDA“ wird das Elutionsprofil bei  $A_{440\text{ nm}}$  dargestellt.

Durch Integrieren die Fläche der Peaks kann zudem die Menge der in der Probe enthaltenen Pigmente errechnet werden. Hierzu wurden von der Software folgende Umrechnungsfaktoren verwendet (Tab 3.3), die von S. Hobe (Universität Mainz) durch Erstellen einer Eichgerade mit Pigmentlösungen bekannter Konzentration ermittelt wurden.

| Pigment              | Umrechnungsfaktor     |
|----------------------|-----------------------|
| Neoxanthin           | $1,227 \cdot 10^{-4}$ |
| Violaxanthin         | $1,002 \cdot 10^{-4}$ |
| Lutein               | $1,154 \cdot 10^{-4}$ |
| Chlorophyll <i>b</i> | $3,855 \cdot 10^{-4}$ |
| Chlorophyll <i>a</i> | $5,593 \cdot 10^{-4}$ |

Tab. 3.3: Umrechnungsfaktoren, mit deren Hilfe die Borwin-Software der analytischen HPLC die in der Probe enthaltenen Pigmentmengen ermittelt.

#### 3.2.5 Herstellung von Farbstoff-Stammlösungen

Aufgrund der geringen Stoffmengen, die bei der Herstellung von 10 mM Fluoreszenzfarbstoff-Stammlösungen einzusetzen sind, wurden die Lösungen nicht durch Einwiegen des Feststoffes, sondern durch eine photometrische Konzentrationsbestimmung angesetzt. Dazu wird vom jeweiligen Feststoff eine geringe Menge in ein Eppendorf-Gefäß überführt und zunächst in 50 µl wasserfreiem DMSO aufgenommen. Anschließend wird von dieser Lösung eine geeignete Verdünnung hergestellt und photometrisch die Absorption bestimmt. Anhand der Absorption und den von den Herstellern angegebenen Extinktionskoeffizienten (Tab. 3.4) kann unter Berücksichtigung der Verdünnung die Konzentration errechnet werden.

| Farbstoff  | Extinktionskoeffizient                            |                           |
|--|---|---------------------------|
|  | $\epsilon$  | bei Wellenlänge $\lambda$ |
| Rhodamin-Isothiocyanat<br>(R-ITC) (Sigma)                      | 49000 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> (Ethanol)  | 547 nm                    |
| Tetramethylrhodamin-5-<br>Maleimid (TMR)<br>(Molecular Probes) | 95000 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> (Methanol) | 541nm                     |
| DY700 (Dyomics)  | 140000 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> (Ethanol) | 707 nm                    |
| DY776 (Dyomics)  | 240000 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> (Ethanol) | 771 nm                    |

Tab. 3.4: In dieser Arbeit eingesetzte Farbstoffe und deren Extinktionskoeffizienten zur Konzentrationsbestimmung.

Die Farbstofflösungen wurden auf eine Konzentration von 10 mM eingestellt und bei -20 °C im Dunklen aufbewahrt.

## 3.3 Oberflächenchemie

### 3.3.1 Reinigung von Glasoberflächen zur anschließenden Funktionalisierung

Bevor Glasoberflächen funktionalisiert werden können, muss sichergestellt werden, dass die Oberfläche von allen Verunreinigungen befreit wurde. Die Funktionalisierung von Glasoberflächen erfolgt nur dann wirklich homogen, wenn mit einer absolut sauberen Oberfläche gearbeitet wird. Daher ist vor der Verwendung des Glases eine gründliche Entfernung von jeder Art von Verschmutzung (Staub, Fingerabdrücke etc.) zwingend notwendig.

Die Reinigung der zur Funktionalisierung vorgesehenen Glasoberflächen erfolgte durch Einlegen der zurechtgeschnittenen Objektträger bzw. der Deckgläschen in konzentrierte Chromschwefelsäure. Nach Inkubation ÜN wurde die Chromschwefelsäure mit dH<sub>2</sub>O entfernt, bis das Spülwasser keine Gelbfärbung mehr aufwies. Die Gläschen wurden anschließend einzeln mit N<sub>2</sub> trockengeblasen und zur Entfernung von Restwasser für 30 min bei 80 °C in den Wärmeschrank gestellt. Die Lagerung der trockenen gereinigten Gläschen erfolgte bei RT in einem geschlossenen, staubfreien Gefäß.

Da sich diese Reinigungsprozedur im Laufe dieser Arbeit jedoch als nicht ausreichend erwies, wurden die Glasoberflächen vor dem Chromschwefelsäurebad mit Mucosol vorgereinigt. Dazu wurden die zurechtgeschnittenen Glasstücke bzw. die Deckgläschen zunächst in 5% Mucosol in dH<sub>2</sub>O eingelegt und drei Mal für je 10 min sonifiziert. Danach wurde das Mucosol mit dH<sub>2</sub>O abgewaschen und die Gläschen ÜN in das Chromschwefelsäurebad eingelegt.

Material:

Mucosol  
H<sub>2</sub>O dest.  
Chromschwefelsäure konzentriert

### 3.3.2 Vorbereitung von Glimmeroberflächen zur anschließenden Funktionalisierung

Die Funktionalisierung von Glimmer mit Aminosilanen setzt eine saubere, reduzierte Oberfläche des Glimmers voraus. Um eine Oxidation des Glimmers vor der Funktionalisierung zu vermeiden, wird daher der kristalline Glimmer erst unmittelbar vor dem Einlegen in die Silanisierungslösung gespalten.

Die Spaltung erfolgt durch Aufkleben eines Tesafilms auf die Oberfläche. Beim Abziehen bleibt die oberste Schicht des Glimmers am Tesafilm kleben. Anschließend wird der Glimmer sofort in die Silanisierungslösung eingelegt.

#### **3.3.3 Aminofunktionalisierung der gereinigten Glas- bzw. Glimmer-Oberflächen mit Aminosilanen**

Zur Funktionalisierung von Glas- bzw. Glimmeroberflächen werden bevorzugt Silan-Verbindungen verwendet, die reaktiv genug sind, mit den OH-Gruppen auf der Glas- bzw. Glimmeroberfläche zu reagieren. Hierbei entsteht eine kovalente Bindung zwischen diesen OH-Gruppen und den Methoxy- oder Ethoxy-Gruppen des eingesetzten Silans. Hierfür steht eine ganze Reihe kommerziell erhältlicher Silane zur Verfügung. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Aminosilane verwendet, um nach der Funktionalisierung eine mit Aminogruppen belegte Glasoberfläche zu erhalten.

Die Silanisierung wurde in speziell angefertigten Kunststoff-Reaktionsgefäßen für zurechtgeschnittene Glasobjektträger (9 x 25 mm) bzw. Deckgläschen (22 x 22 mm) durchgeführt, die für die Dauer der Reaktion in ein mit einem Filzring verschlossenem Einmachglas aufbewahrt wurden, um eine übermäßige Verdunstung des Lösemittels zu vermeiden. Im Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Silanisierung von Glasoberflächen verwendet. Die zu Beginn dieser Arbeit angewendete Prozedur (5% Aminopropyltriethoxysilan (APTES) in getrocknetem Toluol für 2 h bei 80 °C) erwies sich im Verlauf dieser Arbeit als wenig geeignet, um eine homogene aminofunktionalisierte Glasoberfläche zu erhalten. Nach verschiedenen Experimenten mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 – 0,5%) an APTES und Aminopropyldimethethoxysilan (APDMES) und verschiedenen Lösemitteln (Toluol, Methanol, jeweils mit und ohne Zusatz von 1% ddH<sub>2</sub>O) erwies sich für die Silanisierung ein Gemisch aus 0,5% APDMES, das in 99% Methanol und 1% ddH<sub>2</sub>O gelöst wurde, als am besten geeignet, um homogene aminofunktionalisierte Glasoberflächen zu erhalten. Die in diese Mischung eingelegten Gläschen wurden üN bei RT inkubiert, anschließend wurden die Gläschen einzeln je zwei Mal mit Methanol p.A. gewaschen und mit N<sub>2</sub> trockengeblasen. Die Lagerung erfolgte in einem geschlossenen, staubfreien Gefäß bei RT.

Material:

Toluol p.A., getrocknet  
Methanol p.A.  
Aminopropyltriethoxysilan  
Aminopropyldimethylethoxysilan  
ddH<sub>2</sub>O

### 3.3.4 Biotinylierung der aminofunktionalisierten Glas- bzw. Glimmer-Oberflächen

Um eine biotinylierte Oberfläche zu erreichen, wird an die Aminogruppen des Silans ein NHS-funktionalisiertes Biotin gekoppelt. Für die anschließende Bindung von Neutravidin ist an dieser Stelle auf eine geeignete Länge des Spacers zwischen der NHS-Gruppe und dem Biotin zu achten. Ein zu kurzer Spacer hat eine schlechte Bindung zur Folge, da das Biotin nicht bis in die Biotinbindetaschen des Neutravidins reichen kann. Bei zu langen Spacern besteht die Gefahr, dass alle Biotinbindetaschen des Neutravidins belegt werden und somit keine weitere Proteinkoppelung an derart funktionalisierte Oberflächen möglich ist. Als geeignet erwies sich die Verwendung von Sulfo-LC-NHS-Biotin mit einer Spacerlänge von 22,4 Å.

Die silanisierten Glas- bzw. Glimmerstückchen wurden zunächst in speziell angerfertigte Kunststoff-Reaktionsgefäße eingelegt und mit 600 µl Biotin-Bindungspuffer für 10 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Vor der Zugabe von 6 µl Sulfo-LC-NHS-Biotin wurde der Biotin-Bindungspuffer abgezogen und durch 600 µl frischen Puffer ersetzt, wobei stets darauf zu achten ist, dass die Oberflächen nicht trockenfallen. Anschließend wurde der Bindungsansatz unter leichtem schütteln bei RT inkubiert.

Nach 2 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 µl Aminoethanol gestoppt. Danach wurde verbliebenes ungebundenes Biotin durch zweimaligen Puffertausch mit Biotin-Bindungspuffer entfernt.

Material:

|                       |                               |
|-----------------------|-------------------------------|
| Biotin-Bindungspuffer | [10 mM Na-P pH 7,4 / 0,5% LM] |
| Sulfo-LC-NHS-Biotin   | [5 mg/ml in DMSO]             |
| Aminoethanol          |                               |

### 3.3.5 Neutravidin-Bindung an biotinylierte Glas- bzw. Glimmer-Oberflächen

Neutravidin ist ein tetrameres Protein, das pro Monomer eine Bindestelle für Biotin besitzt. Diese Bindung stellt die stärkste bekannte biologische nicht-kovalente Bindung dar und kann nur unter sehr stark denaturierenden Bedingungen (8 M Guanidiniumhydrochlorid pH 1,5) gespalten werden. Da bei den in dieser Arbeit vorgesehenen Versuchen eine starke Beanspruchung der Oberflächenimmobilisierung erwartet wurde, erwies sich diese Form der Koppelung als Methode der Wahl.

### 3 Methoden

---

Zunächst musste zur Bindung von Neutravidin durch mehrmaligen Pufferwechsel das von der Biotinylierung der Oberfläche noch vorhandene LM abgewaschen werden. Dazu wurde mindestens zwei Mal mit Neutravidin-Bindungspuffer gewaschen. Die eigentliche Bindung des Neutravidins erfolgte durch Einlegen der Glasoberfläche in 490 µl kalten Neutravidin-Bindungspuffer und Zugabe von 10 µl Neutravidin. Anschließend wurde der Ansatz bei 4 °C unter langsamem Schütteln üN inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde überschüssiges nicht-gebundenes Neutravidin durch zweimaligen Pufferwechsel mit kaltem Neutravidin-Bindungspuffer entfernt.

Material:

|                            |                                 |
|----------------------------|---------------------------------|
| Neutravidin-Bindungspuffer | [20 mM Na-P pH 5,85]            |
| Neutravidin                | [5 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O] |

#### **3.3.6 Bindung von LHCII-Apoprotein an Neutravidin-beschichtete Oberflächen zur Messung im Fluoromax2**

Zur Bindung von LHCII Apoproteinen an die Neutravidin-Oberflächen müssen die Oberflächen zunächst in den Protein-Bindungspuffer überführt werden, was durch zweimaligen Pufferwechsel mit Protein-Bindungspuffer geschieht. Anschließend wird die Oberfläche in 495 µl Protein-Bindungspuffer überführt und 5 µl LHCII-Stammlösung A hinzugegeben. Anschließend wird der Ansatz für 2 h unter leichtem schütteln bei RT inkubiert. Um die Bindung abzubrechen und nicht gebundenes Protein zu entfernen, wird der Proteinbindungspuffer auf der Oberfläche zweimal gegen frischen Puffer ausgetauscht.

Der Erfolg der Oberflächenimmobilisierung von LHCII Apoproteinen kann jetzt in Protein-Bindungspuffer im Fluoromax2 überprüft werden.

Material:

|                        |   |
|------------------------|---|
| Protein-Bindungspuffer | [20 mM Na-P pH 5,85 / 1% OG / 0,2% SDS] |
| LHCII-Stammlösung A    | [0,2 µg/µl LHCII-Apoprotein in 1% SDS]  |

#### **3.3.7 Bindung von LHCII-Apoprotein an Neutravidin-beschichtete Oberflächen zur Messung im Einzelmolekül-Aufbau**

Um immobilisierte LHCII Apoproteine im Einzelmolekül-Aufbau vereinzelt beobachten zu können, muß die Belegungsdichte der Oberfläche gegenüber den für die Messung im Fluoromax2 vorgesehenen Oberflächen stark reduziert werden. Dies geschieht durch eine

Verdünnung der LHCII Stammlösung A um den Faktor 100 (2 ng/μl LHCII Apoprotein in 1% SDS = LHCII Stammlösung B; siehe Abschnitt 3.3.6). Die übrige Vorgehensweise wird beibehalten.

Material:

|                        |   |
|------------------------|---|
| Protein-Bindungspuffer | [20 mM Na-P pH 5,85 / 1% OG / 0,2% SDS] |
| LHCII-Stammlösung B    | [2 ng/μl LHCII-Apoprotein in 1% SDS]    |

### 3.3.8 Bindung von LHCII-Komplexen an Neutraavidin-beschichtete Oberflächen zur Messung im Fluoromax2

Zur Bindung von rekonstituierten und durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation aufgereinigten Komplexen müssen die Neutraavidin-Oberflächen zunächst in Komplexbindungspuffer überführt werden, was ebenfalls durch zweimaligen Pufferwechsel geschieht. Danach wird die Neutraavidinoberfläche in 495 μl Komplexbindungspuffer eingelegt und 5 μl einer Lösung mit 500 μM LHCII Komplexen in Komplexbindungspuffer zugesetzt. Dieser Ansatz wird bei 4 °C für 30 min im dunkeln leicht geschüttelt.

Material:

|                       |   |
|-----------------------|---|
| LHCII Komplexe A      | [500 μM in Komplexbindungspuffer]               |
| Komplexbindungspuffer | [5 mM Na-P pH 6,5 / 0,6 M Saccharose / 0,1% LM] |

### 3.3.9 Bindung von LHCII-Komplexen an Neutraavidin-beschichtete Oberflächen zur Messung im Einzelmolekül-Aufbau

Zur Beobachtung vereinzelter immobilisierter Komplexe im Einzelmolekülmessaufbau wurde eine im Vergleich zu 3.3.8 um den Faktor 100 verdünnte Komplexlösung eingesetzt. Die übrige Vorgehensweise blieb unverändert.

Material:

|                       |   |
|-----------------------|---|
| LHCII Komplexe B      | [5 μM in Komplexbindungspuffer]                 |
| Komplexbindungspuffer | [5 mM Na-P pH 6,5 / 0,6 M Saccharose / 0,1% LM] |

## 3.4 Rekonstitution von rekombinantem LHCII

### 3.4.1 Rekonstitution von rekombinantem LHCII in Lösung

In *E. coli* überexprimierte und isolierte IBs können unter geeigneten Bedingungen unter Zugabe von Pigmenten und einem anschließenden Detergenzwechsel *in vitro* rekonstituiert werden (Detergenzwechselrekonstitution, Paulsen *et al.* 1993).

50-100 µg IBs werden in 150 µl 2x Solubilisierungspuffer gelöst (bei unmarkiertem Lhcb1 durch 1 min kochen, im Falle von markiertem Lhcb1 durch 15 min sonifizieren) und anschließend 150 µl dH<sub>2</sub>O zugesetzt. 200-250 µg TE wurde in 20-25 µl Ethanol p.A. (10 µg/µl) gelöst und unter gründlichem Vortexen mit den vorbereiteten Proteinlösungen vermischt. Nach 10 min Inkubation bei RT im Dunklen wurden 32 µl OG zugesetzt und die Lösung kurz vermischt, nach weiteren 10 min Ruhezeit wurden 34 µl KCl zugegeben und die Lösung nach erneutem Mischen für mindestens 20 min auf Eis gestellt. Durch die Zugabe von KCl wird das SDS in Form von Kaliumdodecylsulfat (KDS) ausgefällt.

Im Anschluß daran wird das gefällte KDS durch eine viertelstündige Zentrifugation (13000 Upm, 4 °C, Hettich Kühlzentrifuge) pelletiert und der Überstand mit den rekonstituierten Komplexen bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Die Abtrennung von überschüssigem Pigment erfolgte entweder durch Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation oder über eine schwach denaturierende Gelelektrophorese.

Material:

|                           |   |
|---------------------------|---|
| TE                        |   |
| IBs                       |   |
| 2x Solubilisierungspuffer | [200 mM Na-P pH 8.0 / 4% SDS / 10 mM β-Mercaptoethanol] |
| dH <sub>2</sub> O         |   |
| OG                        | [10%]   |
| KCl                       | [2 M]   |

### 3.4.2 Rekonstitution von LHCII auf einer Nickelsäule

Rogl *et al.* veröffentlichten 1998 eine Methode zur Rekonstitution von immobilisiertem Lhcb1. Dazu wurden in Harnstoff solubilierte Proteine über einen zuvor in die Aminosäuresequenz eingefügten His<sub>6</sub>-Tag an eine Ni<sup>2+</sup>-Sepharose-Säule gebunden und erst anschließend durch Zugabe von Pigmenten rekonstituiert.

Zur Verwendung kommt hierbei NTA- oder IDA-Sepharose, die mit  $\text{Ni}^{2+}$  ein Chelat bilden kann. Hierbei werden 3 der 6 Koordinierungsstellen des  $\text{Ni}^{2+}$  belegt, über die freien Koordinierungsstellen werden die Histidine des His<sub>6</sub>-Tags gebunden (Kågedal, 1989).

#### Vorbereitung der $\text{Ni}^{2+}$ -Sepharose-Säule:

Die in 20% Ethanol aufbewahrte IDA-Sepharose wird in eine BioRad Poly-Prep®-Säule pipettiert, bis nach Sedimentation des Säulenmaterials ein Volumen von ca. 0,5 ml erreicht ist. Nach spülen mit einem Säulenvolumen (SV)  $\text{dH}_2\text{O}$  werden 2 SV  $\text{NiCl}_2$  zugegeben. Das Säulenuelat wird hierbei getrennt gesammelt und dem Schwermetallabfall zugeführt. Anschließend wird die Säule mit 2 SV Äquilibrierungspuffer äquilibriert und ist nun zur weiteren Verwendung bereit.

#### Immobilisierung und Rekonstitution von LHCII auf einer $\text{Ni}^{2+}$ -Sepharose-Säule

1 SV von in Solubilisierungspuffer oder Harnstoff gelöstem LHCII Apoprotein (1 mg/ml) wird bei RT auf die vorbereitete Säule aufgetragen. Anschließend wird nicht gebundenes Protein mit 3 SV LDS-Säulenpuffer gewaschen, anschließend wird das auf der Säule immobilisierte LHCII Apoprotein in 1 SV OG-Säulenpuffer überführt. In der Zwischenzeit wird das benötigte Pigment (1  $\mu\text{g}$  Chlorophyll / 1  $\mu\text{g}$  LHCII Apoprotein) in 100% Ethanol gelöst (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und auf dem Vortexer mit OG-Säulenpuffer auf 1 SV aufgefüllt. Dieser Pigmentpuffer wird auf die Säule aufgetragen, dann wird die Säule gestoppt und bei 4 °C für 30 min im dunklen inkubiert. Anschließend wird die Säule zunächst mit 1 SV OG-Säulenpuffer, dann mit 3-4 SV Triton-Säulenpuffer gespült, bevor die gefalteten Komplexe durch Zugabe von Eluatpuffer von der Säule gewaschen werden. Der Erfolg der Rekonstitution kann Fluoreszenzspektroskopisch kontrolliert werden.

#### Regeneration der $\text{Ni}^{2+}$ -Sepharose-Säule

Zur Regeneration des Säulenmaterials werden verbliebene Proteinverunreinigungen sowie die  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen durch Zugabe von je 2 SV Regenerierungslösung, 0,5 M EDTA und 20% bzw. 60 % Ethanol vom Säulenmaterial abgewaschen. Die so gereinigte Sepharose wird gesammelt und im Kühlschrank in 20% Ethanol aufbewahrt. Vor der erneuten Verwendung wird diese Reinigungsprozedur ein weiteres Mal durchgeführt.

### 3 Methoden

---

Material:

|                        |  |
|------------------------|--|
| NiCl <sub>2</sub>      | [300 mM]   |
| Äquilibrierungspuffer  | [50 mM Tris/HCl pH 7,5]  |
| Solubilisierungspuffer | [200 mM Na-P pH 8.0 / 4% SDS / 10 mM β-Mercaptoethanol]                        |
| Harnstoff              | [8 M]  |
| LDS-Säulenpuffer       | [2% LDS / 100 mM Tris/HCl pH 9,0 / 100 mM NaCl / 20 mM Imidazol]               |
| OG-Säulenpuffer        | [1% OG / 100 mM Tris/HCl pH 9,0 / 12,5% Saccharose]                            |
| Ethanol                | [100%] ; [60%] ; [20%]   |
| Triton-Säulenpuffer    | [0,05% Triton X-100 / 0,1 mg/ml PG / 100 mM Tris/HCl pH 7,5]                   |
| Eluatpuffer            | [0,05% Triton X-100 / 0,1 mg/ml PG / 100 mM Tris/HCl pH 7,5 / 300 mM Imidazol] |
| Regenerierungslösung   | [2% SDS / 400 mM Imidazol]   |
| EDTA                   | [0,5 M]  |

#### 3.4.3 Rekonstitution von oberflächenimmobilisiertem LHCII Apoprotein

Die mit LHCII Apoprotein beschichteten Glasoberflächen (siehe Abschnitt 3.3.6 bzw. 3.3.7) wurden zunächst zweimal mit SDS-Spülpuffer gewaschen. Nach vollständigem Abnehmen des Spülpuffers wurden die Glasoberflächen mit 50 µl 1% SDS benetzt. In der Zwischenzeit wurde die benötigte Pigmentmenge (20 – 200 µg Chlorophyllgehalt, die für diese Rekonstitution eingesetzte Pigmentmischung wurde auf ein Chl a/b-Verhältnis von 1 eingestellt und zusätzlich mit 100µg Gesamtcarotinoiden / 1 mg Chlorophyll angereichert) in 40 µl 100% Ethanol gelöst auf dem Mischgerät mit 410 µl OG-Rekonstitutionspuffer vermischt. Diese pigmenthaltige Lösung wurde auf die Gläschen gegeben (= 500 µl Gesamtvolumen im Rekonstitutionsansatz), mit der Pipette kurz durchmischt und für 30 min bei RT abgedunkelt stehen gelassen.

Anschließend wurden die Oberflächen zunächst mit für 5 min 500 µl kaltem OG-Spülpuffer, dann 3 x für je 10 min mit kaltem LM-Spülpuffer unter langsamem schütteln gewaschen, um überschüssiges Pigment zu entfernen. Der Erfolg der Rekonstitution konnte dann fluoreszenzspektroskopisch im Ensemble sowie Einzelmolekular in LM-Spülpuffer eingebettet kontrolliert werden.

Material:

|                          |  |
|--------------------------|--|
| SDS-Spülpuffer           | [0,2% SDS / 20 mM Na-P pH 8,0]   |
| SDS                      | [1%]   |
| OG-Rekonstitutionspuffer | [1,22% OG / 15,25% Saccharose / 1,22 mM β-Mercaptoethanol / 122 mM Tris/HCl pH 9.0 / 0,122 mg/ml PG] |
| OG-Spülpuffer            | [1% OG / 12,5% Saccharose; / 1 mM β-Mercaptoethanol / 100 mM Tris/HCl pH 9.0 / 0,1 mg/ml PG]         |
| LM-Spülpuffer            | [ 0,05% LM / 12,5% Saccharose / 1 mM β-Mercaptoethanol / 100 mM Tris/HCl pH 9.0 / 0,1 mg/ml PG]      |

### 3.4.4. Denaturierung von immobilisierten LHCII Komplexen

Zur Kontrolle der Stabilität der Oberflächenimmobilisierung des LHCII sowie zur Aufnahme von Entfaltungskinetiken wurden immobilisierte Komplexe (siehe Abschnitt 3.3.8 bzw. 3.3.9) sowie Rekonstituierter LHCII (siehe Abschnitt 3.4.3) gezielt denaturiert. Hierzu wurde der auf den Glasoberflächen befindliche Puffer vollständig abgezogen und 500 µl Denaturierungspuffer hinzugegeben. Die Denaturierung konnte anschließend im Ensemble fluoreszenzspektroskopisch kontrolliert oder zeitaufgelöst einzelmolekular verfolgt werden.

Material:

Denaturierungspuffer [20 mM Na-P pH 6,5 / 1% SDS]

### 3.4.5 Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Um den nach der Detergenzwechselrekonstitution in Lösung verbliebenen Überschuss an Pigmenten von den gefalteten Komplexen abzutrennen, wurde eine Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation durchgeführt. Die Trennung der Rekonstituierten Komplexe von freien Pigmenten erfolgt über die unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit der einzelnen Komponenten.

Zur Herstellung der Gradienten wurde dazu zunächst eine Dichtegradientenlösung hergestellt und je 4 ml davon in entsprechende Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Beckmann SW60) eingefüllt. Die befüllten Röhrchen wurden dann bei -20 °C eingefroren und am nächsten Tag ca. 4 h vor Beginn der Zentrifugation bei 4-6 °C zum Auftauen erschütterungsfrei abgestellt. Vor dem Auftrag der Proben auf die Gradienten wurden jeweils die obersten 500 µl von jedem Gradienten abgenommen und anschließend je 250 – 400 µl einer Lösung mit rekonstituierten Komplexen vorsichtig daraufpipettiert, so dass die Gradientenlösung überschichtet wurde. Die Zentrifugation erfolgte für 17 h bei 4 °C und 54000 Upm (Beckmann Optima 100, Rotor SW60).

Nach Ende des Laufes wurden die Gradienten vorsichtig aus den Gehängen genommen und in einem Ständer mit der Digitalkamera dokumentiert. Die einzelnen Banden wurden mit einer Spritze abgesaugt und auf Eis bis zur weiteren Verwendung für maximal 24 h gelagert.

Material:

Dichtegradientenlösung [0,6 M Saccharose, 10 mM Na-P pH 7,4]

### 3.4.6 Quantifizierung von aufgereinigten Komplexen

Die Quantifizierung aufgereinigter Komplexe erfolgte über die Bestimmung der Absorption bei 670 nm. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von  $5,46 \cdot 10^5$  (Butler und Kühlbrandt 1988) für monomere LHCII Komplexe kann dann die Komplexkonzentration über das Gesetz von Lambert und Beer errechnet werden. Für eine 1 cm-Küvette gilt dann:

$$c_{\text{LHCII}} = A_{\text{LHCII bei } \lambda = 670 \text{ nm}} / \epsilon_{\text{LHCII}} \text{ [Mol/l]}$$

Bei der Absorptionsbestimmung wurde zur Erhöhung der Genauigkeit stets eine Mehrfachbestimmung durchgeführt und durch entsprechende Verdünnung darauf geachtet, dass die Werte nicht größer als  $A = 1$  sind.

## 3.5 Oberflächenanalytik

### 3.5.1 Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy* (AFM))

Im Verlauf dieser Arbeit wurde auch die Rasterkraftmikroskopie zur Darstellung der modifizierten Oberflächen eingesetzt. Diese Messungen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Physikalische Chemie (Universität Mainz) von S. Schuy (AG Janshoff,) durchgeführt.

Die Technik des AFM beruht auf dem Abtasten der zu untersuchenden Oberfläche mit einer molekular feinen Nadel (*Tip*), die an einer Feder (*Cantilever*) befestigt ist (Abb. 3.X). Mit dieser Nadel wird über die Oberfläche gerastert, und es kann ein Oberflächen-Höhenprofil erstellt werden. Die Oberfläche wird also direkt abgebildet. Über das Höhenprofil der Oberfläche hinaus können über die federkonstante aber auch Informationen über die Beschaffenheit der Oberfläche, wie beispielsweise Adhäsivität oder Härte, gewonnen werden.

Im einfachsten Fall, dem *contact mode*, bei dem die Messspitze in ständigem Kontakt mit der Oberfläche steht, stehen hierzu zwei verschiedene Messtechniken zu Auswahl. Im sog. „*Constant height mode*“ wird die Auslenkung des Cantilevers mit Hilfe eines Lasers gemessen, der vom Cantilever je nach Biegung unterschiedlich reflektiert wird, woraus dann

das Höhenprofil der Oberfläche abgeleitet werden kann. (Abb. 3.2) Um Unterschied dazu wird im sog. „*Constant force mode*“ die Auslenkung des Cantilevers konstant gehalten und das Höhenprofil über die dazu notwendigen Höhenkorrekturen ermittelt. Nachteilig bei diesen Meßmodi ist die starke mechanische Beanspruchung der Oberflächen durch die laterale Bewegung der Messspitze.

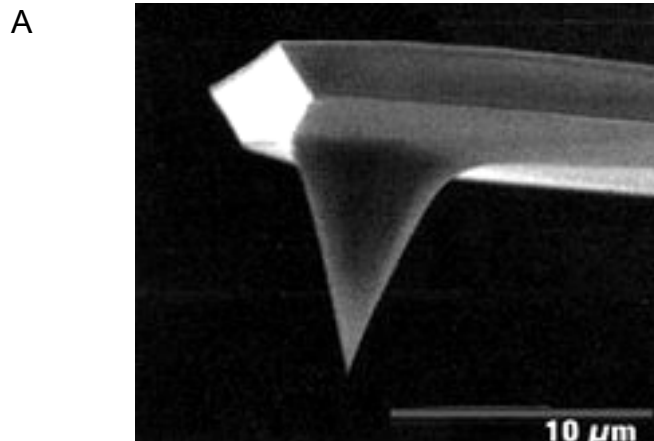
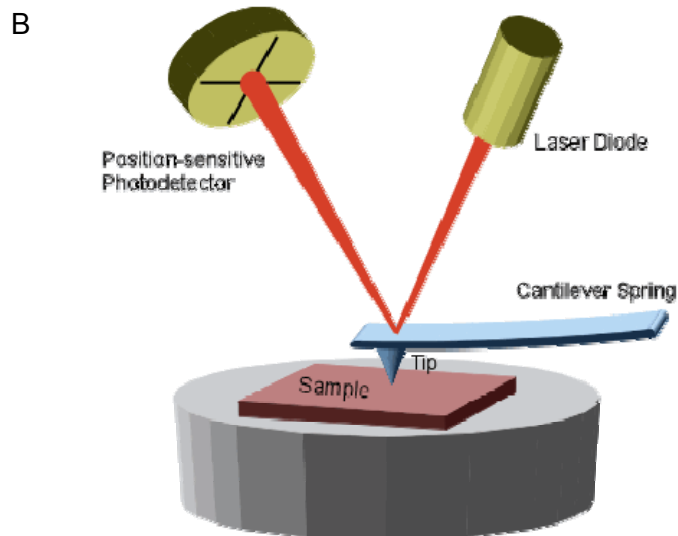


Abb. 3.2: (A) Standard-Messspitze und Cantilever, wie sie im AFM zum Einsatz kommen. (B) Schematische Darstellung der Messanordnung. Über einen vom Cantilever reflektierten Laser kann die Auslenkung der Messspitze beim Kontakt mit der Probe erfasst und ein Höhenprofil erstellt werden.

[www3.physik.uni-greifswald.de/method/afm/eafm.htm](http://www3.physik.uni-greifswald.de/method/afm/eafm.htm)



Weitaus schonender für die Oberflächen sind dynamische Betriebsmodi wie der *non-contact mode* oder der *tapping mode*. Bei ersterem werden die Cantilever jenseits der Eigenfrequenz – diese liegt bei den Standard-Siliziumcantilevern bei ca. 300 – 400 MHz – angeregt und berühren die Oberfläche nicht. Eine Annäherung zwischen Messspitze und Oberfläche kann über eine sog. Tylorentwicklung mathematisch berechnet werden. Im *tapping mode* wird der Cantilever mit seiner Eigenfrequenz angeregt, was zu einer deutlich größeren Amplitude führt. Nur im Bereich der größten Auslenkung berührt der Cantilever dabei die Oberfläche, was laterale Beanspruchungen weitgehend vermeidet. Allerdings ist der technische Aufwand für diese Meßmodi größer. Auch hier stehen zur Erstellung des Höhenprofils der „*constant height mode*“ und der „*constant force mode*“ zu Verfügung.

Das Ergebnis solcher AFM-Messungen ist aus naheliegenden Gründen sehr stark davon Abhängig, welche „Grundrauhigkeit“ das für die Experiment eingesetzte Trägermaterial besitzt, d.h. auf sehr rauen Oberflächen lassen sich kleine Höhendifferenzen nicht mehr auflösen und können daher nicht mehr gemessen werden. Der bevorzugte Träger ist Glimmer, ein kristallines Material, das nach seiner Spaltung eine Rauigkeit von nur 0,1 nm aufweist. Im Unterschied zum neutralen Glas ist es negativ geladen, weist aber ansonsten eine sehr ähnliche Oberflächenchemie auf. Für die in dieser Arbeit durchgeführten AFM-Messungen wurde daher, nachdem sich Glas als wenig brauchbar erwiesen hatte, stets frisch gespaltener Glimmer als Trägermaterial verwendet (siehe 3.3.2).

Die nach der Anleitung in 3.3 dieser Arbeit angefertigten Proben wurden dann in den jeweiligen Puffer eingebettet in einer Teflon-Probenhalterung in das Rasterkraftmikroskop eingesetzt und vermessen. Zur Messung wurde ein AFM des Typs Dimension 3100 mit einem NanoScope IIIA Controller der Firma Veeco Instruments (Mannheim) eingesetzt.

#### **3.5.2 Evaneszenz-Feld-Resonanz-Messungen**

Für einige Experimente dieser Arbeit wurde die Evaneszenz-Feld-Resonanz-Technik eingesetzt. Hierbei kann die Anlagerung von Molekülen an eine planare Oberfläche über eine Änderung des Brechungsindex des Trägermaterials gemessen werden.

Die Messzelle besteht aus einem Prisma mit einem aufgelagerten Sandwich aus einer niedrig-brechenden und einer stark brechenden Schicht. Durch den speziellen Einstrahlwinkel des Lasers kommt es innerhalb der stark brechenden Schicht zur vollständigen Reflektion des Lichtes, es entsteht ein sog. „resonant mirror“. Auf der Oberseite dieser Schicht kommt es zur Ausbildung eines evaneszenten Feldes, innerhalb dessen sich Anlagerungen an die Oberfläche auf die Brechungseigenschaften auswirken. Eine Änderung des Brechungsindex führt dann zu einer Änderung des Ausfallswinkels des Resonanzlichtes. Nachteilig ist bei dieser Methode, dass nicht zwischen einer unspezifischen Adsorption und einer spezifischen Oberflächenkoppelung unterschieden werden kann, wozu daher generell Kontrollexperimente notwendig sind. Da pro Meßeinsatz des für diese Experimente eingesetzten Gerätes (IASys Affinity sensors) nur zwei Meßkammern vorhanden sind und verschiedene Meßeinsätze mit gleicher Oberflächenfunktionalisierung sich aber in ihren Bindungseigenschaften unterscheiden (persönliche Mitteilung von R.

Lauterbach), sind stets mehrere Experimente notwendig, um gesicherte Ergebnisse zu erhalten.

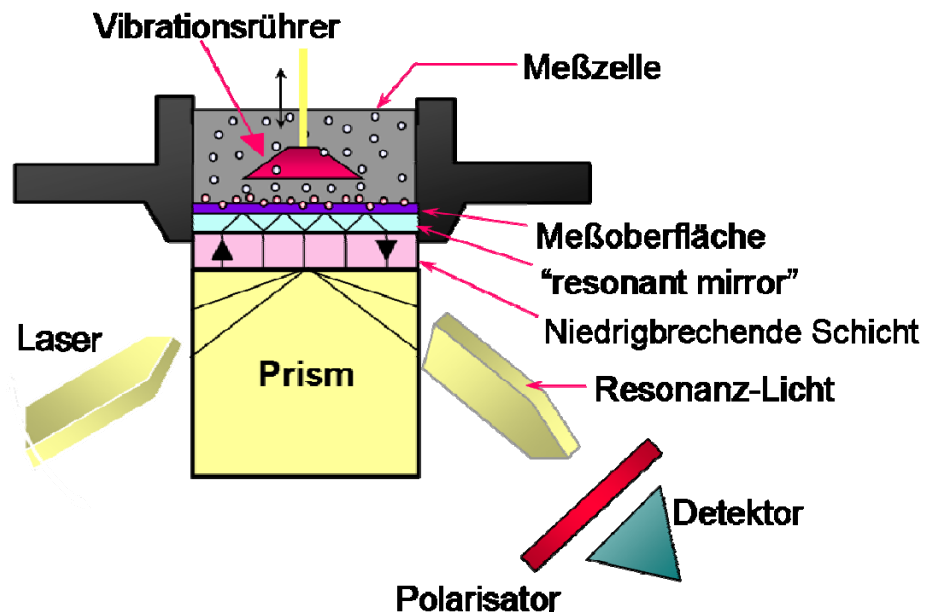


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Evaneszenz-Feld-Resonanz-Technik. Eine Substanzanlagerung an die Meßoberfläche ändert die Brechungseigenschaften des „resonant mirror“ und führt in der Folge zu einem veränderten Abstrahlwinkel des reflektierten Lichtes, der gemessen werden kann. [<http://www.immunology.unibe.ch/services/iasys/iaindex.htm>]

Vor der Durchführung einer Evaneszenz-Feld-Resonanz-Messung wurde zunächst ein Biotin-funktionalisierter Meßeinsatz in das Gerät eingesetzt und die Meßkammern so lange mit Spülpuffer 1 gespült, bis keine Signaländerung mehr sichtbar war. Anschließend wurden 48 µl Spülpuffer 1 und 2 µl Neutravidin in beide Meßkammern hineinpipettiert und unter rühren (Stirrer auf 80% eingestellt) für 15 min inkubiert, bis sich das Signal nur noch sehr langsam änderte. Danach wurde nicht gebundenes Neutravidin durch Spülen mit Spülpuffer 1 entfernt und die Meßzellen in Spülpuffer 2 überführt. Erst nachdem keine Signaländerung mehr sichtbar war, wurde 50 µl mit LHCII-Apoprotein (200 µg /ml) versetzter Spülpuffer 2 in die Meßzellen pipettiert, wobei jeweils eine Meßzelle mit biotinyliertem bzw. nicht-biotinyliertem LHCII Apoprotein befüllt wurde. Die Signaländerung der beiden Meßzellen wurde unabhängig voneinander durch die Geräte-Software aufgezeichnet.

Nach Abschluß der Oberflächenkoppelung wurde der Meßeinsatz regeneriert, indem die Meßzellen mit 8 M GuHCl (pH 1,5) so lange gespült wurden, bis wieder das Anfangssignal vor Zugabe des Neutravidins erreicht wurde. Gegebenenfalls wurde diese Prozedur mehrmals wiederholt.

Material:

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| IBs           |                                       |
| Spülpuffer 1: | 20 mM Na-P pH 5,85                    |
| Spülpuffer 2: | 20 mM Na-P pH 5,85 / 1% OG / 0,2% SDS |
| Neutravidin:  | 5 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O         |

### 3.6 Spektroskopische Methoden

#### 3.6.1 Absorptionsspektroskopie

Zur Aufnahme aller Absorptionsspektren dieser Arbeit wurde ein Spektralphotometer (UV-2101PC, UV-VIS scanning spectrophotometer) eingesetzt. Mit dieser Methode wird bestimmt, welcher Wellenlängenbereich des eingestrahnten Lichtes von der Probe in welchem Umfang absorbiert wird. Durch eine Referenzmessung mit dem entsprechenden Lösungsmittel bzw. Puffer kann die Absorption der Probe genau ermittelt werden. In dieser Arbeit wurde die Absorptionsspektroskopie zur Konzentrationsbestimmung von Farbstofflösungen und von aufgereinigten LHCII Komplexen herangezogen. Die Konzentration der jeweiligen Lösung kann unter Berücksichtigung der Verdünnung über folgende Formel errechnet werden:

$$c = A / (\epsilon \times d) \text{ (Lambert-Beer)}$$

wobei  $c$  = Konzentration in mol/l,  $A$  = Absorption,  $\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient,  $d$  = Schichtdicke der bei der Messung eingesetzten Küvette in cm (i.d.R  $d = 1$  cm).

Um größere Messungengenauigkeiten zu vermeiden, sollte die Konzentration der Probe so eingestellt werden, dass die Absorption zwischen 0,1 und 1 liegt.

Zur Konzentrationsbestimmung von Chlorophylllösungen wurde die von Porra *et al.* (1989) veröffentlichte, bereits in Abschnitt 3.2.3 beschriebene Formel verwendet.

#### 3.6.2 Fluoreszenzspektroskopie

Chlorophylle und Fluoreszenzfarbstoffe geben bei der Rückkehr vom angeregten Zustand ( $S_1$ ) in der Grundzustand ( $S_0$ ) die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenzlicht ab. Da ein Teil der aufgenommenen Energie bei Relaxationsvorgängen verloren geht, ist die Fluoreszenz gegenüber dem Anregungslicht stets in den längerwelligen, energieärmeren Bereich verschoben. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Fluoreszenzspektroskopie zur Kontrolle der Intaktheit rekonstituierter Komplexe nach der Aufreinigung (im Ensemble) und zur Kontrolle der Immobilisierung und Rekonstitution bzw. Denaturierung von immobilisiertem LHCII (im Ensemble sowie Einzelmolekülspektroskopisch) eingesetzt.

## Ensemble-Messungen

Alle Ensemble-Fluoreszenzemissionsmessungen dieser Arbeit wurden an einem Fluoromax2 Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Hierbei sind zwei unterschiedliche Messanordnungen verwendet worden:

### Fluoreszenzbestimmung von Lösungen

Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren in Lösung wurde die Fluoreszenzemission stets über einen 90 ° Winkel gegenüber dem Anregungsstrahl gemessen. Hierdurch wird gewährleistet, dass kein Anregungslicht in den Detektor gelangen kann und die Ergebnisse nicht verfälscht werden. Es wurden generell stark verdünnte Lösungen gemessen, um eine Reabsorption der Fluoreszenzemission innerhalb der Probe zu unterbinden. Die für die Fluoreszenzmessungen dieser Arbeit eingestellten Messparameter sind in Tab. 3.5 aufgelistet.

|                             |                    |                    |   |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|---|
| Anregung von                | Chl a              | Chl b              | DY776                                     |
| Anregungswellenlänge        | 410 nm             | 470 nm             | 730 nm                                    |
| Reduction                   | S/R                | S/R                | S/R                                       |
| Messbereich                 | 600 – 750 / 850 nm | 600 – 750 / 850 nm | 780 – 850 nm                              |
| Integrationszeit            | 0,2 s              | 0,2 s              | 0,2 s                                     |
| Spaltbreite Anregung        | 2 nm               | 2 nm               | 2 nm                                      |
| Spaltbreite Emission        | 4 nm               | 4 nm               | 4 nm                                      |
| Filter Anregung<br>Emission | 530 nm Filter      | 530 nm Filter      | 730 nm Interferenzfilter<br>780 nm Filter |

Tab. 3.5: Messparameter für Fluoreszenz-Messungen an Lösungen

### Fluoreszenzbestimmung von Oberflächen

Zur Messung der Fluoreszenzemission von auf Glasoberflächen immobilisierten Proteinen wurde die „front face“ - Apparatur eingesetzt. Hierbei wird das in Richtung des Anregungsstrahls emittierte Fluoreszenzlicht über zwei Spiegel in den Detektor gelenkt. Als Glas wurden auf das Format 9 x 25 mm zurechtgeschnittene Objektträger (Menzel) verwendet. Zur Messung der Oberflächen wurde die in Abb. 3.4 für diese Arbeit entwickelte Halterung eingesetzt, um eine gerichtete Orientierung der Glasoberfläche innerhalb des Fluoreszenzspektrometers zu gewährleisten.

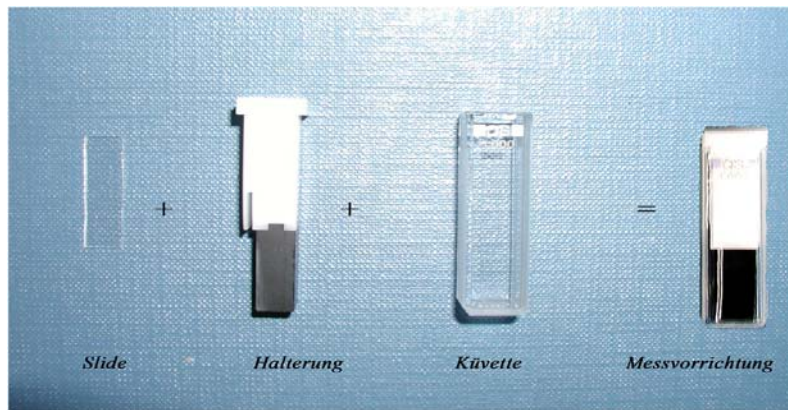


Abb. 3.4 Probenhalterung für zurechtgeschnittene beschichtete Glasobjektträger zur Aufnahme von Ensemble-Fluoreszenzspektren. Das Gläschen wurde zur Messung stets zum Anregungslicht gerichtet positioniert. (aus Köhler, 2005)

Für die Ensemble-Messungen an beschichteten Glasoberflächen wurden die in Tab. 3.6 aufgelisteten Messparameter eingestellt

|                      |               |               |                          |
|----------------------|---------------|---------------|--------------------------|
| Anregung von         | Chl a         | Chl b         | DY776                    |
| Anregungswellenlänge | 410 nm        | 470 nm        | 730 nm                   |
| Reduction            | S             | S             | S                        |
| Messbereich          | 600 – 850 nm  | 600 – 850 nm  | 780 – 850 nm             |
| Integrationszeit     | 0,5 s         | 0,5 s         | 1 s                      |
| Spaltbreite Anregung | 6 nm          | 6 nm          | 10 nm                    |
| Spaltbreite Emission | 6 nm          | 6 nm          | 10 nm                    |
| Filter Anregung      |               |               | 730 nm Interferenzfilter |
| Emission             | 530 nm Filter | 530 nm Filter | 780 nm Filter            |

Tab. 3.6 Meßparameter für Ensemble-Fluoreszenzmessungen von Glasoberflächen am Fluoromax2.

#### Einzelmolekül-Messungen

Die im Verlauf dieser Arbeit angefertigten Einzelmolekül-Fluoreszenzaufnahmen wurden in Kooperation mit dem 3. Physikalischen Institut der Universität Stuttgart von Sebastian Schuler und Peter Schwaderer (AG Wrachtrup) angefertigt. Für diese Experimente wurden einseitig beschichtete Deckgläschen (22 x 22 mm, Menzel) als Basis verwendet. Die gesamte Oberflächenchemie von der Funktionalisierung der silanisierten Oberfläche bis zu Fluoreszenzmessung wurde in den in Abb. 3.5 dargestellten Halterungen durchgeführt. Zur Messung der Fluoreszenz wurden zwei verschiedene, von P. Schwaderer und S. Schuler zusammengestellte Messaufbauten verwendet, deren Funktionsweise schematisch in Abb. 3.6 dargestellt ist.

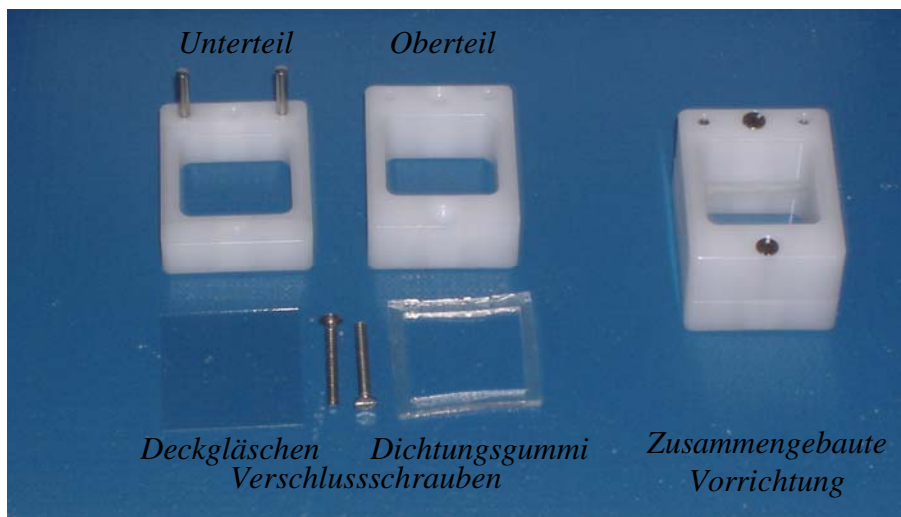


Abb. 3.5: Probenhalterung für 22 x 22 mm Deckgläschen. Die gesamte Oberflächenmodifikation von der einseitigen Biotinylierung bis zur Bestimmung der Fluoreszenz einseitig immobilisierter Proteine wurde in diesen Halterungen durchgeführt.

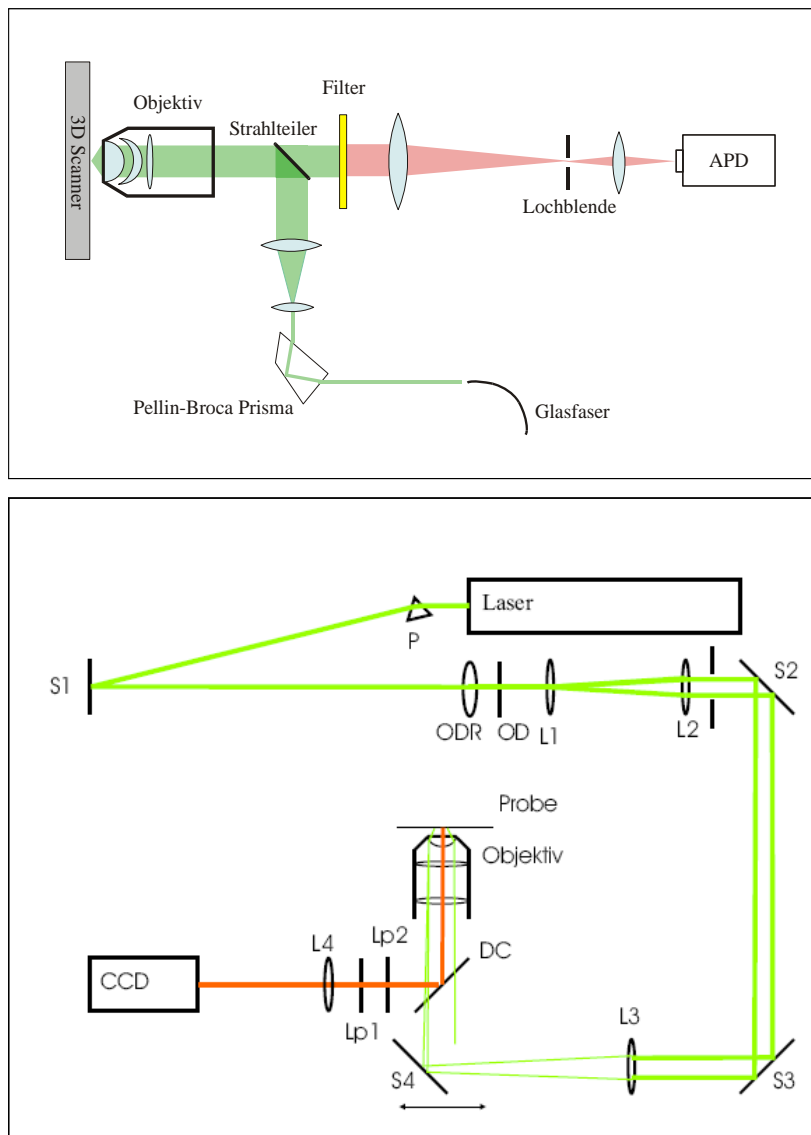


Abb. 3.6 (A) Schematischer Aufbau des konfokalen Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopes. Das eingestrahlte Laserlicht wird über ein Pellin-Broca-Prisma wellenlängenbereinigt und über verschiedene Linsen und ein Objektiv auf das Objekt gelenkt. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird über einen Strahlteiler vom Anregungslicht getrennt und mittels einer avalanche photo diode (APD) gemessen. (aus Wolf-Klein, 2001)

(B) TIRF-Aufbau zur zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung einzelner Moleküle. Der Laser-Anregungsstrahl wurde über verschiedene Linsen und Spiegel auf die Probe gelenkt. Die Fluoreszenzemission wird über einen Strahlteiler vom Anregungslicht getrennt und durch Filter in die CCD-Kamera gelenkt. (aus Schwaderer 2005)

Die Fluoreszenz der auf der Oberfläche immobilisierten Proteine wurde durch abstrahlen der Oberfläche mit einer Photodiode (APD in Abb. 3.5 A = *avalanche photo diode* im konfokalen Messaufbau; SPCM-AQR 16, EG&G) bzw. durch Aufnahme mit einer CCD-Kamera im TIRF-Aufbau gemessen (CCD in Abb. 3.5 B; Cascade-512, Photometrics). Die Funktion des TIRF wurde bereits in der Einleitung dargestellt (Siehe Abschnitt 1.3.2).

Das konfokale Fluoreszenzmikroskop wurde zur Kontrolle der Immobilisierung von DY776-markiertem LHCII Apoprotein mit den in Tab 3.7 dargestellten Messparametern eingesetzt. Die Fluoreszenzemission wurde durch den Einsatz eines 750 nm Langpass-Filters auf den Bereich Oberhalb von 750 nm eingegrenzt, die einzelnen Moleküle anhand des Bleichungsverhaltens und der Emissionsstärke identifiziert.

|                                    |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| Anregung von                       | DY776           |
| Anregungswellenlänge               | 720 nm          |
| Integrationszeit                   | 4 ms / Pixel    |
| Anregungsleistung vor dem Objektiv | 3 – 30 $\mu$ W  |
| Filter                             | 750 nm Langpass |

Tab. 3.7 Messparameter des konfokalen Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopes.

Im Unterschied dazu arbeitet der TIRF-Aufbau mit einer CCD-Kamera, die einen größeren Bildausschnitt permanent aufzeichnet. Die Wellenlängen der Fluoreszenzemission wurden hier – ähnlich dem konfokalen Aufbau – durch den Einsatz von Langpass-Filtern eingegrenzt. Für diesen Messaufbau wurde ein Laser anderer Wellenlänge eingesetzt, mit dem spezifisch Chl b angeregt werden kann. Die für diese Messungen angewendeten Parameter sind in Tab. 3.8 aufgelistet.

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| Anregung von                       | Chl b  |
| Anregungswellenlänge               | 488 nm   |
| Integrationszeit                   | 100 – 200 ms / Bild  |
| Anregungsleistung vor dem Objektiv | 0,3 – 4 mW   |
| Filter                             | 540 nm Langpass (für Chl-Fluoreszenz)<br>750 nm Langpass (für DY776-Fluoreszenz) |

Tab. 3.8: Messparameter zur Aufnahme zeitaufgelöster Einzelmolekül-Fluoreszenzen

## 4 Ergebnisse

Anknüpfend an Veröffentlichungen von Horn und Paulsen (2002) und Reinsberg *et al.* (2000, 2001), die sich mit der pigmentinduzierten Faltung des LHCII in Lösung beschäftigten, sollte in dieser Arbeit der Faltungsprozess einzelner LHCII Proteine zeitaufgelöst beobachtet werden. Auf diese Weise sollten Informationen über die Heterogenität des Faltungsprozesses bzw. Entfaltungsprozesses und über die Reihenfolge der Pigmentbindung erhalten werden.

Für einzelmolekulare Faltungsexperimente muss das Protein zunächst auf einer planaren, transparenten Oberfläche (Glas) immobilisiert werden, um in konfokalmikroskopischen Experimenten untersucht werden zu können. Anschließend sollte durch Zugabe von gelösten Pigmenten die Faltung der oberflächenimmobilisierten Proteine induziert und der Prozess der Faltung zeitaufgelöst in TIRF- (*total internal reflection fluorescence*) Experimenten beobachtet werden.

Für einen besseren Überblick sind die einzelnen im Laufe dieser Arbeit beschriebenen experimentellen Ansätze in einem als Verlaufsdiagramm dargestellt (Abb. 4.1).

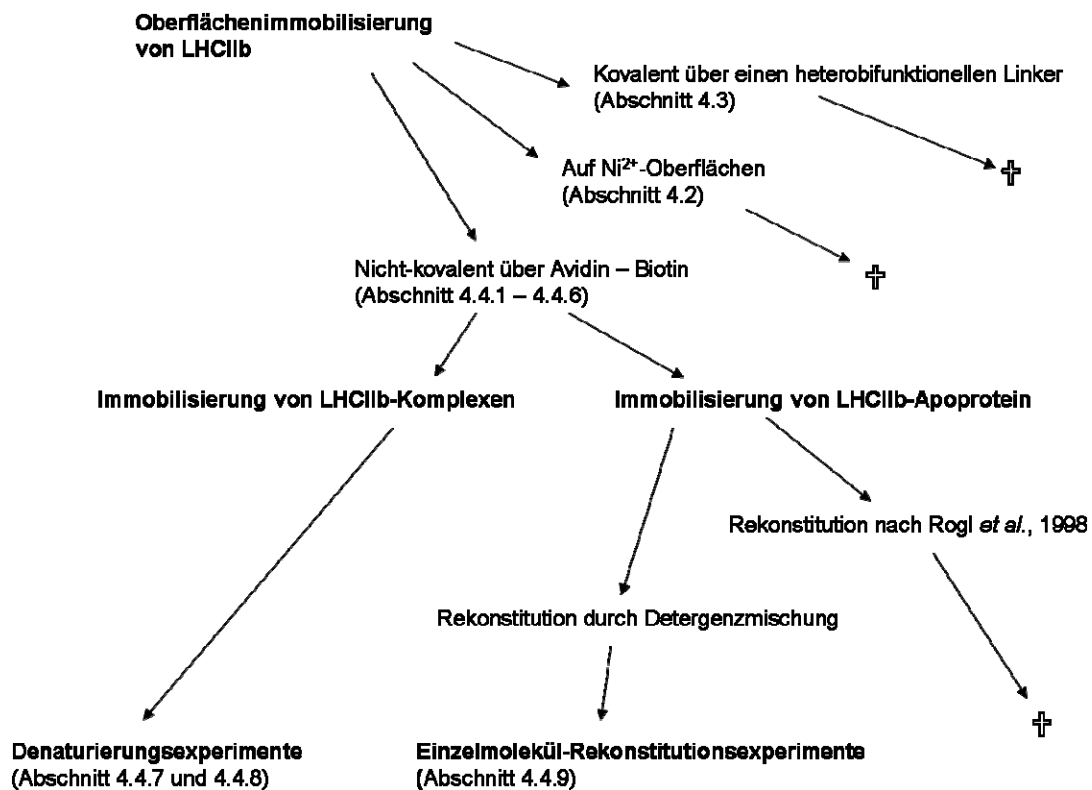


Abb. 4.1: Übersichtsdiagramm über die in dieser Arbeit untersuchten Themengebiete.

Für die Immobilisierung der Proteine wurden im Verlauf dieser Arbeit drei verschiedene Wege beschrieben (Immobilisierung auf  $\text{Ni}^{2+}$ -, Linker- bzw. Neutravidin-Oberflächen). Nach erfolgreicher Proteinimmobilisierung wurden zum einen Experimente zur gezielten Dissoziation immobilisierter LHCII-Komplexe durchgeführt, zu Anderen wurde auf zwei unterschiedlichen Wegen an der Rekonstitution oberflächenimmobilisierter LHCII-Apoproteine gearbeitet. Die Resultate dieser Experimente sollen im Folgenden detailliert dargestellt werden.

#### 4.1 Rekonstitution von auf einer Nickel-Säule immobilisiertem LHCII Apoprotein (nach Rogl *et al.*, 1998)

Um zu zeigen, dass eine Faltung des immobilisierten Apoproteins durch Zugabe von Pigmente möglich ist, sollte das bereits von Rogl *et al.* (1998) veröffentlichte Protokoll zur Rekonstitution von auf einer  $\text{Ni}^{2+}$ -Säule immobilisiertem LHCII Apoprotein reproduziert werden. Hierbei wird das mit einem  $\text{His}_6$ -Tag versehene rekombinante LHCII-Protein (C3.2h, Huschenbett 2001) zunächst in 8 M Harnstoff gelöst und anschließend  $\text{His}_6$ -Tag an eine  $\text{Ni}^{2+}$ -Säule gebunden. Parallel dazu wurde das Protein auch in Solubilisierungspuffer (Protein in SDS-Micellen) gelöst, um dessen Tauglichkeit zu zeigen.

Die eigentliche Rekonstitution wurde durch Zugabe von in kaltem OG-Puffer gelösten Pigmenten induziert. Nach verschiedenen Waschschriffen mit OG- und Triton X-100-haltigen Puffern, mit denen überschüssiges Pigment von der Säule entfernt wird, und der Elution der gefalteten Komplexe wurde das Ergebnis durch Fluoreszenzspektroskopie kontrolliert

(Abb. 4.2).

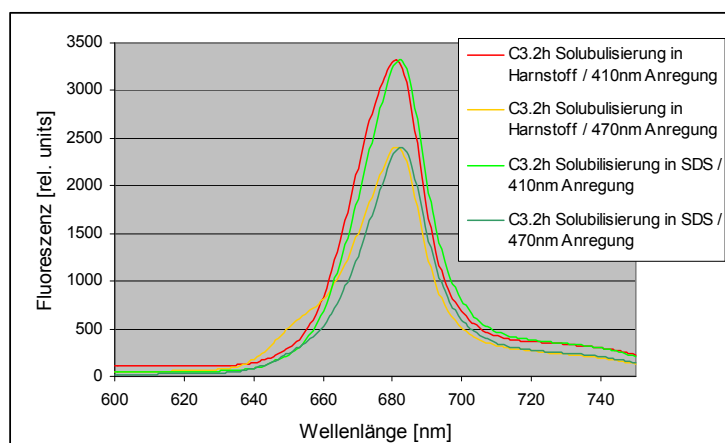


Abb. 4.2: Fluoreszenzspektren von der Rekonstitution von C3.2h nach Immobilisierung auf einer  $\text{Ni}^{2+}$ -Sephrose-Säule nach Rogl *et al.* (1998) mit in Harnstoff gelöstem Apoprotein bzw. in Anlehnung daran mit in Solubilisierungspuffer gelöstem Apoprotein. Die Spektren wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die jeweiligen Maxima normiert.

## 4 Ergebnisse

In beiden Versuchsansätzen kann bei Chl b-Anregung (470 nm) eine Energieübertragung auf Chl a mit einem für komplexgebundenes Chl a typischen Maximum bei 680 nm beobachtet werden, was auf eine erfolgreiche Rekonstitution schließen lässt. Eine leichte Chl b-Schulter, die bei der Rekonstitution von in Harnstoff solubilisiertem Protein auftritt, konnte bei einer Solubilisierung mit SDS nicht beobachtet werden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte im nächsten Schritt versucht werden, die Versuchsanordnung auf  $\text{Ni}^{2+}$ -beschichtete, kommerziell erhältliche Glasobjektträger zu übertragen.

### 4.2 Immobilisierung von LHCII auf $\text{Ni}^{2+}$ -Glasoberflächen

Um die Möglichkeit zur Bindung auf  $\text{Ni}^{2+}$ -Glasoberflächen zu testen, sollten bereits rekonstituierte monomere LHCII Komplexe über einen His<sub>6</sub>-Tag immobilisiert werden (Abb. 4.3). Man macht sich hier die gleichen Wechselwirkungen zwischen Histidin-Resten des Proteins und komplexierten  $\text{Ni}^{2+}$  wie auf der Säule in Abschnitt 4.1 zu Nutze.

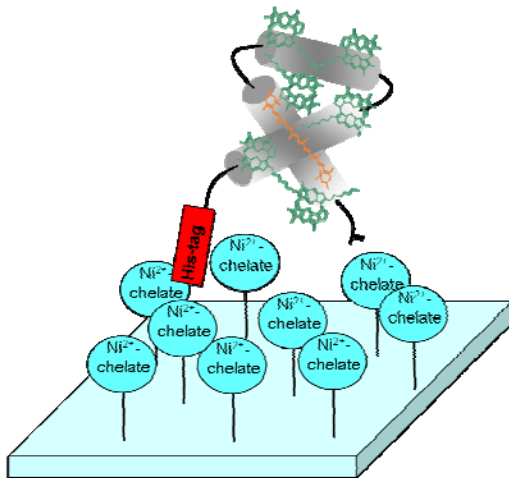


Abb. 4.3: Schematische Abbildung der Immobilisierung von LHCII-Komplexen auf einer  $\text{Ni}^{2+}$ -Chelat-Glasoberfläche. Die Immobilisierung erfolgt hier nicht-kovalent über einen an das Protein angefügten His<sub>6</sub>-Tag.

Um kommerziell erhältliche  $\text{Ni}^{2+}$ -beschichtete Glasobjektträger im Fluoreszenzspektrometer vermessen zu können, war es notwendig, diese in kleine Stücke von ca. 9 x 25 mm zu zerschneiden, wobei darauf zu achten war, dass beim Bearbeiten des Glases möglichst schonend mit der Oberfläche verfahren wird, um die Funktionalisierung nicht zu beschädigen. Dies wurde mit einer Diamanttrennscheibe durchgeführt. Die zurechtgeschnittenen Glasstücke konnten dann in einer mit Puffer gefüllten 1 x 1 cm Quarzglasküvette fixiert und im Fluorimeter vermessen werden.

Gefaltete und über eine Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation aufgereinigte C3.2h-Komplexe wurden analog zu Kågedal (1989) auf die Ni<sup>2+</sup>-Objektträger gebunden. Nach einem Spülschritt zur Entfernung nicht gebundener Komplexe wurde der Erfolg der Immobilisierung durch die Aufnahme von Fluoreszenzspektren untersucht (Abb. 4.4).

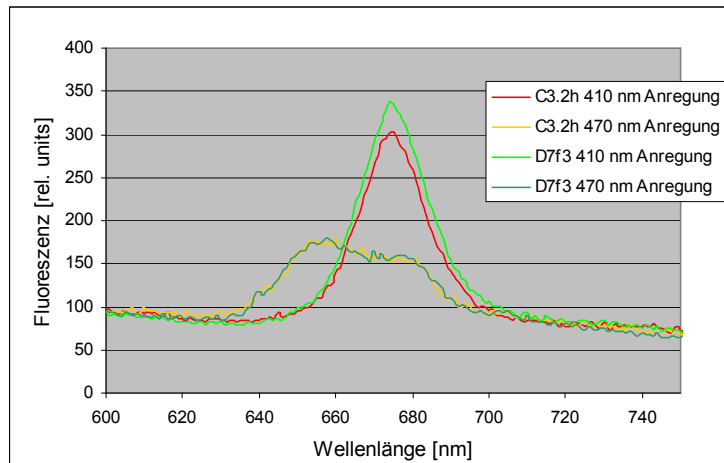


Abb. 4.4: Fluoreszenzspektren von rekonstituiertem C3.2h, der auf kommerziellen Ni<sup>2+</sup>-beschichteten Glasobjektträgern immobilisiert wurde. Bei Chl b-Anregung (470 nm) zeigt sich ein Maximum bei 655 nm mit einer breiten Schulter bei 675 nm, bei Chl a-Anregung (410 nm) zeigt sich ein Maximum bei 675 nm.

Bei Chl a-Anregung zeigten sich bei beiden Proben vergleichbar starke Fluoreszenzen mit einem Maximum bei 675 nm, was auf freies Chl a hindeutet. Bei Chl b-Anregung konnten starke Chl b-Peaks sowie eine Chl a-Schulter bei 675 nm detektiert werden, was ebenfalls typisch für freie Pigmente ist. Auf der Ni<sup>2+</sup>-Oberfläche befinden sich offenbar keine komplexgebundenen Pigmente, sondern ausschließlich freie Pigmente, die zum einen von einer Verunreinigung der Komplexbande nach der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation mit freien Pigmenten, zum anderen aber auch von denaturierten Komplexen stammen können. Gefaltete Komplexe konnten auf den Glasoberflächen nicht detektiert werden. Möglicherweise wurden gebundene Komplexe durch den Spülschritt wieder von der Oberfläche abgelöst.

Mit diesem Ergebnis konnten Angaben aus der Literatur bestätigt werden, wonach die Bindung von Proteinen an planare Oberflächen über einen His<sub>6</sub>-Tag als sehr schwach beschrieben wird (Lue *et al.*, 2004) Daher wurde diese Methode nicht weiter verfolgt, sondern es wurde ein anderer Weg zu Immobilisierung des LHCII auf Glasoberflächen eingeschlagen.

Da für die im weiteren Verlauf vorgesehenen zeitaufgelösten Einzelmolekül-Fluoreszenzaufnahmen ohnehin die Verwendung von Quarzglas obligatorisch ist, das kommerziell nicht mit funktionalisierten Oberflächen verfügbar ist, war es notwendig, eine im

## 4 Ergebnisse

Labormaßstab selbst herzustellende funktionale Glasoberfläche zur Immobilisierung zu entwickeln.

Aus Gründen der Stabilität wurde entschieden, eine kovalente Immobilisierung über einen heterobifunktionellen Linker zu favorisieren.

### 4.3 Immobilisierung von LHCII über einen heterobifunktionellen Linker

Eine weitere Möglichkeit zur Immobilisierung von Proteinen besteht in einer kovalenten Oberflächenkoppelung über einen heterobifunktionellen Linker, der sowohl eine aminoreaktive (z.B. N-hydroxy-succinimid (NHS) oder Isothiocyanat (ITC)) als auch eine sulfhydrylreaktive (z.B. Maleimid (MAL) oder Iodacetamid (IAA)) Gruppe aufweist. Von solchen Linkermolekülen ist eine große Auswahl mit unterschiedlichsten Spacerlängen zwischen den beiden funktionellen Gruppen kommerziell erhältlich. Um ein möglichst stabil auf der Oberfläche immobilisiertes Protein zu erhalten, wurden Linkermoleküle mit einer relativ kurzen Spacerlänge von nur drei C-C Bindungen verwendet.

Zur Immobilisierung wird das Linkermolekül zunächst über seine aminoreaktive Funktion an eine zuvor aminofunktionalisierte Glasoberfläche gebunden. Die Funktionalisierung der Oberfläche erfolgt über eine Silanisierung mit einem Aminosilan, in diesen Experimenten wurde Aminopropyltriethoxysilan (APTES) eingesetzt. In einem zweiten Schritt kann dann ein Protein über ein Cystein an die Sulfhydryl-reaktive Funktion der Linkers gekoppelt werden (Abb. 4.5).

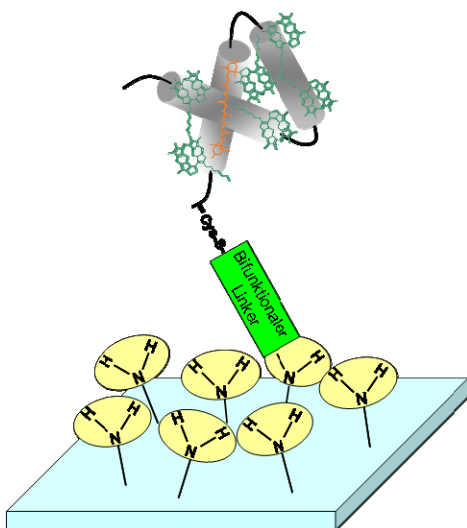


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der LHCII-Komplex-Immobilisierung über einen heterobifunktionellen Linker. Das Linkermolekül wird hierfür über seine NHS-Gruppe an aminofunktionalisierte Glasoberflächen gekoppelt. Das Protein wird kovalent über ein Cystein mit der Maleimid-Gruppe des Linkers verknüpft.

### 4.3.1 LHCII Komplexbindung

Zur Bindung des heterobifunktionellen Linkers (Maleimidopropionyl-N-hydroxysuccinimide (MPS-NHS)) an aminofunktionalisiertes Glas wurde analog zur N-terminalen Markierung von Proteinen mit NHS-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoffen bzw. Biotinen verfahren, da es sich hier um die gleiche Reaktion handelt. Für die Koppelung der Proteine über ein singuläres Cystein wurde auf das Protokoll von Huschenbett (2001) zur SH-Markierung von Proteinen zurückgegriffen.

Mit diesem System sollten aufgereinigte LHCII Komplexe mit (S3Ch, Huschenbett, 2001) und ohne Cystein (C79S, Huschenbett, 2001) immobilisiert werden. Zusätzlich wurden auch Kontrollexperimente mit verschiedenen, nicht vollständig funktionalisierten Glasoberflächen durchgeführt (Abb. 4.6).

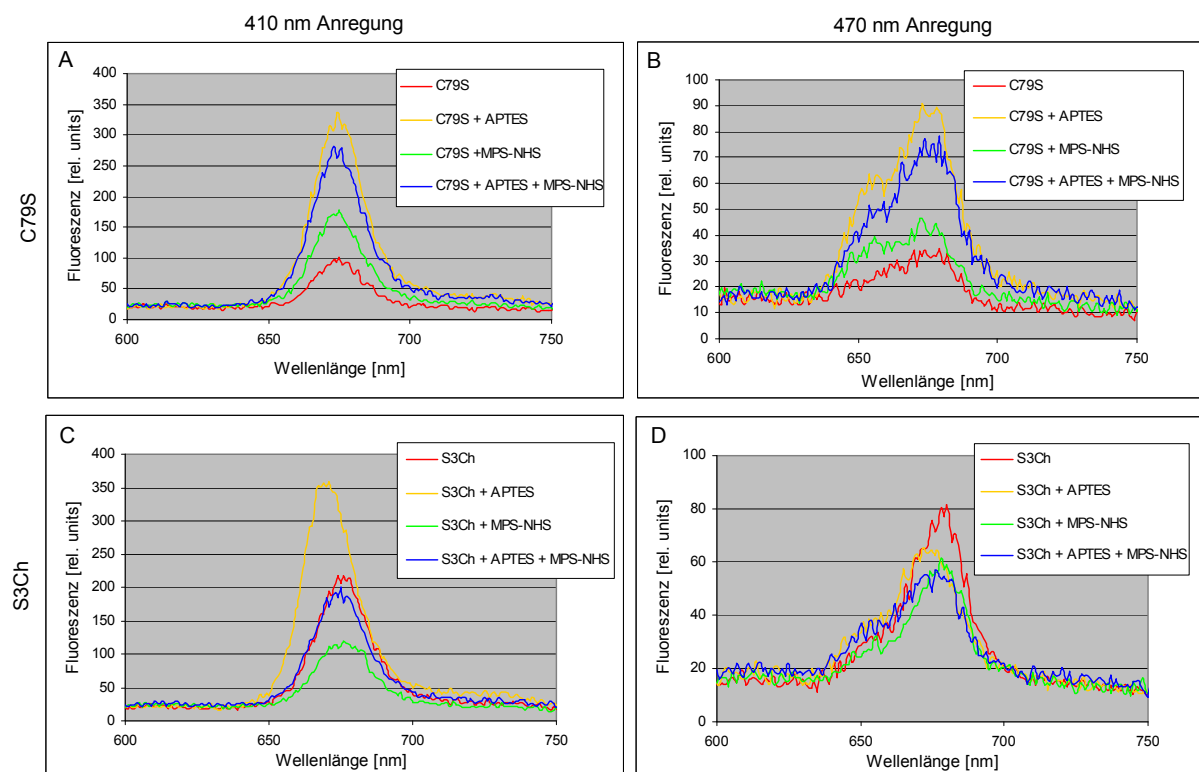


Abb. 4.6: Fluoreszenzspektren zur Bindung von rekonstituiertem S3Ch bzw. C79S an unfunktionalisierte, APTES-silanisierte, mit MPS-NHS behandelte sowie an APTES- und MPS-NHS-behandelte Glasoberflächen. Es zeigten sich sowohl bei S3Ch, das bei einer vollständig funktionalisierten Oberfläche gekoppelt werden sollte, als auch bei der cysteinfreien Mutante C79S vergleichbare Spektren. In keinem der Versuchsansätze wurde ein signifikant stärkeres Fluoreszenzsignal beobachtet, wie es bei einer spezifischen Kontrolle erwartet wurde.

Wie in Abb. 4.6 anhand einer Energieübertragung von Chl b auf Chl a mit Fluoreszenzmaxima bei 680 nm zu erkennen ist, stammen die Signale zwar von

## 4 Ergebnisse

Komplexen, es konnte aber in keinem der Versuchsansätze eine spezifische Bindung des cysteinhaltigen Klons S3Ch gegenüber dem cysteinfreien C79S beobachtet werden. Auf allen hier eingesetzten Oberflächen wurde eine mehr oder weniger starke Bindung von Komplexen beobachtet, was lediglich auf unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Komplexen und dem Glas hindeutet.

### 4.3.2 LHCII Apoprotein-Bindung

Da bei der Bindung von Komplexen über MPS-NHS offensichtlich kein Erfolg erzielt wurde, sollte die Immobilisierung von LHCII Apoprotein untersucht werden, da hier bei der Koppelung über das Cystein keine Rücksicht auf die gegenüber Temperatur, Belichtung und Detergentien deutlich empfindlicheren rekonstituierten Komplexe genommen werden muß. Zudem sind keine Störsignale von freien Pigmenten zu erwarten, die eine Interpretation der Fluoreszenzmessungen erschweren. Um die ungefalteten Proteine im Fluoreszenzspektrometer sehen zu können, mußte der N-Terminus zuvor mit Rhodamin-Isothiocyanat (R-ITC) markiert werden. Nachteilig sind hier allerdings die gegenüber LHCII-Komplexen schwächeren Fluoreszenzsignale des Fluoreszenzfarbstoffes.

Die Koppelung der Proteine an das auf die Glasoberfläche aufgebrachte MPS-NHS über ein singuläres Cystein am LHCII-Klon S3Ch sollte hier unter den gleichen Bedingungen stattfinden, wie sie auch bei der Cystein-spezifischen Markierung standardmäßig im Labor durchgeführt werden (Abb. 4.7). Als Kontrolle diente die cysteinfreie LHCII-Mutante C79S. Die Bindung an die Oberfläche wurde über die Rhodamin-Fluoreszenz kontrolliert.

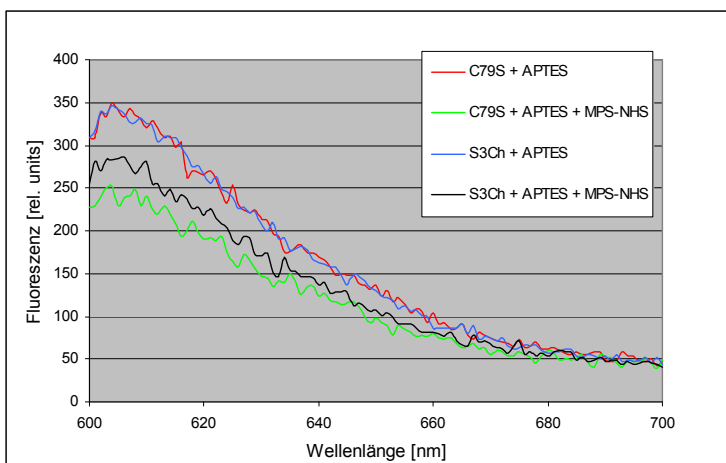


Abb. 4.7: Fluoreszenzspektren zur Bindung von R-ITC-markiertem S3Ch bzw. C79S Apoprotein an APTES-silanisierte Glasoberflächen über einen hetero-bifunktionellen Linker (MPS-NHS). Zur Kontrolle wurden jeweils Experimente auf silanisierten Oberflächen ohne Zugabe von MPS-NHS durchgeführt. Gegenüber den Ansätzen mit Linker zeigt sich eine geringfügig höhere Fluoreszenz. S3Ch zeigt trotz des zur Bindung an den Linker notwendigen Cysteins nur ein geringfügig höheres Fluoreszenzsignal als der cysteinfreie C79S. Anregungswellenlänge aller Spektren 560 nm.

Eine spezifische Bindung wurde wie auch schon im vorhergehenden Experiment nur bei S3Ch erwartet, da C79S über kein Cystein zur Koppelung an die Oberfläche verfügt. Die Fluoreszenzspektren zeigen bei Kontrolleexperimenten auf einer aminosilanisierten Oberfläche ohne MPS-NHS etwas höhere Fluoreszenzen als in den Ansätzen auf einer mit Linker versehenen Oberfläche, was offenbar auf eine starke unspezifische Bindung der Proteine hinweist. Bei dem mit Linker versehenen Glas zeigt S3Ch geringfügig höhere Signale als C79S, was auf eine geringe Menge an spezifisch gebundenem S3Ch-Apoprotein hinweist. Insgesamt scheint sich aber weniger Protein auf der Glasoberfläche zu befinden als in den Kontrolleexperimenten ohne Linkermolekül. Trotz verschiedener Änderungen im Immobilisierungsprotokoll konnte keine Verbesserung dieser Ergebnisse erreicht werden.

### 4.3.3 Untersuchung der Funktionalität der Silanisierung

Auf der Suche nach der Ursache für diese schlecht erklärbaren Daten bzw. die hohe Unspezifität wurden zunächst die einzelnen Schritte der Oberflächenfunktionalisierung untersucht.

Der erste Schritt zur Beschichtung gereinigten Glasoberflächen stellt eine Funktionalisierung der Glasoberfläche mit Aminogruppen dar, die über eine Behandlung des Glases mit einem in Toluol gelösten Aminosilan erreicht wird. In diesen Experimenten wurden zwei verschiedene Aminosilane (Aminopropyltriethoxysilan (APTES) und Aminopropyltrimethylethoxysilan (APDMES)) auf ihre Fähigkeit zur Funktionalisierung der Oberfläche getestet. Die beiden Silane unterscheiden sich in der Anzahl der Ethoxygruppen (APTES = 3; APDMES = 1), worin auch die höhere Reaktivität des APTES begründet liegt (Abb. 4.8), wobei sich hier aber die Neigung zur Aggregatbildung über die Ethoxygruppen bei Anwesenheit von Wasser nachteilig auswirken kann. Daher ist für diese Reaktion die Verwendung von Lösemitteln, die durch ein Molekularsieb getrocknet wurden, obligatorisch. Die Funktionalisierung der Oberflächen wurde nachgewiesen, indem an die Aminogruppe des Silans ein aminoreaktiver Fluoreszenzfarbstoff (R-ITC) gebunden wurde (Abb. 4.9).

## 4 Ergebnisse

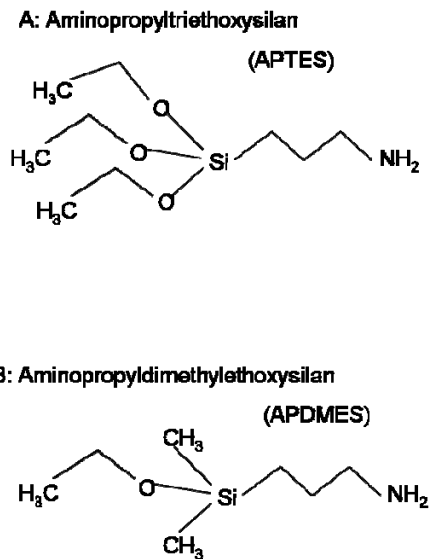


Abb. 4.8: Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Silane zur Herstellung von Aminofunktionalisierten Glasoberflächen.

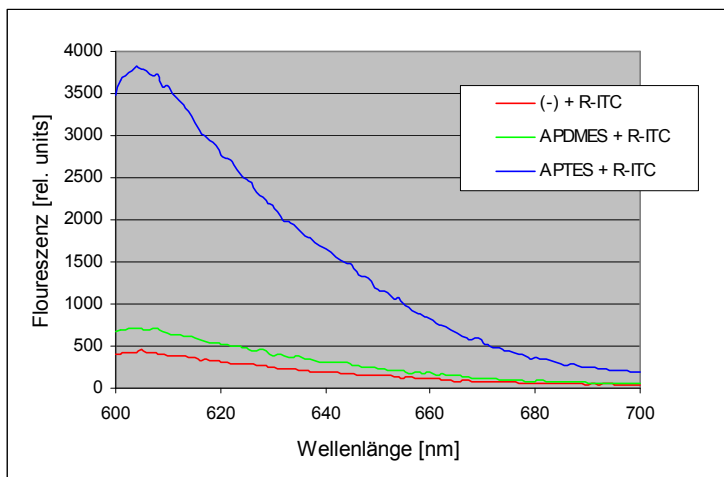


Abb. 4.9: Fluoreszenzspektren zum Nachweis der erfolgreichen Silanisierung der Glasoberfläche durch Bindung eines aminoreaktiven Fluoreszenzfarbstoffes (Rhodamin B-Isothiocyanat (R-ITC)) an die Aminogruppe der Silane. Alle Spektren wurden mit einer Anregungswellenlänge von 560 nm aufgenommen. Die silanisierten Oberflächen zeigen stärkere Fluoreszenzsignale als die unbehandelte Kontrolle. Mit APTES werden deutlich höhere Werte erreicht als mit APDMES.

Sowohl die mit APTES als auch die mit APDMES behandelte Oberfläche zeigen ein stärkeres Fluoreszenzsignal als die unfunctionalisierte Kontrolle, im Falle von APDMES-silanisierten Oberflächen fällt das Signal etwa doppelt so stark aus. Bei Verwendung von APTES konnte ein um ein vielfaches höheres Signal beobachtet werden. Um limitierenden Effekten durch zu geringe und daher im Fluoreszenzspektrometer nicht mehr detektierbaren Signalen vorzubeugen, wurde daher mit APTES weitergearbeitet.

#### 4.3.4 Untersuchung der Linkerbindung an silanisierte Glasoberflächen

Um den nächsten Schritt der Oberflächenbeschichtung, die Bindung des heterobifunktionellen Linkers an mit APTES silanisierte Glasoberflächen, zu überprüfen, wurde eine Negativ-Färbung mit einem aminoreaktiven Farbstoff (R-ITC) durchgeführt. Durch die Bindung des Linkers an die Aminogruppen sollten die Anzahl der auf der Oberfläche zur Farbstoffbindung zur Verfügung stehenden Aminogruppen – und damit auch die Fluoreszenz des Farbstoffes – zurückgehen. Die Bindung des Linkers kann daher über eine gegenüber dem Kontrollexperiment ohne Linker geringere Farbstofffluoreszenz nachgewiesen werden. Erst nach verschiedenen Anpassungen bezüglich der Pufferzusammensetzung konnten ein der Theorie entsprechendes Ergebnis im Fluorimeter beobachtet werden (Abb. 4.10), womit die Bindung des Linkers gleichzeitig als Fehlerquelle für die vorangegangenen Experimente in Frage kommt. Zusätzlich zu MPS-NHS wurden verschiedene andere Linkermoleküle (sulfo-MBS-NHS (Sulfo-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide), MBS-NHS (Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide)) sowie als Positivkontrolle N-hydroxysuccinimide-LC-Biotin (NHS-LC-Biotin) eingesetzt.

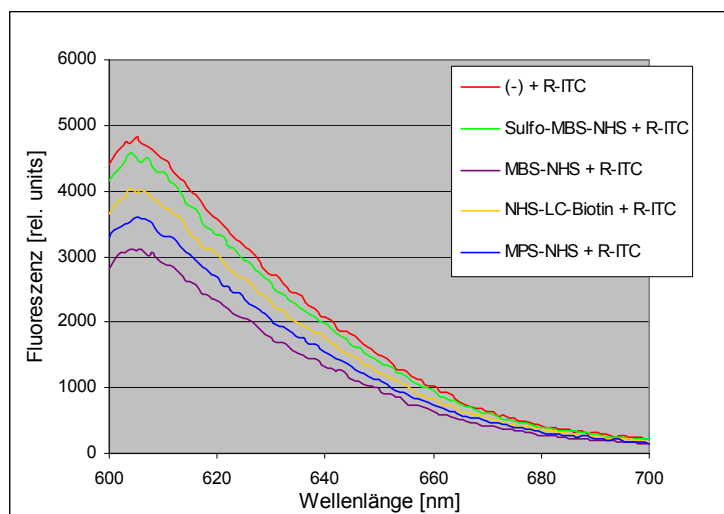


Abb. 4.10: Fluoreszenzspektren zum Nachweis der Bindung heterobifunktioneller Linker an silanisierte Glasoberflächen mittels Farbstofffluoreszenz von R-ITC. Alle mit einem Linker bzw. Biotin versehenen Oberflächen zeigen niedrigere Werte als die Kontrolle mit silanisierendem Glas. Anregungswellenlänge aller Spektren 560 nm.

Alle Versuchsansätze zeigten gegenüber dem Leerwert ohne Linker eine geringere Fluoreszenz, was auf eine erfolgreiche Bindung an die Oberfläche schließen lässt. Allerdings fielen die Differenzen zum Leerwert in allen Ansätzen schwächer aus als erwartet. Sulfo-MBS-NHS zeigt nur marginale Unterschiede zum Leerwert. Der bereits in den vorhergehenden Experimenten eingesetzte Linker MPS-NHS bindet unter den hier angewendeten Bedingungen ebenfalls an die Silan-Oberfläche und wurde daher auch in den weiteren Experimenten verwendet. In keinem der hier gezeigten Ansätze scheint aber eine quantitative Belegung der Glasoberfläche mit den Linkermolekülen gelungen zu sein.

## 4 Ergebnisse

(erkennbar an der nach wie vor bestehenden Möglichkeit, R-ITC an noch freie Aminogruppen zu binden), was aber angesichts des Zieles, die anzukoppelnden Proteine vereinzelt zu immobilisieren, eher förderlich als hinderlich erschien.

### 4.3.5 Immobilisierung von R-ITC-markiertem LHCII Apoprotein auf Linkeroberflächen

Nach den Anpassungen in der Puffer Zusammensetzung bei der Koppelung des Linkers an aminofunktionalisierte Glasoberflächen (Abschnitt 4.3.4) sollte erneut versucht werden, LHCII Apoprotein auf linkerbeschichtete Glasoberflächen zu binden. Für die Proteinbindung wurden die gleichen Bedingungen wie in Abschnitt 4.3.2 gewählt (Abb. 4.11).

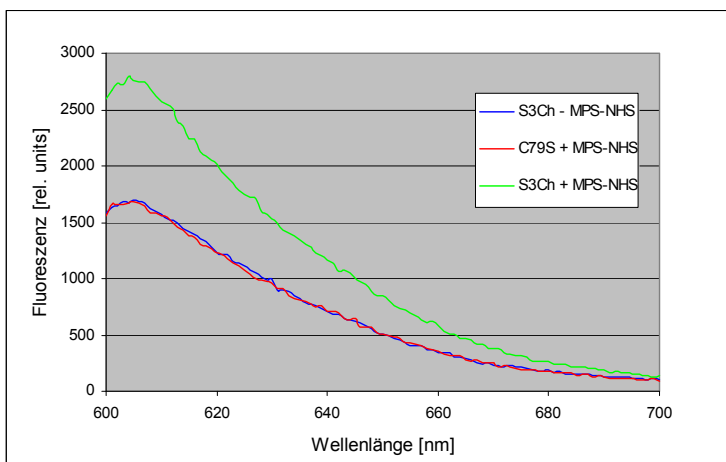


Abb. 4.11: Immobilisierung von R-ITC-markiertem LHCII Apoprotein auf Glasoberflächen über einen heterobifunktionellen Linker (MPS-NHS). Der Nachweis der Immobilisierung erfolgte über die Farbstofffluoreszenz. Der cysteinhaltige LHCII-Klon S3Ch zeigt stärkere Signale als die cysteinfreie Kontrolle mit C79S. Anregungswellenlänge aller Spektren 560 nm.

Mit dem optimierten Protokoll der Linkerkoppelung war eine spezifische Immobilisierung von S3Ch möglich. Die Kontrollexperimente mit C79S und S3Ch ohne Linker zeigten deutlich geringere Fluoreszenzsignale mit vergleichbaren Intensitäten.

Das in Abb. 4.10 gezeigte Ergebnis konnte so nicht reproduziert werden. Die beobachtete spezifische Bindung wurde bei weiteren Versuchen nicht erreicht (Abb. 4.12).

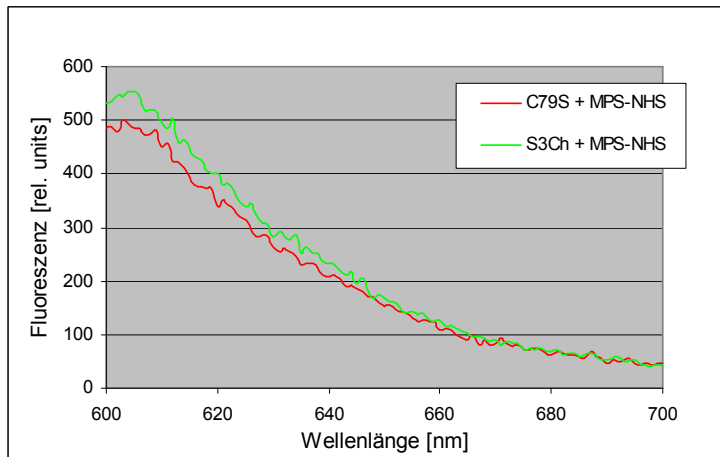


Abb. 4.12: Reproduktion des in Abb. 4.11 dargestellten Versuches. S3Ch und C79S zeigen vergleichbar starke Fluoreszenz-signale. Anregungswellenlänge aller Spektren 560 nm.

Die hier gezeigten Fluoreszenzspektren stellen symptomatisch die schlechte Reproduzierbarkeit des in Abb. 4.11 dargestellten Versuches dar. S3Ch zeigt identische Fluoreszenzintensitäten wie die Negativkontrolle mit C79S, was einer spezifischen Bindung deutlich widerspricht.

Um als Ursache das für diese Versuche eingesetzte Linkermolekül auszuschließen, wurden nochmals Vergleiche mit einem anderen Linker durchgeführt (MBS-NHS). Auch in diesen Versuchen konnte jedoch keine reproduzierbare spezifische Bindung auf die mit einem heterobifunktionellen Linker versehenen Glasoberflächen erreicht werden (Abb. 4.13).

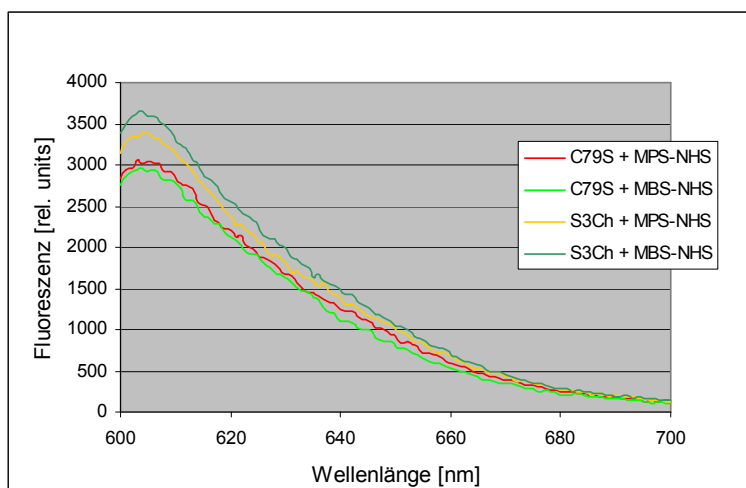


Abb. 4.13: Immobilisierung von R-ITC-markiertem LHCII Apo-protein auf Glasoberflächen über zwei unterschiedliche heterobifunktionelle Linker (MPS-NHS und MBS-NHS). Der Nachweis der Immobilisierung erfolgte über die Farbstofffluoreszenz. Es zeigen sich kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen. Anregungswellenlänge aller Spektren 560 nm.

In den Versuchsansätzen mit S3Ch kann eine geringfügig höhere Fluoreszenz beobachtet werden als in den Ansätzen mit C79S, was auf sehr geringe Anteile an spezifisch gebundenem Protein hinweist, jedoch scheint der größte Teil unspezifisch an die Oberfläche adsorbiert zu sein, was sich in den nur wenig schwächeren Signalen von C79S äußert. Die Art des eingesetzten Linkermoleküls scheint hierbei keine Rolle zu spielen.

## 4 Ergebnisse

---

Da sich auch mit einer Vielzahl von Experimenten keinerlei Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einstellte und auch Änderungen in den Versuchsprotokollen nichts besserten, wurde eine weitere Methode zur Immobilisierung von LHCII Apoprotein bzw. LHCII Komplexen entwickelt.

### 4.4 Immobilisierung von LHCII über das Biotin / Avidin – System

Die Biotin / Avidin-Bindung stellt die stärkste bekannte biologische Bindung dar ( $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ). Die Immobilisierung über dieses System geht von einer Avidin-Oberfläche aus, auf die biotinylierte Proteine gebunden werden können. Im Gegensatz zur Oberflächenkoppelung über einen heterobifunktionellen Linker ist diese Bindung nicht-kovalent. Vorteilhaft ist dadurch die Möglichkeit, die Oberflächen durch Spaltung der Bindung mehrmals einzusetzen und somit den Materialverbrauch zu beschränken. Darüber hinaus ist dieses System universeller einsetzbar, da praktisch alle Proteine und auch DNA oder RNA für eine Biotinylierung zugänglich sind. Nachteilig ist der höhere Aufwand in der Herstellung der Avidinoberflächen.

Diese Oberflächen lassen sich durch Koppelung eines aminoreaktiven Biotins an die schon aus den vorhergehenden Abschnitten bekannten aminosilanisierten Glasoberflächen erhalten, auf die dann Neutravidin – die deglykosylierte Form von Avidin – gebunden werden kann. Neutravidin ist ein ca. 60 kDa schweres wasserlösliches Homotetramer und besitzt pro Monomer eine Bindestelle für Biotin. Durch die Wahl eines Biotinderivates mit einer geeigneten Spacerlänge zwischen Biotin und NHS-Gruppe werden dabei jeweils nur die zur Glasoberfläche hin gerichteten Biotinbindestellen des Neutravidins belegt, die anderen Bindetaschen bleiben unbesetzt, so dass hier ein zuvor biotinyliertes Protein gebunden werden kann (Abb. 4.14).

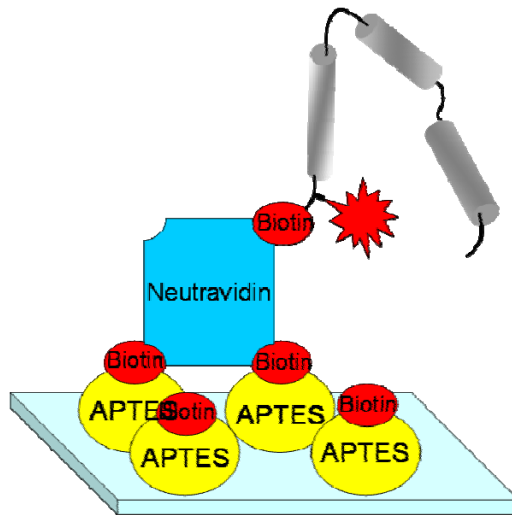


Abb. 4.14: Schematische Darstellung der Immobilisierung von LHCII Apoprotein auf einer Glasoberfläche über das Biotin-Avidin-Kopplungssystem. Hierbei werden die Aminogruppen der silanisierten Glasoberfläche biotinyliert und daran Neutravidin gekoppelt. Durch die Länge des Spacerarms des Biotins kann erreicht werden, daß nur die zur Glasoberfläche zeigenden Biotin-Bindestellen des Neutravidins belegt werden. An die freien Biotin-Bindestellen kann anschließend ein biotinyliertes Protein gekoppelt werden.

Vor den ersten Versuchen zur Immobilisierung von LHCII Apoproteinen wurden zunächst zwei Vorversuche durchgeführt, mit denen zum Einen die prinzipielle Möglichkeit, über dieses System Proteine zu immobilisieren, nachgewiesen werden sollte (siehe Abschnitt 4.4.1), zum Anderen sollte untersucht werden, ob eine der beteiligten Substanzen in der Einzelmolekülspektroskopie störende Hintergrundsignale verursacht (siehe Abschnitt 4.4.2).

#### 4.4.1 Evaneszenz-Feld-Resonanz-Messungen zur Immobilisierung von LHCII Apoprotein über das Neutravidin / Biotin-Bindungssystem

Um zu testen, ob dieses Bindungssystem prinzipiell zur Immobilisierung von LHCII Apoprotein geeignet ist, wurde die Oberflächenbindung zunächst im Evaneszenz-Feld-Resonanz-Gerät (IAsys) ausprobiert, wo auf Erfahrungen von R. Lauterbach zurückgegriffen werden konnte. Die Oberfläche eines „Sandwiches“ aus einem Prisma und alternierenden Materialien mit sehr niedrigen und sehr hohen Brechungsindices wird hierbei beschichtet (Abb. 3.3 bzw. Abschnitt 3.5.2). Durch den speziellen Aufbau entsteht in der obersten, stark brechenden Schicht ein sog. „resonant mirror“, der das Licht vollständig reflektiert und auf der Oberseite ein evaneszentes Feld erzeugt, innerhalb dessen Anlagerungen an die Oberfläche detektiert werden können. Im Falle einer Anlagerung von beispielsweise Proteinen an die Oberfläche kann aufgrund einer Änderung des Brechungsindex eine Veränderung des Reflektionswinkels beobachtet werden, auf dem das Messprinzip beruht.

## 4 Ergebnisse

In der Evaneszenz-Feld-Resonanz-Messung mit S3C (Huschenbett 2001) zeigte sich eine spezifische Bindung des biotinylierten, farbstoffmarkierten Apoproteins und nur eine geringe unspezifische Bindung des nicht-biotinylierten farbstoffmarkierten Kontrollproteins (Abb. 4.15).

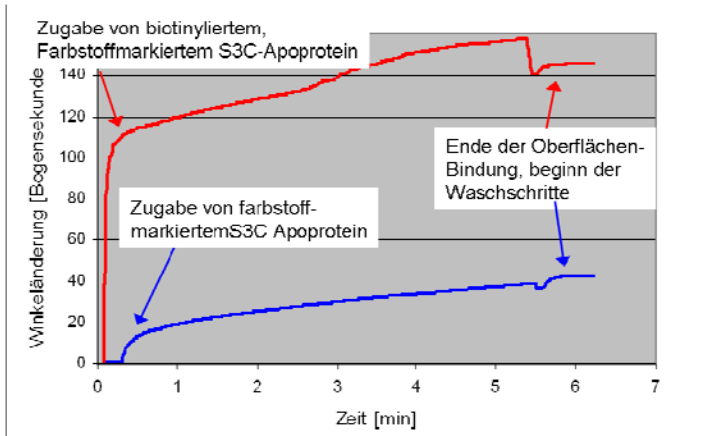


Abb. 4.15: Evaneszenz-Feld-Resonanz-Messung der Oberflächenbindung von biotinyliertem und nicht-biotinyliertem, farbstoffmarkiertem S3C Apoprotein auf Neutravidinoberflächen. Das biotinylierte Apoprotein zeigt ein deutlich höheres Signal.

Mit diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass mit dem Avidin-Biotin-System eine spezifische Proteinimmobilisierung auf planaren Oberflächen möglich ist. Einen entscheidenden Nachteil dieser Methode stellt jedoch die Tatsache dar, dass die hier gewonnen Erkenntnisse nicht unbedingt für alle Avidin-Oberflächen gelten müssen, da hier die näheren Angaben zur Biotin-Beschichtung, auf die das Neutravidin gebunden wird, wie beispielsweise die Spacerlänge des Biotins, vom Hersteller nicht abgegeben werden. Nachteilig ist auch, dass stets nur die zwei Messkammern eines Meßeinsatzes gleichzeitig beobachtet werden können, so dass eine Vielzahl von Experimenten notwendig wäre, um alle Parameter festzulegen. Parallelexperimente in unterschiedlichen Messeinsätzen haben zudem nur eine bedingte Vergleichbarkeit, da sich in der Praxis zeigte, dass die Oberflächen der Messeinsätze voneinander abweichende Bindungseigenschaften besitzen (persönliche Mitteilung von R. Lauterbach). Nach dem prinzipiellen Nachweis der Eignung dieser Immobilisierungsmethode wurde daher an der Entwicklung von Neutravidin-beschichteten Glasoberflächen gearbeitet.

### 4.4.2 Kontrolle auf Eigenfluoreszenz der bei der Oberflächenmodifikation verwendeten Komponenten

Nachdem die Spezifität der Immobilisierung über das Biotin / Avidin-System gezeigt worden war, wurde über die konfokale Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie untersucht, ob eine

der eingesetzten Komponenten ein störendes Hintergrundsignal verursacht. Dazu wurde analog zur Linkerbindung (siehe Abschnitt 4.3.4) eine Biotinoberfläche hergestellt, indem an die Aminogruppen des Aminosilans NHS-Biotin gebunden wurde. Auf diese Oberfläche wurde NeutrAvidin unter den gleichen Bedingungen wie in der Evaneszenz-Feld-Resonanzmessung (siehe Abschnitt 4.4.1) aufgebracht, anschließend wurde die Oberfläche im konfokalen Einzelmolekülaufbau auf ihre Fluoreszenz hin untersucht (Abb. 4.16). Zusätzlich wurde auf die Neutravidinschicht auch biotinyliertes sowie biotinyliertes und mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY776 markiertes S3C Apoprotein aufgebracht und untersucht.

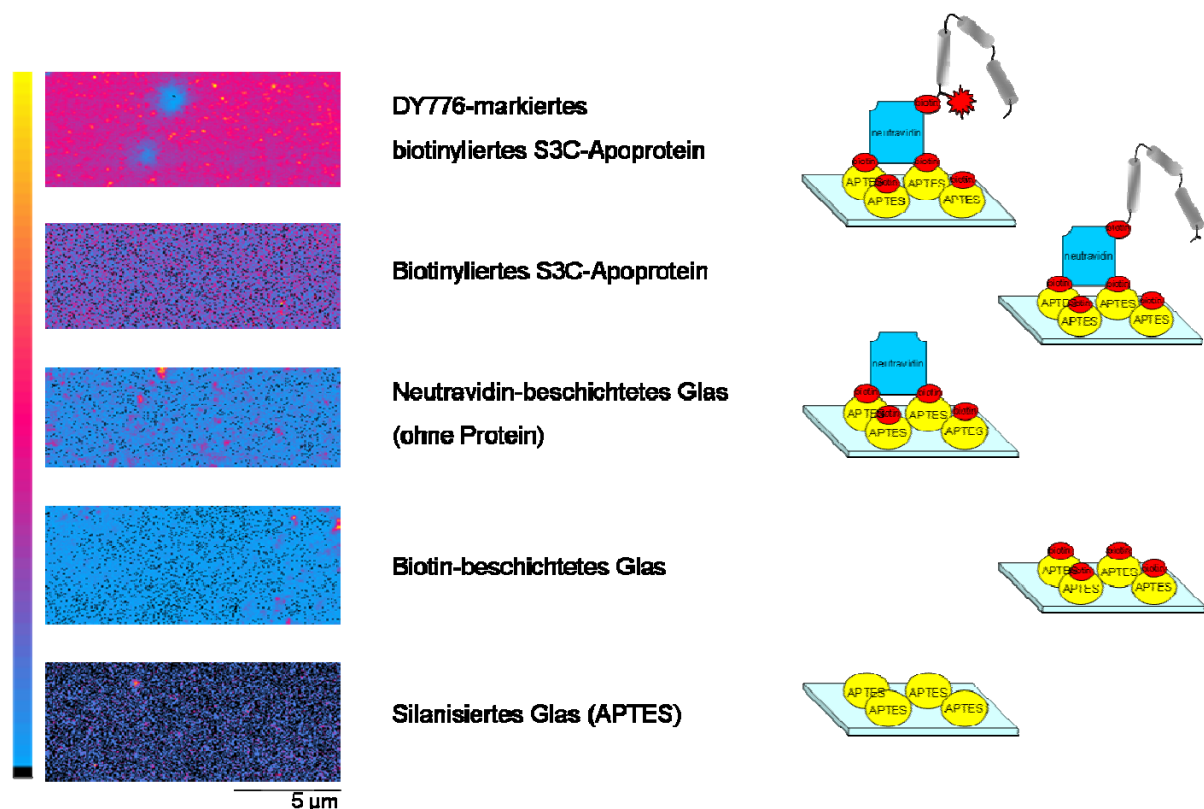


Abb. 4.16: Konfokale Einzelmolekül-Fluoreszenzaufnahmen aller verwendeten Komponenten der Immobilisierung über das Avidin-Biotin-Kopplungssystem. Getestet wurde, ob eine der verwendeten Substanzen Eigenfluoreszenz aufweist. Erst durch ein DY776-markiertes S3C-Apoprotein zeigt sich ein starkes Fluoreszenzsignal. Die weniger hellen (blau angefärbten) Flecken in der mit fluoreszenzmarkiertem LHCII beschichteten Oberfläche sind Bleichpunkte, die durch längeres Bestrahlen mit dem Anregungslaser verursacht wurden. Anregungswellenlänge 720 nm, Integration 4 ms/pixel, Anregungsleistung 1 μW (vor dem Objektiv), Bildgröße 256 x 128 pixel (= 30 x 15 μm)

Abb. 4.16 zeigt, dass keine der eingesetzten Komponenten ein überproportional starkes Eigenfluoreszenzsignal verursacht. Erst durch die Bindung des fluoreszenzfarbstoffmarkierten Proteins steigt die Fluoreszenz sprunghaft an. Alle Substanzen wurden damit für tauglich für die Einzelmolekülspektroskopie befunden.

## 4 Ergebnisse

### 4.4.3 Immobilisierung von LHCII Apoprotein nach dem aus den vorhergehenden Versuchen entwickelten Protokoll

Eine weitere Anforderung an die Neutraavidin-Oberfläche stellt die Tatsache dar, dass biotinylierte Proteine spezifisch immobilisiert werden müssen, um eine definierte Orientierung auf der Oberfläche zu garantieren. Durch Auftrag biotinylierter und nicht-biotinylierter S3C Apoproteine, die mit Tetramethylrhodamin (TMR) markiert waren, wurde die Bindungsspezifität untersucht. (Abb. 4.17).

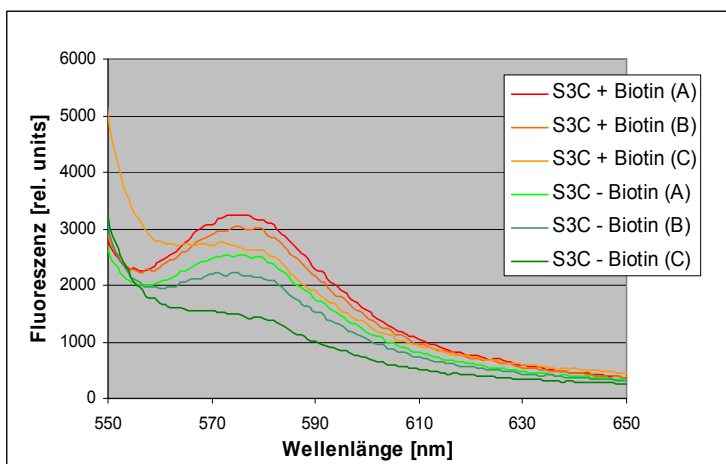


Abb. 4.17: Immobilisierung von TMR-markiertem S3C Apoprotein auf Neutraavidin-Oberflächen. Nachweis der Oberflächenimmobilisierung über die Farbstofffluoreszenz. Es sind nur geringe Unterschiede in der Fluoreszenz zwischen biotinyliertem und nicht-biotinyliertem Protein zu sehen. Anregung bei 530 nm.

Trotz der zuvor ermutigenden Ergebnisse der Vorversuche konnte in den unterschiedlichen Ansätzen keine spezifische Bindung des biotinylierten Proteins auf die Neutraavidin-Oberflächen beobachtet werden. Die biotinylierten Proben zeigen zwar höhere Fluoreszenzen als die nicht-biotinylierten Kontrollen, jedoch sind die Unterschiede nur gering. Ein besseres Ergebnis konnte auch durch die deutlich genauere Darstellung der Oberfläche in einzelmolekularen konfokalfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4.18) nicht beobachtet werden, wo sich ebenfalls nur sehr geringe Unterschiede zwischen den biotinylierten Proben und den nicht-biotinylierten Kontrollen zeigten.

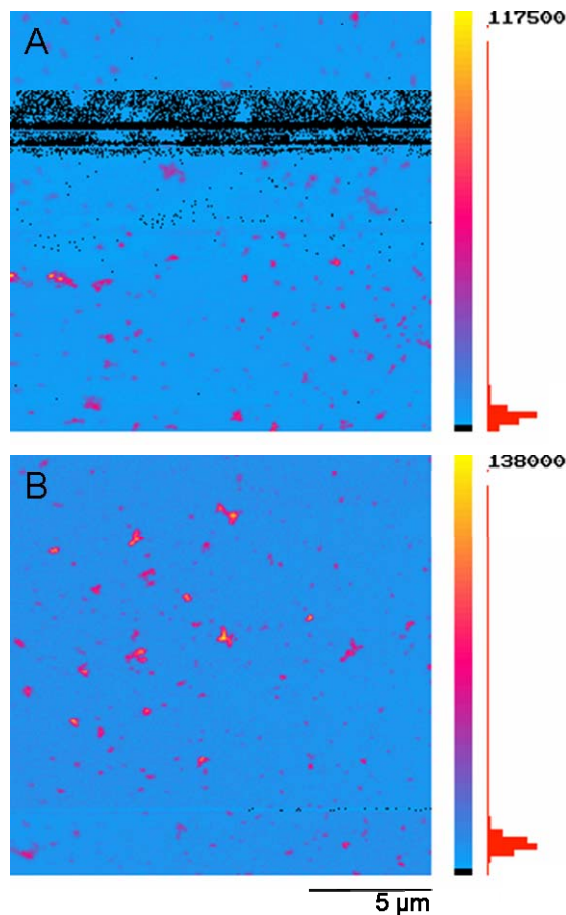


Abb. 4.18: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von mit DY776-markiertem S3C Apoprotein beschichteten Neutravidin-Glasoberflächen. Das nicht-biotinylierte Protein (A) zeigt mit 117500 cps nur wenig niedrigere Fluoreszenzwerte als das biotinylierte Protein (B) mit 138000 cps.

Anregungswellenlänge 720 nm, Integration 4 ms/pixel, Anregungsleistung 3 µW (vor dem Objektiv) Bildgröße 256 x 256 pixel (= 30 x 30 µm).

Abb. 4.18 zeigt, dass kaum Unterschiede in der Fluoreszenzintensität der biotinylierten und nicht-biotinylierten Proben bestehen und bestätigt damit die Ergebnisse von Abb. 4.17. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Proteine in keinem der Ansätze einzeln auf den Oberflächen gebunden sind, sondern dass hier über weite Bereiche eine geschlossene Proteinschicht mit einzelnen, darauf aufgelagerten Aggregaten auf die Oberfläche aufgetragen ist.

In den folgenden Experimenten wurde daher nach der Ursache für die schwankenden Ergebnissen und die geringen Fluoreszenzunterschiede zwischen den biotinylierten Proben und den nicht-biotinylierten Kontrollen und nach Möglichkeiten zur vereinzelt Immobilisierung von LHCII Apoproteinen gesucht.

## 4 Ergebnisse

### 4.4.4 Immobilisierung von fluoreszenzfarbstoffmarkiertem Neutravidin

Um die Gründe für die geringen Unterschiede in der Immobilisierung von biotinyliertem und nicht-biotinyliertem LHCII Apoprotein zu finden, wurden erneut die einzelnen Oberflächemodifikations- bzw. beschichtungsschritte untersucht. Da sich die Silanisierung der Glasoberfläche (siehe Abschnitt 4.3.3) schon in den Versuchen zur Herstellung einer Linkeroberfläche als funktionell erwiesen hat und auch die Bindung von NHS-Biotin nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 4.3.4), wurde die Bindung von Neutravidin an die biotinylierte Glasoberfläche näher untersucht. Hierzu wurde Neutravidin mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY700 markiert und auf silanisierte (Kontrolle) sowie silanisierte und biotinylierte Oberflächen gegeben und die Bindung über die Fluoreszenz des Farbstoffes kontrolliert (Abb. 4.19).

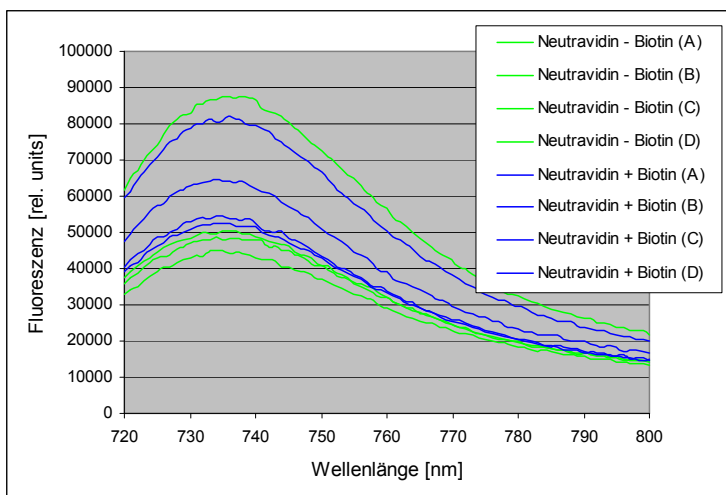


Abb. 4.19: Kontrolle der Bindung von Neutravidin an biotinylierte Glasoberflächen. DY700NHS-markiertes Neutravidin wurde auf biotinylierte bzw. nicht-biotinylierte Oberflächen (Kontrolle) gegeben und die Bindung über die Farbstofffluoreszenz gemessen. Es konnte keine spezifische Bindung beobachtet werden, zudem schwankten die Ergebnisse stark.

Wie anhand der Fluoreszenzspektren zu erkennen ist, konnte keine spezifische Bindung von Neutravidin gezeigt werden. Unabhängig vom Vorhandensein von Biotin auf der Glasoberfläche konnte in allen Ansätzen eine Farbstofffluoreszenz detektiert werden, zudem zeigte sich eine breite Streuung zwischen den Parallelproben. Um den Gründen für dieses Ergebnis auf die Spur zu kommen, erschien es notwendig, statt des indirekten Nachweises über Fluoreszenzspektroskopie eine Methode zur direkten Darstellung der Oberfläche einzusetzen, um Informationen über die Oberflächenstrukturen zu erhalten, die über die Fluoreszenz nicht zugänglich sind.

#### 4.4.5 Rasterkraft-Mikroskop-Aufnahmen zur Immobilisierung von LHCII Apoprotein

Die Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy* = AFM) stellt eine gängige Technik zur Untersuchung von Oberflächenstrukturen dar. Hierbei werden Oberflächen nicht indirekt spektroskopisch über Fluoreszenzfarbstoffe wie in den vorangegangenen Experimenten, sondern direkt über ein Abrastern der Oberfläche mit einer molekular feinen Nadel (Tip), die an einer Feder (Cantilever) befestigt ist, dargestellt (Abb. 3.2). Der Kontakt der Nadel mit der Oberfläche wird hierbei über den Reflektionswinkel des auf den Cantilever eingestrahlten Laserlichtes detektiert. Über die Biegung des Cantilevers und die dabei angewendete Kraft bei Berührung der Oberfläche können über die Federkonstante zusätzlich auch Informationen über die Konsistenz (Härte und Adhäsivität) gewonnen werden. Somit lassen sich sehr harte (z.B. Glas) von weichen (z.B. Protein) Oberflächen unterscheiden. Prinzipiell gibt es zwei unterschiedliche Meßmethoden, um eine Oberfläche darzustellen: Den sog. *Contact Mode*, bei dem die Spitze des Cantilevers in ständigem Kontakt mit der Oberfläche steht und über diese hinweggezogen wird. Das Höhenprofil kann hierbei entweder über die Biegung des Cantilevers erfasst werden („*constant-height-mode*“), oder aber, indem die Auslenkung des Cantilevers durch Höhenkorrektur konstant gehalten wird und die Höhenanpassungen aufgezeichnet werden („*constant force mode*“). Im Unterschied dazu wird im sog. *Tapping Mode* die Messspitze in Schwingung versetzt, die Spitze berührt dabei nur bei der größten Auslenkung der Schwingungsamplitude die Oberfläche. Die Schwingungsfrequenzen bewegen sich abhängig vom eingesetzten Cantilevertyp im Bereich der Eigenfrequenz der Cantilever von ca. 300 – 400 kHz. Da die Spitze hierbei nicht über die Oberfläche „kratzt“, ist diese Meßmethode deutlich schonender für die untersuchte Oberfläche, technisch aber aufwendiger zu realisieren. Prinzipiell kann die Rasterkraftmikroskopie auf allen ebenen Oberflächenmaterialien durchgeführt werden, allerdings hängt die Qualität der Ergebnisse von der Eigenrauhigkeit des verwendeten Trägermaterials ab. Das für AFM bevorzugte Trägermaterial ist Glimmer, ein kristallines Schichtmaterial, das nach seiner Spaltung nahezu molekular Eben ist (Oberflächenrauhigkeit von ca. 0,1 nm). Im Gegensatz zum neutralen Glas handelt es sich hier um ein negativ geladenes Material, das aber davon abgesehen eine sehr ähnliche Oberflächenchemie wie Glas aufweist. Die AFM-Messungen wurden in Kooperation mit S. Schuy (Institut für Physikalische Chemie, Universität Mainz) durchgeführt.

Da es für die anvisierte konfokale Einzelmolekülspektroskopie notwendig ist, auf Glasoberflächen zu arbeiten, wurde zunächst untersucht, ob die bislang verwendeten Glasoberflächen zur Aufnahme von AFM-Höhenprofilen geeignet sind. Dazu wurde in

## 4 Ergebnisse

einem Vorversuch ungereinigtes, Chromschwefelsäure-gereinigtes sowie APTES-silanisiertes Glas vermessen (Abb. 4.20).

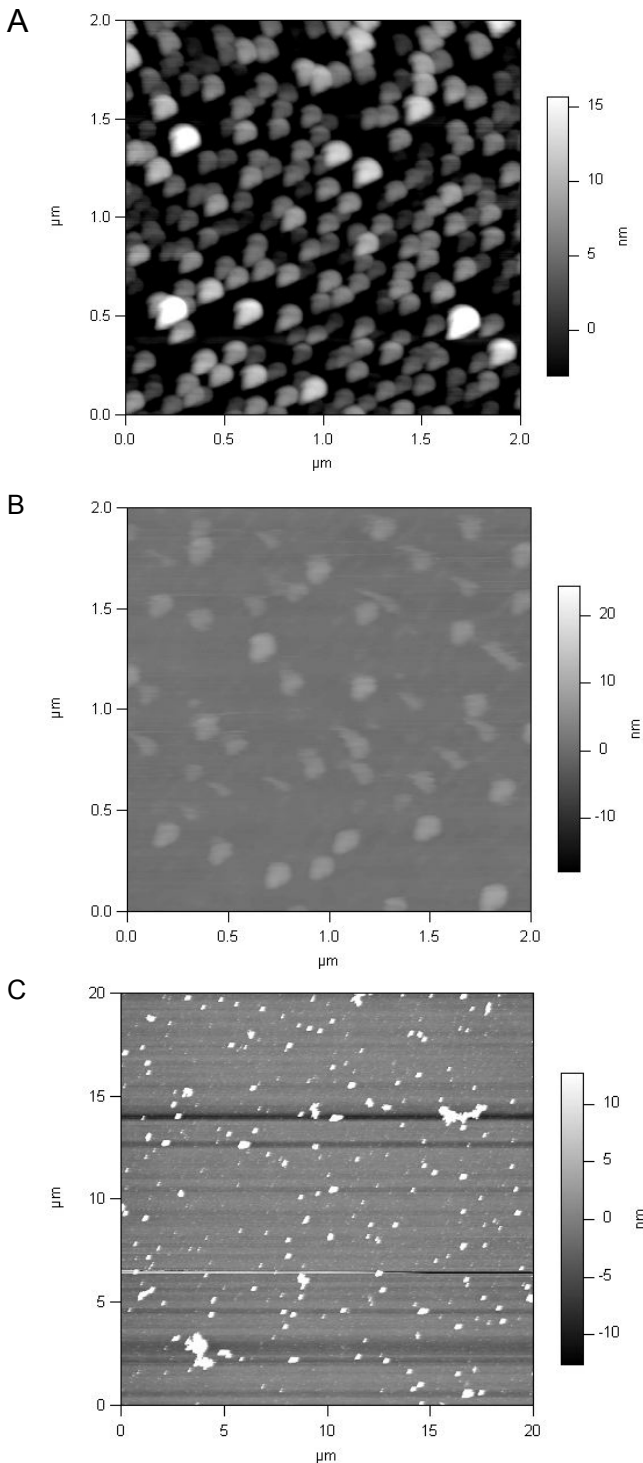


Abb. 4.20: Rasterkraftmikroskopische (AFM) Aufnahmen der zur Immobilisierung verwendeten Glasoberflächen.

(A) Oberfläche vor der Reinigung mit Chromschwefelsäure.

(B) Oberfläche nach Reinigung mit Chromschwefelsäure.

(C) APTES-silanisierte Glasoberfläche (0,5% APTES in Toluol).

Die mit Chromschwefelsäure gereinigte Glasoberfläche zeigt dennoch verbliebene Verunreinigungen. Die silanierte Oberfläche zeigt mit ca. 20 nm eine sehr hohe Rauigkeit, die es unmöglich macht, weitere Beschichtungsschritte im AFM aufzulösen.

Die Oberfläche von ungereinigtem Glas ist geprägt ist von zahlreichen grobkörnigen tropfenförmigen „Plaques“, die eine Höhe von bis zu 15 nm haben und sich als ausgesprochen hartnäckig erweisen, da ein Teil dieser „Plaques“ auch nach Reinigung der Oberfläche im Chromschwefelsäurebad noch vorhanden ist. In der Folge zeigen sich diese

Verunreinigungen auch noch nach der Silanisierung der Glasoberfläche, womit sich diese mit Höhendifferenzen von bis zu 20 nm als ungeeignet für AFM-Messungen erweist, da sich dann die bei der Beschichtung der Oberfläche mit Protein erwarteten Höhendifferenzen von ca. 4-6 nm (= Durchmesser des LHCII) nicht mehr auflösen lassen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde dieser Versuch auf Glimmer-Oberflächen wiederholt, da hier von einer *per se* planaren Oberfläche – die Oberflächenrauigkeit von unfunktionalisiertem gereinigtem Glimmer liegt bei ca. 0,1 nm – ausgegangen werden kann und jede Erhöhung der Rauigkeit daher auf den jeweiligen Beschichtungsschritt zurückzuführen ist (Abb. 4.21).

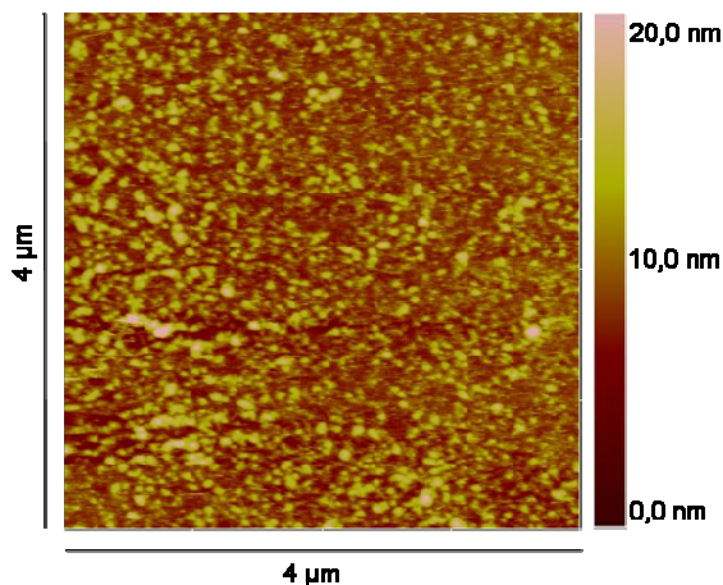


Abb. 4.21: AFM-Aufnahme von silanisiertem Glimmer (Mica) (0,5% APTES in trockenem Toluol). Die Oberfläche zeigt eine Rauigkeit von  $\sim 5,5$  nm mit starker Aggregatbildung, die aufgrund der geringen Oberflächenrauigkeit des Mica ( $\sim 0,1$  nm) auf die Silanisierungsprozedur zurückzuführen ist, wodurch weitere Bindungsschritte nur schwer im AFM darzustellen sind.

Es zeigte sich, dass zumindest ein Teil der auf den silanisierten Glasoberflächen (Abb. 4.20) beobachteten großen Rauigkeit auf die Silanisierungsprozedur zurückzuführen ist, da in diesem Experiment nach der Silanisierung des Glimmers eine durchschnittliche Rauigkeit von ca. 5,5 nm mit Höhendifferenzen von bis zu ca. 20 nm und einer deutlichen Aggregatbildung auf der Oberfläche gemessen wurden. Da dies aufgrund der geringen Eigenrauigkeit des Glimmers ausschließlich auf das Silanisierungsprotokoll zurückzuführen war, war es notwendig, ein besseres Protokoll zur Herstellung von aminofunktionalisierten Oberflächen zu erarbeiten.

Hierzu wurden zwei grundlegende Punkte des bislang verwendeten Silanisierungsprotokolls geändert: Zum einen wurde statt des bisher fast ausschließlich verwendeten APTES das nicht zur Aggregatbildung neigende APDMES (Abb. 4.8) eingesetzt, zum anderen wurde das sehr unpolare Lösungsmittel Toluol gegen das polarere Methanol ausgetauscht, wodurch eine homogenere Lösung des ebenfalls polaren Silans erreicht werden sollte.

## 4 Ergebnisse

Nach diesen Änderungen wurde eine homogene Silanisierung ohne Anzeichen von Aggregatbildung erreicht (Abb. 4.22 A). Darauf basierend wurden auch die weiteren Schritte der LHCII-Oberflächenimmobilisierung im AFM untersucht (Abb. 4.22 B, Abb. 4.23).

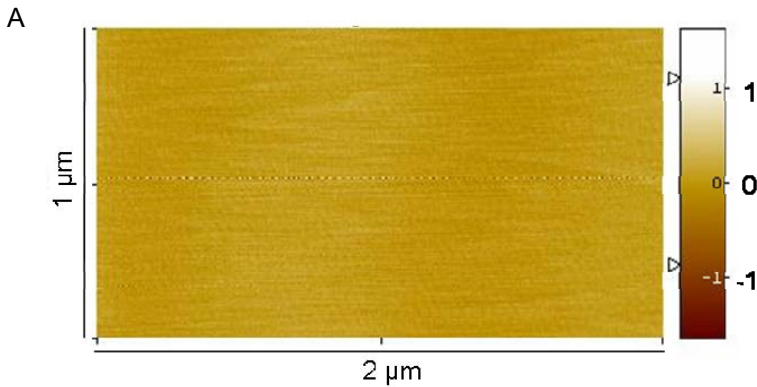


Abb. 4.22 A: AFM-Aufnahme einer mit APDMES in Methanol silanisierten Mica-Oberfläche. Mit einer Rauigkeit von  $\sim 0,1$  nm ist keine Unterscheidung von unfunktionalisiertem Mica möglich.

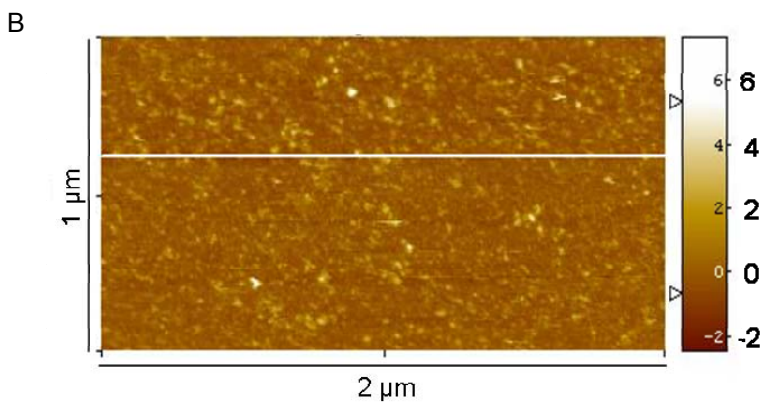


Abb. 4.22 B: AFM-Aufnahme einer biotinylierten APDMES-silanisierten Mica-Oberfläche. Die Rauigkeit beträgt  $\sim 1$  nm und liegt damit über der einer silanisierten Mica-Oberfläche.

Abb. 4.22 A zeigt die APDMES-silanisierte Glimmer-Oberfläche, die von unfunktionalisiertem Glimmer nicht mehr zu unterscheiden ist (Rauigkeit ca. 0,1 nm). Der nächste Beschichtungsschritt – die Biotinylierung der Silan-Oberfläche - führt zu einer Erhöhung der Rauigkeit auf ca. 1 nm (Abb. 4.22 B). Diese Oberfläche zeigt eine sehr homogene Oberflächenstruktur.

In einem weiteren Schritt wurde auf biotinylierte bzw. nicht-biotinylierte APDMES-Oberflächen Neutraavidin gebunden (Abb. 4.23).

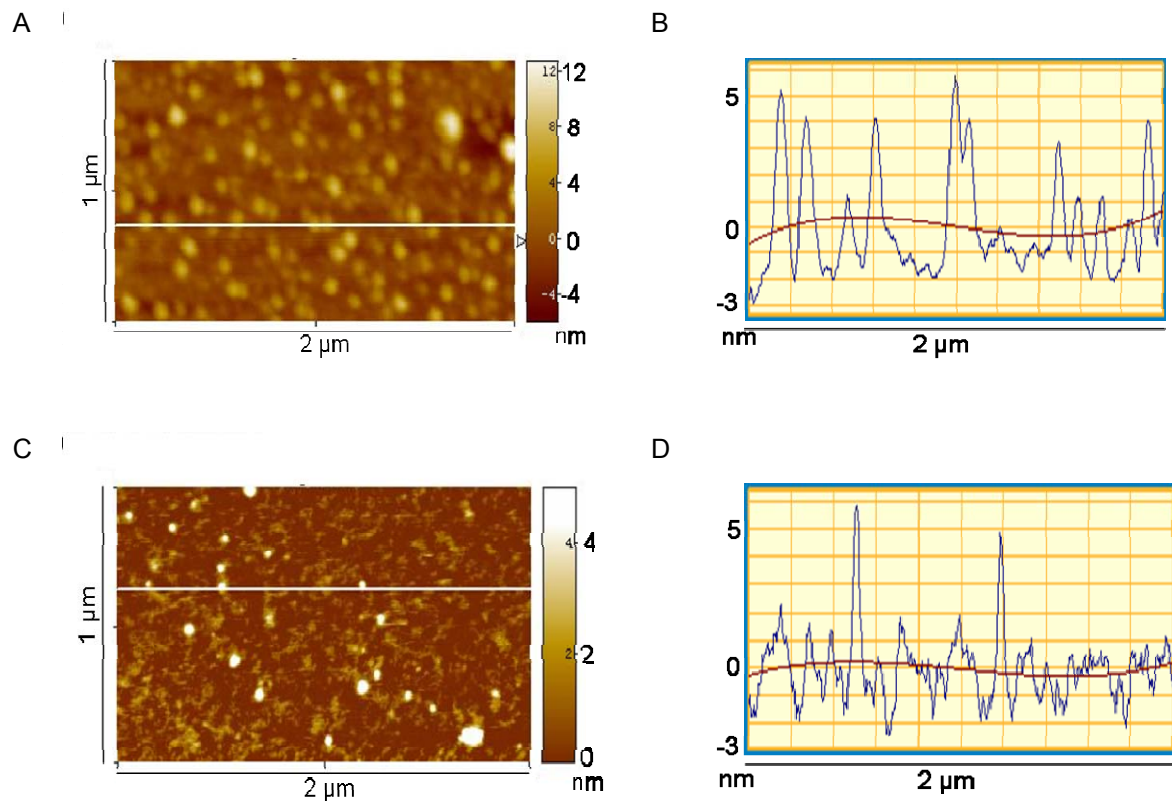


Abb. 4.23: (A) AFM-Aufnahme von auf biotinyliertem Mica immobilisiertem Neutravidin. Die Rauigkeit beträgt  $\sim 6$  nm, die Oberfläche zeigt ein inhomogenes Muster mit einzelnen Spots. (B) Im Höhenprofil entlang der weißen Linie aus Abb. A zeigen sich große Höhenunterschiede von ca. 7 nm zwischen den einzelnen Bereichen, was auf eine unvollständig bedeckte Oberfläche hinweist. (C) AFM-Aufnahme von auf silanisiertem Mica immobilisiertem Neutravidin. Die Rauigkeit beträgt  $\sim 3,5$  nm. (D) Das Höhenprofil entlang der weißen Linie aus Abb. C zeigt ein scharfes Muster mit einzelnen, bis zu 5 nm hohen Peaks.

Hier zeigte sich, dass auch bei der eigentlichen Negativ-Kontrolle ohne Biotin Neutravidin an die Oberfläche gebunden hatte. Allerdings unterscheiden sich die Oberflächenstrukturen und die Höhenprofile der Proben stark voneinander. Die Oberfläche bei Anwesenheit von Biotin zeigte einzelne unscharf erscheinende Spots und ein weiches Höhenprofil mit einzelnen großen Erhebungen, was typisch für Oberflächen mit aufgetragenen Proteinen ist. Die im Höhenprofil dieser Oberfläche (Abb. 4.23 B) sichtbaren „Täler“ weisen auf eine unvollständige, lückenhafte Neutravidinschicht hin, was sich aber experimentell sehr leicht durch eine Erhöhung der Neutravidinkonzentration im Bindungspuffer beheben ließ (Abb. 4.24 A und B). Im Gegensatz dazu zeigt die Oberfläche ohne vorherige Biotinylierung eine völlig andere Oberflächenstruktur und ein scharfes Höhenprofil, was auf ein Denaturieren des Neutravidins aufgrund starker elektrostatischer Wechselwirkungen mit der silanisierten Glasoberfläche hinweist (persönliche Mitteilung von S. Schuy, Institut für Physikalische Chemie).

## 4 Ergebnisse

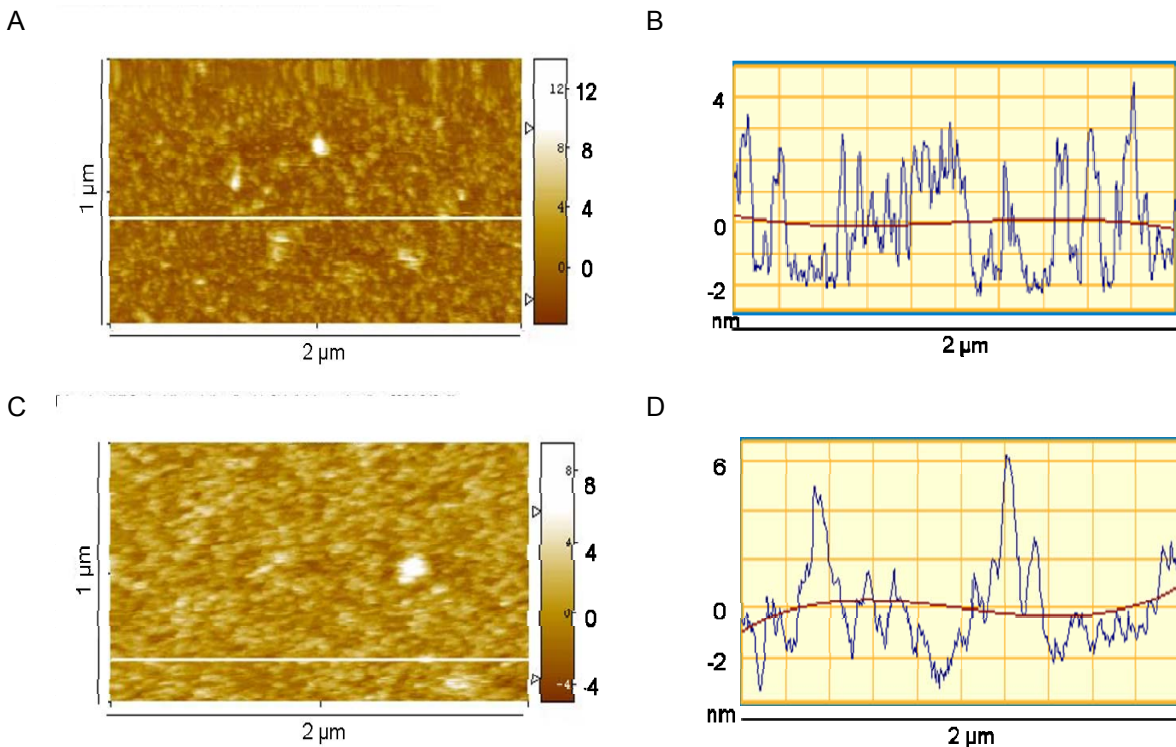


Abb. 4.24: (A) AFM-Aufnahme einer Neutravidin-beschichteten Mica-Oberfläche. Die Rauigkeit beträgt hier ca. 5,5 nm. Anhand der Homogenität der Oberfläche kann auf eine lückenlose Neutravidin-Schicht geschlossen werden. (B) Im Höhenprofil entlang der weißen Linie aus Abb. A zeigt die Neutravidinoberfläche eine über weite Bereiche homogene Verteilung mit nur geringen Höhenunterschieden (ca. 5,5 nm Höhendifferenz). (C) AFM-Aufnahme einer mit biotinyliertem S3C Apoprotein versehenen Neutravidin-Mica-Oberfläche. Die Rauigkeit beträgt ca. 3 nm, wobei einzelne Spots bis zu 8 nm hoch sind. (D) Im Höhenprofil entlang der weißen Linie aus Abb. C zeigen sich im Vergleich mit (B) Veränderungen und eine Erhöhung der Höhenendifferenzen auf ca. 8 nm.

Die Neutravidinoberfläche zeigte jetzt eine sehr homogene Oberflächenstruktur, wie es bei einer geschlossenen Oberflächenbedeckung erwartet wurde.

Allerdings erwies sich die Darstellung einer Koppelung von LHCII Apoprotein an die Neutravidinoberfläche im AFM als sehr schwierig, da sich die beiden Proteinoberflächen (Neutravidin bzw. LHCII Apoprotein) in ihrer Oberflächenstruktur kaum unterscheiden lassen. Einen Hinweis auf eine erfolgreiche Bindung gibt aber die Änderung der Rauigkeit der Oberflächen (Neutravidinoberfläche ca. 5,5 nm; LHCII-Apoproteinoberfläche ca. 8 nm), ohne dass diese aber durch Rasterkraftmikroskopie eindeutig nachgewiesen werden konnte.

#### 4.4.6 Nachweis der spezifischen Immobilisierung von farbstoffmarkiertem biotinyliertem bzw. nicht-biotinyliertem LHCII Apoprotein

Um dennoch festzustellen, ob die Bindung von LHCII Apoprotein auf Neutravidinoberflächen erfolgreich und spezifisch ist, wurde erneut versucht, fluoreszenzfarbstoffmarkiertes biotinyliertes bzw. nicht-biotinyliertes Protein zu binden. Der Nachweis der Bindung erfolgte wie auch schon in früheren Experimenten über die Fluoreszenz des Farbstoffes (Abb. 4.25). Im Vorgriff auf die Rekonstitutionsexperimente mit oberflächenimmobilisierten Proteinen wurde hier zusätzlich zu V229C auch der LHCII-Klon S3Cd49 (Horn, 2004) eingesetzt. Dieser Klon hat aufgrund einer Deletion am C-Terminale Ende der Aminosäurekette die Fähigkeit zu Rekonstitution verloren und wird den Faltungsexperimenten als Negativkontrolle verwendet.

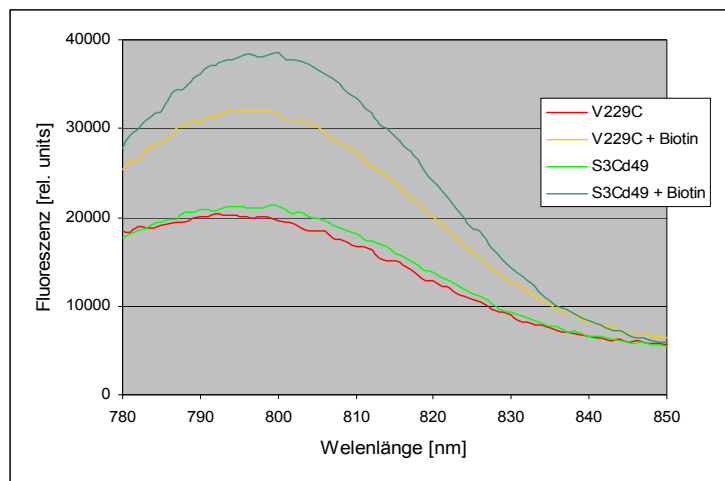


Abb. 4.25: Immobilisierung von DY776-markiertem LHCII Apo-protein auf Neutravidin-Oberflächen. Die Spezifität der Bindung wurde über die Fluoreszenz des Farbstoffes nachgewiesen. Nicht-biotinyliertes Protein zeigt deutlich kleinere Fluoreszenzsignale als die biotinylierten Proben. Anregungswellenlänge 730 nm.

Man kann deutlich erkennen, dass die biotinylierten Proben höhere Fluoreszenzsignale aufweisen, als die nicht-biotinylierten Kontrollansätze. Die Art des LHCII-Klons scheint bei der Oberflächenkoppelung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da jeweils vergleichbare Fluoreszenzen erhalten wurden. Die Bindung von LHCII Apoprotein an Neutravidin-Oberflächen scheint also erfolgreich und spezifisch zu sein.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde das Experiment auch im konfokalen Einzelmolekül-Aufbau durchgeführt (Abb. 4.26), allerdings mit stark verringerten Proteinmengen, um die immobilisierten Proteine vereinzelt auf der Oberfläche vorliegen zu haben.

## 4 Ergebnisse

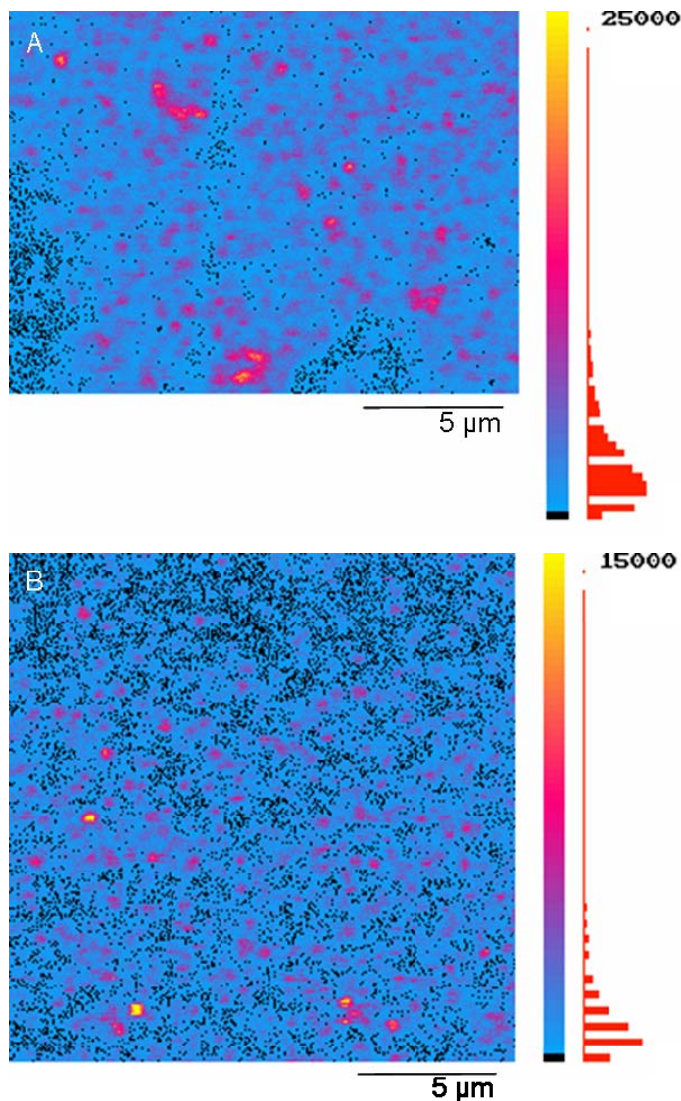


Abb. 4.26: Konfokalmikroskopische Fluoreszenzaufnahmen zur Bindung von LHCII Apoprotein an Neutravidin-Oberflächen: Nicht-biotinyliertes DY776-markiertes S3C Apoprotein (B) zeigt trotz einer 100-fach höheren Konzentration (2 µg/ml bzw. 20 ng/ml) eine geringere Fluoreszenz auf der Oberfläche als biotinyliertes DY776-markiertes HU2 Apoprotein (A). Anregungswellenlänge 720 nm, Integration 4 ms/pixel, Anregungsleistung 30 µW (vor dem Objektiv) Bildgröße 256 x 256 pixel (= 20 x 20 µm)

Trotz einer 100fach höheren Proteinkonzentration im Bindungspuffer zeigen sich bei dem nicht-biotinylierten Protein niedrigere Fluoreszenzwerte als bei biotinyliertem Apoprotein, was auch hier auf eine spezifische Immobilisierung der LHCII Apoproteine hinweist. Anhand des Bleichungsverhaltens wurde festgestellt, dass bei dem immobilisierten biotinylierten Protein keine vereinzelt Farbstoffspots zu beobachten sind, sondern dass diese in mehreren Schritten bleichen.

Um die vorgesehenen Einzelmolekül-Faltungsexperimente durchzuführen, war es daher notwendig, die LHCII Apoprotein-Konzentration im Bindungspuffer weiter zu reduzieren, um sie auf der Glasoberfläche vereinzelt vorliegen zu haben (Abb. 4.27).

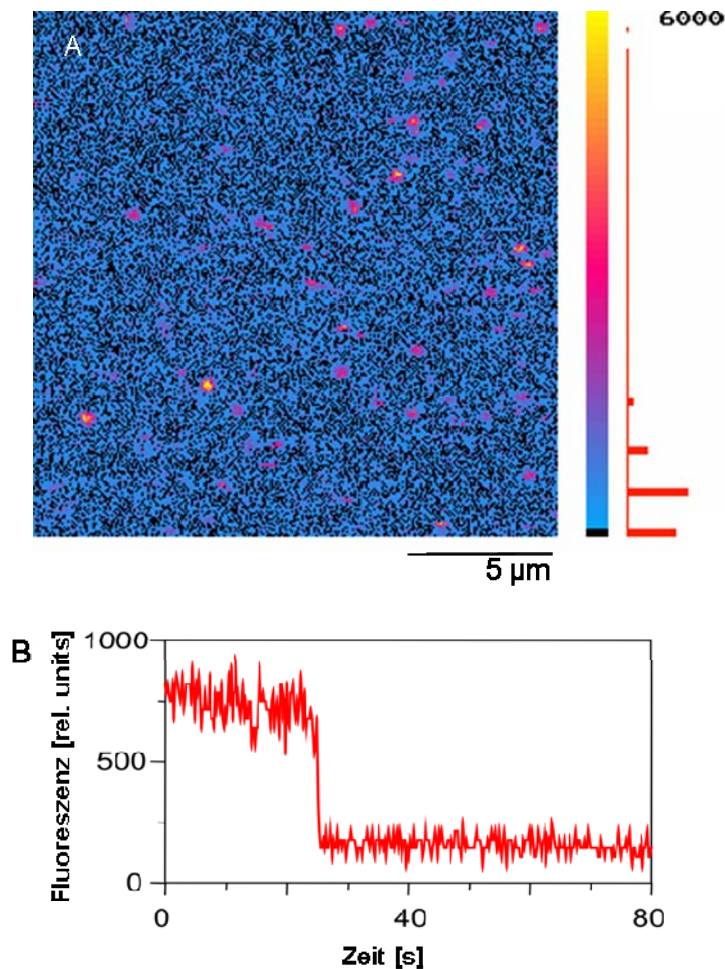


Abb. 4.27: (A) Konfokalmikroskopische Einzelmolekül-Fluoreszenzaufnahmen von auf Neutravidin-Oberflächen immobilisiertem biotinyliertem und DY776-markiertem S3C Apoprotein mit einer Konzentration von 0,2 ng/ml im Bindungspuffer. Es lassen sich einzelne Spots erkennen. Anregungswellenlänge 720 nm, Integration 4 ms/pixel, Anregungsleistung 30  $\mu$ W (vor dem Objektiv) Bildgröße 256 x 256 pixel (= 20 x 20  $\mu$ m). (B) Fluoreszenzverlauf eines einzelnen DY776-Spots über die Zeit. Die Fluoreszenz wird nach etwa 25 s in einem Schritt gelöscht.

Wie man in Abb. 4.27 A gut erkennen kann, nimmt die Anzahl der immobilisierten Proteine mit der Verringerung der Proteinkonzentration im Bindungspuffer ab. Bei einer Konzentration von 0,2 ng / ml kann man vereinzelt immobilisierte Proteine beobachten. Die einzelnen roten Punkte im Bild repräsentieren dabei jeweils ein Protein auf der Oberfläche, was sich anhand einer 1-Schritt-Bleichung belegen lässt (Abb. 4.27 B). Die im Bild unten links sichtbaren gelben Punkte zeigen vermutlich aggregierte Proteine oder eine Verunreinigung im Bindungspuffer. Durch Auszählen der Spots kann eine Belegungsdichte von  $\sim 0,02$  fmol Protein /  $\text{cm}^2$  Glasoberfläche errechnet werden.

Nachdem eine spezifische Immobilisierung von LHCII Apoprotein erreicht wurde, sollten in weiteren Experimenten zum Einen in Lösung rekonstituierte Komplexe immobilisiert und anschließend gezielt denaturiert werden, um zeitaufgelöste Entfaltungskinetiken aufzuzeichnen, zum Anderen sollte eine Methode zur Rekonstitution oberflächenimmobilisierter LHCII Apoproteine etabliert werden, um Faltungskinetiken aufnehmen zu können. Aufgrund der besseren experimentellen Ausgangslage wurde zunächst mit Ersterem weitergearbeitet.

## 4 Ergebnisse

### 4.4.7 Immobilisierung und Denaturierung von rekonstituierten LHCII-Komplexen im Fluorimeter

Nachdem die Immobilisierung von LHCII Apoprotein reproduzierbar funktioniert hat, wurden Experimente zur Immobilisierung von fertig gefalteten LHCII-Komplexen durchgeführt und die Bindung über die Chl-Fluoreszenz kontrolliert. Anschließend sollten die Komplexe entfaltet werden, um zu untersuchen, ob die Bindung an das Neutravidin stabil genug ist, um einer gezielten Denaturierung der immobilisierten Komplexe standzuhalten. Zum Nachweis der Immobilisierung nach der Denaturierung wurden die Proteine mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY776 markiert.

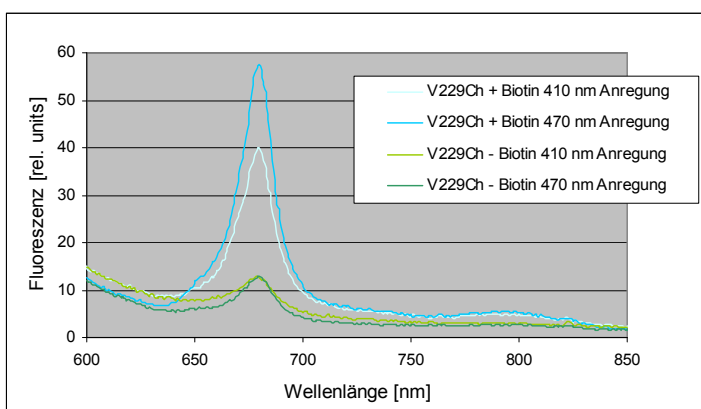


Abb. 4.28: Immobilisierung von rekonstituiertem und über Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation aufgereinigtem DY776-markiertem V229Ch auf Neutravidin-Oberflächen. Biotinylierte Komplexe (+ Biotin) zeigen ein deutlich stärkeres Signal als die nicht-biotinylierte Kontrolle (- Biotin).

Bei den biotinylierten Komplexen mit bzw. ohne Farbstoff zeigten sich deutlich stärkere Fluoreszenzsignale als bei der farbstoffmarkierten, aber biotinfreien Kontrolle, was auf eine spezifische Bindung der Komplexe hinweist. Anhand des auch nach der Oberflächenimmobilisierung stattfindenden Energietransfers von Chl b auf Chl a kann davon ausgegangen werden, dass die Komplexe in funktionellem Zustand auf der Oberfläche vorliegen.

Um die Stabilität der Bindung zu zeigen, wurden die Komplexe auf der Oberfläche gezielt durch Zugabe von 1% SDS denaturiert. Bei einer stabilen Bindung sollten die Proteine über den kovalent an das Protein gebundenen Fluoreszenzfarbstoff auch nach der Denaturierung noch nachzuweisen sein (Abb. 4.29).

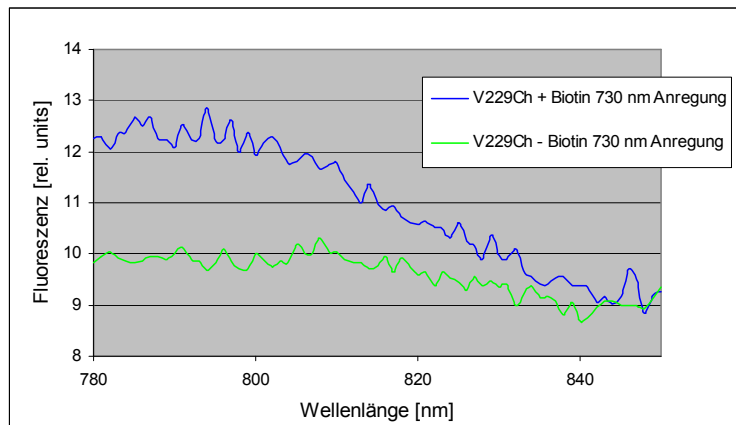


Abb. 4.29: Fluoreszenzspektren nach der Denaturierung der immobilisierten Komplexe aus Abb. 4.28. Nach SDS-Denaturierung können die immobilisierten entfaltenen biotinylierten Apoproteine über die DY776-Fluoreszenz nachgewiesen werden, wodurch die Stabilität der Bindung gegenüber SDS gezeigt wurde. Anregungswellenlänge 730 nm

In den Fluoreszenzspektren nach der Denaturierung der Komplexe konnte bei direkter Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes gezeigt werden, dass nur im Falle des biotinylierten Proteins ein Signal erhalten wird, während bei nicht-biotinyliertem Protein nur eine Basislinie zu sehen ist. Die Bindung zwischen dem biotinylierten Protein und dem Neutraavidin auf der Glasoberfläche ist also spezifisch und stabil genug, um auch stringente Bedingungen zu überstehen, da ein Großteil des immobilisierten Proteins auch nach der Denaturierung noch auf der Oberfläche nachgewiesen werden konnte. Dies ist die Voraussetzung für die Rekonstitution oberflächenimmobilisierter LHCII Apoproteine.

#### 4.4.8 Immobilisierung und Denaturierung von rekonstituierten LHCII-Komplexen im Einzelmolekül-TIRF-Aufbau

Die Abkürzung TIRF (*total internal reflection fluorescence*) bezeichnet eine besondere Form der Fluoreszenzmikroskopie. Durch den speziellen Einfallswinkel des Anregungslasers oberhalb des kritischen Winkels auf einen Objektträger wird dieser an der Glasoberfläche vollständig reflektiert (Abb. 1.6). Dadurch entsteht auf der Oberfläche des Glases ein sog. evaneszentes Feld, das typischerweise eine Dicke von 150 – 200 nm besitzt und mit zunehmendem Abstand von der Oberfläche exponentiell abfällt. Innerhalb dieses evaneszenten Feldes kommt es zu einer Fluoreszenzanregung der darin befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe, während die Moleküle, die sich außerhalb dieses Feldes befinden, nicht angeregt werden. Durch diesen Effekt können höhere Auflösungen bei gleichzeitig deutlich geringerem Hintergrund erreicht werden.

Zunächst sollte untersucht werden, ob sich die auf Neutraavidin-Oberflächen immobilisierten LHCII-Komplexe im Einzelmolekül-TIRF-Aufbau gut beobachten lassen, und ob es sich um einzelne Komplexe handelt, was sich wie auch schon in den vorher gezeigten

## 4 Ergebnisse

Einzelmolekül-Aufnahmen von immobilisierten Apoproteinen am Bleichverhalten feststellen lässt.

Die Beobachtung der Komplexe nach der Immobilisierung erfolgte in Lösung in einer Flusszelle (Abb. 4.30).

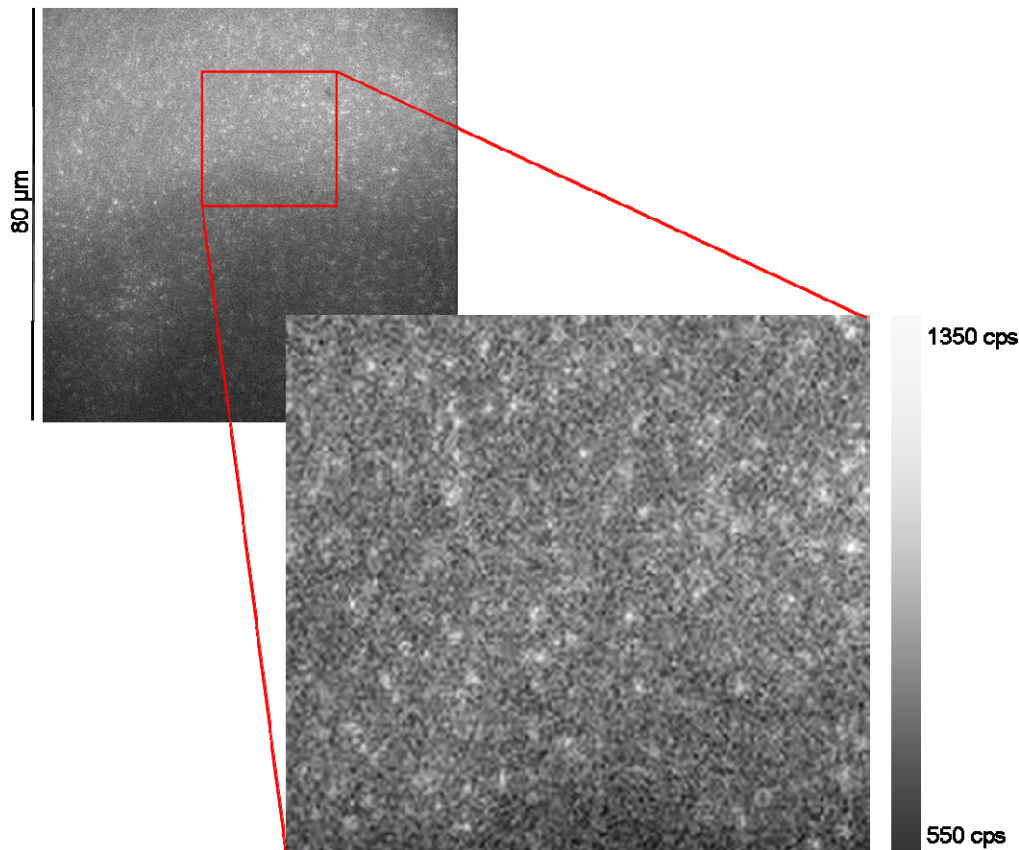


Abb. 4.30: Fluoreszenz-spektroskopische Aufnahme immobilisierter rekonstituierter S3C-Monomere im TIRF-Aufbau. Die hellen Spots repräsentieren jeweils die Chlorophyllfluoreszenz einzelner Monomere, was durch deren Bleichverhalten in nur einem Schritt bei Belichtung bestätigt wird. Anregungswellenlänge 488 nm, Leistung 1 mW, Integration 150 ms / Bild, 540 nm Filter.

Wie in Abb. 4.30 zu erkennen ist, lassen sich die immobilisierten Komplexe gut im einzelmolekularen Maßstab beobachten. Jeder einzelne der in der Aufnahme zu sehenden hellen Punkte stellt einen einzelnen Komplex dar, was durch das beobachtete Ein-Schritt-Bleichverhalten bestätigt wird.

Anschließend wurde die Flusszelle mit Denaturierungspuffer gespült, um zu zeigen, dass es sich bei den Spots tatsächlich um LHCII-Komplexe handelt. Die Denaturierung wurde nachvollzogen, indem in verschiedenen Zeitabständen nach Zugabe des Puffers Aufnahmen von der Oberfläche gemacht wurden (Abb. 4.31).

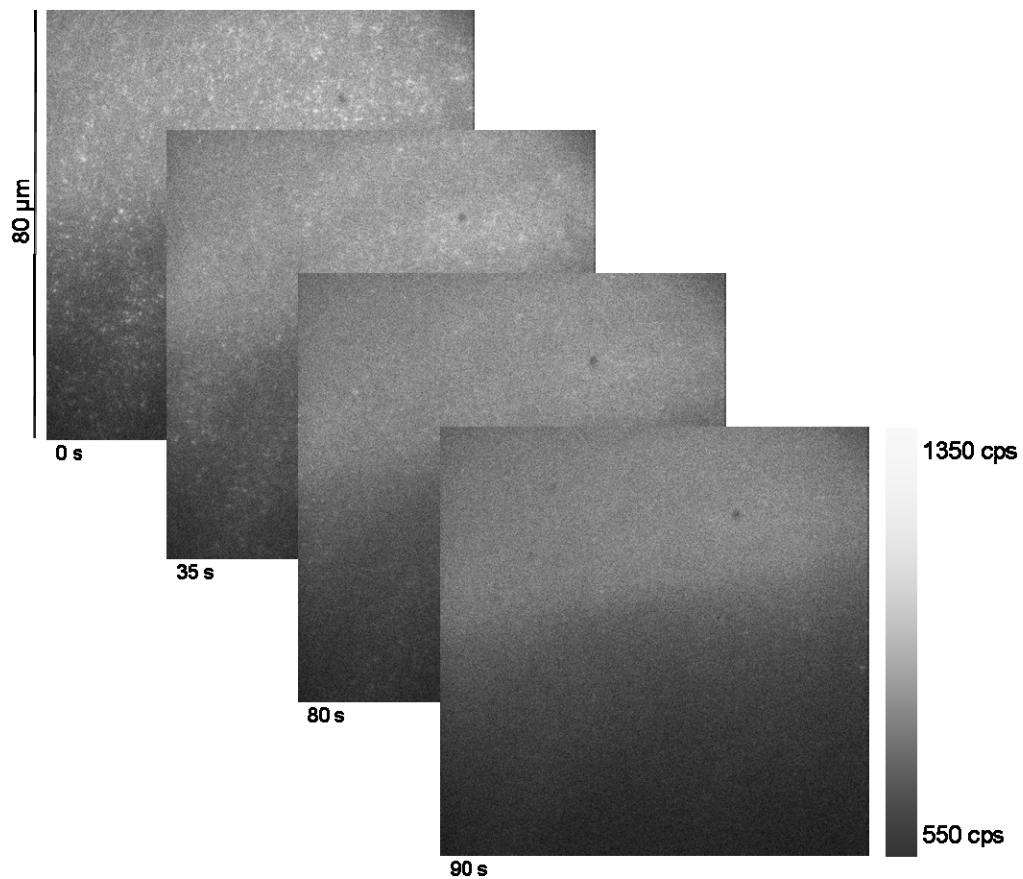


Abb. 4.31: Einzelmolekül-TIRF-Aufnahmen zur kontrollierten Dissoziation rekonstituierter S3C Komplexe zur Aufzeichnung von Zerfallskinetiken. Die beschichteten Oberflächen wurden nach dem Einbau in die Apparatur mit Denaturierungspuffer gespült. Nach etwa 90 s war keine Chlorophyllfluoreszenz mehr detektierbar. Anregungswellenlänge 488 nm, Leistung 1 mW, Integration 150 ms / Bild, 540 nm Filter.

Anhand der Spots in den Aufnahmen von Abb. 4.31 kann die Denaturierung der Komplexe nachvollzogen werden. Nach etwa 90 s können keine Spots mehr detektiert werden, was einer vollständigen Denaturierung aller Komplexe entspricht. Ein Nachteil dieser Serie ist die Tatsache, dass die Oberfläche zwischen den Aufnahmen abgedunkelt wurde, um ein Ausbleichen der Komplexe aufgrund der Laserstrahlung zu vermeiden. Bei dauerhafter Belichtung zeigte sich, dass die Komplexe lediglich über einen Zeitraum von ca. 15 s stabil sind, was für die Aufnahme von Zerfallskinetiken nicht ausreichend ist (Abb. 4.32).

## 4 Ergebnisse

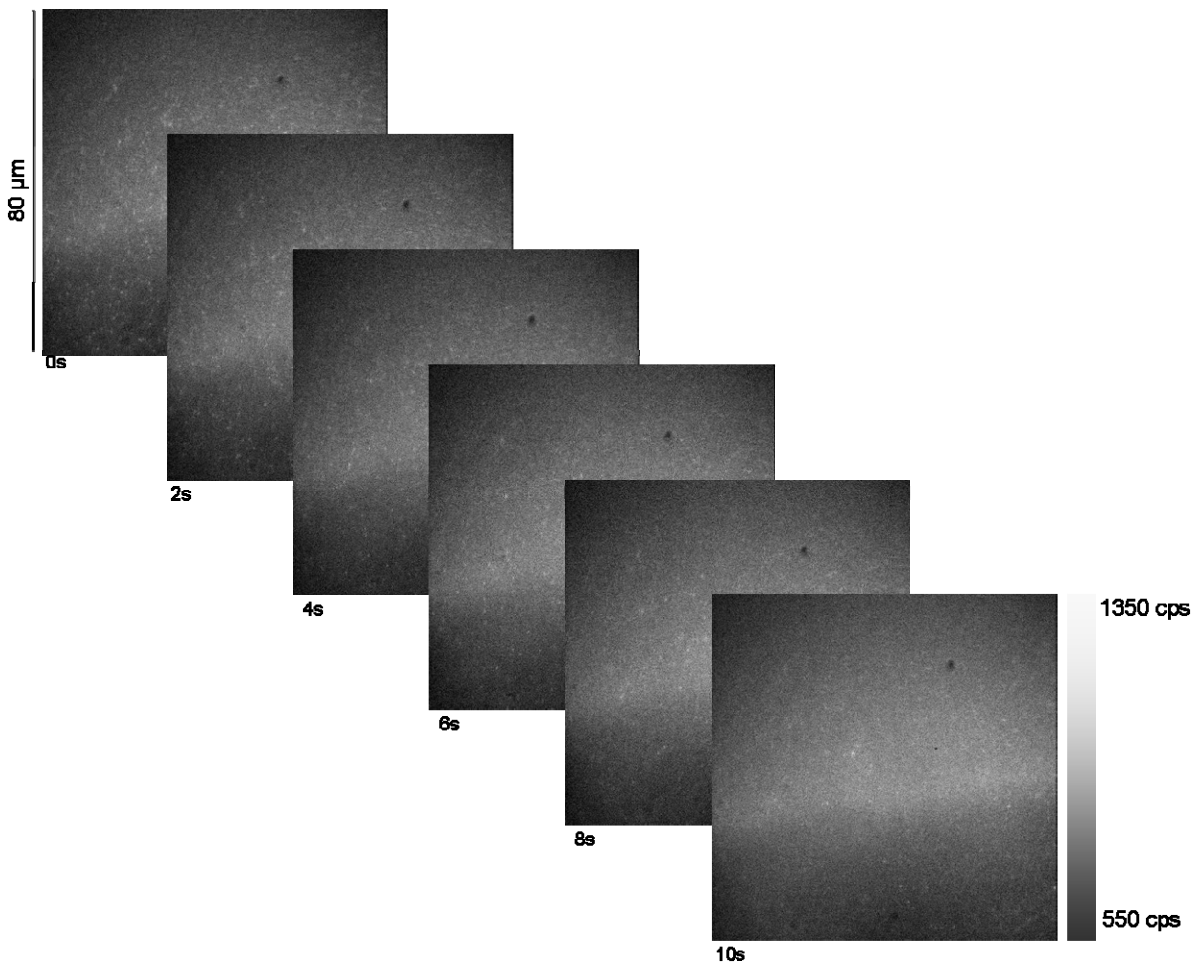


Abb. 4.32: Zeitaufgelöste Einzelmolekül-TIRF-Aufnahme von immobilisierten rekonstituierten S3C Komplexen. Nach etwa 10 s ist ein Großteil der Spots ausgebleicht. Anregungswellenlänge 488 nm, Leistung 4 mW, Integration 100 ms / Bild, 540 nm Filter.

Es ist zu erkennen, dass schon nach ca. 10 s die meisten der Komplexe gebleicht und daher nicht mehr zu sehen sind. Es ist daher unter diesen Bedingungen nicht möglich, den Denaturierungsprozeß zeitaufgelöst zu beobachten, da sich im vorherigen Experiment (Abb. 4.31) eine Dauer von 90 s bis zur vollständigen Denaturierung aller Komplexe nach Zugabe des Denaturierungspuffers gezeigt hat. Es kommt zu einer Überlagerung der Denaturierung durch den Puffer mit der Photooxidation durch die Belichtung mit dem Anregungslaser. In den folgenden Experimenten wurde daher an der Verlängerung der Lebensdauer der Komplexe gearbeitet.

Eine Möglichkeit zur Stabilisierung besteht in der Zugabe von Reduktionsmitteln, um eine Oxidation der Pigmente zu vermeiden. Zusätzlich kann auch Stickstoff in die Lösung eingeblasen werden, um Sauerstoff als potentielles Oxidationsmittel auszuschließen. Darüber hinaus wurde die Integrationszeit pro Bild erhöht, damit im Gegenzug die Anregungsleistung verringert werden kann. Mit diesen Änderungen an der

Versuchsdurchführung wurde ein erneuter Versuch unternommen, zeitaufgelöste Aufnahmen der Komplexdenaturierung aufzuzeichnen (Abb. 4.33).

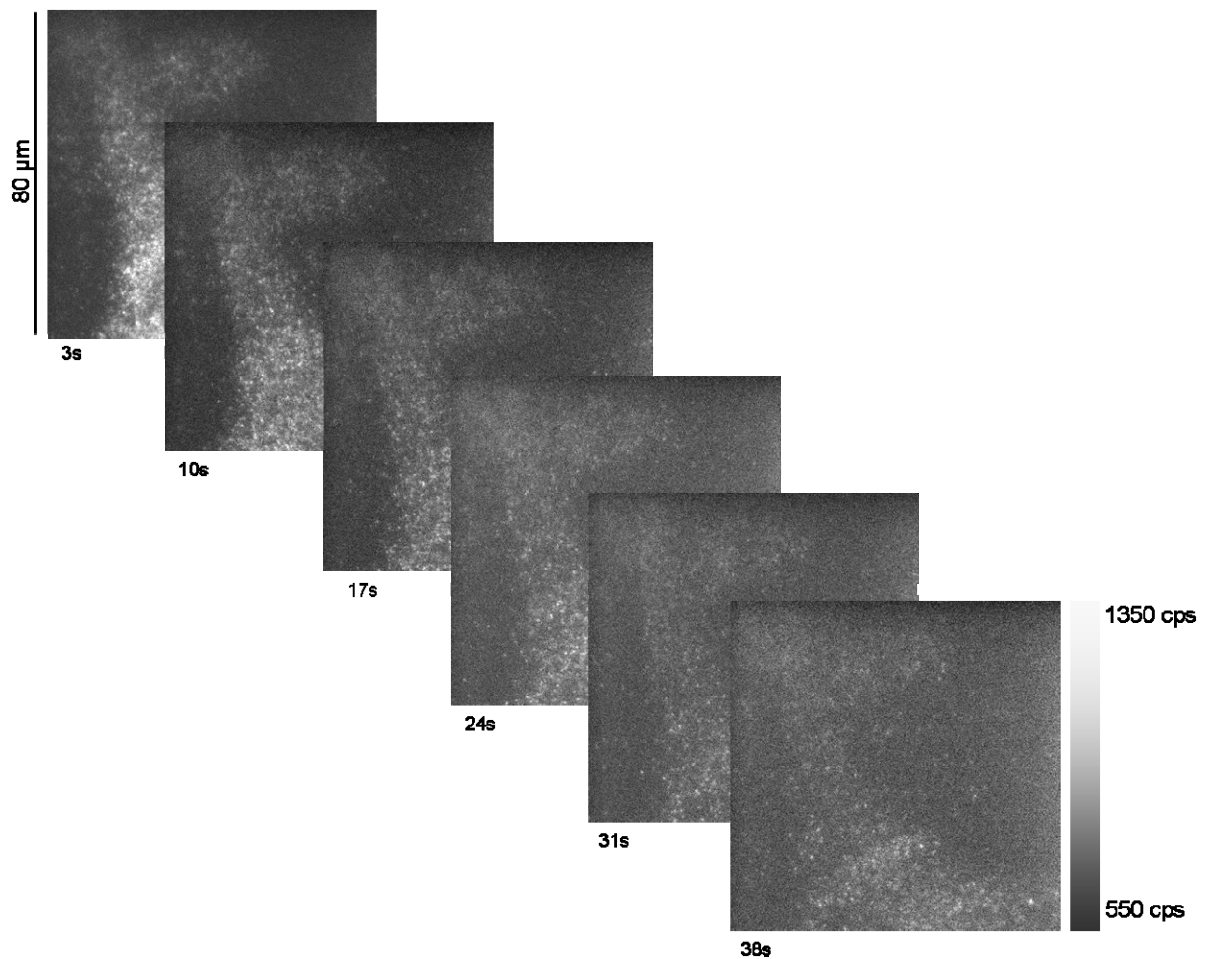
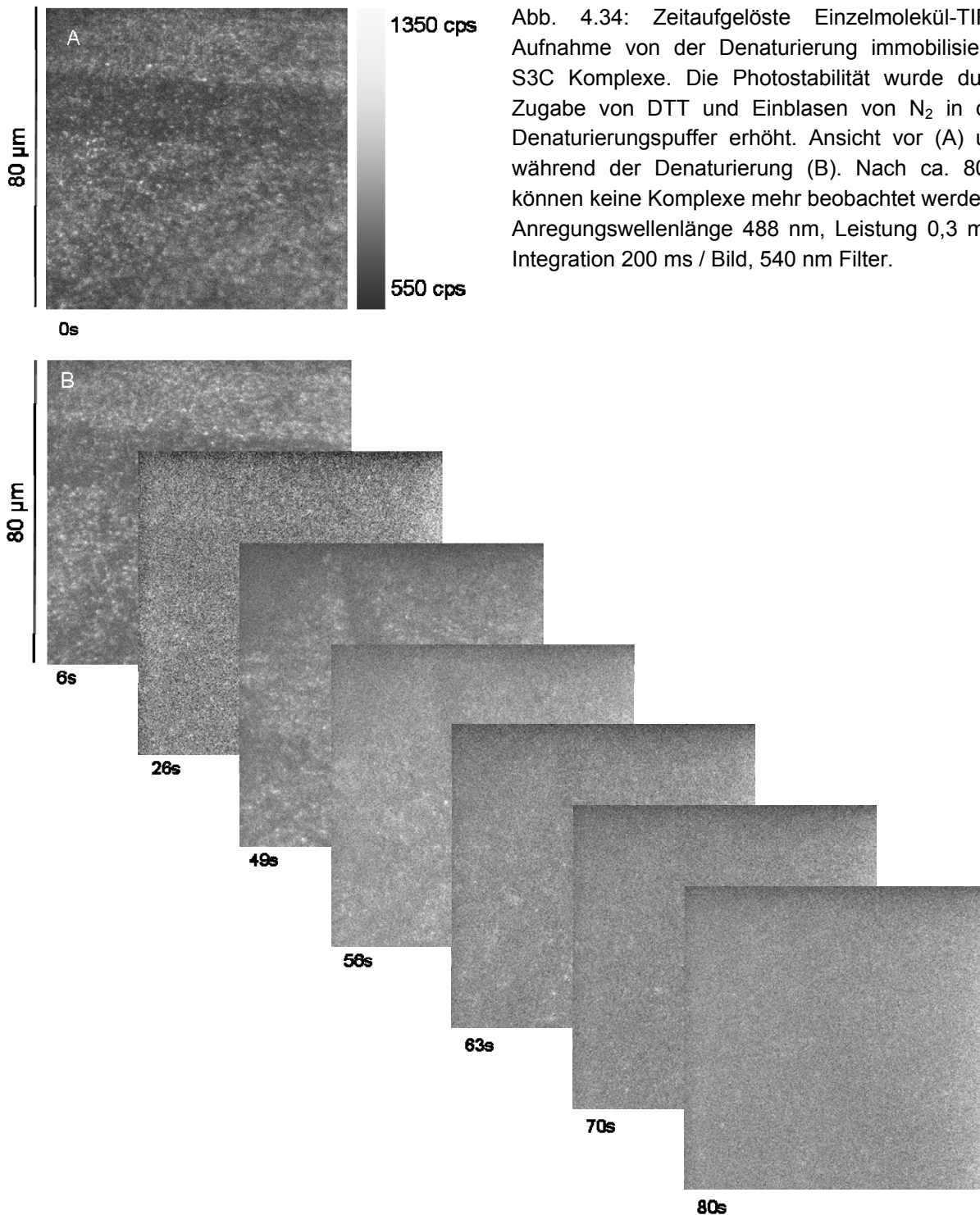


Abb. 4.33: Zeitaufgelöste Einzelmolekül-TIRF-Aufnahme von immobilisierten rekonstituierten S3C Komplexen. Durch Zugabe des Reduktionmittels DTT und einblasen von  $N_2$  in den Puffer kann die Photooxidation durch die Laser-Belichtung hinausgezögert werden. Nach etwa 38 s ist ein Großteil der Komplexe ausgebleicht.

Anregungswellenlänge 488 nm, Leistung 0,3 mW, Integration 200 ms / Bild, 540 nm Filter.

Es zeigte sich, dass mit den oben erwähnten Veränderungen eine deutliche Erhöhung der Komplexstabilität erreicht werden konnte, da erst nach ca. 38 s der Großteil der Spots verschwunden war, womit sich die Stabilität der Komplexe durch die oben genannten Maßnahmen mehr als verdoppelt hat (Abb. 4.33). Tatsächlich ist aber auch zu beobachten, dass das Bleichen der Komplexe zwar verlangsamt wurde, aber der Beginn dieses Prozesses nicht verzögert wird, so dass die Photostabilität der Komplexe für die nachfolgenden Denaturierungsexperimente (Abb. 4.34) noch nicht ausreichend war zur Aufzeichnung von Zerfallskinetiken.

## 4 Ergebnisse



Aufgrund vergleichbarer Lebensdauern der Komplexe bei der Photooxidation und bei der durch Zugabe von Detergenspuffer induzierten Denaturierung kann unter diesen Bedingungen keine Aussage über die gezielte Entfaltung der Komplexe getroffen werden. (vergleiche Abb. 4.33 und Abb. 4.34).

Eine weitere in Abb. 4.34 B zu erkennende Schwierigkeit stellte auch der Fokusverlust beim Einspritzen des Denaturierungspuffers in die Flusszelle dar (Abb. 4.34 B, 49 s), der einerseits durch ein Verstellen des Objektisches, andererseits vor allem durch ein

Aufwölben des Deckgläschens in der Flusszelle durch den Druck, der durch den einströmenden Puffer verursacht wird, bedingt ist. Für diese Problematik sollte für zukünftige Experimente eine Lösung erarbeitet werden.

Es konnte in diesen Experimenten also gezeigt werden, dass ein gezieltes Denaturieren immobilisierter Komplexe durch Zugabe von denaturierenden Puffern möglich ist. Eine Unterscheidung zwischen einem pufferinduzierten Zerfall der Komplexe und einem Ausbleichen der Komplexe aufgrund der Laserstrahlung war aufgrund der trotz aller Maßnahmen zu kurzen Lebensdauer der Komplexe nicht möglich.

Parallel zu diesen Denaturierungsexperimenten wurde auch am Hauptziel dieser Arbeit, der Aufnahme von zeitaufgelösten Faltungskinetiken einzelner LHCII-Proteine gearbeitet.

#### **4.4.9 Rekonstitution von oberflächenimmobilisierten LHCII Apoproteinen im Fluoreszenzspektrometer**

Ein erster Ansatz zur Rekonstitution von oberflächenimmobilisierten LHCII Apoproteinen war die Übertragung des eigentlich für Ni<sup>2+</sup>-Säulen entwickelten Protokolls von Rogl *et al.* (1998) (siehe Abschnitt 4.1) auf die Neutravidin-Glasoberflächen. Der Erfolg dieser Experimente wurde nach dem Waschen fluoreszenzspektroskopisch untersucht (Abb. 4.35).

## 4 Ergebnisse

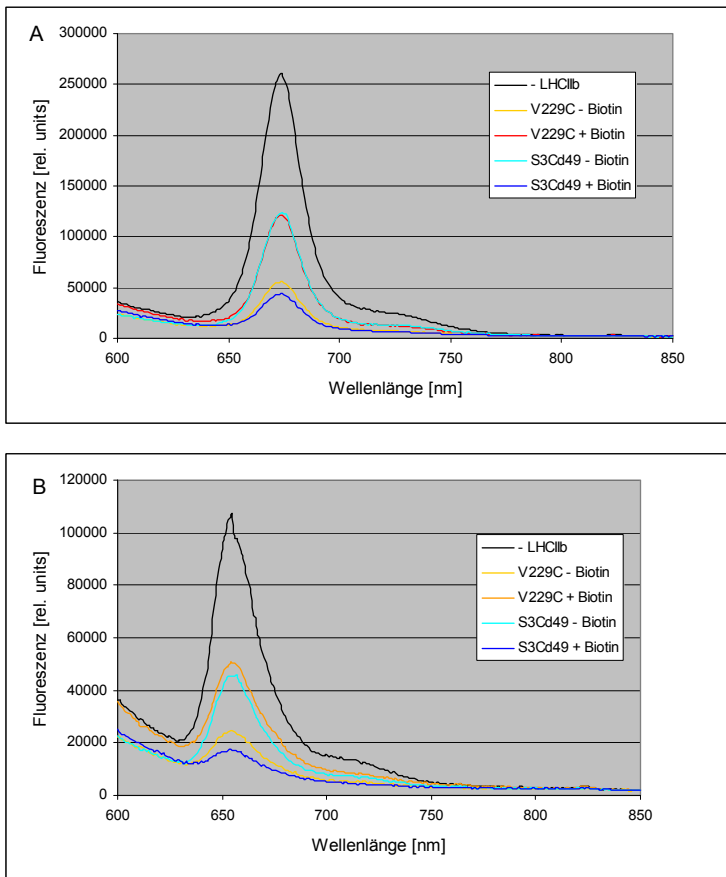


Abb. 4.35: Fluoreszenzspektren von oberflächenimmobilisiertem DY776-markiertem V229Ch nach Rekonstitution nach Rogl *et al.* (1998).

(A) Bei Chl a-Anregung (410 nm) zeigen alle Ansätze ein für freies Chl a typisches Maximum bei 675 nm.

(B) Bei Chl b-Anregung (470 nm) liegt das Maximum aller Proben bei 655 nm.

Die LHCII-freie Kontrolle zeigt bei beiden Anregungswellenlängen die stärksten Signale. Die nicht-biotinylierten Proben zeigen niedrigere Signale als die biotinylierten Proben.

Wie in Abb. 4.35 zu erkennen, zeigt sich in keinem der Versuchsansätze eine Energieübertragung von Chl b auf Chl a. Bei Chl a-Anregung zeigt sich ein für freies Chl a typisches Fluoreszenzmaximum bei 675 nm, bei Chl b-Anregung zeigt sich vor allem das für freies Chl b typische Maximum bei 655 nm. Eine Energieübertragung zwischen den Chlorophyllen sowie auf den an den Proteinen angebrachten Fluoreszenzfarbstoff ist ebenfalls nicht zu beobachten, so dass eine Überlagerung der Komplexfluoreszenz durch freies Pigment ausgeschlossen werden kann. Es hat also keine Rekonstitution stattgefunden. Da sich das von Rogl *et al.* (1998) veröffentlichte Protokoll nicht direkt auf die Glasoberflächen übertragen ließ, wurden verschiedene Variationen getestet, um doch noch eine erfolgreiche Rekonstitution auf der Glasoberfläche zu erreichen. Trotz verschiedener Abwandlungen wurden allerdings in keinem der Ansätze Anzeichen für rekonstituierte Komplexe gefunden.

Daher wurde entschieden, eine Rekonstitution durch Detergenzmischung zu erreichen. Das immobilisierte Apoprotein wurde in ein Gemisch der Detergenzien OG und SDS (0,2% SDS / 1% OG) überführt und anschließend in OG gelöstes Pigment auf die Gläschen gegeben. Das Waschen erfolgte anschließend mit einem LM-haltigen Puffer, da die Komplexe in diesem Detergenz stabiler sind als im von Rogl *et al.* (1998) verwendeten

Triton X-100. Der Erfolg dieser Methode wurde über Fluoreszenzspektroskopie kontrolliert (Abb. 4.36).

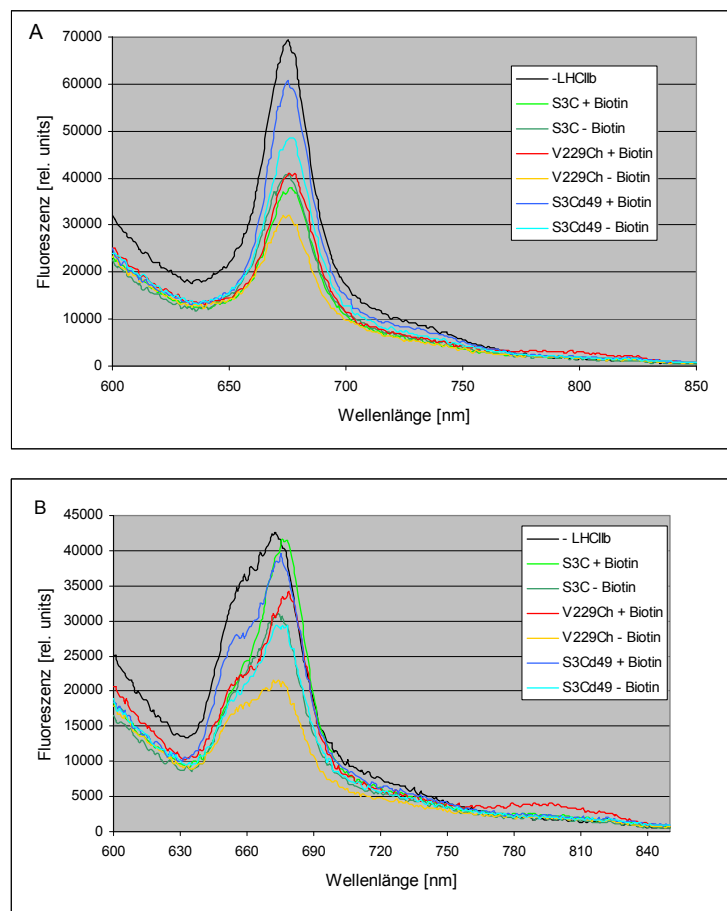


Abb. 4.36: Fluoreszenzspektren der Rekonstitution oberflächenimmobilisierter DY776-markierter LHCII Apoproteine durch Zugabe von pigmenthaltigem OG-Puffer zu in 0,2% SDS / 1% OG-Micellen befindlichem Protein. Nach der Rekonstitution wurde mit LM-Puffer gespült, um freies Pigment von der Oberfläche abzuwaschen. (A) Bei Chl a-Anregung streuen die Maxima zwischen 674 und 679 nm, bei V229Ch + Biotin erscheint zusätzlich ein sehr schwacher Peak bei ca. 800 nm.

(B) Bei Chl b-Anregung liegen die Maxima im gleichen Bereich wie bei Chl a-Anregung, zusätzlich zeigt sich aber eine stark ausgeprägte Chl b-Schulter bei ca. 655 nm. Bei V229Ch + Biotin zeigt sich ein weiterer Peak bei ca. 800 nm.

In diesem Versuchsansatz zeigte sich bei Chl a-Anregung, dass die einzelnen Peaks nicht bei einer einheitlichen Wellenlänge, sondern zwischen 674 und 679 nm gestreut lagen. Zusätzlich zeigte sich auch bei der V229Ch + Biotin ein schwacher Peak bei ca. 800 nm, der durch den Fluoreszenzfarbstoff verursacht wird. Bei Chl b-Anregung zeigte sich, dass alle Proben einen mehr oder weniger starken Energietransfer auf Chl a zeigen, auch hier streuten die Peaks zwischen 674 und 679 nm. V229Ch + Biotin zeigt auch hier den zusätzlichen Peak bei ca. 800 nm, der durch einen Energietransfer von den Chlorophyllen auf den Fluoreszenzfarbstoff zustande kommt, was zumindest bei diesem LHCII-Klon auf eine erfolgreiche Rekonstitution schließen lässt.

Um diese Ergebnisse noch zu verbessern, sollte im nächsten Schritt eine „richtige“ Detergensmischrekonstitution durchgeführt werden, indem das Apoprotein auf der Glasoberfläche vor der Zugabe der Pigmente in SDS und nicht in einem Detergensgemisch vorliegt. Eine Durchmischung der Detergentien erfolgt erst durch die Zugabe der in OG-Puffer gelösten Pigmente.

## 4 Ergebnisse

Hierzu wurde zunächst ein Vorversuch im Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt, bei dem zu in SDS-solubiliertem LHCII Apoprotein Pigmente in OG-Puffer hinzugegeben wurden. Von jedem Klon wurden jeweils zwei Versuchsansätze durchgeführt, von denen einer auf dem Vortexer gemischt, der andere nur mit Hilfe einer Pipette durchmischt wurde, wodurch gezeigt werden sollte, dass eine gründliche und schnelle Durchmischung nicht entscheidend für eine erfolgreiche Rekonstitution ist (Abb. 4.37).

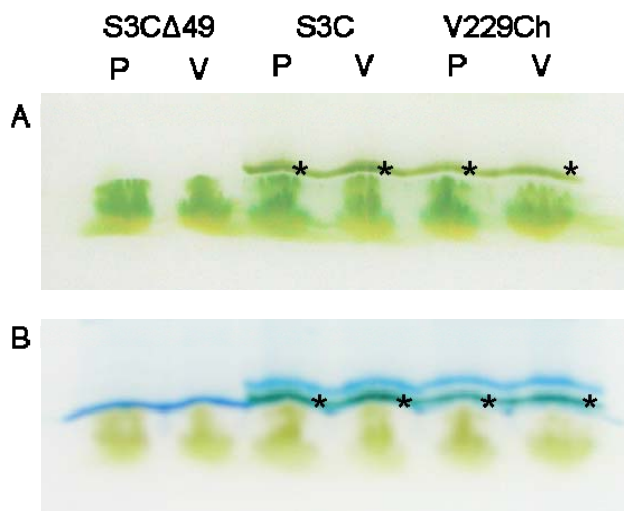


Abb. 4.37: Schwach denaturierende Gelelektrophorese eines Rekonstitutionsansatzes analog zur Rekonstitution immobilisierter LHCII Apoproteine (A). Pigmenthaltiger OG-Puffer wurde unter leichtem durchmischen mit der Pipette (P) bzw. auf dem Vortexer (V) zu SDS-solubiliertem LHCII Apoprotein gegeben, 30 min bei RT stehen gelassen und anschließend auf das Gel aufgetragen. Bei allen Proben zeigt sich eine breite Bande mit freien Pigmenten, bei S3C und V229Ch ist noch eine weitere pigmentierte Bande zu erkennen, die bei der Negativkontrolle mit S3CΔ49 fehlt. In der Coomassie-Färbung (B) zeigt sich, daß die zuvor pigmentierte Bande bei S3C und V229Ch proteinhaltig ist.

Wie in Abb. 4.37 A zu erkennen, zeigt sich bei den Klonen S3C und V229Ch oberhalb der Bande mit den freien Pigmenten, die bei allen Proben zu sehen ist, sowohl im auf dem Vortexer gemischten Ansatz als auch im nur mit der Pipette durchmischten Ansatz eine weitere pigmentierte Bande (mit \* markiert). Da diese Bande bei S3CΔ49 fehlt und dieser Klon durch eine C-terminale Deletion die Fähigkeit zur Rekonstitution verloren hat, kann von einer erfolgreichen Rekonstitution ausgegangen werden. Um zu untermauern, dass es sich hier tatsächlich um rekonstituierte LHCII-Komplexe handelt, wurde das Gel anschließend mit Coomassie angefärbt (Abb. 4.37 B). Es konnte gezeigt werden, dass in den zuvor pigmentierten Banden bei S3C und V229Ch Protein enthalten ist (mit \* markiert). Zusätzlich erscheint nach der Coomassie-Färbung bei allen Proben eine Bande, die im grünen Gel nicht sichtbar war, hierbei handelt es sich um nicht-gefaltetes freies Protein. Aufgrund der C-terminalen Deletion läuft das S3CΔ49-Apoprotein im Gel etwas weiter als die S3C und V229Ch-Apoproteine.

Unter den hier gewählten Bedingungen erfolgte also eine Rekonstitution in Lösung durch einfaches Mischen der Protein- und der Pigmentlösung. Im nächsten Schritt wurde daher

dieses Rekonstitutionsprotokoll auf die auf der Glasoberfläche immobilisierten Proteine übertragen.

Vor Rekonstitutionsexperimenten auf den Glasoberflächen wurden in einem weiteren Vorversuch die Auswirkungen der Waschschritte auf immobilisierte Komplexe untersucht. Bei diesen Experimenten ging es darum, auszuschließen, dass die Rekonstitution an sich erfolgreich ist, die Komplexe aber bei den anschließenden Waschschritten zur Entfernung freier Pigmente wieder zerstört („kaputtgewaschen“) werden. Dazu wurden in Lösung rekonstituierte Komplexe vor der Aufreinigung (d.h. mit einem Überschuss an freiem Pigment) auf Neutravidin-Oberflächen immobilisiert und die freien Pigmente mit OG- bzw. LM-Puffer abgewaschen und anschließend die Intaktheit der Komplexe über die Fluoreszenz kontrolliert (Abb. 4.38). Als Kontrolle dienten nicht-biotinylierte Proteine.

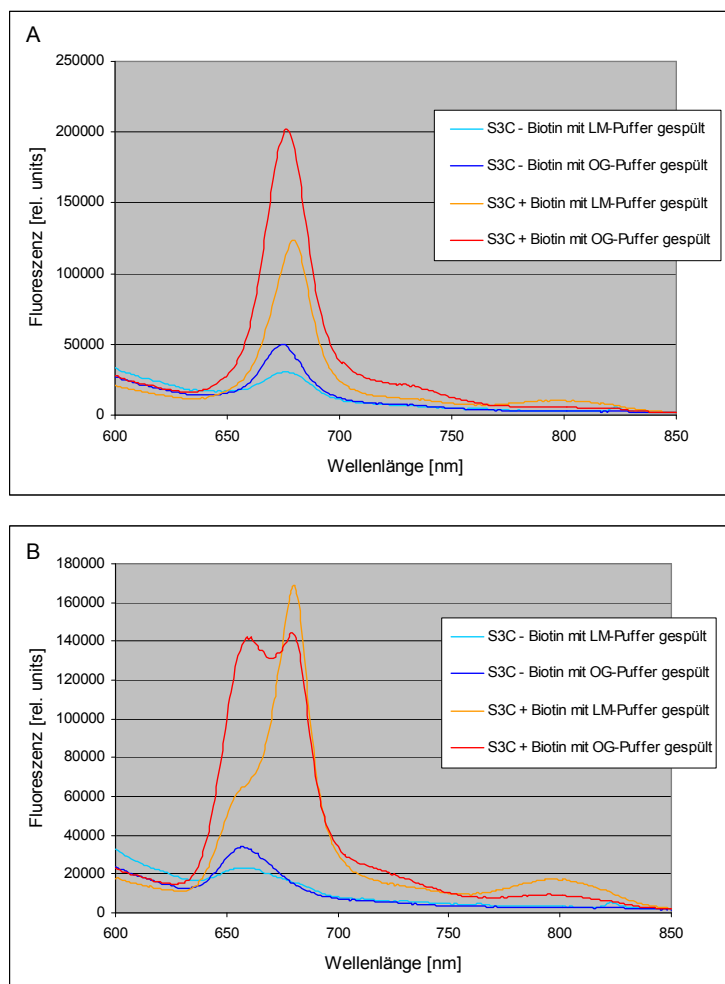


Abb. 4.38: Fluoreszenzspektren nach Immobilisierung gefalteter Komplexe und Waschen mit LM- bzw. OG-Puffer.

(A) Spektren bei 410 nm Anregung. Die mit LM-Puffer gewaschene Probe zeigt ein Maximum bei 680 nm und ca. 800 nm, alle anderen Proben bei 675 nm. Die nicht-biotinylierten Proben zeigen sehr viel schwächere Signale.

(B) Spektren bei 470 nm Anregung. Die mit LM-Puffer gewaschenen Proben zeigen Maxima bei 680 und ca. 800nm sowie eine Schulter bei 655 nm, die mit OG-Puffer gewaschene Oberfläche zeigt ein Maximum mit zwei gipfeln bei 655 und 679 nm sowie ein sehr schwaches Signal bei ca. 800 nm. Die Maxima der nicht-biotinylierten Proben liegen bei 655 nm.

In den Fluoreszenzspektren zeigt sich sehr deutlich, dass exzessives Spülen mit OG-Puffer zur Zerstörung der immobilisierten Komplexe führt. Bei Chl a-Anregung kann eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums auf 675 nm beobachtet werden, bei Chl b-

## 4 Ergebnisse

Anregung zeigt sich anhand einer sehr stark ausgeprägten Chl b-Fluoreszenz ein Zusammenbruch des Energietransfers zwischen den Chlorophyllen. Zusätzlich lässt sich hier auch kein Energietransfer auf den Fluoreszenzfarbstoff beobachten.

Da sich freies Pigment aber in OG-Micellen deutlich besser löst als in LM-Micellen, konnte für die folgenden Versuche dennoch nicht vollständig auf OG verzichtet werden. Für alle weiteren Experimente wurde daher zunächst ein kurzer Waschschrift mit OG durchgeführt, um den Großteil des freien Pigmentes zu entfernen, anschließend wurde mit LM-Puffer gespült.

Im nächsten Schritt wurde mit diesen Erkenntnissen erneut eine Rekonstitution von oberflächenimmobilisiertem LHCII Apoprotein nach der in 3.4.3 beschriebenen Methode versucht und anschließend das freie Pigment abgewaschen. Der Erfolg der Rekonstitution wurde durch Fluoreszenzspektroskopie untersucht.

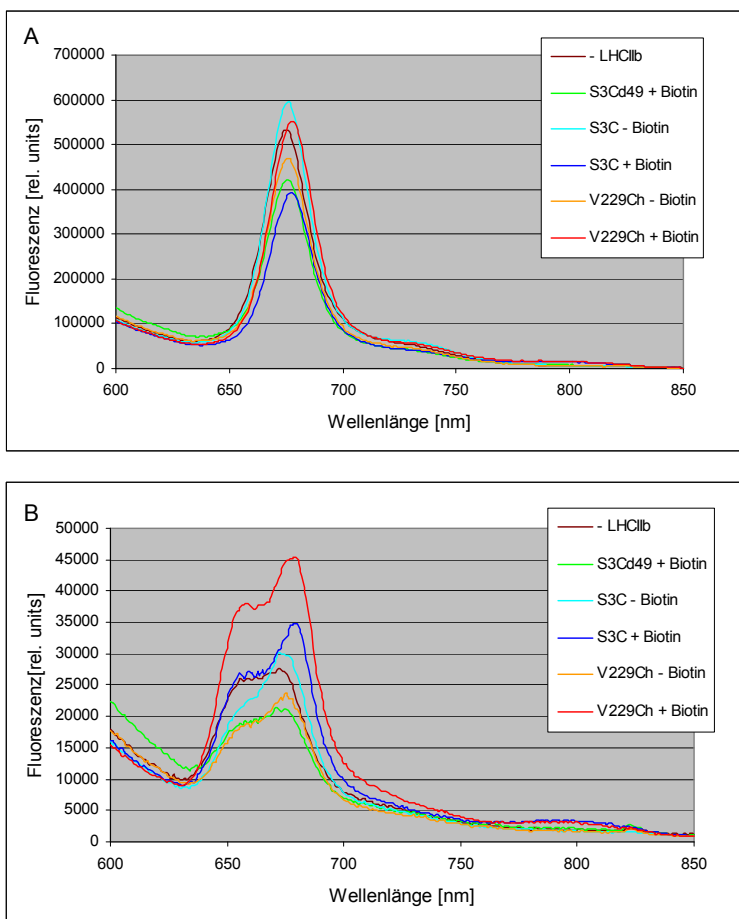


Abb. 4.39: Fluoreszenzspektren nach Rekonstitution oberflächenimmobilisierter S3CΔ49, S3C und V229Ch.

(A) Spektren bei 410 nm Anregung. S3C + Biotin und V229Ch + Biotin zeigen Maximum bei 679 nm sowie eine schwache Schulter bei ca. 800 nm, alle anderen Proben bei 675 nm.

(B) Spektren bei 470 nm Anregung. Alle Proben zeigen eine ausgeprägte Chl b Schulter bei ca. 655 nm und ein Maximum bei 675 nm, das bei S3C + Biotin und V229Ch + Biotin auf 679 nm verschoben ist. Zusätzlich zeigt sich bei diesen Proben erneut ein schwaches Maximum bei ca. 800 nm.

In den Spektren zeigte sich bei 410 nm Anregung in allen Proben ein Chl a Peak, der aber in den Rekonstitutionsansätzen mit S3C + Biotin und V229Ch + Biotin leicht in den längerwelligen Bereich auf 680 nm verschoben ist. Ähnliches lässt sich auch bei Chl b-Anregung beobachten, wo neben einer ausgeprägten Chl b-Schulter eine

Energieübertragung auf Chl a zu beobachten ist, die aber nur im Falle von S3C + Biotin und V229Ch + Biotin ihr Maximum bei 680 nm hat. Darüber hinaus lässt sich bei diesen beiden Ansätzen auch noch eine DY776-Fluoreszenz bei ca. 800 nm beobachten (Abb. 4.40, Vergrößerung des Bereiches von 750 – 850 nm aus Abb. 4.39), die durch einen Energietransfer von den Chlorophyllen auf den Farbstoff zustande kommt, der nur bei korrekt gefalteten Komplexen beobachtet werden kann.

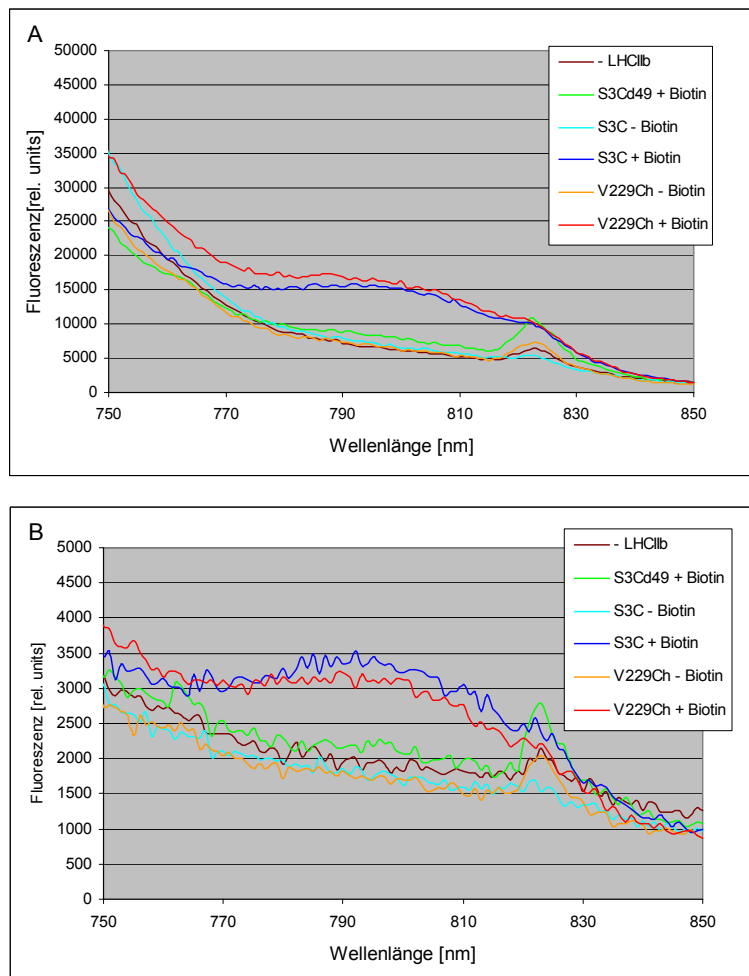


Abb. 4.40: Vergrößerung des Bereiches von 750 – 850 nm der Fluoreszenzspektren aus Abb. 4.39 zur besseren Ansicht des kleinen Maximums bei ca. 800 nm.

(A) 410 nm Anregung.

(B) 470 nm Anregung.

Bei diesen beiden Ansätzen hat also eine Rekonstitution stattgefunden, wenn auch mit einer sehr geringen Ausbeute, was allerdings für Qualität der geplanten zeitaufgelösten einzelmolekülspektroskopischen Faltungsexperimente nicht entscheidend ist.

Die auf diese Weise hergestellten Oberflächen mit rekonstituiertem LHCII wurden auch einzelmolekülspektroskopisch untersucht, um den Erfolg der Rekonstitution zu bestätigen. Hierbei zeigte sich bei den Ansätzen mit biotinyliertem V229Ch eine Vielzahl von rekonstituierten Komplexen (helle Punkte in Abb. 4.41 A), die bei den Ansätzen mit S3Cd49 und nicht-biotinyliertem V229Ch nicht beobachtet werden konnten. (Abb. 4.41 B und C).

## 4 Ergebnisse

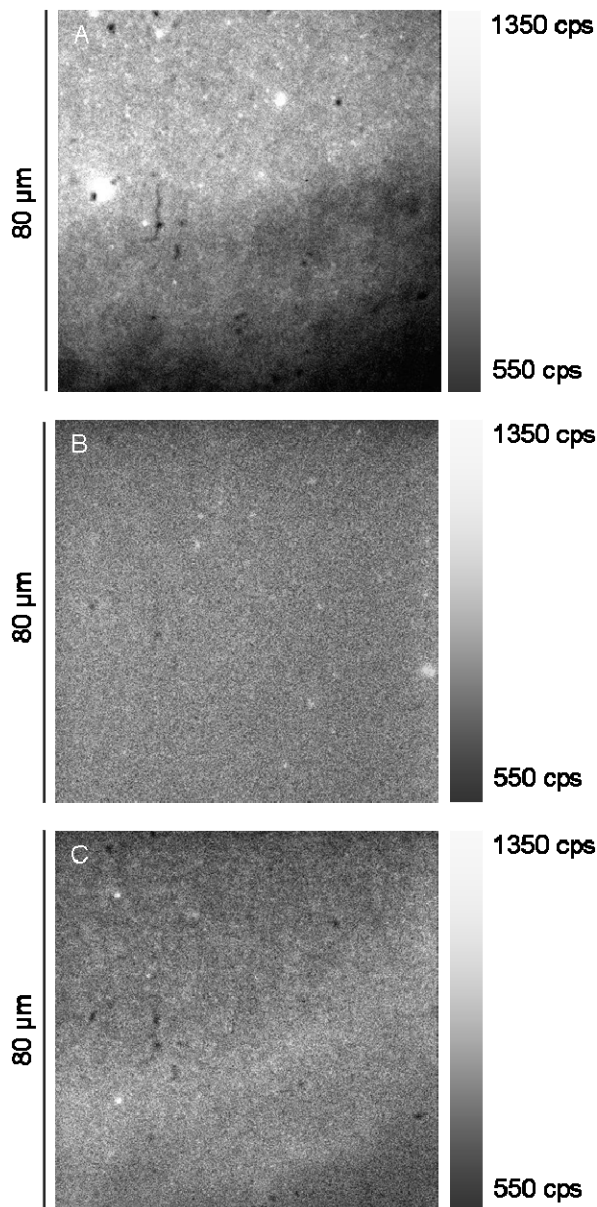


Abb. 4.41: Einzelmolekül-TIRF-Aufnahmen von LHCII-Oberflächen nach der Reconstitution.

(A) Biotinylierter, DY776-markierter V229Ch: Nach der Reconstitution sind sehr viele helle Punkte zu sehen. (B) DY776-markierter V229Ch: Bei nicht-biotinyliertem Protein sind keine hellen Spots zu beobachten. (C) Biotinylierter DY776-markierten S3CΔ49: Auch bei der Negativkontrolle mit können keine Spots detektiert werden.

Anregungswellenlänge 488 nm, Leistung 2 mW, Integration 100 ms / Bild, 750 nm Filter.

In den Einzelmolekül-TIRF-Aufnahmen nach der Reconstitution konnten nur auf Oberflächen, die mit biotinyliertem, DY776-markiertem V229Ch behandelt wurden, helle Spots aufgenommen werden. Diese fehlen sowohl bei nicht-biotinyliertem V229Ch als auch bei der Negativkontrolle mit S3CΔ49, der nicht mehr rekonstituieren kann. Es konnten somit die Ergebnisse aus Abb. 4.39 bzw. 4.40 bestätigt werden, die ebenfalls eine erfolgreiche Reconstitution zeigten. Im Gegensatz zu den Experimenten zur Immobilisierung von LHCII Apoprotein (siehe Abschnitt 4.4.6) bzw. aufgereinigten gefalteten Komplexen (4.4.8) und deren Messung im einzelmolekularen Maßstab, bei denen im Vergleich zu Ensemble-Messungen mit stark verdünnten Proben gearbeitet wurde, wurden hier identische Konzentrationen verwendet. Da die rekonstituierten Komplexe dennoch vereinzelt aufgenommen werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass nur ein geringer Prozentsatz der immobilisierten Proteine rückgefaltet werden konnte. Da für das Ziel dieser

Arbeit – die Aufnahme zeitaufgelöster Faltungskinetiken einzelner LHCII - die Ausbeute aber nur eine äußerst untergeordnete Rolle spielt, wurden mit dieser Methode weitergearbeitet.

In Experimenten, die Rekonstitution direkt im TIRF-Einzelmolekül-Aufbau zeitaufgelöst zu beobachten, verursachte die für die bisherigen erfolgreichen Rekonstitutionen auf der Glasoberfläche eingesetzte Pigmentmenge jedoch einen so starken Hintergrund, dass die Komplexfluoreszenz vollständig überlagert wurde (Abb. 4.42).

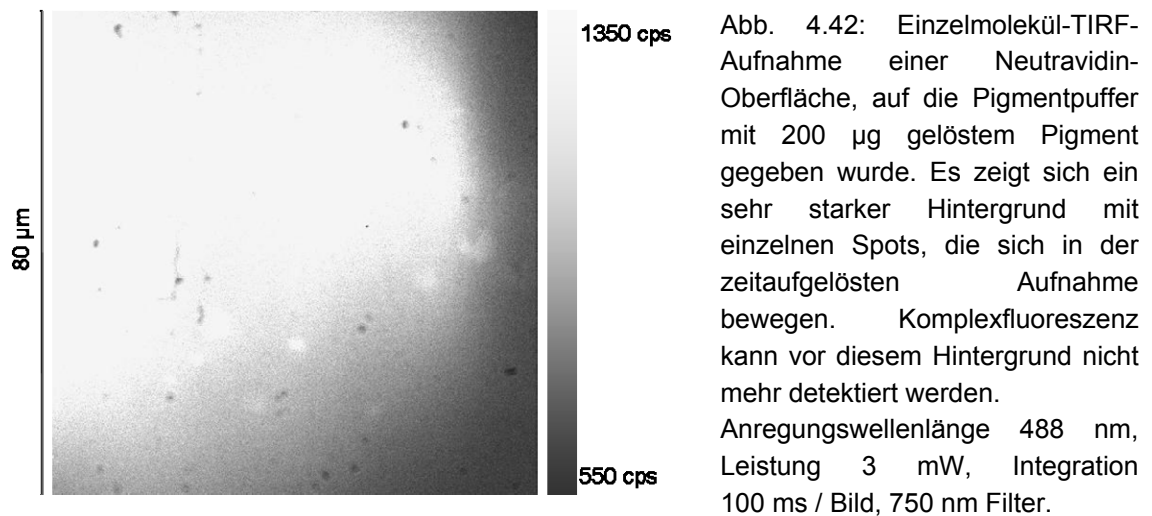


Abb. 4.42 zeigt eine Probe mit den für alle bisherigen Rekonstitutionen auf Glasoberfläche eingesetzten 200  $\mu\text{g}$  Pigment pro Glas gelöst in 500  $\mu\text{l}$  Puffer. Trotz des eingesetzten 750 nm Filters verursacht diese Pigmentlösung so viel Hintergrundfluoreszenz, dass jede andere Fluoreszenz überlagert wird.

In den folgenden Versuchen wurde daher untersucht, ob – und wie weit – die zur Rekonstitution eingesetzte Pigmentmenge reduziert werden kann (Abb. 4.43).

## 4 Ergebnisse

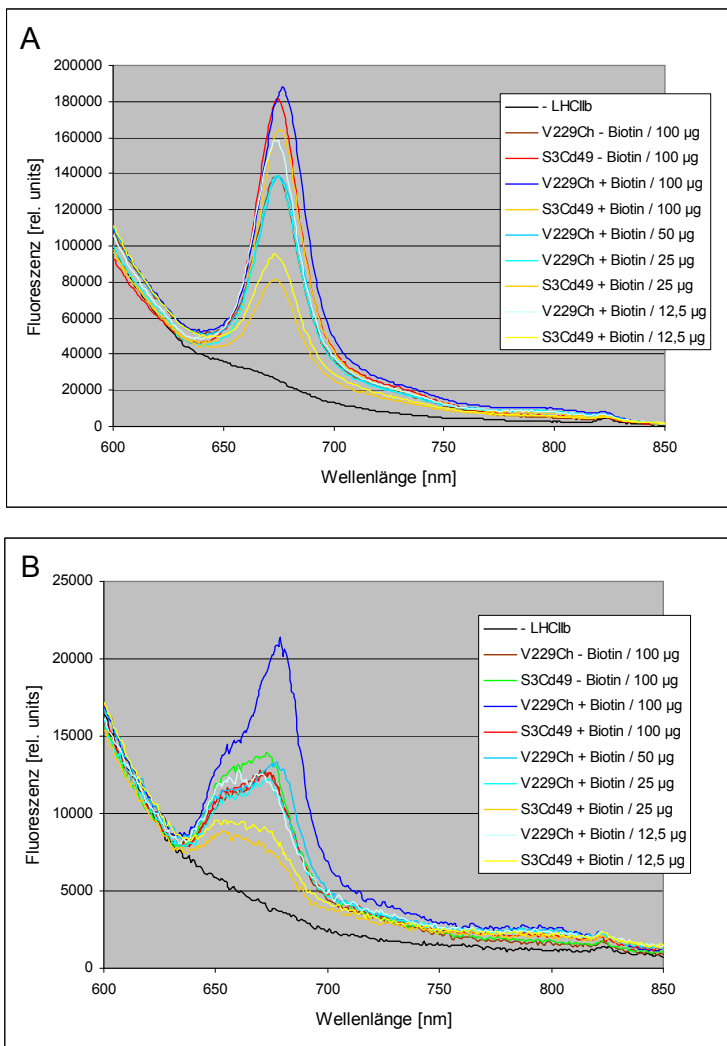


Abb. 4.43: Fluoreszenzspektren nach der Rekonstitution von oberflächenimmobilisiertem DY776-markiertem LHCII mit unterschiedlichen Pigmentmengen.

(A) Chl a-Anregung: Die Maxima der Proben streuen über den Bereich von 675 – 680 nm, im Bereich der DY776-Fluoreszenz bei ca. 800 nm sind keine deutlichen Peaks erkennbar. Mit fallender Pigmentmenge werden die Peaks schwächer.

(B) Chl b-Anregung: Die Proben ähnliche Maxima im Bereich von 675 – 680 nm wie in (A), zusätzlich aber eine ausgeprägte Chl b-Schulter bei 655 nm. Auch hier kann der Bereich der Farbstofffluoreszenz nicht aufgelöst werden.

In den Fluoreszenzspektren (Abb. 4.43) zeigte sich – wie auch schon in Abb. 4.39 – bei den Chlorophyllfluoreszenzen eine Streuung der Peaks zwischen 675 und 680 nm (bei Chl a-Anregung) bzw. deutliche Chl b-Schultern (bei Chl b-Anregung). Der Bereich der Farbstofffluoreszenz bei ca. 800 nm kann nicht deutlich aufgelöst werden, daher ist dieser Bereich in Abb. 4.44 nochmals vergrößert dargestellt.

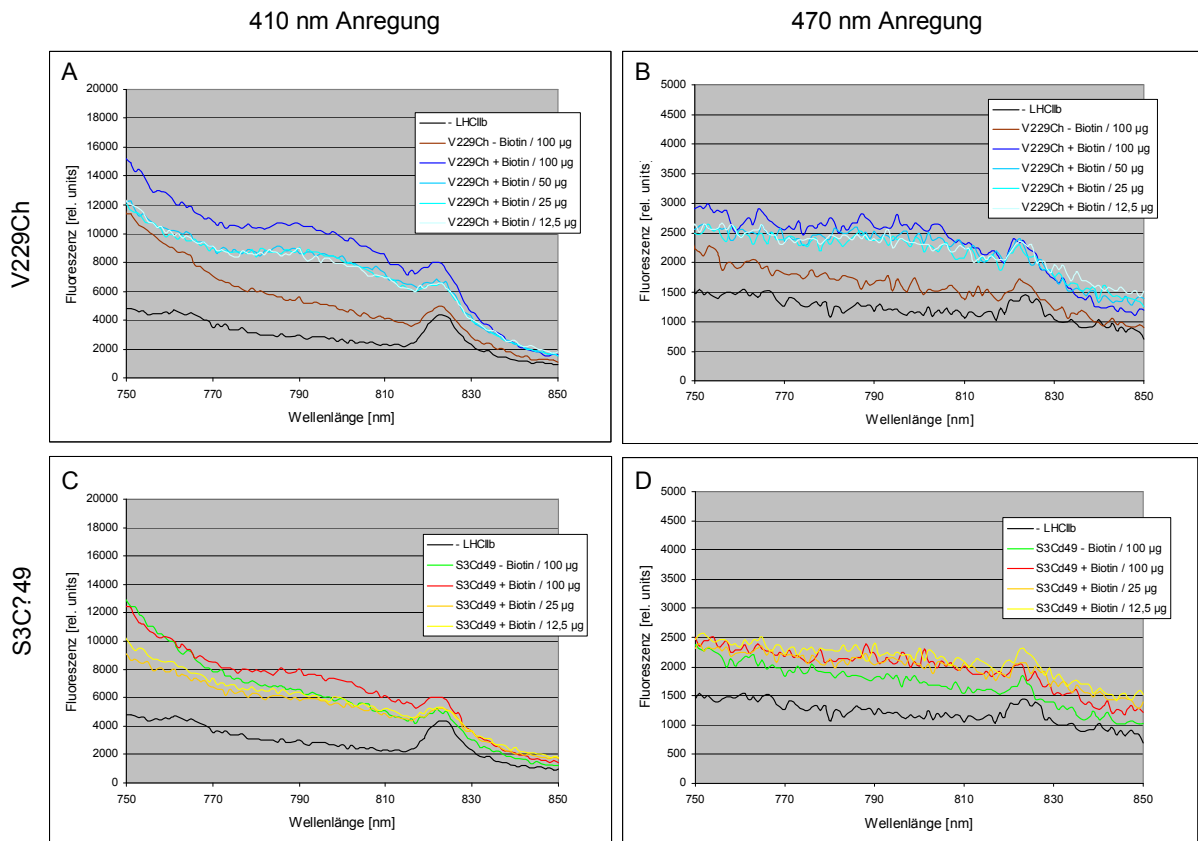


Abb. 4.44: Fluoreszenzspektren nach der Rekonstitution von oberflächenimmobilisiertem DY776-markiertem LHCII mit unterschiedlichen Pigmentmengen. Der Bereich von 750 – 850 nm wurde aus Abb. 4.43 herausvergrößert und zur besseren Übersicht die Graphen von V229Ch bzw. S3CΔ49 getrennt dargestellt. (A-B) Sowohl bei Chl a- als auch bei Chl b-Anregung zeigt sich bei biotinyliertem V229Ch bei allen Pigmentkonzentrationen ein Farbstoffsignal bei ca. 800 nm, dass bei nicht-biotinyliertem Protein nicht auftritt. Bei nur 12,5 µg Pigment ist bei Chl b-Anregung nur noch eine schwache Farbstofffluoreszenz messbar. (C-D) Bei S3CΔ49 zeigt sich bei Chl a-Anregung ein sehr schwaches Signal bei ca. 800 nm, bei Chl b-Anregung kann kein Signal detektiert werden.

Abb 4.44 zeigt, dass bei V229Ch nach der Rekonstitution bei allen hier eingesetzten Pigmentmengen eine DY776-Fluoreszenz detektiert werden kann, die aber mit abnehmender Pigmentmenge schwächer wird. Bei S3CΔ49 fehlt dieses Signal, was aufgrund der fehlenden Rekonstitutionsfähigkeit dieses LHCII-Klons auf eine erfolgreiche Rekonstitution von V229Ch hinweist. Die Interpretation der Spektren wird durch die Schwäche der Signale erschwert. Anhand dieser Ergebnisse und Einzelmolekül-TIRF-Messungen wurde als untere Grenze für die Komplexbildung unter diesen Bedingungen 20 µg Pigment pro beschichteter Glasoberfläche festgelegt.

Mit dieser Pigmentmenge wurden erneut zeitaufgelöste TIRF-Messungen während der Rekonstitution einzelner LHCII durchgeführt (Abb. 4.45).

## 4 Ergebnisse

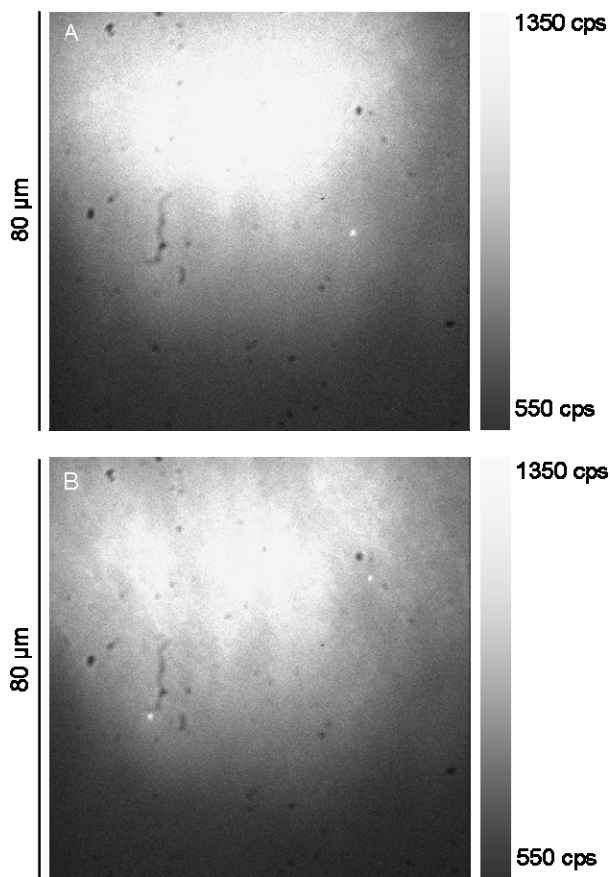


Abb. 4.45 : Einzelmolekül-TIRF-Aufnahme einer mit biotinyliertem DY776-markierten V229Ch (A) bzw. S3CΔ49 (B) belegten Oberfläche, auf die Pigmentpuffer mit 20 µg gelöstem Pigment gegeben wurde. Es zeigt sich ein starker Hintergrund mit einzelnen Spots, die sich in der zeitaufgelösten Aufnahme bewegen. Im Vergleich zu Abb. 4.42 hat der Hintergrund abgenommen, Komplexfluoreszenz kann aber dennoch nicht detektiert werden, da die Pigmentfluoreszenz zu dominant ist. Anregungswellenlänge 488 nm, Leistung 3,5 mW, Integration 100 ms / Bild, 750 nm Filter.

Im Vergleich mit Abb. 4.42 hat die Hintergrundfluoreszenz durch die 10-fache Verdünnung des Pigmentpuffers zwar deutlich abgenommen, sie dominiert aber nach wie vor über die mögliche Komplex-Fluoreszenz. Eine weitere Verdünnung der Pigmente führte dazu, dass sich keine Komplexe mehr bildeten. Aufgrund von Zeitmangel konnte für diese Problematik im Verlauf dieser Arbeit keine Lösung mehr erarbeitet werden.

Im Verlauf dieser Arbeit konnte nach verschiedenen Schwierigkeiten eine spezifische Methode zur Immobilisierung von LHCII Apoprotein und Komplexen auf Glasoberflächen etabliert werden. Diese Oberflächenkoppelung erwies sich auch unter stringenten Bedingungen als stabil. Auf Basis dieser Möglichkeiten konnten immobilisierte Komplexe einzelmolekülspektroskopisch aufgenommen werden. Denaturierungsexperimente zur Aufzeichnung von Entfaltungskinetiken scheiterten aber an der trotz verschiedener Maßnahmen noch zu geringen Lebensdauer der Komplexe bei Belichtung durch den Anregungslaser.

Die Rekonstitution oberflächenimmobilisierter LHCII Apoproteine konnte erfolgreich durchgeführt und die gefalteten Komplexe sowohl im Ensemble als auch Einzelmolekular nachgewiesen werden. Große Schwierigkeiten bei Experimenten, den Faltungsprozess

zeitaufgelöst aufzunehmen, bereitete eine dominierende Hintergrundfluoreszenz durch die zur Rekonstitution notwendige Pigmentlösung.

Aufgrund von Zeitmangel konnten für die mangelnde Lebensdauer und die starke Hintergrundfluoreszenz der Pigmente gegen Ende dieser Arbeit keine Lösungen mehr erarbeitet werden. Dennoch konnte aber eine sehr gute Basis für zukünftige Experimente zur Aufnahme von Faltungs- bzw. Entfaltungskinetiken einzelner LHCII Moleküle gelegt werden.

# 5 Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Rekonstitution des LHCII zeitaufgelöst im einzelmolekularen Maßstab beobachtet werden. Als Monitor diene der im Verlauf der Faltung einsetzende Energietransfer von den komplexgebundenen Chlorophyllen auf kovalent an das Proteingerüst angebrachte Fluoreszenzfarbstoffe. Im vorliegenden Diskussionsteil wird zunächst auf die verschiedenen in dieser Arbeit angewendeten Verfahren zur Immobilisierung des LHCII auf Glasoberflächen und deren Vor- und Nachteile eingegangen. Im zweiten Teil werden die Experimente zur Immobilisierung und Dissoziation von LHCII Komplexen näher beleuchtet und die Gründe dafür, dass keine zeitaufgelösten Einzelmolekül-Entfaltungskinetiken aufgezeichnet werden konnten. Der dritte Teil dieser Diskussion beschäftigt sich mit den Hintergründen der Versuche zur Faltung oberflächenimmobilisierter LHCII Apoproteine.

## 5.1 Die Immobilisierung des LHCII

Ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit ist die Immobilisierung des LHCII auf Glasoberflächen. Diese Immobilisierung zur einzelmolekularen Rekonstitution ist aus zwei Gründen unabdingbar:

Zum Einen muss das zu beobachtende Objekt fixiert werden, um ein Davonschwimmen aus dem Fokus des Fluoreszenzmikroskopes in der Lösung zu verhindern. Hierfür stehen verschiedene Techniken zur Verfügung, im einfachsten Falle das Einfrieren einer entsprechend verdünnten Lösung. Die Probe kann aber auch in PVA eingebettet und in einem dünnen Film auf das Trägermaterial aufgebracht werden („*spin coating*“), wie dies für den LHCII schon beschrieben wurde (Tietz et al., 2001). Bei diesen Immobilisierungen ist das Objekt aber nicht mehr für weitere Reaktionen zugänglich, weshalb in dieser Arbeit eine Fixierung über eine Koppelung an die Glasoberfläche ausgeführt wurde, so dass das Protein in der Pufferlösung vorliegt.

Zum Anderen muss der Messaufbau so beschaffen sein, dass die Glasoberfläche stets mit Puffer benetzt ist und darüber hinaus ein Austausch des Puffers ermöglicht wird, um mit den Proben arbeiten zu können. Daher muss der Messstrahl das Trägermaterial durchdringen können, weshalb hierfür nur Glas in Frage kommt. Im Unterschied zur Immobilisierung von löslichen Proteinen ist bei der Arbeit mit Membranproteinen wie dem LHCII der Einsatz von Detergenzien unabdingbar, was u.U. Auswirkungen auf einzelne Koppelungsschritte haben kann. Auch nach der Immobilisierung kann in keinem

Schritt auf Detergenzien verzichtet werden, da das Protein andernfalls auf der Oberfläche ausfallen würde und es wahrscheinlich schwierig, wenn nicht sogar unmöglich wäre, dieses wieder in Detergenzmicellen zu lösen.

### 5.1.1 Die Oberflächenfunktionalisierung

Prinzipiell kann für Experimente, bei denen mit oberflächenimmobilisierten Proteinen oder auch DNA gearbeitet werden soll, zum Einen auf kommerziell erhältliche, fertig funktionalisierte Oberflächen zurückgegriffen werden (beispielsweise von Greiner Bio-One), zum Anderen können im Labormaßstab anzufertigende Funktionalisierungen eingesetzt werden. In der Literatur finden sich hierzu vielfältige Protokolle. Für den Fall, dass – wie auch in dieser Arbeit – das immobilisierte Protein weiterhin experimentell zugänglich sein soll, scheiden Methoden wie das Einbetten in PVA oder Acrylamid von vornherein aus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst versucht, den mit einem His<sub>6</sub>-Tag versehenen LHCII auf kommerzielle Ni<sup>2+</sup>-Oberflächen zu koppeln, was aber experimentell nicht gelang – möglicherweise aufgrund der nur schwachen Wechselwirkungen zwischen His-Tag und Ni<sup>2+</sup>, die auf glatten Oberflächen zu einem vorzeitigen Ablösen führen können (Lue *et al.*, 2004). Ein weiterer Nachteil kommerzieller Oberflächen ist die Tatsache, dass diese zur Zeit nur in Form von Objektträgern am Markt verfügbar sind, für die hier geplanten konfokalen Einzelmolekülaufnahmen aber funktionalisierte Quarzglas-Deckgläschen nötig sind.

Daher wurde für das weitere Vorgehen mit selbst im Labormaßstab funktionalisierten Glasoberflächen gearbeitet. In der Literatur sind hierfür unterschiedliche Möglichkeiten beschrieben, die im Folgenden kurz vorgestellt und deren Anwendungsmöglichkeiten für diese Arbeit diskutiert werden sollen.

#### Immobilisierung über eine unspezifische Adsorption an die Glasoberfläche

Von verschiedenen Proteinen ist eine spontane unspezifische Adsorption an Glasoberflächen bekannt, beispielsweise für Rinder-Serum-Albumin (*bovine serum albumine*, BSA), oder auch für die Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase*,

HRP). Speziell letztere wurde auch schon für Einzelmolekül-Aufnahmen des LHCII verwendet (Wolf-Klein, 2001), indem ein Konjugat aus HRP und Ni<sup>2+</sup>-NTA an die Oberfläche adsorbiert wurde und über das Ni<sup>2+</sup> ein rekonstituierter, mit einem HIS<sub>6</sub>-tag versehener LHCII gekoppelt wurde (Gerken *et al.*, 2002). Prinzipiell ist hier der LHCII für weitere Experimente zwar zugänglich, allerdings ist es fraglich, ob unter den im Rahmen dieser Arbeit geplanten Bedingungen während der Rekonstitution auf der Oberfläche die unspezifische Koppelung an die Oberfläche stabil bleibt, oder ob sich im Laufe der Experimentes nicht das ganze Konstrukt von der Oberfläche ablöst. Zweiter „unsicherer Faktor“ ist hier außerdem die Komplexierung über das Ni<sup>2+</sup>, deren Stabilität im vorigen Abschnitt schon angesprochen wurde. Daher wurde dieser Ansatz im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

### **Immobilisierung über eine spezifische Bindung an die Glasoberfläche**

Für alle im Folgenden beschriebenen Immobilisierungsvarianten ist zunächst eine Funktionalisierung der Glasoberfläche notwendig. Die Methode der Wahl stellt hierbei die Silanisierung dar, Protokolle hierfür gibt es in der Literatur in großer Anzahl und breiten experimentellen Vorgehensweisen (Benters *et al.*, 2001, Beier und Hoheisel 1999, Zammattéo *et al.*, 2000, Todt & Blohm, 2009). Prinzipiell wird an die Glasoberfläche ein in einem organischen Lösungsmittel gelöstes Silan – für biologische Experimente in den meisten Fällen Aminopropyltriethoxysilan (APTÉS) – gebunden. Dieses Silan verfügt über eine Aminogruppe, mit der in den anschließenden Koppelungsschritten weitergearbeitet wird. Es gibt aber auch die Möglichkeit, von vornherein mit einem entsprechend funktionalisiertem Silan (Kumar *et al.*, 2004) bzw. Polysiloxan (Kessler *et al.*, 2009) zu arbeiten.

Im Rahmen dieser Silanisierung ist zu beachten, dass peinlich genau auf Wasserfreiheit der eingesetzten Lösemittel geachtet wird – auf diesen Punkt wird auch in der Literatur hingewiesen („dry toluene“, Wayment und Harris 2009). Im Rahmen dieser Arbeit erwies sich genau dieser Punkt als sehr kritisch bei der Anwendung von APTÉS, was eindrücklich in den AFM-Aufnahmen gezeigt wurde (Abb 4.21). Offensichtlich war das hier eingesetzte Toluol trotz Einsatzes eines Molekularsiebes zur Trocknung nicht ausreichend wasserfrei, was experimentell eine starke Aggregatbildung auf der Oberfläche zur Folge hatte – ähnliche Effekte wurden auch in der Literatur beschrieben (Ulman 1996). Durch diese erhöhte Rauigkeit mit ihren Erhebungen und Vertiefungen

besteht die Gefahr, dass bei weiteren Modifikationsschritten die unspezifische Anhaftung stark gefördert wird.

Abhilfe konnte hier durch das in der Literatur weit weniger gebräuchliche, aber in der Anwendung wesentlich einfacher zu handhabende APDMES geschaffen werden. Im Unterschied zum APTES sind hier zwei der drei Ethoxy-Gruppen gegen Methyl-Gruppen ausgetauscht, wodurch die Aggregatbildung bei Anwesenheit von Wasser unterbunden wird. Die großen Unterschiede in den damit erreichbaren Oberflächenstrukturen zwischen diesen beiden Silanen werden mittlerweile auch in der Literatur bestätigt (Pegg *et al.*, 2009). Die geringere Reaktivität des APDMES gegenüber APTES kann für Einzelmolekül-Experimente durchaus in Kauf genommen werden. Eine weiterhin leichte Inhomogenität mit körnigen Erhebungen – weit weniger als bei Verwendung von APTES – konnte durch den Wechsel des Lösungsmittels von Toluol zu Methanol beseitigt werden. Diese Beobachtung lässt sich vermutlich durch die im Verhältnis zu den Silanisierungsreagenzien geringe Polarität des Toluols erklären, wodurch es zur Bildung von Tröpfchen kommt, die sich auf der Oberfläche ablagern.

Auf Basis solcher aminofunktionalisierter Glasoberflächen bestehen verschiedene Möglichkeiten zur Immobilisierung des Forschungsobjektes. Die wahrscheinlich stabilste Koppelung besteht in eine kovalenten Bindung an die Oberfläche. Um dies zu erreichen, können verschiedene sog. heterobifunktionelle Linker zu Einsatz kommen. Diese Gruppe zeichnet sich durch zwei reaktive Gruppen aus, die zur Vernetzung der Objektes mit der Glasoberfläche genutzt werden können, beispielsweise über aminoreaktive oder SH-Reaktive Komponenten (Todt & Blohm, 2009). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dieser Immobilisierungsmethode experimentiert, die aminoreaktive Gruppe des Linkers sollte hierbei mit den (über das Silan) auf der Glasoberfläche vorhandenen Aminogruppen gekoppelt werden, die SH-Reaktive Komponente mit dem (singulären) Cystein des LHCII. Ähnliche Protokolle sind auch aus der Literatur zur Immobilisierung von DNA oder Proteinen bekannt (z.B. Klein *et al.*, 2006 (mit homobifunktionellem Linker), Brockmann *et al.*, 1999 (mit heterobifunktionellem Linker, Jordan *et al.*, 1997 (mit heterobifunktionellem Linker)). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die entsprechenden Experimente durchweg auf APTES-Oberflächen durchgeführt, die sich im Nachhinein allerdings aufgrund der oben beschriebenen Problematik als wenig tauglich erwiesen, so dass hier kaum eine Aussage über den tatsächlichen praktischen Nutzen dieser Versuche getroffen werden kann, zumal die tatsächliche Bindung des Linkers nicht direkt über einen farbstoffmarkierten Linker beobachtet werden konnte, sondern nur indirekt über die Koppelung eines farbstoffmarkierten LHC-Apoproteins an die SH-Reaktive Komponente des Linkers – aber ohne greifbares Ergebnis. Als Ursache kommen hier

abgesehen von der unzureichenden Silanisierung aber auch eine nicht ausreichende Reduktion des singulären Cysteins am Protein oder eine ungünstig gewählte Spacerarmlänge des Linkermoleküls in Frage – schließlich müssen sich das Cystein und die SH-Reaktive Gruppe des Linkers auch nahe genug kommen können.

Allerdings konnten positive Ergebnisse bei der Bindung von NHS-Biotin auf APDMES-Oberflächen gezeigt werden – mit derselben funktionellen Gruppe, über die auch der in dieser Arbeit eingesetzte heterobifunktionelle Linker verfügt. Somit sollte eigentlich davon ausgegangen werden können, dass auch über einen solchen heterobifunktionellen Linker (unter der Voraussetzung einer „ordentlichen“ Silanisierung der Glasoberfläche und der Wahl einer günstigen Spacerarmlänge) ein zufriedenstellendes Koppelungs-Ergebnis erzielt werden können sollte.

Mit den hier hergestellten biotinylierten Glasoberflächen können Proteine und andere Biomoleküle über das Biotin / Avidin-System immobilisiert werden, wie dies beispielsweise schon für Antikörper, Enzyme (De Alwis und Wilson, 1989, Pantano und Kuhr, 1993) und DNA (Su *et al.*, 2005) gezeigt werden konnte. Auf die biotinylierten Oberflächen wird Avidin bzw. Neutravidin (die deglykosylierte Form von Avidin) aufgebracht. Dieses Protein verfügt über 4 Bindungstaschen für Biotin (Rosano *et al.*, 1999). Auf der Glasoberfläche kann bei der Wahl eines Biotins mit einer günstigen Länge des Spacerarms davon ausgegangen werden, dass nur die zur Oberfläche zeigenden Biotinbindestellen belegt werden und somit die von der Oberfläche abgewandten Bindungstaschen zur Koppelung eines biotinylierten Proteins weiterhin zur Verfügung stehen (Yam *et al.*, 2002). Die Bindungskinetik des Neutravidins wurde mittlerweile auch auf einzelmolekülspektroskopischer Ebene untersucht (Wayment und Harris, 2009).

Nach einigen kleineren Anpassungen konnte in AFM-Aufnahmen eine homogene, flächendeckende Neutravidin-Schicht gezeigt werden. Somit erwies sich das hier gewählte Biotin mit einer Spacerarmlänge von 22,4 Å als geeignete Basis zur Herstellung einer funktionellen Neutravidinoberfläche.

Ein interessanter Aspekt dieser Experimente war die Beobachtung, dass auch ohne Biotin auf den Glasoberflächen eine Neutravidin-Oberflächenkoppelung im AFM gezeigt wurde. Die scharfkantigen Höhenprofile dieser Oberflächen weisen auf ein Denaturieren des Neutravidins hin – möglicherweise aufgrund der starken Adhäsionskräfte an die nicht durch Biotin abgeschirmte Glasoberfläche. Diese Beobachtung deckt sich mit Neutravidin-Bindungsexperimenten, die fluoreszenzspektroskopisch verfolgt wurden –

hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen biotinylierten und nicht-biotinylierten Oberflächen festgestellt werden – und es zeigt sich hier klar, dass fluoreszenzspektroskopisch nicht erfasst werden kann, ob eine spezifische oder eine unspezifische Oberflächenkoppelung stattgefunden hat.

### 5.1.2 Die Koppelung des LHCII an funktionalisierte Glasoberflächen

In einem Vorexperiment wurde durch Evaneszenz-Feld-Resonanz-Messungen die prinzipielle Möglichkeit der Koppelung von biotinyliertem LHCII an Neutravidin-beschichtete Oberflächen gezeigt (Abb. 4.15). Auch konnte beim Regenerieren dieser Oberfläche die Robustheit dieses Systems (die Bindung zwischen Avidin und Biotin besitzt die höchste bekannte Affinität einer biologischen Bindung,  $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ , Livnah *et al.*, 1993) belegt werden, da das Neutravidin erst im sehr sauren Bereich in 8 M Guanidiniumchlorid von der Oberfläche abgelöst werden konnte (experimentelle Beobachtung bei der Regeneration der Messoberflächen des Evaneszenz-Feld-Resonanz-Messgerätes).

Im AFM konnte eine erfolgreiche Immobilisierung des LHCII auf Neutravidinoberflächen erst nach Beseitigung verschiedener in den vorherigen Kapiteln beschriebener Fehlerquellen bei der Oberflächenfunktionalisierung reproduzierbar und spezifisch gezeigt werden. Gleichzeitig konnte in diesen AFM-Messungen bei Abwesenheit von Neutravidin eine Oberflächenstruktur beobachtet werden, die auf eine unspezifische Adsorption des LHCII an die Oberfläche unter gleichzeitigem Denaturieren hindeutet.

Zur Vermeidung solcher unspezifischer Bindungen erwies es sich daher als unabdingbar, eine flächendeckende Neutravidinschicht bei der Immobilisierung des LHCII zu verwenden, da ansonsten unspezifisch gebundener LHCII in den Lücken des Neutravidinteppichs adsorbieren und so das Hintergrundsignal verstärken würde. Bei Anwesenheit von Neutravidin konnte eine Immobilisierung des LHCII im AFM allerdings nicht eindeutig belegt werden, da sich die Neutravidin- und die LHCII-beschichteten Glasoberflächen anhand ihrer Oberflächenstruktur kaum unterscheiden lassen (Abb. 4.24 B). Die nach der Bindung des LHCII veränderte Rauigkeit gibt aber einen Hinweis auf eine erfolgreiche Bindung. Der Beleg für die spezifische Bindung konnte durch Ensemble-Fluoreszenzmessungen erbracht werden, hier konnte eine spezifische Immobilisierung von biotinyliertem und farbstoffmarkiertem LHCII auf Neutravidin-Glasoberflächen gezeigt werden (Abb. 4.25). Dies ist gleichzeitig ein weiterer Beleg, dass die Länge des Spacerarms des in dieser Arbeit eingesetzten Biotins als Basis für

die Neutravidinbindung gut gewählt wurde, da durch die erfolgreiche Koppelung des biotinylierten LHCII an das Neutravidin bestätigt wurde, dass bei der Immobilisierung nur die nach unten gerichteten Biotinbindestellen belegt wurden und die von der Oberfläche abgewandten weiterhin für die Koppelung des LHCII zur Verfügung stehen. Diese Oberflächen zeigten in konfokalen Einzelmolekülfluoreszenzaufnahmen neben einigen Anhäufungen fluoreszierender Bereiche vor allem einzelne fluoreszierende Spots. Anhand deren Intensität und Bleichungsverhalten in einem Schritt kann davon ausgegangen werden, dass diese jeweils ein einzelnes Farbstoffmolekül und damit ein einzeln auf der Glasoberfläche immobilisiertes LHCII Apoprotein repräsentieren. Unter dieser Annahme konnte durch weiteres Verdünnen (Faktor 100) eine Oberfläche erhalten werden, auf der ausschließlich solche vereinzelt Spots zu erkennen waren (Abb. 4.27 A). Durch auszählen der Spots konnte hier eine Belegungsdichte von ca.  $0,02 \text{ fmol/cm}^2$  Glasoberfläche errechnet werden. Diese Konzentration liegt deutlich unterhalb der Detektionsgrenze des für die Ensemble-Versuche eingesetzten Fluoromax2, weshalb daher für diese Experimente mit der 100-fach höheren Konzentration gearbeitet wurde.

Für die Limitierung der Oberflächenbelegung, die für die einzelmolekulare Beobachtung notwendig ist, stehen auf allen experimentellen Stufen Möglichkeiten zur Verfügung, so kann beispielsweise die Anzahl der Aminogruppen auf der Glasoberfläche durch Beimischung eines Silans ohne Aminogruppe entsprechend reduziert werden (Wayment und Harris, 2009). Ähnliches kann auch für den Biotinylierungs-Schritt durch Zugabe von unfunktionalisiertem NHS erreicht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Taktiken jedoch nicht weiter verfolgt, da sich im Laufe der Experimente gezeigt hatte, dass auch – ähnlich wie BSA oder HRP - der LHCII dazu neigt, an Glasoberflächen unspezifisch zu adsorbieren. Die konnte vermieden werden, wenn die Glasoberfläche flächendeckend mit Neutravidin belegt ist. Im Nachhinein erwies sich die in dieser Arbeit angewendete Methode, mit entsprechend verdünnten LHC-Lösungen zu arbeiten, daher als richtiger Weg.

### 5.2 Denaturierung immobilisierter LHCII Komplexe

Auf den Neutravidinoberflächen wurden auch fertig gefaltete und aufgereinigte Komplexe immobilisiert und anschließend denaturiert, um die Stabilität der Immobilisierung zu überprüfen. In den Ensemble-Aufnahmen am Fluoromax2 wurden dazu „Vorher-Nachher-Spektren“ aufgenommen. Hier zeigte sich anhand des ausschließlich in

intakten Komplexen stattfindenden Energietransfers von den angeregten Chlorophyllen auf den kovalent an das Proteingerüst gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff, dass oberflächenimmobilisierte Komplexe bei 4 °C über längere Zeit (> 24 h) stabil sind (Abb. 4.28). Darüber hinaus konnte in Denaturierungsexperimenten der Nachweis erbracht werden, dass die Oberflächenbindung trotz stringenter Bedingungen stabil ist, da das immobilisierte Protein über die direkte Farbstoffanregung auch nach dem Denaturieren noch nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.29).

Bei der Einzelmolekülspektroskopischen Untersuchung solcher mit monomeren LHCII Komplexen belegten Glasoberflächen zeigten sich einzelne Komplexe, die sich trotz der völlig verschiedenen Immobilisierungsmethoden ähnlich wie die von Gerken *et al.* (2002) immobilisierten Komplexe verhielten und ein vergleichbares Bleichungsverhalten zeigten. Die Orientierung der so immobilisierten Komplexe wurde nicht näher untersucht, da der für zeitaufgelöste Einzelmolekülfluoreszenzaufnahmen eingerichtete Messaufbau zur Feststellung der Polarität des emittierten Lichtes, über die Hinweise zur Orientierung gewonnen werden können, nicht geeignet ist. Im Unterschied zu den Ensemble-Messungen bestand hier durch die Verwendung einer Flußzelle aber die Möglichkeit, den Zerfall der Komplexe nach Zugabe eines SDS-haltigen denaturierenden Puffers zu beobachten. Hierzu wurde die Fluoreszenz der Komplexe zeitaufgelöst aufgezeichnet. Ein großes Problem dieser – und aller noch folgender – Einzelmolekülmessungen stellte dabei das Ausbleichen der Komplexe aufgrund der Laseranregungsleistung dar. Ohne weitere vor Photooxidation schützende Maßnahmen lag die Komplexlebensdauer unter Laseranregung bei nur ca. 10 s (Abb. 4.32). Ähnliche Lebensdauern werden auch von Gerken *et al.* (2002) beschrieben, wobei direkte Vergleiche aufgrund der unterschiedlichen Messaufbauten aber schwierig sind. Eine Steigerung der Lebensdauer auf ca. 40 s konnte durch den Zusatz von Reduktionsmitteln (DTT) und den Ausschluss von Sauerstoff durch Einblasen und Überschichten der eingesetzten Lösungen mit N<sub>2</sub> erreicht werden (Abb. 4.33). Höhere Lebensdauern im Bereich von ca. 1 min werden von Tietz *et al.* (2001) beschrieben, allerdings wurden die monomeren Komplexe hier durch *spin coating* immobilisiert und sind daher nicht mehr für weitere Experimente zugänglich. Anhand von Aufnahmen, in denen während der Denaturierung jeweils ein neuer Bildausschnitt angefahren wurde, wurde für die gezielte pufferinduzierte Entfaltung aber ein Zeitrahmen von ca. 90 s ermittelt, bis pro Bildausschnitt keine gefalteten Komplexe mehr detektiert werden konnten (Abb. 4.31). In zeitaufgelösten Experimenten zur Entfaltung von LHCII Komplexen konnte daher nicht zwischen einem pufferinduzierten Denaturieren und einem Ausbleichen aufgrund der Laseranregung unterschieden werden (Abb. 4.34). Im Verlauf dieser Arbeit konnte für dieses Problem keine Lösung mehr erarbeitet werden. Ein Lösungsansatz zur Steigerung der Lebensdauer des LHCII

unter Laseranregung bestünde in der Verringerung der Anregungsleistung, was jedoch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität nach sich ziehen würde. Um die Komplexfluoreszenz vor dem Hintergrund noch detektieren zu können, müsste daher in diesem Fall die Integrationszeit pro Bild drastisch erhöht werden, was zu Lasten der zeitlichen Auflösung geht, da die Bildfrequenz sinkt. Bei gleich bleibender Anregungsleistung wäre auch der Einsatz eines „Choppers“ denkbar, mit dessen Hilfe die Probe zwischen den Fluoreszenzaufnahmen jeweils abgedunkelt würde. Auch diese Maßnahme würde zu Lasten der zeitlichen Auflösung gehen, da zwischen den Bildern zeitliche Lücken entstehen und man eher ein „Daumenkino“ erhält. Unter der Annahme, dass der Grund für das „verschwinden“ der Fluoreszenz im Akzeptorfarbstoff bzw. dessen Ausbleichen liegt, könnte hier möglicherweise Abhilfe durch den Einsatz sog. „*quantum dots*“, beispielsweise colloidale Halbleiter-Nanokristalle, geschaffen werden.

Diese „*quantum dots*“ zeichnen sich aufgrund ihrer günstigen Quanten-Ausbeute durch eine deutlich stärkere Fluoreszenz im Vergleich zu herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen aus, womit sich die Leistung des Anregungslasers bei konstanter Fluoreszenzintensität verringern ließe. Dies hätte erwartungsgemäß eine erhöhte Lebensdauer der Komplexe zur Folge. Ein großer Nachteil dieser „*quantum dots*“ stellt ihre Größe dar: Während sich normale Fluoreszenzfarbstoffe im Bereich von 200 – 1000 Da bewegen (und damit deutlich kleiner sind als der LHCII-Komplex selbst), kehrt sich das Massenverhältnis bei den „*quantum dots*“ um, da diese mit einem Durchmesser von 10 – 50 nm (entsprechend 1000 – 100000 Atomen) (Durchmesser des LHCII Komplexes: ca. 5 nm) den LHCII „erschlagen“. Ob ein LHCII Apoprotein, das an einen „*quantum dot*“ gekoppelt wurde, noch die Fähigkeit zur Rekonstitution besitzt, ist allerdings mehr als fraglich. Es konnte experimentell aber mittlerweile gezeigt werden, dass eine Koppelung des rekonstituierten LHCII an „*quantum dots*“ möglich ist und er LHCII dabei seine Funktionalität nicht einbüßt (Boggasch, 2006, Erker *et al.*, 2009, Gundlach 2010).

### 5.3 Rekonstitution immobilisierter LHCII Apoproteine

In ersten Versuchsansätzen wurde zur Rekonstitution der oberflächenimmobilisierten LHCII Apoproteine das von Rogl *et al.* (1998) für auf Ni<sup>2+</sup>-Säulen immobilisieren LHCII veröffentlichte Protokoll angewendet, das die Möglichkeit zur Faltung immobilisierten LHCII belegt. Die Rekonstitution erfolgt hier durch einen Detergenzwechsel. Es stellte sich im Laufe dieser Arbeit aber heraus, dass mit dieser Methode trotz verschiedener

Anpassungen auf den Glasoberflächen keine Rekonstitution erreicht wird (Abb. 4.35). Die Gründe hierfür könnten in der Beobachtung einer spontanen Adsorption des LHCII an Oberflächen liegen, die nicht durch eine Neutravidin-Schicht abgeschirmt wurden. Dadurch würde eine Rekonstitution effizient verhindert werden.

Eine erfolgreiche spezifische Immobilisierung konnte auf Neutravidin-Oberflächen sowohl mit denaturiertem als auch mit rekonstituiertem LHCII gezeigt werden. In Spülexperimenten mit solchen zuvor rekonstituierten und anschließend immobilisierten LHCII-Komplexen konnte gezeigt werden, dass OG-haltige Puffer relativ schnell zu einer Zerstörung der Komplexe führen (Abb. 4.38). Dies liegt möglicherweise in der im Vergleich zu LM besseren Löslichkeit der Pigmente in OG-Micellen begründet, wodurch den oberflächenimmobilisierten Komplexen einzelne Pigmente entrissen werden können, was schließlich zum Zerfall der Komplexe führt. In LM konnte dagegen experimentell gezeigt werden, dass die Komplexe bei 6°C und abgedunkelt über mindestens 24 Stunden stabil sind. Die Rekonstitution dieser über das Biotin-Avidin-System oberflächenimmobilisierten LHCII Apoproteine konnte über eine Detergensemischung erreicht werden. Zu in SDS-Micellen gelöstem Protein auf den Oberflächen wird in OG-Micellen gelöstes Pigment gegeben und die beiden Lösungen gründlich vermischt, wodurch das SDS weit genug verdünnt wurde, dass eine Rekonstitution stattfinden kann. Um die mögliche Rekonstitutionsausbeute zu erhöhen, wurde mit sehr dicht mit farbstoffmarkiertem LHCII belegten Oberflächen gearbeitet.

Der Erfolg dieser Rekonstitution konnte anhand eines Energietransfers auf den Fluoreszenzfarbstoff – dieser findet ausschließlich in intakten Komplexen statt - in Ensemblemessungen nachgewiesen werden (Abb. 4.39 und 4.40). Einzelmolekülspektroskopisch wurde die Fluoreszenz des DY776 durch den Einsatz eines 750 nm Langpassfilters von der Fluoreszenz des Chlorophylle unterschieden, da die Chlorophylle im kürzerwelligen Bereichen fluoreszieren. Der Fluoreszenzfarbstoff DY776 zeigte zudem das für einzelne Moleküle typische Bleichverhalten in einem einzigen Schritt, wodurch von einzelnen auf der Oberfläche lokalisierten Komplexen ausgegangen werden konnte. In anbetracht der Tatsache, dass für die Rekonstitution mit sehr dicht mit LHCII Apoprotein belegten Oberflächen gearbeitet wurde, scheint die Rekonstitutionsausbeute gering zu sein, was aber für Einzelmolekül-Faltungskinetiken keine Rolle spielt. Limitierende Effekte durch die eingesetzte Pigmentmenge können weitgehend ausgeschlossen werden, wenn als Vergleich die Standard-Rekonstitution in Lösung nach der Detergenzwechsellmethode herangezogen wird, bei der nur 1/10 der Pigmentmenge im Verhältnis zum Protein eingesetzt wird. Einem Mangel an einzelnen Pigmenten wie etwa Chl b im Totalextrakt wurde durch Anreicherung der eingesetzten

## 5 Diskussion

---

Pigmentmischung mit diesem sowie mit Gesamtcarotinoiden vorgebeugt. Somit wurden die Rekonstitutionsbedingungen bezüglich des Pigmentangebotes weitgehend optimiert. Es ist denkbar, dass sich auf den sehr dicht mit LHCII belegten Oberflächen benachbart liegende Proteine während der Faltung gegenseitig behindern. Aus der anhand von Abb. 4.27 ermittelten Belegungsdichte kann anhand der Formel:

$$\text{Abstand zweier Proteine} = \sqrt{\frac{\text{Fläche}}{\text{Anzahl Proteine}}}$$

der durchschnittliche Abstand zwischen 2 immobilisierten Proteinen errechnet werden, in Abb. 4.27 beträgt dieser 2,88  $\mu\text{m}$ , wobei sich dieser errechnete Wert sehr gut mit der Abbildung deckt. Unter der Annahme, dass bei einer im Vergleich zu Abb. 4.27 um den Faktor 10000 erhöhten Proteinkonzentration im Bindungspuffer auch die Belegungsdichte der Oberfläche um den Faktor 10000 steigt (und folglich zunächst eine Limitierung der Bindung durch eine vollständige Abdeckung aller zur Verfügung stehenden Bindungsstellen außer acht gelassen wird), so kann von einem mittleren Abstand zwischen zwei benachbart liegenden LHCII Apoproteinen in den Rekonstitutionsansätzen von nur noch ca. 29 nm von Proteinmittelpunkt zu Proteinmittelpunkt ausgegangen werden.

Diese Nähe benachbarter Proteine eröffnet durchaus die Möglichkeit, dass benachbart liegende Proteine um einzelne Pigmente kompetieren, wodurch die Rekonstitutionsausbeute verringert werden könnte. Da es sich hierbei auch um einen Durchschnittswert handelt, können sich benachbarte Proteine auch direkt bei der Faltung behindern. Ein zusätzliches Hindernis könnte auch die erzwungene Nähe zum Neutravidin auf der Glasoberfläche darstellen, wodurch eine Veränderung in der Proteinumgebung gegeben ist. Ein Einfluss des Neutravidins auf das Proteingerüst ist unter der gegebenen räumlichen Nähe beider Proteine durchaus vorstellbar. Auch die Art der Immobilisierung über ein Biotin mit einem relativ kurzen Spacerarm könnte Auswirkungen auf die Rekonstitutionsfähigkeit des LHCII haben, da die Bewegungsfreiheit vermutlich eingeschränkt wird. Hier hätte ein längerer Spacerarm zwischen dem Proteingerüst und dem Biotin möglicherweise Abhilfe geschaffen, hätte aber die Interpretation von Einzelmolekülspektren erschwert, da der Komplex dann deutlich mehr Bewegungsmöglichkeiten hätte, so dass in weiterführenden Experimenten beispielsweise die Polarisierung des emittierten Fluoreszenzlichtes nicht mehr hätte festgestellt werden können. Zusätzlich wäre die Wahrscheinlichkeit einer gegenseitigen Behinderung benachbarter Proteine während der Faltung weiter erhöht worden.

Schließlich ist eine Verringerung der Rekonstitutionsausbeute allein schon aufgrund der Immobilisierung wahrscheinlich. Möglicherweise hat auch der am Proteingerüst angebrachte Fluoreszenzfarbstoff selbst aufgrund der Immobilisierung einen größeren Einfluss auf die Rekonstitution als dies in Lösung – hier zeigen sich kaum Auswirkungen – der Fall ist.

Die Lebensdauer dieser erst auf der Oberfläche rekonstituierten Komplexe bewegte sich im selben Zeitrahmen, wie die der in bereits gefaltetem Zustand immobilisierten Komplexe (ca. 40 s). In der Literatur wurde für die vollständige Rekonstitution des LHCII aber eine Dauer von ca. 200 – 300 s (im Ensemble, Reinsberg et al., 2001; Horn & Paulsen, 2002) beobachtet. Zur Aufnahme von zeitaufgelösten Einzelmolekül-Fluoreszenzspektren wäre also wenigstens eine Erhöhung der Lebensdauer um den Faktor 5 notwendig – ein Problem, das schon im Zusammenhang mit Denaturierungsexperimenten nicht befriedigend gelöst werden konnte. Ein zusätzliches Hindernis stellte die trotz des Einsatzes eines 750 nm Cut-Off-Filters sehr starke Hintergrundfluoreszenz der Pigmentlösung des Rekonstitutionsansatzes dar (Abb. 4.42). Ausgelöst wurde diese vermutlich durch sehr langwellig emittierende Chlorophyllaggregate, die beim Einmischen der in Ethanol gelösten Pigmente in den OG-Rekonstitutionspuffer entstehen. Besonders Chl a neigt zu solchen Aggregaten, da es aufgrund seiner planaren Struktur Stapel bilden kann, was mit einer Verschiebung der Fluoreszenz in den längerwelligen Bereich einhergeht. Die Entstehung solche Aggregate konnte trotz Zusammenmischens auf dem Schüttler und einer gründlichen Zentrifugation zur Pelletierung der größten Aggregate nicht deutlich minimiert werden. Da unter diesen Bedingungen die Komplexfluoreszenz vollständig überlagert wurde, wurde die für eine erfolgreiche Rekonstitution mindestens notwendige Pigmentmenge (20 µg pro Glas) ermittelt (Abb. 4.43 und 4.44), und erneut versucht, die Rekonstitution zeitaufgelöst aufzuzeichnen. Aber auch die um den Faktor 10 reduzierte Pigmentmenge produzierte noch eine deutlich zu starke Hintergrundfluoreszenz, um rekonstituierte Komplexe sehen zu können (Abb. 4.45). Möglicherweise hätte sich dieses Problem auch durch den Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes umgehen lassen, der weiter im infraroten Bereich als der in dieser Arbeit eingesetzte DY776 (Dyomics) fluoresziert. Ideal wäre ein Fluoreszenzfarbstoff mit einem ähnlichen Absorptionsmaximum, um eine für einen Energietransfer ausreichend große Überschneidung mit der Komplexfluoreszenz zu gewährleisten, aber mit einem größeren „Stokes shift“, also einer weiter ins Infrarote verschobenen Fluoreszenz. Ein Farbstoff mit den genannten Eigenschaften ist im Moment jedoch nicht verfügbar. Zusätzlich würde sich auch das Problem der in diesem Wellenlängenbereich stark abnehmenden Empfindlichkeit der verfügbaren CCD-

Kameras, wie sie im Einzelmolekül-Messaufbau dieser Arbeit eingesetzt wurden, stellen. An dieser Stelle muss die weitere technische Entwicklung abgewartet werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz wurde durch die ausschließliche Verwendung von Chl b getestet, da dieses im Gegensatz von Chl a aufgrund seiner Formylgruppe und der dadurch bedingten geringeren Polarität weniger zur Bildung von „Stapeln“ – einer Übereinanderlagerung der planaren Porphyringerüste, der Ursache der Aggregatbildung – neigt. Für die Rekonstitution des LHCII ist Chl a nicht essentiell (Paulsen et al., 1990; Ros et al., 1998). Da jedoch aufgrund der Chl b-Anregung bei 488 nm in diesen Experimenten zwar die Chlorophyll a-Aggregate keine Rolle mehr spielten, dafür aber das gesamte im Ansatz befindliche Chlorophyll angeregt wurde, konnte keine nennenswerte Verringerung der Hintergrundfluoreszenz festgestellt werden.

Ein weiteres Problem, das die Aufzeichnung von Faltungskinetiken verhinderte, zeigte sich in Versuchen, während der Belichtung im Einzelmolekülmessaufbau eine Rekonstitution mit der zuvor erarbeiteten Methode zu erhalten, da auf der gesamten Oberfläche nach dem Entfernen des freien Pigmentes keine LHCII Komplexe detektiert werden konnten. Offensichtlich scheint die Belichtung die Faltung der oberflächenimmobilisierten Proteine zu verhindern. Möglicherweise werden instabile Faltungsintermediate durch die Belichtung zerstört bzw. können sich nicht bilden, so dass keine Komplexbildung stattfinden kann.

Diese Beobachtung steht zunächst im Widerspruch zur Vorgehensweise von Horn & Paulsen 2002 und Horn *et al.* 2007, die zeitaufgelöste Fluoreszenz-Ensemble Messungen zur LHCII-Faltung unter fortwährender Belichtung im Fluorimeter durchaus aufzeichnen konnten. Allerdings dürfte um Unterscheid dazu die Anregungsstärke im Einzelmolekül-Messaufbau mit seinem Anregungslaser deutlich höher liegen als die des von Horn & Paulsen eingesetzten Fluoreszenzspektrometers. Dies zeigt sich auch an der in der Einzelmolekülspektroskopie im Vergleich zur klassischen Fluoreszenzspektroskopie deutlich geringeren Lebensdauer belichteter Komplexe. Horn *et al.* konnten 2007 ein solches Faltungsintermediat beobachten – hier werden im Zuge sog. „double-jump“-Faltungsexperimente, bei denen zuerst Chl a und erst anschließend in einem 2. Schritt Chl b in den Rekonstitutionsansatz hinzugegeben wird, Zwischenstufen beschrieben, die in einem schnellen Schritt Chl a binden, bei denen die Rekonstitution aber bis zur Zugabe von Chl b nicht vollendet wird. Möglicherweise reagieren während der Faltung gerade diese Chl a-Zwischenstufen äußerst empfindlich auf eine Belichtung. Ein Zerfall der Komplexe während der Spülschritte kann nach der Erfahrung der Vorexperimente (Spülschritte mit OG- bzw. LM-haltigen Waschpuffern)

weitgehend ausgeschlossen werde, hier konnten bei Verwendung von LM auch nach 24 Stunden noch stabile Komplexe gezeigt werden.

Eine weitere Theorie, die die Empfindlichkeit des Faltungsprozesses gegenüber Belichtung erklären könnte, wird von Garab et al. Beschrieben: Hier wird innerhalb der Pigment-Protein-Komplexe von eine lokale Tempaurerhöhung aufgrund der Dissipation der Anregungsenergie bei Belichtung berichtet, die möglicherweise bei den während der Faltung instabilen Intermediaten deren Zerfall zur Folge haben könnte (Holm *et al.*, 2005, Dobrikova *et al.*, 2003, Cseh *et al.*, 2000). Um solche Intermediate näher charakterisieren zu können, wäre allerdings zunächst deren genaue Identifikation und die Isolierung notwendig.

## 5.4. Technische Aspekte

Im folgenden Absatz sollen kurz die Vorzüge und Nachteile der hauptsächlich in dieser Arbeit eingesetzten Techniken – Fluoreszenzspektroskopie, AFM und Einzelmolekülspektroskopie – gegenübergestellt und diskutiert werden.

### *Fluoreszenzspektroskopie:*

Die Vorteile der klassischen Fluoreszenzspektroskopie mit kommerziell verfügbaren Fluorimetern liegen vor allem in der hohen Empfindlichkeit und der relativ einfachen Messanordnung. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes kann mittels eines Monochromators exakt bestimmt werden. Durch geeignete Software lassen sich aus den Spektren die verschiedensten Parameter ableiten. Auch Prozesse können durch geeignete Apparaturen über eine Fluoreszenzänderung aufgezeichnet werden (Horn 2004, Horn *et al.*, 2007). Für die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Experimente ist es nachteilig, dass ausschließlich Ensemble-Messungen durchgeführt werden können, so dass stets überlagernde Signale von einer großen Anzahl an Fluorophoren gemessen werden. Zudem kann nur gemessen werden, dass etwas fluoresziert, das *wie* kann – z.B. bei Oberflächen - nicht dargestellt werden. Somit wurde diese Technik im Verlauf dieser Arbeit erfolgreich zur Kontrolle einzelner experimenteller Schritte herangezogen, einzelne Komplexe oder Oberflächenstrukturen können aber nicht beobachtet werden. Im Rahmen der Etablierung eines Verfahrens zur Immobilisierung erwies sich gerade dieser Punkt als nachteilig, was sich bei der Untersuchung vergleichbarer Proben im Fluorimeter bzw. im AFM gezeigt hat.

Eine Weiterentwicklung der Fluoreszenzspektroskopie stellt das Fluoreszenzmikroskop dar, bei dem das Objekt über eine Optik direkt beobachtet und über eine CCD-Kamera aufgezeichnet werden kann. Im Unterschied zur Fluoreszenzspektroskopie können hier räumliche Informationen, z.B. die Lage bestimmter Stoffe innerhalb von Zellen, erfasst werden. Zur Beobachtung einzelner Moleküle, wie in dieser Arbeit, ist die optische Auflösung solcher Fluoreszenzmikroskope allerdings nicht groß genug, daher wurde dieses Verfahren im Rahmen dieser Arbeit nicht angewendet.

Basierend darauf wurde die Technik des konfokalen Fluoreszenzmikroskopes entwickelt, die im Unterschied zur klassischen Fluoreszenzmikroskopie nicht das gesamte Präparat beleuchtet, sondern stets nur einen sehr kleinen Punkt belichtet. Durch eine Lochblende („*pinhole*“) können Fluoreszenz-Überlagerungen aus anderen Belichtungsebenen effizient herausgefiltert werden, wodurch die Auflösung stark verbessert wird. Zur Belichtung wird hierbei meist – auch hier – ein Laser eingesetzt. Diese Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, um die Hintergrundfluoreszenz, die durch die einzelnen Immobilisierungsschritte verursacht wird, zu untersuchen sowie zur Findung einer für weitergehende Experimente geeigneten Oberflächenbelegungsdichte. Nachteilig ist hier, dass das Objekt in Form einzelner Lichtpunkte abgerastert werden muss, um anschließend aus den einzelnen Punkten das Gesamtbild zusammensetzen zu können. Daher können mit dieser Technik keine fortlaufenden Prozesse abgebildet werden, da mit zunehmender Rastergeschwindigkeit die Auflösung abnimmt.

### *AFM*

Das AFM stellt im Gegensatz zur Fluoreszenzspektroskopie und zur Einzelmolekülspektroskopie kein optisches Verfahren dar, die Oberflächen werden direkt durch Abrastern abgebildet. Somit können Informationen über das *wie* (die Oberflächenstruktur und die Homogenität verschiedener Oberflächenbereiche) bis zu einer Auflösung von ca. 0,1 nm erhalten werden, die durch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen nicht zugänglich sind. Somit kann beispielsweise unterschieden werden, ob die Anlagerung von Proteinen unter einer unspezifischen Adsorption (bei gleichzeitiger irreversibler Denaturierung) oder spezifisch über einen „Anker“ an die Oberfläche stattfindet (Abb. 4.23). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Technik angewendet, um die Qualität der Immobilisierungen zu überprüfen. Voraussetzung ist hier die Verwendung einer Oberfläche, die eine möglichst geringe Grundrauhigkeit aufweist, meist wird hierfür Glimmer benutzt, der allerdings nicht durchsichtig ist und somit für die meisten optischen Verfahren – für alle im Rahmen dieser Arbeit angewendeten – ungeeignet ist. Allerdings können Oberflächenmodifikationen von Glimmer direkt auf

Glas übertragen werden, daher besitzen die Messergebnisse dieser Experimente auch nach der Übertragung auf Glasoberflächen zur Aufnahme der Einzelmolekülspektren eine große Aussagekraft. Limitierungen können durch sehr ähnliche Oberflächenstrukturen entstehen, die anhand solcher AFM-Aufnahmen nur schwer unterschieden werden können (z. B. in dieser Arbeit Neutravidin- bzw. LHC-Oberflächen, Abb. 4.24). Zur Aufzeichnung von Kinetiken, wie sie im weiteren Verlauf dieser Arbeit erstellt wurden, ist das AFM aufgrund der Messgeschwindigkeit – ähnlich wie auch beim konfokalen Fluoreszenzmikroskop - ungeeignet.

### *Einzelmolekülspektroskopie*

Die Einzelmolekülspektroskopie stellt eine Abwandlung der Fluoreszenzmikroskopie dar, hier werden die Proben i.d.R. im TIRF-Verfahren (*total internal reflection fluorescence*) angeregt. Die genaue Funktionsweise dieser Technik wurde bereits in der Einleitung (Abschnitt 1.4.2.) vorgestellt. Um die von einzelnen Molekülen emittierte Fluoreszenz für eine Detektion stark genug auftreten zu lassen, wird die Probe hier durch einen Laser angeregt. Hierdurch wird eine ausreichende Anregungsenergie auf das Fluorophor gegeben, um ein Verschmelzen der Fluoreszenz mit dem Hintergrundrauschen zu vermeiden. Auf diese Art und Weise lassen sich Effekte, die durch die Überlagerung der Fluoreszenzen verschiedener Moleküle entstehen, eliminieren. Die Detektion des emittierten Lichtes erfolgt durch eine hochempfindliche CCD-Kamera, so dass ähnlich wie im Fluoreszenzspektrometer die Beobachtung von Prozessen über einen „live-Mitschnitt“ möglich ist. Die Kamera bildet – vergleichbar mit einem Fluoreszenzmikroskop – jeweils den gewählten Bildausschnitt ab, die Oberflächen werden also direkt beobachtet. Nachteilig ist hier der hohe technische (und monetäre) Aufwand, der betrieben werden muss. Hinzu kommt die im Vergleich zu einem Fluoreszenzspektrometer relativ eingeschränkte Wahl der Anregungswellenlänge, die von der Verfügbarkeit geeigneter Laser abhängig ist. Auch die Emissionswellenlänge kann ausschließlich über verschiedene Filter eingegrenzt werden, eine genaue Bestimmung (wie im Fluorimeter mittels eines Emissionsmonochromators) ist hier über die CCD-Kamera nicht möglich.

Für die Experimente dieser Arbeit wurde diese Methode zur Beobachtung von Prozessen auf einzelmolekularer Ebene angewendet. Die Grenzen dieser Technik haben sich dabei vor allem im infraroten Emissionsbereich gezeigt, hier nimmt die Empfindlichkeit der verfügbaren CCD-Kameras sehr stark ab. Aus diesem Grund konnte ein möglicher Lösungsweg für die starke Hintergrundfluoreszenz, die durch die Chlorophyll-Aggregate verursacht wird, nämlich die Verwendung von

Fluoreszenzfarbstoffen, deren Emission weiter in den infraroten Bereich verschoben ist, nicht weiter verfolgt werden.

### 5.5 Ausblick

Mit den im Verlauf dieser Arbeit entwickelten Methoden zur Herstellung von Neutraavidin-beschichteten Glasoberflächen und der Immobilisierung von LHCII in denaturierter und gefalteter Form wurde eine gute Plattform zur einzelmolekularen Beobachtung des LHCII und anderer Proteine geschaffen. Einzige Voraussetzung für eine solche Oberflächenkoppelung stellt die Biotinylierung dar, die sich über Standard-Methoden mit praktisch jedem beliebigen Protein – auch Membran-Proteinen, wie dem LHCII - oder auch DNA-Fragmenten durchführen lässt. Somit wird eine Vielzahl von Biomolekülen für eine einzelmolekülspektroskopische Beobachtung zugänglich. Auf Basis dieser Plattform konnte eine spezifische Immobilisation sowohl von LHCII-Apoproteinen als auch von fertig rekonstituierten LHCII-Komplexen gezeigt werden. Diese Komplexe waren in geeignetem Puffer (mit LM als Detergenz) über mehr als 24 Stunden stabil. Darüber hinaus konnte eine Methode entwickelt werden, mit der sich auf festen Oberflächen immobilisierte LHCII-Apoproteine rekonstituieren ließen. Allerdings konnten aufgrund des vorzeitigen Ausbleichens der Komplexe und der Hintergrundfluoreszenz (ausgelöst durch die zur Rekonstitution notwendige Pigmentlösung) während des Rekonstitutionsvorganges keine zeitaufgelösten Einzelmolekül-Faltungskinetiken aufgezeichnet werden.

Einige Lösungsvorschläge für die noch bestehenden Probleme wurden im Verlauf der Diskussion vorgestellt. Ob damit eine Lösung erreicht werden kann, müsste durch weitere Experimente untersucht werden.

Auf Basis einer erfolgreichen Aufnahme einer Faltungs- bzw. Entfaltungskinetik an einzelnen LHCII Proteinen könnte in weiterführenden Experimenten über eine differenzierte Detektion der Fluoreszenzemission auch die Reihenfolge der Pigmentbindung und deren Heterogenität untersucht werden, ähnlich wie Horn *et al.* 2007 dies in Ensemble-Messungen untersucht haben. Diese Experimente würden wertvolle Hinweise für das Verständnis der Faltung von Membranproteinen und die Bindung der dazu notwendigen Cofaktoren liefern.

Ein weiterer Ansatz, um dem Faltungsmechanismus des LHCII auf die Spur zu kommen, ist der Einsatz der Elektronen-Spin-Resonanz-(ESR)-Spektroskopie. Mit dieser Technik

kann der Abstand zwischen zwei am Proteingerüst angebrachten Spin-Sonden – kleine Moleküle mit ungepaarten Elektronen – gemessen werden. Diese Abstände verändern sich im Zuge der Komplexbildung. Erste Experimente dazu wurden von Dockter 2009 bzw. Dockter *et al.*, 2009 beschrieben. Im Falle von einer zweiphasigen Faltung sollten alle Proteine im Ensemble eine ähnliche Abstandsverteilung aufweisen, im Falle von zwei unterschiedlich schnellen Faltungswegen sollte man (mindestens) eine Zweiteilung der Abstände erwarten. Diese Nicht-spektroskopische Methode kann im Gegensatz zur einzelmolekularen Fluoreszenzspektroskopie aber keine Informationen über die Reihenfolge der Bindung der verschiedenen Pigmentspezies liefern, hierfür sind weitere fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen an einzelnen LHCII-Komplexen unumgänglich.

Allen bisherigen Experimenten dieser Arbeit gemein ist die Tatsache, dass die LHCII-Proteine – in ihrer Eigenschaft als Membranproteine – stets in Detergenz-Micellen gelöst vorlagen, was genau genommen nur als „grobes Hilfsmittel“ bezeichnet werden kann, in der Natur liegen Membranproteine in Lipidschichten eingebettet vor.

Experimentell ist es mittlerweile gelungen, rekonstituierte LHC-Komplexe in Lipidvesikel zu inserieren und im Anschluß daran die zur Rekonstitution nach wie vor notwendigen Detergenzien weitgehend abzureichern – unter geeigneten Bedingungen konnte auch eine gerichtete Orientierung der Komplexe in den Vesikeln erreicht werden, was für die Interpretation spektroskopischer Messungen von entscheidendem Vorteil ist (Boggasch, 2006). Großen Einfluß auf die Insertion und die Konformation des LHCII hat dabei die Lipidzusammensetzung der Membranen. Um inserierte Membranproteine experimentell besser zugänglich zu machen, gibt es die Möglichkeit, diese Membranvesikel auf planaren Oberflächen zu spreiten, so daß eine auf die Oberfläche aufgelagerte, planare Lipiddoppelschicht entsteht. Inwieweit diese gespreiteten Vesikel bzw. die darin eingelagerten Proteine für entsprechende einzelmolekülspektroskopische Aufnahmen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, weiterhin zugänglich sind, müsste experimentell untersucht werden. Somit ließen sich fertig rekonstituierte Komplexe in einer „natürlicheren“ Umgebung als einer Detergenzhülle beobachten – beim Vorgang der Rekonstitution selbst ist bislang der Einsatz von Detergenzien unabdingbar (Ruschmann 2005, Boggasch 2006). Ein Vergleich der Rekonstitutionsbedingungen (Detergenz vs. Lipid) wäre sicherlich aufschlussreich. Hier muss die weitere Entwicklung abgewartet werden.

Eine noch über einfach gespreitete Membranen hinaus gehende Version sind sogenannte „*tethered membranes*“, bei denen sich zwischen der Trägeroberfläche (Gold) und der Membran noch eine Spacerschicht befindet, so daß eingelagerte

## 5 Diskussion

---

Membranproteine auf beiden Seiten der Membran in Lösung vorliegen können. In solche künstlichen Membranen können *in vitro* synthetisierte Membranproteine direkt inkorporiert werden, so daß in diesem System ganz ohne Detergenzien gearbeitet werden kann (Robelek *et al.*, 2007). Im Bezug auf den LHCII besteht hier allerdings die Schwierigkeit, dass zusätzlich zur Faltung und Inserierung in die Membran – im Unterschied zu den von Robelek eingesetzten Rezeptorproteinen – auch noch Cofaktoren (Chlorophylle) gebunden werden müssen – abgesehen davon, daß – wie oben beschrieben – die Rekonstitution direkt in die Membran bislang nicht gelungen ist.



### 6. Zusammenfassung

Der Faltungsprozess des Hauptlichtsammelkomplexes des Photosystems II aus höheren Pflanzen (*light harvesting complex II*, LHCII) wurde bereits mehrfach untersucht, die Experimente hierzu fanden stets im Ensemble statt. Anhand der bislang veröffentlichten Faltungskinetiken des LHCII aus höheren Pflanzen lassen sich aber keine eindeutigen Aussagen bezüglich der Diversität der Faltungswege treffen. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit Faltungskinetiken einzelner LHCII-Moleküle während der Komplexbildung aufgenommen werden, um weitergehende Informationen zum Faltungsmechanismus zu erhalten und zur Frage, ob hier mehrere unterschiedliche Wege eingeschlagen werden.

Hierfür war zunächst die Etablierung einer Oberflächenimmobilisierung mit Glas als Trägermaterial notwendig. Nachdem Versuche, diese Immobilisierung über einen His<sub>6</sub>-tag oder über einen heterobifunktionellen Linker zu bewerkstelligen, nicht zum Erfolg geführt haben, konnte eine Immobilisierung des Biotin-markierten Proteins an Oberflächen-gebundenes Avidin erreicht werden. Die Qualität dieser Immobilisierung wurde hierbei sowohl über Bindungsversuche mit fluoreszenzfarbstoffmarkiertem Protein als auch über eine direkte Kontrolle der Oberflächenbeschaffenheit mittels Rasterkraftmikroskopie überprüft. Die für die folgenden Versuche optimale Belegungsdichte wurde im konfokalen Fluoreszenzmikroskop ermittelt. Zudem wurde sichergestellt, dass die Proteine vereinzelt auf der Oberfläche immobilisiert vorliegen.

Auf dieser Basis wurden LHCII-Komplexe, die zuvor *in vitro* rekonstituiert wurden, immobilisiert und Versuche zur kontrollierten Denaturierung unternommen, um Zerfallskinetiken im Verfahren der internen Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (*total internal reflection fluorescence*, TIRF) aufnehmen zu können. Hierbei traten Schwierigkeiten bezüglich der Lebensdauer der Komplexe unter Laser-Belichtung auf, da sich die Löschung der Fluoreszenz durch Zerstrahlung der Pigmente einerseits oder Dissoziation der LHCII andererseits nicht unterscheiden ließen. Auch durch verschiedene Maßnahmen zur Erhöhung der Lebensdauer konnte diese nicht in dem Maße gesteigert werden, wie es experimentell notwendig gewesen wäre.

Für das eigentliche Hauptziel dieser Arbeit – die Aufzeichnung von Einzelmolekül-Faltungskinetiken – war die Entwicklung einer Methode zur Rekonstitution oberflächen-immobilisierter LHCII-Apoproteine notwendig. Dieses Ziel wurde mithilfe einer Detergenzmisch-Rekonstitution erreicht. Der Erfolg der Rekonstitution konnte

experimentell sowohl im Fluorimeter anhand des komplexinternen Energietransfers auf einen kovalent an das Protein gebundenen Infrarot-Fluorophor als auch im TIRF-Verfahren direkt beobachtet werden. Auch hier konnte nach ca. 80 Sekunden ein Ausbleichen der Komplexe während der Belichtung durch den Anregungs-Laser beobachtet werden.

In Versuchen zur Beobachtung des Komplexbildungsvorganges zeigte sich, dass die Rekonstitution offenbar durch die Belichtung massiv gestört wird. Ein weiteres Problem war eine sehr starke Hintergrundfluoreszenz, ausgelöst durch die zur Rekonstitution notwendige Pigmentlösung, die trotz der TIRF-Anregung von ausschließlich oberflächengebundenem Material die Fluoreszenz der Komplexe überlagerte. Somit konnte die Rekonstitution oberflächenimmobilisierter LHCII-Proteine zwar in Vorher-Nachher-Aufnahmen gezeigt werden, der Faltungsprozess an sich konnte dagegen im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgezeichnet werden.

### 6. Summary

The folding of the main light-harvesting complex of photosystem II from higher plants (light-harvesting complex II, LHCII) has already been researched several times. Previously published folding kinetics of LHCII from higher plants are unequivocal regarding the diversity of folding pathways. So far all experiments focused on assembly measurements. This work researches the LHCII folding kinetics of individual molecules during the complex formation, aiming to obtain further information about the folding mechanism and to clarify whether there are several different folding pathways involved.

At first it was necessary to establish an immobilization procedure with glass as a substrate. Biotin-labelled proteins were immobilized to surface-bound avidin, after first attempts via a heterobifunctional His<sub>6</sub>-tag or via a linker were not successful. The quality of this immobilization was ascertained in two ways: by binding experiments with fluorescence-dye labelled proteins and via direct control of the surface by *atomic force microscopy* (AFM).

The optimum protein density for the sequentially experiments was determined in the confocal fluorescence microscope. Moreover, it was ensured that single proteins are immobilized on the surface.

On this presumption previously *in vitro* reconstituted LHCII complexes were immobilized and experiments of controlled denaturation were carried out in order to measure decay kinetics using the *total internal reflection fluorescence* (TIRF). Difficulties arose with respect to the lifetime of the complexes under laser exposure. The source of fluorescence quenching could not explicitly be assigned to severely damaged pigments or dissociated LHCII. Even various measures to increase the lifetime of the complexes were not successful to such a degree, as it would have been experimentally necessary.

For the real objective of this work - the monitoring of single-molecule folding kinetics - a method to reconstitute surface-immobilized LHCII-apoproteins had to be developed. This aim was achieved by using a mixed detergent-reconstitution.

The success of the reconstitution experiments could be observed directly in two ways: In the fluorimeter using the energy transfer within the protein complex to a covalently bound infrared fluorophore and in the *total internal reflection fluorescence* (TIRF). After about 80 seconds exposure to the excitation laser a fading of the complexes could be observed as well. An exposure to the excitation laser obviously disturbed the reconstitution

severely in experiments observing the LHCII formation. Very high background fluorescence caused by the pigment solution necessary for reconstitution overlaid the complex fluorescence, despite the higher-TIRF excitation of merely surface-bound material, proving to be another difficulty. Within the bounds of this work, the reconstitution of surface-immobilized LHCII proteins could be shown in before-after shots, whereas the immediate folding process could not be monitored.

## 7 Literatur

**Bauer, J., Hiltbrunner, A., Kessler, F.** (2001).

Molecular biology of chloroplast biogenesis: gene expression, protein import and intraorganellar sorting.

*CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 420-433.

**Beier M. & Hoheisel, J.D.** (1999).

Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding of DNA-microchips.

*Nucleic Acids Res.* **27**, 1970-1977.

**Benters, R., Niemeyer, C.M., Wöhrle, D.** (2001).

Dendrimer-activated solid supports for nucleic acid and protein microarrays.

*Chembiochem* **2**, 686-694.

**Boekema E.J., van Roon H., van Breemen J.F.L., Dekker J.P.** (1999).

Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes.

*Eur. J. Biochem* **266**, 444 – 452.

**Boggasch, S.** (2006).

Immobilisierung von rekombinantem Haupt-Lichtsammlerkomplex

LHCIIb in Liposomen, an Affinitätsmaterialien und Nanokristallen. biochemische und einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen.

*Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

**Booth PJ, Curnow P.** (2006).

Membrane proteins shape up: understanding in vitro folding.

*Curr Opin Struct Biol.* **16**(4):480-8.

**Booth, P.J., Paulsen, H.** (1996).

Assembly of light-harvesting chlorophyll a/b complex *in vitro*. Time-resolved fluorescence measurements.

*Biochemistry* **35**, 5103-5108.

**Bopp MA, Jia Y, Li L, Cogdell RJ, Hochstrasser RM.** (1997).

Fluorescence and photobleaching dynamics of single light-harvesting complexes.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(20),10630-5.

**Bowie, J.U.** (2005)

Solving the membrane protein folding problem.

*Nature*, **438**, 581-589

**Brockmann, J., Frutos, A., Corn, R.** (1999).

A multistep chemical modification procedure to create DNA arrays on gold surfaces for the study of protein-DNA interactions with surface plasmon resonance imaging.

*Am. Chem. Soc.* **121**, 8044-8051.

**Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Müller, M., Ibrahimi, I., Häuptle, M.T., Dobberstein, B.,** (1987).

A T5-promoter-based transcription-translation system for the analysis of protein expression *in vivo* and *in vitro*.

*Methods. Enzymol.* **155**, 416-433

- Butler, P.J.G. & Kühlbrandt, W.** (1988).  
Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex from chloroplast membranes.  
*PNAS* **85**, 3797-3801.
- Cseh Z, Rajagopal S, Tsonev T, Busheva M, Papp E, Garab G.** (2000).  
Thermooptic effect in chloroplast thylakoid membranes. Thermal and light stability of pigment arrays with different levels of structural complexity.  
*Biochemistry*. **39**(49), 15250-7.
- de Alwis U, Wilson GS.** (1989).  
Strategies for the reversible immobilization of enzymes by use of biotin-bound anti-enzyme antibodies.  
*Talanta*. **36**(1-2), 249-53.
- Dekker J. P, Boekema E. J.** (2005).  
Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants.  
*BBA* **1706**, 12-39.
- Dobrikova AG, Várkonyi Z, Krumova SB, Kovács L, Kostov GK, Todinova SJ, Busheva MC, Taneva SG, Garab G.** (2003).  
Structural rearrangements in chloroplast thylakoid membranes revealed by differential scanning calorimetry and circular dichroism spectroscopy. Thermo-optic effect.  
*Biochemistry*. **42**(38), 11272-80.
- Dobson CM.** (2003).  
Protein folding and misfolding.  
*Nature*. **426**, 884-90.
- Dockter, C.** (2009).  
Untersuchung der Struktur und Assemblierung des Lichtsammelkomplexes II höherer Pflanzen mittels elektronenparamagnetischer Resonanz (EPR).  
*Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Dockter, C., Volkov, A., Bauer, C., Polyhach, Y., Joly-Lopez, Z., Jeschke, G., Paulsen, H.** (2009).  
Refolding of the integral membrane protein light-harvesting complex II monitored by pulse EPR.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 18485–18490.
- Engelmann, D.M., Chen, Y., Chin, C-N., Curran, A.R., Dixon, A.M., Dupuy, A.D., Lee, A.S., Lehnert, U., Matthews, E.E., Reshetnyak, Y.K., Senes, A., Popot, J-L.** (2003).  
Membrane protein folding: beyond the two stage model.  
*FEBS Letters* **555**, 122-125.
- Erker, W., Boggasch, S., Xie, R., Grundmann, G., Paulsen, H., Basché, T.** (2009)  
Assemblies of semiconductor quantum dots and light-harvesting-complex II.  
*J. of Luminescence*, **130** (9), 1624-1627.

**Gerken, U., Wolf-Klein, H., Huschenbett, C., Götze, B., Schuler, S., Jelezko, F., Tietz, C., Wrachtrup, J., Paulsen, H.** (2002).

Single molecule spectroscopy of oriented recombinant trimeric light harvesting complexes of higher plants.

*Single Molecules* **3** (4), 183-188.

**Gerdes, L., Bals, T., Klostermann, E., Karl, M., Phillippar, K., Hünken, M., Soll, J., Schünemann, D.** (2006).

A second thylakoid membrane localized Alb3/Oxa1/YidC homologue is involved in proper chloroplast biogenesis in *Arabidopsis thaliana*.

*J. Biol. Chem* **281**, 16632.16642.

**Grundmann G.** (2005).

Zeitaufgelöste Messung der Faltung und Assemblierung von LHCII.

*Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

**Gundlach, K.** (2010).

Pflanzlicher Lichtsammler (LHCII) in Hybridkomplexen mit organischen Farbstoffen und anorganischen Halbleiter-Nanokristallen (Quantum dots).

*Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

**Heldt W. H.** (1999).

Pflanzenbiochemie.

*Spektrum Akademischer Verlag, 2.Aufl., Heidelberg, Berlin, Oxford, ISBN 3-86025-261-5.*

**Hobe, S.** (1995)

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

*Verlag Mainz, Wissenschaftsverlag, Aachen.*

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

Determination of relative chlorophyll binding affinities in the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex.

*J. Biol. Chem.* **278**, 5912-5919.

**Holm JK, Várkonyi Z, Kovács L, Posselt D, Garab G.** (2005).

Thermo-optically induced reorganizations in the main light harvesting antenna of plants. II. Indications for the role of LHCII-only macrodomains in thylakoids.

*Photosynth Res.* **86**(1-2), 275-82.

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

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

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

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

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

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

**Hooper, J.K., Eggink, L.L., Chen, M.,** (2007).

Chlorophylls, ligands and assembly of light-harvesting complexes in chloroplasts.

*Photosynth. Res.* **94**, 387-400.

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

Folding *in vitro* of light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein is coupled with pigment binding.

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

**Horn, R.** (2004)

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

*Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**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.

**Huang KS, Bayley H, Liao MJ, London E, Khorana HG.** (1981).

Refolding of an integral membrane protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments.

*J Biol Chem.* **256**(8), 3802-9.

**Huschenbett C.** (2001).

Zugänglichkeit einzelner Domänen des Lichtsammelkomplexes

LHCII: ein Vergleich zwischen Monomeren und Trimeren.

*Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, 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 (LHCII).

*Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 340 – 345.

**Jeschke G., Bender, A., Schweikartdt, T., Panek, G., Decker, H., Paulsen, H.** (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.

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

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

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

**Jordan, C., Frutos, A., Thiel, A., Corn, R.** (1997).

Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA hybridization adsorption and streptavidin/DNA multilayer formation at chemically modified gold surfaces.

*Anal. Chem.* **69**, 4939-4947.

**Kessler, D., Roth, P.J., Theato, P** (2009)

Reactive surface coatings based on polysilsesquioxanes: Controlled functionalization for specific protein immobilization.

*Langmuir* **25** (17), 10068-10076.

**Köhler, S.** (2005).

Rekonstitution eines oberflächenimmobilisierten Lichtsammelproteins höherer Pflanzen.

*Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

- Kühlbrandt, W., Wang, D.N., Fujiyoshi, Y.** (1994).  
Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography.  
*Nature* **367**, 614-621.
- Kumar, M.A., Sarath Babu, V.R., Karanth, N.G., Thakur, M.S.** (2004).  
Stabilization of immobilized glucose oxidase against thermal inactivation by silanization for biosensor applications.  
*Biosens Bioelectron.* **19**(10), 1337-41.
- Kumar, P., Choithani, J., Gupta, K.** (2004).  
Costruction of oligonucleotide arrays on a glass surface using a heterobifunctional reagent, N-(2-trifluoroethanesulfonatoethyl)-N-(methyl)-triethoxysilylpropyl-3-amine (NTMTA).  
*Nucleic Acids Res.* **32**, e80.
- Kuttkat, A., Edhofer, I., Eichacker, L.A., Paulsen, H.** (1997).  
Light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein stably inserts into etioplast membranes supplemented with Zn-peophytin *a/b*.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 20451-20455.
- Laemmli, U. K.**, (1970).  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature* **227**, 680-685.
- Liu, Z., Yan, H., Kuang, T., Zhuang, J., Bui, L., An, X., Chang, W.** (2004).  
Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution.  
*Nature* **428**, 287-292.
- Livnah, O., Bayer, E.A., Wilchek, M., Sussman, J.L.** (1993).  
Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5076-5080.
- London E., Khorana H.G.** (1982).  
Denaturation and renaturation of bacteriorhodopsin in detergents and lipid-detergent mixtures.  
*J Biol Chem.* **257**(12), 7003-11.
- Lue, R.Y.P., Chen, G.Y.J., Zhu, Q., Lesaichere, M.-L., Yao, S.Q.** (2004).  
Site-Specific immobilization of biotinylated proteins for protein microarray analysis.  
*Methods in Molecular Biology*, volume **264**: Protein Arrays; Artikel 8.
- 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.
- Pantano P., Kuhr W.G.** (1993).  
Dehydrogenase-modified carbon-fiber microelectrodes for the measurement of neurotransmitter dynamics. 2. Covalent modification utilizing avidin-biotin technology.  
*Anal Chem.* **65**(5):623-30.
- Park, H., Hooper, J.K.** (1997).  
Chlorophyll synthesis modulates retention of apoproteins of lightharvesting complex II by the chloroplast in *Chlamydomonas reinhardtii*.  
*Physiol. Plant* **101**, 135-142.

- Paulsen, H., Finkenzeller, B., Kühlein, N.** (1993).  
Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein.  
*Eur. J. Biochem.* **215**, 809-816.
- 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.
- Pegg E.C., Walker G.S., Scotchford C.A., Farrar D., Grant D.** (2009)  
Mono-functional aminosilanes as primers for peptide functionalization.  
*J Biomed Mater Res A.* **90**(4), 947-58.
- 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.
- 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.  
*BBA* **975**, 384-394.
- Reinsberg, D., Ottmann, K., Booth, P.J., Paulsen, H.** (2001).  
Effects of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, and xanthophylls on the *in vitro* assembly kinetics of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex LHCIIb.  
*J. Mol. Biol.* **308**, 59-67.
- Robelek R, Lemker ES, Wiltschi B, Kirste V, Naumann R, Oesterhelt D, Sinner EK.** (2007).  
Incorporation of *in vitro* synthesized GPCR into a tethered artificial lipid membrane system.  
*Angew Chem Int Ed Engl.* **46**(4), 605-8.
- Rogl, H., Kosemund, K., Kühlbrandt, W., Collison** (1998).  
Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography.  
*FEBS Lett.* **432**, 21-26.
- Ros, F., Bassi, R., Paulsen, H.** (1998).  
Pigment-binding properties of the recombinant photosystem II subunit CP26 reconstituted *in vitro*.  
*Eur. J. Biochem.* **253**, 653-658.
- Rosano, C., Arosio, P., Bolognesi, M.** (1999).  
The X-ray three-dimensional structure of avidin.  
*Biomol Eng.* **16**(1-4), 5-12.
- Ruban A.V., Wentworth M., Yakushevskaya A.E., Andersson J., Lee P.J., Keegstra W., Dekker J.P., Boekema E.J., Jansson S., Horton P.** (2003).  
Plants lacking the main light-harvesting complex retain photosystem II macro-organization.  
*Nature* **421**, 648-52.

- Ruschmann, K.** (2005).  
Versuch der Rekonstitution von rekombinantem Lichtsammelprotein in pigmentbeladenen Liposomen.  
*Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Scheer, H.** (1999).  
Pigmente und Antennenkomplexe.  
In: Photosynthese (1999), Häder, H.-P. (Hrsg), Thieme Verlag Stuttgart
- Schmid, V. H. R.** (2008).  
Light-harvesting complexes of vascular plants.  
*Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 3619–3639.
- Schuler, B., Eaton, W.A.** (2008)  
Protein folding studied by single-molecule FRET.  
*Curr. Opin. Struc. Biol.* **18**, 16.26.
- Schuler, S.** (2006).  
Optische Untersuchungen einzelner Quantensysteme: Experimentelle Verifizierung verschiedener Fluktuationstheoreme eines diskreten Systems.  
Einzelmolekülspektroskopie an Lichtsammelkomplexen höherer Pflanzen.  
*Dissertation*, 3. Physikalisches Institut, Universität Stuttgart.
- Schünemann, D.** (2007).  
Mechanisms of protein import into thylakoids of chloroplasts.  
*Biol Chem.* **388**(9), 907-15.
- Schwaderer, P.** (2004).  
Untersuchungen zur Faltungsdynamik der Lichtsammelkomplexe höherer Pflanzen.  
*Diplomarbeit*, 3. Physikalisches Institut, Universität Stuttgart.
- Shriver-Lake, L.C., Donner, B., Edelstein, R., Breslin, K., Bhatia, S.K., Ligler, F.S.** (1997).  
Antibody-immobilization using heterobifunctional crosslinkers.  
*Biosensors & Bioelectronics* **12** (11), 1101-1106.
- Standfuss, R., van Scheltinga, A. C. T., 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.
- Su X., Wu Y.J., Robelek R., Knoll W.** (2005).  
Surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance study of streptavidin film structure effects on biotinylated DNA assembly and target DNA hybridization.  
*Langmuir.* **21**(1), 348-53.
- Surrey, T., Jähnig, F.** (1992).  
Refolding and oriented insertion of a membrane protein into a lipid bilayer.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7457-7461
- Tietz, C., Jelezko, F., Gerken, U., Schuler, S., Schubert, A., Rogl, H., Wrachtrup, J.** (2001).  
Single molecule spectroscopy on the Light-harvesting Complex II of higher plants.  
*Biophysical Journal* **81**, 556-562

- Todt S, Blohm DH.** (2009).  
Immobilization chemistries.  
*Methods Mol Biol.* **529**, 81-100.
- Tu, C-J., Schuenemann, D., Hoffman, N.E.** (1999).  
Chloroplast FtsY, Chloroplast Signal Recognition Particle, and GTP Are Required to Reconstitute the Soluble Phase of Light-harvesting Chlorophyll Protein Transport into Thylakoid Membranes  
*J. Biol. Chem.* **274**, 27219-27224.
- Ulman, A.** (1996).  
Formation and structure of self-assembled monolayers.  
*Chem. Rev.* **96**, 1533-1554.
- Valiyaveetil F.I., Zhou Y., MacKinnon R.** (2002).  
Lipids in the structure, folding, and function of the KcsA K<sup>+</sup> channel.  
*Biochemistry.* **41**(35), 10771-7.
- van Amerongen H., van Grondelle R.** (2001).  
Understanding the energy transfer function of LHCII, the major light-harvesting complex of green plants.  
*Journal of Physical Chemistry B* **105**, 604 – 617.
- van Grondelle R., Novoderezhkin V. I.** (2006).  
Energy transfer in photosynthesis: experimental insights and quantitative Models.  
*Phys. Chem. Chem. Phys.* **8**, 793–807.
- van Oijen A.M., Ketelaars M., Kohler J., Aartsma T.J., Schmidt J.** (1999).  
Unraveling the electronic structure of individual photosynthetic pigment-protein complexes  
*Science* **285**, 400-2.
- Vothknecht, U.C. & Soll, J.** (2006).  
Protein import into chloroplasts: who, when, and how?  
In: Wise RR, Hooper, J.K. (Editors): *The structure and function of plastids. Advances in photosynthesis and respiration*, Vol **23**, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 53-74.
- Wayment J.R. & Harris J.M.** (2009).  
Biotin-Avidin binding kinetics measured by single-molecule imaging.  
*Anal. Chem.* **81**, 336-342.
- Wolf-Klein, H.** (2001).  
Biomimetisches Modell eines Photosystems aus dem pflanzlichen Photosyntheseapparat. Energietransfermessungen und Einzelmolekülspektroskopie an Fluoreszenzfarbstoff-markiertem rekombinantem Lichtsammelkomplex.  
*Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Yakushevskaya A.E., Jensen P. E., Keegstra W., van Roon H., Scheller H. V., Boekema E. J., Dekker J. P.** (2001).  
Supermolecular organization of photosystem II and its associated light-harvesting antenna in *Arabidopsis thaliana*.  
*Eur. J. Biochem.* **268**, 6020 – 6028.

**Yam, C., Pradier, C., Salmain, M., Fischer-Durand, N., Jaouen, G.** (2002).  
Molecular recognition of Avidin on Biotin-functionalized Gold surfaces detected by FT-IRRAS and use of metal carbonyl probes.  
*J. of Colloid and Interface Sci.* **245**, 204-207.

**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**, 4537-4533.

**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.

**Zammatteo N., Jeanmart L., Hamels S., Courtois S., Louette, P., Hevesi L., Remacle J.** (2000).  
Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays.  
*Anal Biochem.* **280**(1):143-50.



|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>Abb.</b>             | Abbildung  |
| AFM                     | Rasterkraftmikroskop (atomic force microscope)               |
| APD                     | <i>avalanche photo diode</i>                                 |
| APDMES                  | Aminopropyl-dimethyl-ethoxysilan                             |
| APS                     | Ammoniumpersulfat  |
| APTES                   | Aminopropyl-triethoxysilan                                   |
| AS                      | Aminosäure   |
| ATP                     | Adenosin-Triphosphat   |
| <b>bR</b>               | Bakteriorhodopsin  |
| BSA                     | Bovines Serum-Albumin  |
| <b>CCD</b>              | Photodioden-Sensor ( <i>charge-coupled device</i> )          |
| Chl                     | Chlorophyll  |
| <b>ddH<sub>2</sub>O</b> | Reinstwasser   |
| dH <sub>2</sub> O       | destilliertes Wasser   |
| DMSO                    | Dimethylsulfoxid   |
| DNA                     | Desoxyribonucleinsäure                                       |
| DTT                     | Dithiothreitol   |
| <i>E. coli</i>          | <i>Escherichia coli</i>                                      |
| EDTA                    | Ethylendiamintetraessigsäure                                 |
| <b>fs</b>               | femto-Sekunde  |
| <b>h</b>                | Stunde   |
| HPLC                    | <i>high performace liquid chromatography</i>                 |
| HRP                     | Meerrettichperoxidase ( <i>horse raddish peroxidase</i> )    |
| i.d.R.                  | in der Regel   |
| IB                      | Einschlußkörper ( <i>inclusion body</i> )                    |
| IPTG                    | Isopropyl-β-thiogalaktosid                                   |
| ITC                     | Isothiocyanat  |
| <b>kDa</b>              | kilo-Dalton  |
| KDS                     | Kaliumdodecylsulfat  |
| <b>LB-Medium</b>        | Luria-Bertani-Medium   |
| LB <sub>Amp</sub>       | Luria-Bertani-Medium, mit Ampicillin versetzt                |
| LDS                     | Lithiumdodecylsulfat   |
| LHCII                   | Lichtsammelkomplex II ( <i>light harvesting complex II</i> ) |
| LM                      | Dodecylmaltosid ( <i>lauryl maltoside</i> )                  |
| <b>MAL</b>              | Maleimid   |
| MBS-NHS                 | Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid                         |
| β-Me                    | β-Mercaptoethanol  |
| min                     | Minute   |

|               |  |
|---------------|--|
| MPS-NHS       | Maleimidopropionyl-N-hydroxysuccinimide                    |
| NADP(H)       | Nicotinamid-Adenindinucleotid-phosphat (reduziert)         |
| Na-P          | Natrium-Phosphat   |
| NHS           | N-Hydroxy-Succinimid                                       |
| NHS-LC-Biotin | N-Hydroxy-Succinimid-LC-Biotin                             |
| NTA           | <i>Nitrilo acetic acid</i> (Nitriloessigsäure)             |
| OG            | Octylglukosid (n-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid)         |
| PAA           | Polyacrylamid  |
| PG            | Dipalmitoyl-Phosphatidylglycerin                           |
| pLhcb         | LHCII-Vorläuferprotein                                     |
| PSII          | Photosystem II   |
| PVA           | Polyvinylalkohol   |
| RC            | Reaktionszentrum ( <i>reaction centre</i> )                |
| R-ITC         | Rhodamin-Isothiocyanat                                     |
| RNA           | Ribonucleinsäure   |
| RT            | Raumtemperatur   |
| SDS           | Natrium-Dodecy-Sulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )    |
| Sulfo-MBS-NHS | sulfo- Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid                |
| SV            | Säulenvolumen  |
| Tab.          | Tabelle  |
| TCP           | Tris-(2-cyanoethyl)phosphin                                |
| TEMED         | N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin                        |
| TIC           | <i>translocon at the inner membrane of the chloroplast</i> |
| TIRF          | total internal reflection fluorescence                     |
| TMR           | Tetramethylrhodamin  |
| TOC           | <i>translocon at the outer membrane of the chloroplast</i> |
| Tris          | Tris-(hydroxymethyl)aminomethan                            |
| u.U.          | unter Umständen  |
| üK            | über-Nacht-Kultur  |
| üN            | über Nacht   |
| Upm           | Umdrehungen pro Minute                                     |
| UV            | Ultraviolett   |