

**Lichtsammler hinter Glas:
Stabilisierung und Funktionalisierung des
pflanzlichen Hauptlichtsammelkomplexes (LHCII)
durch biomineralische Einbettung in Nanopartikel**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sebastian Röder

geb. am 03.10.1983 in Fulda

Mainz, 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2013

**Lernen ist Erfahrung.
Alles andere ist einfach nur Information.**

Albert Einstein

0.	Vorwort.....	1
1.	Einleitung.....	3
1.1.	Fotosynthese und Farbstoffsolarzellen.....	3
1.2.	Der majore Lichtsammelkomplex des Fotosystems II – LHCII.....	6
1.3.	Rekombinanter LHCII.....	9
1.4.	Stabilisierung von Proteinen und Enzymen.....	10
1.5.	Sol-Gel-Silikateinschluss von biologischen Komponenten.....	12
1.6.	Biologische Silikatbildung.....	13
1.7.	Mechanismen der biogenen Silikatbildung.....	14
2.	Zielsetzung.....	19
3.	Allgemeine Materialien und Methoden.....	21
3.1.	Material.....	21
3.1.1.	Geräte.....	21
3.1.2.	Chemikalien.....	26
3.1.3.	Längenstandards.....	27
3.1.4.	LHCII-Varianten.....	28
3.2.	Methoden.....	29
3.2.1.	Darstellung von trimeren LHCII-Varianten.....	29
3.2.1.1.	Herstellung von LHCP-Einschlusskörperchen.....	29
A)	Herstellung von Kulturmedien und –platten.....	29
B)	Überexpression und Aufarbeitung der LHCP-IBs.....	30
C)	Bestimmung der IB-Proteinkonzentration.....	31
3.2.1.2.	Pigment-Totalextrakt aus Erbsen.....	31
A)	Isolierung und Aliquotierung der Pigmente.....	31
B)	Vermessung der Totalextrakte mittels analytischer HPLC.....	32
3.2.1.3.	Rekonstitution und Trimerisierung von LHCII.....	33
A)	Rekonstitution zu Lichtsammelkomplexen.....	33
B)	Trimerisierung der rekonstituierten Lichtsammelkomplexe.....	34
C)	Aufreinigung durch Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation.....	34

D)	Aufkonzentrierung und Pufferwechsel von LHCII-Lösungen.....	36
E)	Quantifizierung von LHCII Monomeren bzw. Trimeren.....	36
3.2.1.4.	Spektroskopische Analyse von LHCII.....	37
A)	Fluoreszenzspektroskopie	37
B)	CD-Spektroskopie.....	38
3.2.1.5.	Analyse von Silikat-eingeschlossenen LHCII.....	38
A)	Grundsätzliches Procedere.....	39
B)	Einbauratenbestimmung.....	39
C)	Butanolextraktion.....	40
D)	Stabilitätsmessungen.....	40
E)	REM-Aufnahmen und EDX-Messungen	41
3.2.1.6.	Gelelektrophorese	42
A)	SDS - PAA - Gelelektrophorese	42
B)	Schwach denaturierende PAA-Gelelektrophorese („grünes Gel“)	42
C)	Herstellung der PAA-Gele.....	43
D)	Coomassiefärbung der PAA-Gele.....	43
E)	Trocknung der Gele.....	44
F)	Aufreinigung des Deriphatrohmaterials.....	44
4.	Kapitel.....	47
I.	Kapitel: Fusionsprotein aus pflanzlichem Lichtsammelkomplex und polykationischem R5-Peptid49	
1.	Einleitung.....	49
2.	Material und Methode.....	50
2.1.	Material.....	50
2.1.1.	Fertig-Kits.....	50
2.1.2.	Restriktionsenzyme.....	50
2.1.3.	Primer	50
2.1.4.	Vektoren.....	52
2.1.4.1.	pDS12-RBSII	52
2.1.4.2.	pET-21(+)......	52

2.1.5. Übersicht R5-modifizierte LHCII.....	52
2.1.6. DNA-Längenstandards	54
2.2. Methoden	54
2.2.1. Molekulargenetische Methoden.....	54
2.2.1.1. Plasmidisolation mittels Miniprep-Kit	54
2.2.1.2. Plasmidisolation mittels Midiprep-Kit	54
2.2.1.3. Quantifizierung von Plasmid-DNA.....	55
2.2.1.4. Agarose-Gelelektrophorese.....	55
2.2.1.5. Transformationen	56
A) Transformation in DH5 α	56
B) Transformation in XL1blue.....	57
C) Transformation in BL21 (DE3).....	57
D) BL21 (DE3) pLysS	57
E) Transformation in Rosetta (DE3).....	57
F) Transformation in XL10-Gold	57
2.2.1.6. Sequenzierung von Plasmid-DNA	58
2.2.1.7. Mutagenesestrategie zur Herstellung des R5C3.2h.....	58
A) Restriktion des pDS12-Vektors und dessen Isolation durch Gelextraktion	59
B) Primerhybridisierung.....	60
C) Ligation von Primerhybrid und pDS12-Vektor	60
D) Plasmidwechsel.....	61
E) Ligation von fehlerhaftem R5C3.2h-Konstrukt und pET21(+)-Vektor	62
F) Basendeletion mittels Quikchange® II site-directed mutagenesis.....	62
2.2.1.8. Herstellung von Cysteinmutanten des R5C3.2h	63
2.2.1.9. Mutagenesestrategie zur Herstellung der Mutante 5RC3.2h.....	64
2.2.1.10. Herstellung von Dauerkulturen	66
2.2.2. Proteinbiochemische Methoden.....	66
2.2.2.1. Totalproteinbestimmung	66
2.2.2.2. R5-LHCII angepasste Inclusion Body Herstellung.....	67

2.2.2.3.	R5-LHCP angepasste Rekonstitution, Trimerisierung und Aufreinigung	67
2.2.2.4.	Schmelzkurven von R5C3.2h.....	68
2.2.2.5.	Silikatfällungen von R5C3.2h.....	69
3.	Ergebnisse.....	70
3.1.	Herstellung von R5-LHCII-Fusionsklonen mittels Primerhybrid-Insertion.....	70
3.1.1.	Konstruktion des Klons R5C3.2h	70
3.1.2.	Konstruktion des Klons 5RC3.2h	72
3.2.	Optimierung der R5C3.2h-Apoprotein-Herstellung	73
3.3.	Optimierung der Rekonstitution und Trimerisierung von R5C3.2h	76
3.3.1.	Einfluss des Rekonstitutions-pH-Wertes	76
3.3.2.	Einfluss der Puffer in Saccharosedichtegradienten.....	77
3.3.3.	Einfluss von Salzzugabe auf die Rekonstitution und Trimerisierung.....	80
3.3.3.1.	Einfluss von NaCl in den Trimerisierungspuffern	80
3.3.3.2.	Salzhaltige Saccharosedichtegradienten und LiCl-Zugabe zur Rekonstitution	82
3.3.4.	Präparative Herstellung von R5C3.2h-Trimeren	86
3.4.	Rekonstitution und Trimerisierung von 5RC3.2h.....	87
3.5.	Cysteininhaltige R5-LHCII-Komplexe.....	88
3.6.	Eigenschaften des R5C3.2h	90
3.6.1.	Komplexstabilität anhand von Schmelzkurven.....	90
3.6.2.	Silikatfällungsverhalten des R5C3.2h.....	90
4.	Diskussion.....	93
4.1.	Auf dem Weg zu R5C3.2h Inclusion Bodies.....	93
4.2.	Präparation trimerer R5C3.2h.....	95
4.3.	Silikatfällungseigenschaften des R5C3.2h.....	99
II.	Kapitel: Copräzipitation von LHCII und Spermin	103
1.	Einleitung.....	103
2.	Material und Methode.....	104
2.1.	Material.....	104
2.1.1.	Farbstoff.....	104

2.1.2. LHCII-Varianten.....	104
2.2. Methoden.....	104
2.2.1. Molybdat-Blau-Test.....	105
2.2.2. Pigmentextraktion aus LHCII-Silikat-Copräzipitaten	106
2.2.3. Zugänglichkeitsexperimente.....	106
3. Ergebnisse.....	108
3.1. Copräzipitation und dessen Charakterisierung	108
3.1.1. Präparative Aspekte.....	108
3.1.2. Quantifizierung von Silikat.....	109
3.1.2.1. Silikatfällungsausbeuten	109
3.1.2.2. Auflösung des Silikats während Hitzeinkubation	110
3.1.3. Charakterisierung des Fluoreszenzverlustes	112
3.1.3.1. Minimierung der Silikatauflösung	112
3.1.3.2. Untersuchung möglicher LHCII-Aggregation der Silikatmatrix	113
3.2. Publikationsmanuskript.....	116
3.3. Ergänzende Resultate zur Copräzipitation.....	150
3.3.1. Salzeinflüsse auf Copräzipitation	150
3.3.2. Einfluss von Saccharose und LM auf die Copräzipitation.....	150
3.3.3. Zugänglichkeit zu LHCII im Silikat	151
3.3.3.1. Zugänglichkeit für kleine Moleküle.....	151
3.3.3.2. Zugänglichkeit für eine lösliche Protease	153
3.3.4. Umgebungs- und Lagerungseinflüsse auf LHCII in Silikat.....	154
3.3.5. Stabilisierung von R5C3.2h bei Spermin-Copräzipitationen in Phosphat pH 7,5	155
3.3.6. Verlust an Komplexen während Hitzeinkubation.....	156
4. Diskussion.....	158
4.1. Quantifizierung von Kieselsäure und Bestimmung der Fällungsausbeute.....	158
4.2. Auflösung von Silikat	160
4.3. Zugänglichkeit zu in Silikat-eingeschlossenen Komplexen	163
4.4. Alternative Silikatstruktur-Beeinflussung.....	165

III.Kapitel: Kovalente Modifikation des LHCII und daraus resultierende Kieselsäurefällungseigenschaften.....	167
1. Einleitung.....	167
2. Material und Methode.....	169
2.1. Material.....	169
2.1.1. Protamin.....	169
2.1.2. (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan (MPS).....	169
2.1.3. LHCII-Varianten.....	169
2.2. Methoden.....	169
2.2.1. Modifikation von LHCII mit Protamin.....	169
A) Reduktion der Komplexe.....	170
B) Anbindung des Crosslinkers an Protamin.....	170
C) Verknüpfung von LHCII und CL-Protamin.....	170
2.2.2. Densitometrische Auswertung der SDS-PAA-Gele.....	171
2.2.3. Erhöhung der Konzentration von Protamin-modifiziertem LHCII.....	171
2.2.4. Silikatfällungen mit Protamin.....	172
2.2.4.1. LHCII-freie Protaminfällungen.....	172
2.2.4.2. Fällungen mit Protamin-modifiziertem LHCII.....	172
2.2.5. Modifikation von LHCII mittels MPS.....	173
2.2.5.1. Verknüpfungsreaktion von MPS mit LHCII.....	173
A) Anbindung des Crosslinkers an LHCII.....	173
B) Pufferwechsel.....	174
C) MPS-Anbindung an LHCII-gebundenen Crosslinker.....	174
2.2.5.2. Copräzipitation von MPS-modifiziertem LHCII mit Spermin.....	174
3. Ergebnisse.....	176
3.1. Kovalente LHCII-Modifikation mit Protamin.....	176
3.1.1. Fällungseigenschaften des Protamins.....	176
3.1.2. Optimierung der Protaminanbindung an LHCII.....	177
3.1.3. Präparative Modifikation von LHCII mit Protamin.....	179

3.1.4.	Aufkonzentrieren von Protamin-modifiziertem LHCII	182
3.1.5.	Positionsabhängige Protamin-Modifikation von LHCII.....	182
3.1.6.	Silikatfällungen mit Protamin-modifiziertem LHCII	184
3.1.6.1.	Silikatfällungen mit Protamin-modifiziertem 3xCh.....	185
3.1.6.2.	Silikatfällungsverhalten Protamin-modifizierter LHCII-Varianten	187
3.1.6.3.	Hitzeinkubation von Protamin-LHCII in Silikat.....	189
3.1.6.4.	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Protamin-induzierten Silikatpräzipitaten.....	191
3.1.7.	Protamin-Modifikation von R5LHCII und weiteren LHCII-Cysteinvarianten	192
3.1.7.1.	Positionsabhängige Protamin-Modifikation von R5LHCII- und einer weiteren LHCII-Variante	192
3.1.7.2.	Silikatfällung durch weitere Protamin-modifizierte LHCII-Varianten.....	194
3.2.	Kovalente LHCII-Modifikation mit MPS.....	194
3.2.1.	Etablierung der Anbindungsreaktion von MPS an LHCII.....	194
3.2.2.	Präparative Modifikation des LHCII mit MPS.....	196
4.	Diskussion.....	197
4.1.	Anbindung von Protamin an trimeren LHCII	197
4.2.	Probleme bei der Aufarbeitung von Protamin-modifiziertem LHCII.....	202
4.3.	Silikatfällungen von Protamin und Protamin-modifiziertem LHCII	203
4.4.	Copräzipitation von Protamin-modifizierten Komplexen.....	208
4.5.	Hitze stabilisierung durch Protamin-induzierten Komplexeinschluss in Silikat.....	209
4.6.	Modifizierung von LHCII mit MPS.....	211
IV.Kapitel:	Fällungen von Titandioxid	215
1.	Einleitung.....	215
2.	Material und Methoden.....	217
2.1.	Material	217
2.1.1.	LHCII-Varianten.....	217
2.1.2.	Chemikalien.....	217
2.2.	Methoden	217

2.2.1. Fällungen von Titandioxid.....	217
2.2.2. Fluoreszenzspektroskopische Analyse von Titandioxid-eingeschlossenem LHCII	218
3. Ergebnisse.....	219
3.1. Protamin-induzierte Titandioxidbildung.....	219
3.2. Titandioxidfällungen durch Protamin-modifizierten LHCII.....	220
3.3. REM-Aufnahmen von Titandioxid-Präzipitaten.....	223
4. Diskussion.....	226
4.1. Fällungen von Titandioxid.....	226
4.2. Aussichten und Entwicklungspotential.....	229
V. Kapitel: Weitere Versuche	231
1. Einleitung.....	231
2. Material und Methode.....	233
2.1. Material.....	233
2.2. Methoden.....	233
2.2.1. Darstellung des polykationischen silaffinähnlichen Proteins Sx3	233
2.2.1.1. Herstellung einer Überexpressionskultur.....	233
2.2.1.2. Isolierung des überexprimierten Sx3	234
2.2.1.3. Aufreinigung der Fusionsproteine mittels Ni ²⁺ -Chelating-Sepharosesäulen	235
2.2.1.4. Prozessierung von Sx3	236
2.2.1.5. Proteinaufreinigung mittels SP-Sepharose-Kationenaustauschersäule.....	236
2.2.1.6. Regeneration der SP-Sepharosesäule.....	237
2.2.1.7. Konzentrationsbestimmung des Sx3	238
2.2.2. Optimierung der Zweitbindung von His ₆ -Tagproteinen an Ni ²⁺ -Chelating-Anker.....	238
2.2.3. SPR-Spektroskopie	238
2.2.3.1. Aktivierung des NIP-Sensorchips.....	239
2.2.3.2. Immobilisierung von Sx3.....	239
2.2.3.3. Applikation von Kieselsäure über halbautomatisches Injektionsventil	240
2.2.3.4. Regeneration der NIP-Chipoberfläche.....	241
2.2.4. Einschluss von nativem LHCII in Polyacrylamid.....	242

2.2.4.1.	Solubilisieren von nativem LHCII	242
2.2.4.2.	Einpolymerisieren von LHCII in Polyacrylamidgele.....	242
2.2.4.3.	Spektroskopische Untersuchung der in PAA-einpolymerisierten Komplexe	243
2.2.4.4.	Lagerungsversuche von PAA-einpolymerisiertem LHCII.....	244
3.	Ergebnisse	245
3.1.	Analyse der Silikatcondensation mittels SPR.....	245
3.1.1.	Darstellung des polykationischen Proteins Sx3	245
3.1.2.	SPR-spektroskopische Analyse von Silikatcondensationsprozessen.....	245
3.1.2.1.	Verfolgung des Silikatcondensationsprozesses	246
3.1.2.2.	Reproduzierbarkeit der Silikatcondensation nach NaOH-Regeneration.....	247
3.1.3.	Optimierung der Zweitbindung eines His ₆ -Tags an Ni ²⁺ -Chelating-Sepharose.....	249
3.2.	Einschluss von nativem LHCII in Polyacrylamid.....	251
3.2.1.	Küvetten- und PAA-Einfluss auf spektroskopische Eigenschaften des LHCII	251
3.2.2.	Ammoniumpersulfat - Einfluss auf die Integrität des LHCII	252
3.2.3.	Stabilisierender Einfluss von PAA auf LHCII während Lagerungen.....	254
3.2.4.	Wärmeinduzierte Zerfallskinetik von PAA-eingeschlossenem LHCII.....	255
3.2.5.	Bestimmung der Schmelztemperatur einpolymerisierter Komplexe	255
3.2.6.	Komplexreorganisation in PAA nach thermischer Destruktion.....	256
4.	Diskussion.....	258
4.1.	SPR-Experimente.....	258
4.1.1.	SPR-Spektroskopie zur Analyse von Protein-induzierter Silikatbildung	258
4.1.2.	Anwendungspotential und Ausblick	260
4.2.	Einschluss von nativem LHCII in Polyacrylamid.....	261
5.	Zusammenfassung.....	265
6.	Summary	266
7.	Literatur.....	267
8.	Anhang	279
8.1.	Berechnung des Isoelektrischen Punktes (pI) verschiedener LHCII-Varianten	279
8.2.	Sequenzen	280

8.3.	Abkürzungsverzeichnis.....	281
8.4.	Abbildungsverzeichnis.....	283
8.5.	Tabellenverzeichnis	285
9.	Danksagung.....	287
10.	Lebenslauf.....	291
11.	Erklärung.....	293

0. Vorwort

Die vorliegende Dissertation wurde auf Grund der im Zeitraum von Mai 2010 bis Sommer 2013 gewonnenen Labordaten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harald Paulsen am Institut für Allgemeine Botanik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz verfasst.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Wissenschaftlichen Zulassungsarbeiten von Christoph Eckrich (CE), Ann-Kathrin Wahl (AKW) und Daniel Palm (DP) sowie die Bachelorarbeit von Franziska Reuter (FR) und Cristopher Dresler (CD) durch den Autor betreut. Ergebnisse dieser unveröffentlichten Arbeiten fanden entsprechenden Eingang in diese Dissertationsschrift. Ergebnisse aus diesen Arbeiten sind in den jeweiligen Abbildungen durch entsprechende Namens Kürzel gekennzeichnet. Im Diskussionsteil sind entsprechend gemeinsam mit den Kandidaten erarbeitete Gedankengänge zu diesen Ergebnissen aufgegriffen worden, wurden jedoch nicht separat gekennzeichnet.

Die Zitation wissenschaftlicher Literatur erfolgt nach der derzeit üblichen Verfahrensweise: Inhalte wurden sinngemäß in deutscher Sprache wiedergegeben und unter Angabe des Autors und Verweis auf die Quellenangabe gekennzeichnet, wobei keine Zitationszeichen verwendet wurden. Ab einem gewissen Grade der Allgemeingültigkeit wurden Inhalte nicht mehr quellenmarkiert. Als Maßgabe für diese Allgemeingültigkeit wurde das Niveau von voraussetzbarem Studienwissen festgelegt.

Die „Material und Methoden“ Kapitel basieren zum Teil auf der nicht veröffentlichten wissenschaftlichen Zulassungsarbeit des Autors dieser Dissertation. Da es sich bei diesen um sein eigenes geistiges Eigentum handelt, sind entsprechende Zitationsverweise in der Dissertation nicht vermerkt.

Mainz, im Juli 2013

Sebastian Röder

1. Einleitung

„I'd put my money on the sun and solar energy. What a source of power! I hope we don't have to wait till oil and coal run out before we tackle that.”

Es sollten noch mehr als 20 Jahre vergehen, bis auf diese Aussage Thomas Alva Edison's kurz vor seinem Tod im Jahre 1931 die Entwicklung der ersten Silicium-basierten Solarzelle 1953/54 durch Forscher der amerikanischen Firma Bell folgte [1]. Erst der rasant steigende Ölpreis in den 1970ern führte dazu, dass 1974 ein erstes Programm zur zivilen Nutzbarmachung regenerativer Energien durch den damaligen US-Präsidenten Richard Nixon aufgelegt wurde. Dennoch führte dies nicht zu einem sofortigen energiepolitischen Umschwenken weg von fossilen und atomaren Energieträgern hin zu regenerativen. Es bedurfte zweier atomarer Reaktorkatastrophen, 1986 in Tschernobyl und 2011 in Fukushima und der immer deutlicher werdenden Folgen des anthropogenen Klimawandels, bis sich in Deutschland als einem der Vorreiterländer politisch und gesellschaftlich eine Hinwendung zu regenerativen Energien als Energieträger der Zukunft durchsetzte. So wurden im Jahr 2012 22,1 % des Stroms in Deutschland durch erneuerbare Energieträger gewonnen (Daten Quelle: Statistisches Bundesamt, Zahl der Woche am 2.7.2013); im Vergleich zum Jahr 2010 bedeutet dies einen Anstieg um fast 35 %. Im Umkehrschluss impliziert dieser Zahlenwert allerdings auch, dass immer noch 77,9 % des Stroms aus nicht-regenerativen Quellen wie Kohle, Gas und Atomkraft gewonnen werden [2].

Die Sonne strahlt pro Jahr Energie mit einer Gesamtleistung von rund 100000 TW auf die Erde [3], was den aktuellen anthropogenen Weltjahresenergieverbrauch von etwa 17,1 TW (2013, [4]) um mehr als das 6000-fache übersteigt. Derzeit werden weltweit nur 9,7 % dieser anthropogen benötigten Energie durch moderne erneuerbare Energiequellen gewonnen (Daten für 2011, Renewables 2013 Global Status Report [5]). Seit mehr als drei Milliarden Jahren wird Sonnenenergie in Form von Fotosynthese bereits biochemisch nutzbar gemacht. Bei diesem Prozess, bei dem eine Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie stattfindet, wird eine Menge an Biotrockenmasse gebildet, die einem Energieäquivalent von 100 TW entspricht [3].

1.1. Fotosynthese und Farbstoffsolarzellen

Der Prozess der Fotosynthese beruht darauf, dass Lichtquanten durch Farbstoffmoleküle absorbiert werden, wodurch Elektronen des delokalisierten Elektronensystems der Farbstoffe angeregt werden. Das Redoxpotential der Farbstoffe – Chlorophylle *a* - in den sog. Reaktionszentren wird dabei negativer und das angeregte Elektron kann auf spezifische Akzeptoren übertragen werden, was ohne die Anregung nicht möglich wäre. Die Reaktionszentren sind in zwei Fotosystemen lokalisiert, die über eine Redoxkette miteinander verbunden sind. Insgesamt findet ein Elektronenfluss von Fotosystem II

über das Fotosystem I hin zum Elektronenendakzeptor $\text{NADPH} + \text{H}^+$ statt, wobei ein Elektronendefizit im Reaktionszentrum des Fotosystems II zurückbleibt. Dieses wird durch die Oxidation von Wasser geschlossen, wobei molekularer Sauerstoff entsteht. Während des Transfers der Elektronen von Fotosystem II zu Fotosystem I über den Cytochrom- b_6/f -Komplex wird ein Protonengradient über der Thylakoidmembran aufgebaut, der die Synthese von ATP durch die ATP-Synthase antreibt. Dieses und das bereits erwähnte $\text{NADPH} + \text{H}^+$ stellen die energiereichen Hauptprodukte der Lichtreaktion dar. In der sich anschließenden Dunkelreaktion werden sie dazu genutzt, aus dem energiearmen Stoff CO_2 energiereiche Kohlenhydratverbindungen zu synthetisieren (Abb. 1. 1).

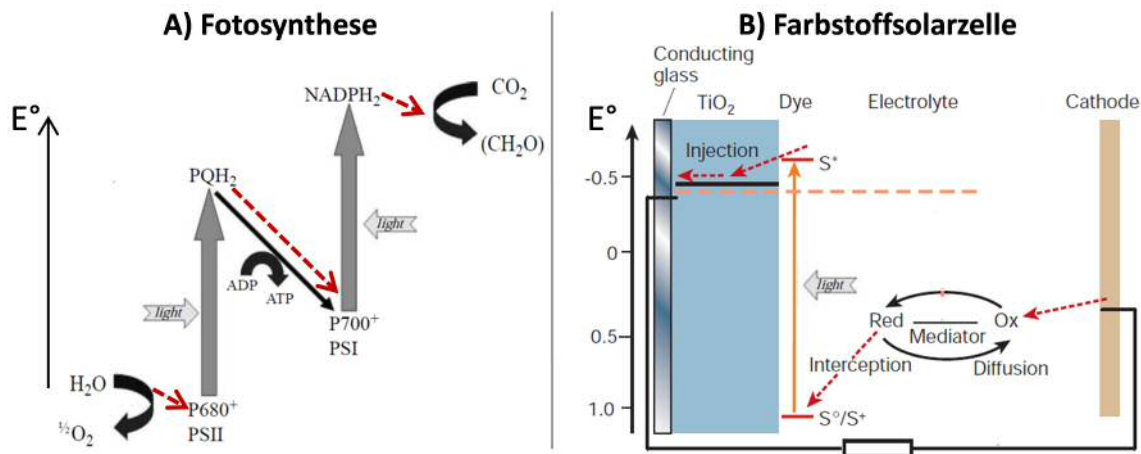


Abb. 1. 1: Reaktionsschema Fotosynthese und Farbstoffsolarzelle

Reaktionsschemata der Fotosynthese (A) und Farbstoffsolarzelle (B). Die gestrichelten roten Pfeile stellen den Elektronenfluss dar. Abbildung A verändert nach Barber, 2007 [3]; Abbildung B verändert nach Graetzel, 2001 [7].

Das Prinzip von Farbstoffsolarzellen – häufig auch nach ihrem Entwickler Graetzel-Zellen genannt – basiert auf einem ganz ähnlichen Mechanismus [6; 7]: Die Lichtabsorption wird von einem Sensibilisator-Farbstoff übernommen, der so in einen angeregten Zustand überführt wird. Aus diesem ist es möglich, ein Elektron in das Leitungsband eines assoziierten Halbleitermaterials – häufig Titandioxid in seiner kristallinen Anatas-Modifikation - zu übertragen. Von dort aus wird das Elektron über eine Indium-Zinkoxid-Schicht in leitfähiges Glas abgeleitet. Die Elektronenlücke im Farbstoff wird durch ein Elektrolyt-Redoxpaar geschlossen. Häufig wird hier das System Iodid/Triiodid verwendet. Ein Nachteil von Farbstoffsolarzellen liegt derzeit noch in ihrem limitierten Wirkungsgrad, der unter Laborbedingungen bei max. 11,4 % liegt [8] und deutlich unter dem Wert von den am häufigsten verwendeten Solarzell-Typen aus Silicium mit 25 % Wirkungsgrad [9]. Auf der anderen Seite besitzen Farbstoffsolarzellen den Vorteil, dass sie aus relativ günstigen Materialien hergestellt werden und so die Zeitspanne bis zur gewinnbringenden Nutzung weniger als ein Jahr beträgt [10; 11].

Kim *et al.* fassen Bedingungen zusammen, die an Farbstoffe für eine Anwendung in Farbstoffsolarzellen gestellt werden [12]: Die Farbstoffe müssen an das Halbleitermaterial gebunden werden können [13]. Außerdem muss das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (LUMO) des Farbstoffs oberhalb des Leitungsbandes des Halbleiters liegen und das höchste besetzte Molekülorbital (HOMO)

unterhalb des Redoxpotentials des Elektrolyts. Als drittes sollte das Absorptionsspektrum des Farbstoffs gut mit dem Lichtspektrum der Sonne übereinstimmen. Des Weiteren sollten die Farbstoffmoleküle nicht aggregieren, was die Elektronenübertragungseffizienz auf den Halbleiter drastisch mindern würde. Als letzter Punkt wird eine ausreichende Stabilität des Farbstoffs gefordert.

Die zuvor beschriebenen Bedingungen gelten auch für die Licht-absorbierenden Pigmente in photosynthetisch aktiven Organismen. Im Zuge der mehr als drei Milliarden Jahre langen Evolution der oxygenen Fotosynthese fanden entsprechende Anpassungen statt, um diese Bedingungen zu erfüllen: Alle an der Lichtreaktion beteiligten Komponenten – die beiden Fotosysteme und der Cytochrom-*b₆/f*-Komplex – sind als Transmembrankomplexe in der Thylakoidmembran verankert und sind so in ihrer räumlichen Lage zueinander definiert. Die eigentlichen Licht-absorbierenden Pigmente liegen dabei Protein-gebunden vor. Die Kombination der beiden Fotosysteme und der zweifachen Lichtanregungen haben zur Folge, dass das Redoxpotential des angeregten Fotosystems I so niedrig liegt, dass Elektronen auf NADP⁺ übertragen werden. Das des oxidierten Chlorophylls in Fotosystem II ist so positiv, dass es durch Wasser reduziert werden kann [14]. Die an der Lichtabsorption für die Fotosynthese beteiligten Pigmente – Chlorophylle und Carotinoide – haben ihr Absorptionsmaximum im Bereich von 400 bis knapp 500 nm (die Chlorophylle zusätzlich im Bereich des roten Lichts). Dieser Bereich umfasst in etwa den Maximalintensitätsbereich des Sonnenlichts. Durch die Proteinassoziiierung der Pigmente wird eine sehr hohe lokale Pigmentkonzentration erreicht, ohne dass diese dabei aggregieren. Es wurden Akklimationsphänomene beobachtet, die belegen, dass durch Veränderungen in der Thylakoidmembran die Stabilität gegenüber erhöhten Temperaturen angepasst werden kann und so Fotosynthese unter ungünstigeren Bedingungen ablaufen kann [15–17].

Die Tatsache, dass im Rahmen der Fotosynthese auf natürlichem Wege die Anforderungen an Farbstoffe in Farbstoffsolarzellen erfüllt werden, rückt biologische Bestandteile in den Fokus zur Verwendung in fotovoltischen Applikationen. Dieses ist bereits in der aktuellen Forschung Gegenstand. Mershin *et al.* immobilisierten das Fotosystem I des thermophilen Cyanobakteriums *Thermosynechococcus elongatus* auf die Halbleiter Titandioxid resp. Zinkoxid einer Farbstoffsolarzelle [18]. Dabei wurde für die Bindung des Fotosystems auf Zinkoxid eine spezifische Bindesequenz in den nativen Komplex eingeführt. Dem Fotosystem kamen dabei in der Applikation zwei Aufgaben zu: Lichtsammlung und Übertragung von angeregten Elektronen auf den Halbleiter. In anderen Anwendungen wurde das Fotosystem I aus Spinat auf Graphen bzw. stark p-dotiertem Silizium immobilisiert und seine Fotoaktivität nachgewiesen [19; 20]. Auch die Bindung eines rekombinanten Allophycocyanin-Trimers auf eine mesoporöse Titandioxid-Elektrode zeigte, dass die Bindung eines Pigment-Protein-Komplexes die Rolle eines Sensibilisator-Farbstoffs übernehmen kann [21]. Einen ganz maßgeblichen Anteil an der Lichtsammlung für die Fotosynthese hat der majore Lichtsammelkomplex des Fotosystems II (LHCII). Auch dieser wurde bereits in fotovoltischen Applikationen als Lichtsammler

verwendet. Nagata *et al.* zeigten, dass nativer LHCII auf einer Titandioxidoberfläche gebunden, effektiv Photonen absorbieren und sogar Elektronen auf den Halbleiter übertragen kann (Abb. 1. 2 A) [22].

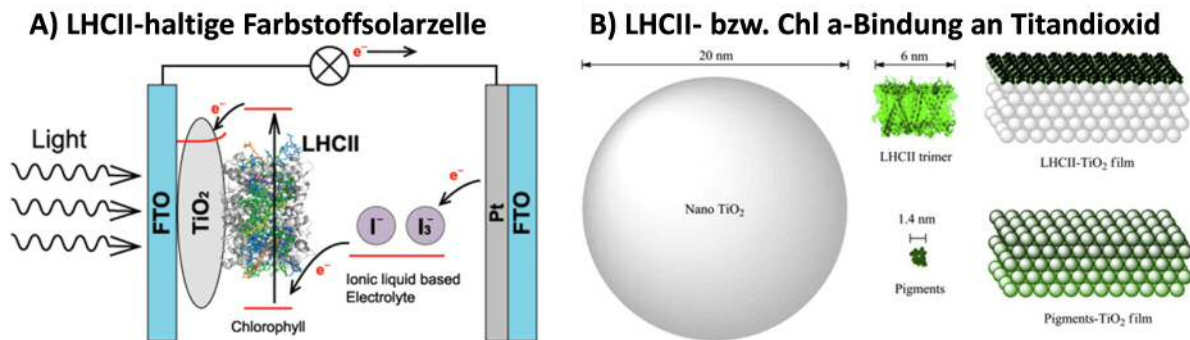


Abb. 1. 2: LHCII in Farbstoffsolarzellen

Nativer LHCII als Sensibilisator in einer Farbstoffsolarzelle (A); Abbildungsteil A entnommen aus Nagata *et al.*, 2012 [22]. Neben LHCII können auch direkt die Pigmente des LHCII auf bzw. an Titandioxid adsorbiert werden (B). Abbildungsteil B entnommen aus Yu *et al.*, 2013 [23].

In einer ähnlichen Anordnung immobilisierten Yu *et al.* nativen LHCII auf Titandioxid und ebenso nur die isolierten Pigmente des Komplexes (Abb. 1. 2 B) [23]. Die Kennzahlen der durch LHCII sensibilisierten Zelle lagen etwas über denen von Nagata *et al.*. Allerdings wurden diese deutlich von den nicht-Komplex-gebundenen Pigmenten übertroffen. Begründet wird dies damit, dass die Bindung des LHCII oberflächlich auf der Titandioxidschicht erfolge, während die freien Pigmente das poröse Material infiltrieren könnten und kein Elektronentransport durch die gesamte Halbleiterschicht erforderlich sei. Mit 30 % ist der LHCII das häufigste Membranprotein in Chloroplasten und besitzt eine Pigmentdichte, die 0,3 M in Lösung entspricht [24]. Diese hohe Bioverfügbarkeit und die ausgesprochen hohe Dichte an Pigmenten machen LHCII zu eben jenem interessanten Kandidaten für technische Anwendungen wie oben beschrieben.

1.2. Der majore Lichtsammelkomplex des Fotosystems II – LHCII

Der LHCII liegt *in vivo* als trimerer Komplex vor. Mehrere Trimere umgeben gemeinsam mit minoreren Lichtsammelkomplexen und weiteren Chlorophyll-bindenden Proteinen das Fotosystem II peripher und bilden den sog. Fotosystem II-Superkomplex (Abb. 1. 3). Hierbei sind nicht alle LHCII gleich stark an diesen Superkomplex gebunden [25].

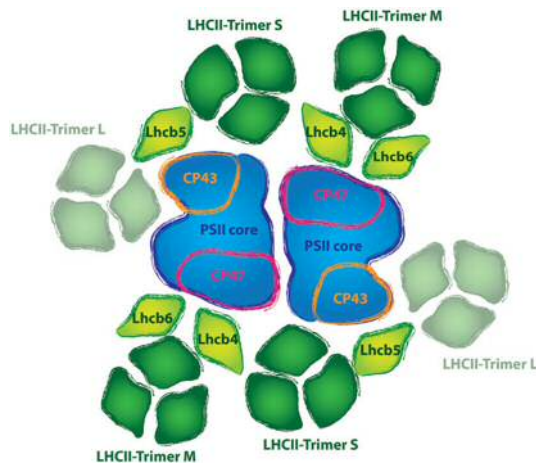


Abb. 1. 3: Photosystem II-Superkomplex

Der Photosystem II-Superkomplex besteht aus zwei Photosystemen (PSII) mit dem jeweiligen Reaktionszentrum und direkt anliegenden inneren Antennen aus Chlorophyllbindenden Proteinen (CP), die den Photosystem II-Kern bilden (PSII Core). Hierzu gesellen sich die äußeren Antennen, die aus minoren (Lhcb 4-6) und majoren (LHCII) Lichtsammelkomplexen bestehen. LHCII ist an diesen Superkomplex schwach (L), mittel (M) oder stark (S) assoziiert. Abbildung entnommen: Ballottari, 2012 [25].

LHCII übernimmt die Hauptrolle in der Lichtsammlung für das Reaktionszentrum des Photosystems. Die absorbierte Lichtenergie wird dabei strahlungsfrei in Richtung des Core-Komplexes weitergeleitet [26]. Die Verteilung der Photosynthesekomponenten in den Thylakoidmembranen ist heterogen. Der Photosystem II-Superkomplex ist hier überwiegend in den gestapelten Granabereichen lokalisiert [27]. Der LHCII spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Granastapelung, die durch elektrostatische Interaktion zwischen verschiedenen LHCII bedingt wird [24]. Lichtstress kann dazu führen, dass das Photosystem II überangeregt wird, was eine Bildung von Triplett-Chlorophyll und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zur Folge haben kann, die den Photosyntheseapparat schädigen und so die Photosynthese inhibieren (Fotoinhibition) [14]. Um die Bildung dieser schädigenden Molekülzustände zu verhindern, evolvierten verschiedene Schutzmechanismen in Pflanzen, in denen LHCII eingebunden ist: LHCII-gebundene Carotinoide können sowohl Triplett-Chlorophyll als auch Singulett-Sauerstoff in ihre Grundzustände überführen. Die dabei entstehenden Triplett-Carotinoide dissipieren die übernommene Energie in Form von Wärme [28]. Allerdings ist es ein großer Vorteil, wenn der Triplett-Zustand des Chlorophylls überhaupt nicht erreicht wird. Triplett-Chlorophyll bildet sich vermehrt, wenn das angeregte Chlorophyll die Anregungsenergie nicht fotochemisch weitergeben kann, da beispielsweise kein entsprechend oxidiertes Reaktionspartner vorhanden ist. Dies ist der Fall, wenn die biochemischen Prozesse den fotochemischen nicht folgen können und das System überangeregt ist. Die sog. nicht-fotochemische Energielöschung (NPQ) kann eine solche Überanregung verhindern. Hierbei sind verschiedene nicht-fotochemische Prozesse unter Beteiligung des LHCII bekannt [29]. Eine Verkleinerung der Antennenfläche von Photosystem II kann dessen Überanregung vermeiden. Dies wird erreicht, indem sich LHCII vom Photosystem II-Superkomplex ablöst, zum Photosystem I wandert und dort an der Lichtsammlung teilnimmt [27]. So wird für eine bessere Verteilung der Anregungsenergie auf beide Photosysteme gesorgt. Dieser Prozess der LHCII-Wanderung wird als State Transition bezeichnet und verläuft reversibel über eine Licht-abhängige Phosphorylierung des LHCII, die die Wanderung in Richtung Photosystem I auslöst [30]. Der schnellste Mechanismus der NPQ basiert auf einer Dissipation von Anregungsenergie in Form von Wärme, die reversibel über den lumenalen pH-Wert gesteuert wird [31]. LHCII scheint hierbei eine wichtige Rolle zu spielen, allerdings ist der genaue Mechanismus

mus bislang nicht aufgeklärt. Es wird hier diskutiert, dass LHCII direkt mit dem Membranprotein PsbS interagiert. Durch sinkenden pH-Wert zerfallen PsbS-Dimere zu Monomeren, die mit LHCII interagieren. Vermutlich kommt es zu einer Wechselwirkung mit einem peripheren Neoxanthin des LHCII, wodurch Anregungsenergie auf PsbS übertragen werden kann und von diesem als Wärme abgeführt wird [32–34].

In höheren Pflanzen gibt es drei Apoprotein-Isomere für die Bildung des LHCII: die Lichtsammelungs-Chlorophyll-*a/b*-bindenden Proteine *b* (Lhcb) 1-3, die in unterschiedlicher Zusammensetzung im trimeren LHCII vorliegen. Lhcb 1 und 2 können sowohl als Homo-, als auch als Heterotrimer vorkommen, das Lhcb 3 nur in heterotrimerer Form gemeinsam mit mindestens einer der beiden anderen Isoformen [35]. Ein Apoprotein assembliert gemeinsam mit nicht-kovalent gebundenen Cofaktoren – 8 Chlorophyll *a*, 6 Chlorophyll *b*, 2 Luteine, ein Neoxanthin und ein weiteres flexibles Xanthophyll aus dem Xanthophyllzyklus [36]- zum monomeren Komplex. Für die ebenfalls nicht-kovalente Zusammenlagerung dreier Monomere zum Trimer sind das Lipid Phosphatidylglycerol (PG) und die N-terminale Aminosäuresequenz WYGPDR unabdingbar [37; 38]. Bislang ungeklärt ist die Funktion eines weiteren vorkommenden Lipids Digalactosyldiacylglycerin [24]. Die Struktur des LHCII wurde mittlerweile bis zu einer Auflösung von 2,5 Å aufgelöst [24; 36; 39]. Das 232 Aminosäuren umfassende Apoprotein besitzt in seiner Tertiärstruktur drei transmembrane Helices, sowie zwei weitere kurze Helices, die beide auf der lumenalen Seite des Komplexes lokalisiert sind (Abb. 1. 4 A). Auf der gleichen Seite des Komplexes liegt der C-Terminus und ist damit gegenüberliegend orientiert zum N-Terminus auf der stromalen Seite. Der N-Terminus ist allerdings erst ab der 10. Aminosäure kristallographisch aufgelöst, was seine Begründung vermutlich in einer erhöhten räumlichen Flexibilität findet, die mittels Elektronenspinresonanz- (EPR-) Spektroskopie nachgewiesen werden konnte [40]. Im Trimer sind die Monomere parallel zueinander ausgerichtet, so dass alle drei N-Termini auf der gleichen Seite der Thylakoidmembran lokalisiert sind (Abb. 1. 4 B und C).

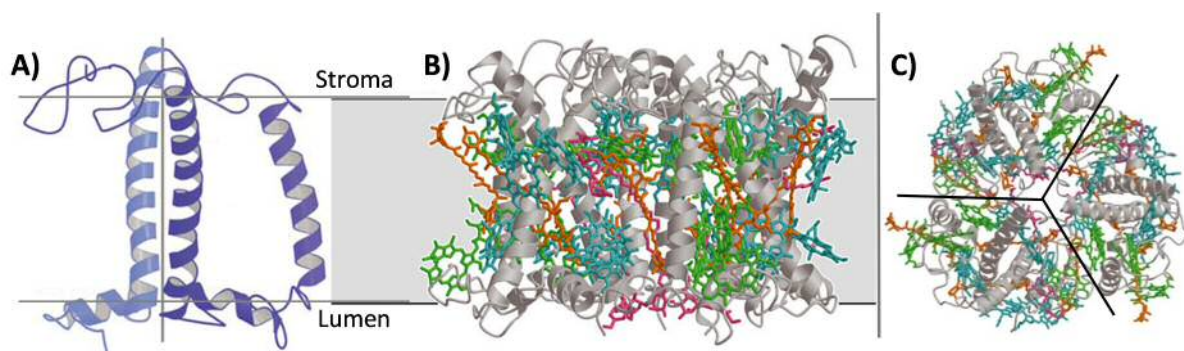


Abb. 1. 4: Struktur des LHCII

LHCII-Proteingerüst eines LHCII Monomers aus Spinat nach Liu, 2004 (A) [36]. Drei Helices durchspannen die Thylakoidmembran; der N-Terminus liegt auf der stromalen Seite, der C-Terminus lumenal. Drei Monomere assemblieren parallel ausgerichtet zu einem Trimer (B und C). B zeigt die Seitenansicht eines trimeren LHCII aus *Pisum sativum* nach Standfuss *et al.*, 2005 [24]; C die dazugehörige Aufsicht von der stromalen Seite aus. In B und C sind folgende Cofaktoren eingezeichnet: grau = Polypeptid, cyan = Chlorophyll *a*, grün = Chlorophyll *b*, orange = Carotinoide, pink = Lipide.

1.3. Rekombinanter LHCII

Das *Lhcb1*-Gen aus *Pisum sativum* wurde 1984 isoliert [41]. Dieses Gen kann in *Escherichia coli* (*E.coli*) überexprimiert werden und das aufgereinigte Apoprotein unter Zugabe der entsprechenden Pigmente in seine native Form rekonstituiert werden [42]. Diese Rekonstitution funktioniert gleichwohl auch mit der Vorläuferform des Apoproteins, die N-terminal noch die Erkennungssequenz für den Chloroplastenimport trägt [43]. Die rekonstituierten Monomere können in Trimere überführt werden. Diese Trimerisierung kann entweder in Liposomen [44] oder in Detergenz-Micellen mittels Metallaffinitätschromatographie [45] durchgeführt werden. Die *in vitro* hergestellten Komplexe weisen vergleichbare spektrale Eigenschaften zum nativen LHCII auf, so dass Circular dichroismus- (CD-) Spektroskopie und Fluoreszenzmessungen dazu genutzt werden können, die Integrität der rekombinanten Komplexe zu überprüfen. Dabei weisen Trimere charakteristische CD-Spektren auf (siehe Spektren in Kapitel I dieser Arbeit) und innerhalb eines Komplexes wird die gesamte Anregungsenergie auf Chlorophyll *a* übertragen, die diese bei 680 nm emittieren. Wird Chlorophyll *b* bei 470 nm angeregt, so weisen nur Komplexe mit einer gestörten Energieweiterleitung – ergo einer nicht intakten Tertiär-/Quartärstruktur - signifikante Fluoreszenz von eben diesen Chlorophyllen-*b* im Bereich von etwa 650 nm auf.

Das plasmidische *Lhcb1*-Gen kann gezielt mutagenisiert werden, woraus spezifische Aminosäureaustausche (z.B.: [46–48]) oder Insertionen/Deletionen im Apoprotein resultieren [49]. Die Einführung eines Cysteins kann für gezielte kovalente Modifikationen genutzt werden, beispielsweise durch Farbstoffe [50] oder Spinsonden für EPR-Messungen [40; 51]. Die kovalenten Modifikationen können am Apoprotein durchgeführt werden und lassen eine Rekonstitution und Trimerisierung des Komplexes zu. Allerdings können kovalente Modifikationen auch am trimeren Komplex durchgeführt und so z.B. ein Farbstoff an den LHCII gebunden werden [52].

Die Einführung eines Farbstoffs kann die spektralen Eigenschaften des LHCII erweitern. So kann durch den Farbstoff Rhodamin Red die Grünlücke, welche charakteristisch zwischen 500 und 630 nm auftritt, partiell verkleinert werden und somit mehr sichtbares Licht vom Komplex absorbiert werden [50]. In diesem Fall überträgt der Farbstoff als Donor seine Anregungsenergie auf LHCII, der als Energieakzeptor fungiert. LHCII kann aber auch die Rolle eines Energiedonors übernehmen. So konnte gezeigt werden, dass er in der Lage ist, Anregungsenergie auf Quantum Dots zu übertragen, die diese zu einer Ladungstrennung nutzen können [49; 53]. Genau diese Möglichkeiten machen rekombinanten LHCII zu einem interessanten Kandidaten für technische Applikationen wie der bereits beschriebenen Farbstoffsolarzelle, in denen bisher nur native Komplexe eine Anwendung fanden. Allerdings wird dies durch eine hohe thermische Labilität eingeschränkt. Daher ist es notwendig, die Stabilität des rekombinanten Komplexes gegenüber thermischem Stress zu erhöhen.

1.4. Stabilisierung von Proteinen und Enzymen

Die Labilität des rekombinanten LHCII ist kein exklusives Problem dieses Proteinkomplexes. Häufig ist die Stabilität von Proteinen und Enzymen das entscheidende Problem bei deren Einsatz in medizinischen, technischen oder anderen biotechnologischen Feldern. Die Mechanismen, die zu einem Funktionsverlust führen, können vielfältiger Natur sein: Konformelle Strukturveränderungen können dazu führen, dass die Funktionen von Proteinen verloren gehen. Werden dabei hydrophobe Bereiche exponiert, folgt hieraus häufig eine Aggregation, die den Prozess oft irreversibel werden lässt. Außerdem können chemische Veränderungen an Aminosäuren/Peptidstruktur auftreten (z.B. Redoxreaktionen an Cysteinen, Spaltung von Disulfidbrücken, kovalente Modifikationen von Aminosäureresten, u.a.). Auch der Verlust von Cofaktoren oder das Dissoziieren des Proteins in Untereinheiten können einen Funktionsverlust nach sich ziehen. Verantwortlich für diese Vorgänge können bestimmte Moleküle/Agenzien, extreme pH-Werte oder auch Hitze sein. Letztere kann auch schlicht die Energiebarriere zur Umwandlung in eine inaktive Konformation absenken, aus der nicht mehr in die aktive Konformation zurückgekehrt werden kann [54].

Auf vielfältige Weise wird deshalb versucht, die Stabilität von Proteinen zu erhöhen, um sie dadurch für weitere Anwendungen verfügbar zu machen: Eine Möglichkeit besteht darin, die Umgebung der Proteine vorteilhaft zu verändern. Dies kann durch Zugabe von Additiven zur Lösung wie Glycerol [55] oder anderen Polyolen [56], Aminosäuren [57] oder Salzen [58] geschehen. Bei Membranproteinen tritt im Vergleich zu löslichen Proteinen das zusätzliche Problem auf, dass diese in ihrer nativen Umgebung – der Lipiddoppelschicht – oftmals sehr stabil sind. Für weitergehende Anwendungen müssen sie allerdings solubilisiert werden. In diesem Zustand weisen sie häufig Stabilitätsprobleme auf. Dabei kann die Wahl des Detergenz einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität ausüben. So kann die längere Alkylkette im Laurylmaltosid (LM) vorteilhafter sein als der kürzerkettige Alkylrest im Octylglykosid (OG) [59]. Yu *et al.* zeigten, dass sog. Tripod-Amphiphile eine Solubilisierung von Bacteriorhodopsin und Rinder-Rhodopsin über lange Zeiträume möglich macht [60]. Auch Amphipole, gemischte Copolymere mit hydrophilem Rückgrat und hydrophoben Seitenketten, eignen sich sehr gut, um Membranproteine stabil in Lösung zu halten und für weitere Anwendungen zugänglich zu machen [61], genau wie sechs bis acht Aminosäuren umfassende amphiphile Peptidsequenzen [62]. Letztere wurden bereits für die LHCII-Solubilisierung verwendet, wo sie allerdings keinen signifikant positiven Effekt auf die thermische Stabilität des Komplexes zeigten [63].

Einen direkteren Einfluss nehmen Veränderungen am Protein selbst, das so genannte Protein-Engineering. Hierbei werden auf Genebene Modifikationen vorgenommen, aus denen eine veränderte Primärstruktur hervorgeht. Die Einführung zusätzlicher Cysteine kann zu einem internen Crosslinking führen, was sich stabilisierend auswirkt. Auch können spezifische Ionenbindungsstellen, Salzbrücken und polare Aminosäuren zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken eingeführt werden, so dass dadurch

die Stabilität des Proteins positiv beeinflusst wird. Werden im inneren Bereich von Proteinen nicht-hydrophobe Aminosäuren gegen hydrophobe ausgetauscht, so führt dies möglicherweise zu einer Verbesserung der Proteindichte, was ebenfalls stabilisierend wirkt. Alternativ werden Proteineigenschaften durch die kovalente Modifikation hin zu größerer Stabilität beeinflusst (für einen Überblick siehe folgende Quellen: [54; 59; 64–66]).

Ein sehr weites Feld ist auch die Stabilisierung von Proteinen durch Immobilisierung, wobei diese sehr unterschiedlich ausgestaltet sein kann. (Für einen Überblick über Immobilisierungstechniken und entsprechende Strukturen sind folgende Reviews zu empfehlen: [54; 67–70]) Neben einer einfachen Adsorption an Oberflächen oder Partikel können Proteine auch kovalent an diese gebunden oder untereinander vernetzt werden. Ein Einbau in große polymere Strukturen kann ebenfalls zu einer Immobilisierung genutzt werden. Abb. 1. 5 fasst einige Micro- und Nanostrukturen mit den jeweilig häufigsten Immobilisierungsmethoden zusammen.

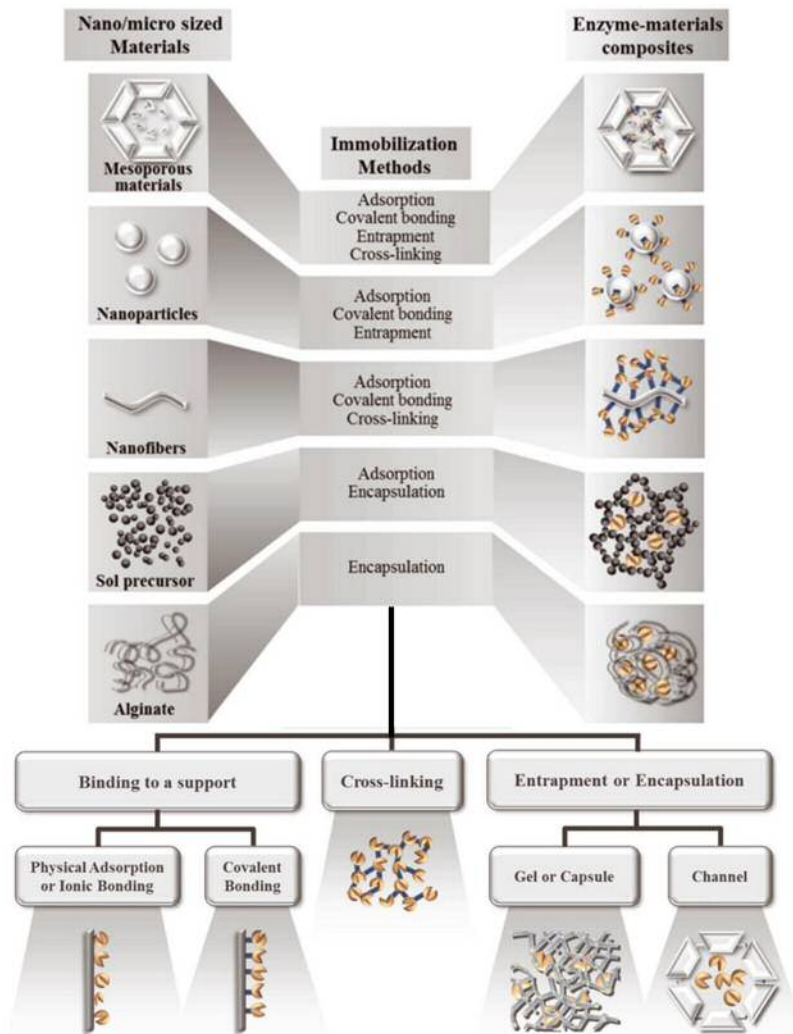


Abb. 1. 5: Immobilisierungsmöglichkeiten von Proteinen

Die Abbildung wurde verändert und zusammengefügt nach Hwang *et al.*, 2013 [70]. Die sprachliche Unterscheidung der Begriffe Entrapment und Encapsulation ist im Deutschen schwierig. Sinngemäß wird ersteres als ein Einschluss in größere und starrere Strukturen beschrieben, während bei einer Encapsulation eine sehr Protein-nahe Einfassung durch Strukturen erfolgt. Allerdings werden die Begriffe in der Literatur häufig synonym verwendet und als Einschluss definiert.

Ein beliebtes Material zur Immobilisierung von Proteinen und Enzymen ist Silikat, wobei sowohl die Adsorption an Silikatoberflächen (als Beispiel: Roach *et al.*, 2006 [71]) als auch der Einschluss in Silikatnetzwerke bekannt ist. Vor allem letzterer Prozess bietet ein hohes Maß an Stabilisierung unter Erhalt von Enzymfunktionen und verhindert durch komplexere Einbindung in das Netzwerk ein Auswaschen des Enzyms im Laufe der Zeit (beispielhaft in Leonard *et al.*, 2011 [72]). Der Effekt der Stabilisierung gegenüber thermischem Stress wird sehr häufig mit der Einschränkung von Konformationsänderungen durch die umgebende Matrix begründet [73–77].

1.5. Sol-Gel-Silikateinschluss von biologischen Komponenten

1990 publizierten Braun *et al.* ein Procedere, bei dem die alkalische Phosphatase in Silikat eingeschlossen wurde [78]. Hierzu wurde das Enzym mit 2,8 M Tetramethoxysilan (TMOS) bei einem pH-Wert von etwa 9 umgesetzt. Der anschließende Polymerisationsprozess wurde über 10 Tage bei 37°C durchgeführt. Die Enzymaktivität der Phosphatase betrug noch 30 %, jedoch konnte eine Erhöhung der Stabilität gegenüber thermischem Stress im Vergleich zum Enzym in Lösung festgestellt werden. Vier Jahre später veröffentlichten die gleichen Autoren eine Übersicht über die Fortschritte im Sol-Gel-basierten Einschluss verschiedener Enzyme und ganzer Zellen in Silikat, aber auch in Zirkoniumoxid, Vanadiumoxid und Titandioxid [79].

E.coli-Zellen zeigten eine sehr hohe Viabilität, wenn sie mittels Sol-Gel-Prozess in Silikat eingeschlossen werden. Allerdings wurde deutlich, dass zu hohe Konzentrationen der Hydrolyseprodukte von Alkoxi-Vorläufern wie TMOS sich nachteilig auf die Viabilität auswirken, was durch ein Ausweichen auf Wasserglas als Quelle für Orthokieselsäure verhindert wird (wässrige Herstellungsrouten) [80]. Auf eben jener wässrigen Route wurden ganze Thylakoide, Pflanzenzellen, Cyanobakterien und Grünalgen in Silikat immobilisiert und alle zeigten über einen Zeitraum von 30 (bei Pflanzenzellen) bis 80 Tagen (bei Grünalgen) fotosynthetische Aktivität [81–84; 72]. Diesen Experimenten kommen zwei Eigenschaften der Silikatmatrix zugute: die Porosität, die die Zugänglichkeit für Substrate ermöglicht und die optische Transparenz, die zum einen eine Lichtbestrahlung zulässt als Grundvoraussetzung für Fotosyntheseprozesse und zum anderen eine spektroskopische Analyse ermöglicht [85]. Diese Eigenschaften waren auch die Grundvoraussetzung für den Einschluss von Bacteriorhodopsin [86], Chlorosomen [87] oder das bereits im Zuge der Farbstoffsolarzellen diskutierte Fotosystem I, das eingeschlossen in Silikat eine Licht-abhängige Wasserstoffproduktion zeigte [88]. Kopnov *et al.* griffen den Einschluss des Fotosystems I auf und kombinierten diesen mit dem Einschluss von Fotosystem II, die mittels des Elektronenüberträgers 2,6-Dichlorphenolindophenol miteinander elektronisch verbunden wurden [89]. Eine besondere Problematik bei der Immobilisierung lag im Einschluss des labilen Fotosystems II, die nur durch eine starke Verkürzung der Gelbildungszeit erreicht werden konnte. Wie auch beim alleinigen Einschluss von Fotosystem I musste nach der Hydrolyse des TMOS (hier 5 M) das Hydrolyseprodukt Methanol entfernt werden, das in einer Konzentration von 20

M entsteht. Hier werden zwei Grundproblematiken des Sol-Gel-Prozesses zum Einschluss von Enzymen/Proteinen deutlich: die hohen Konzentrationen an Vorläufermolekülen und die relativ lange Reaktionsdauer, wodurch die Immobilisierung einer Reihe von Proteinen limitiert wird.

In der Natur bilden Organismen Silikat unter milden physiologischen Bedingungen bei sehr niedrigen Konzentrationen an Kieselsäure. Die Mechanismen der biogenen Silikatbildung sollten damit die Möglichkeit bieten, eine Immobilisierung unter milderer Bedingungen durchzuführen.

1.6. Biologische Silikatbildung

Man findet den Prozess der biogenen Silikatbildung bei Diatomeen (Kieselalgen), Schwämmen, Radiolaria, Choanoflagellaten und höheren Pflanzen. Die gemeinsame Eigenschaft der Bildung des amorphen Silikats ist die, dass der Prozess unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei niedrigen Temperaturen und Drücken und nahezu neutralem pH-Wert abläuft und sich damit von der anthropogenen Glasherstellung unterscheidet. Diatomeen sind eine sehr artenreiche Gruppe, die für insgesamt 20 % der weltweiten fotosynthetischen Primärproduktion verantwortlich sind [90; 91]. Als ein Grund für den hohen evolutionären Erfolg dieser einzelligen Algen wird die aus Silikat bestehende Schale angeführt, die einen guten Schutz gegenüber Räubern bietet [92]. Die Orthokieselsäure, das monomere Vorläufermolekül für Silikat, wird in den Kieselalgen in sog. Silikatablagerungs-Partikeln (SDV) beträchtlich aufkonzentriert. In den Prozess der Kieselsäurekondensation sind vor allem zwei Stoffgruppen involviert: Proteine mit Silikat-Affinität – die sog. Silaffine - und langkettige Polyamine. Ihre Gemeinsamkeit ist der polykationische Charakter. Es sind vier Silaffine in *Cylindrotheca fusiformis*, Silaffin-1A₁, Silaffin-1A₂, Silaffin-1B und Silaffin-2, bekannt [93; 94]. Die Silaffine 1A₁, 1A₂ und 1B werden in einem Gen – *sill* – codiert. Dessen Expressionsprodukt (Silp) ist ein Vorläuferpeptid, das proteolytisch verdaut wird. Hierbei wird der saure N-Terminus abgespalten und der C-Terminus in sieben Wiederholungseinheiten (R1 – 7) zerlegt. Auf Grund der hohen Sequenzhomologie entstehen hieraus die oben beschriebenen drei Silaffine (R1 entspricht 1B, R2 1A₂ und R3-7 1A₁). Die Silaffine werden posttranslational modifiziert (Abb. 1. 6 B). Alle weisen Phosphorylierungen von Hydroxy-Aminosäuren auf [95]. Bei den Silaffinen-1 treten zudem Methylierungen der ε-Aminogruppe der Lysine, bzw. deren Modifikation mit Polyaminen auf. Bei Silaffin-2 sind Sulfatierungen und Glykosylierungen die häufigsten Veränderungen. Letzteres Silaffin besitzt keine intrinsische Aktivität zur Silikatbildung und nimmt vermutlich eine regulierende Rolle ein [94]. Im engen Verbund mit den Silaffinen wurden auch ungebundene langkettige Polyamine in Diatomeen-Silikat identifiziert (Abb. 1. 6 C) [96]. Dass diese die Fähigkeit besitzen, die Kondensation von Kieselsäure zu Silikat zu katalysieren, konnten Mizutani *et al.* schon vor ihrer Entdeckung in Kieselalgenschalen nachweisen und dabei eine strenge Phosphat-Abhängigkeit dieses Prozesses aufzeigen [97], die auch für Silaffine gilt [95].

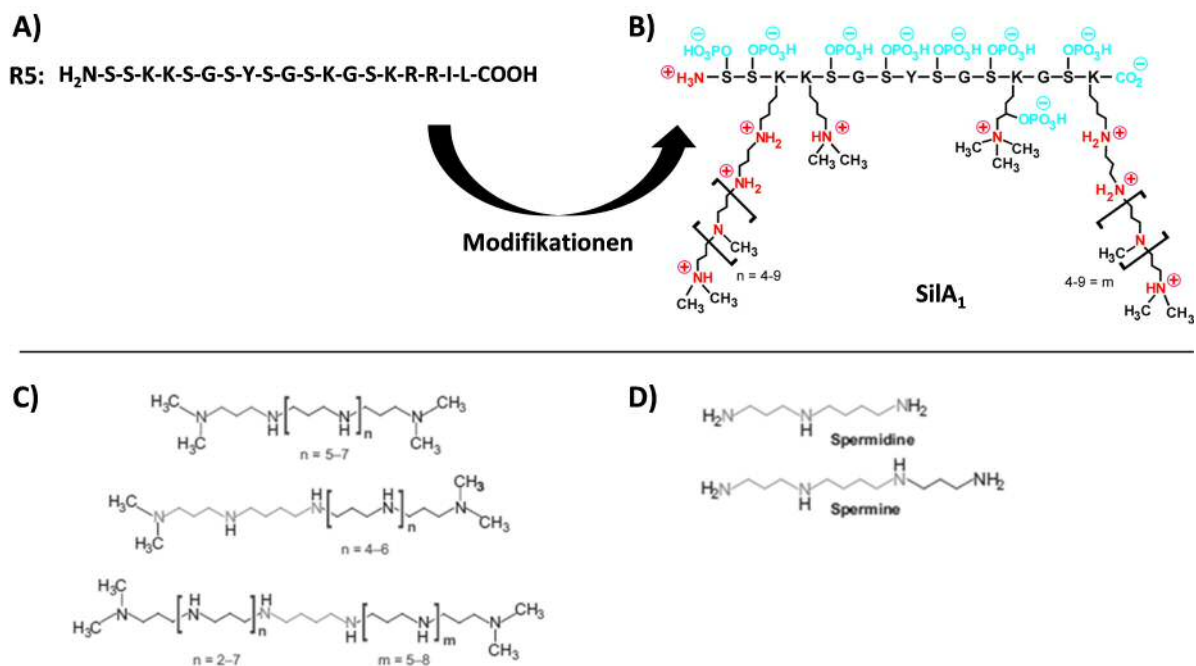


Abb. 1. 6: Biogene Silikat-bildende Verbindungen

A) Primärstruktur der Silaffin-Wiederholungseinheit R5.

B) zeigt die Sequenz des posttranslational modifizierten Silaffin-1A₁. Abbildung entnommen aus Kröger *et al.*, 2002 [95].

In C) sind verschiedene Polyaminstrukturen zu sehen, die man in Diatomeen findet. In D) die beiden natürlich vorkommenden Oligoamine Spermidin und Spermin, die ebenfalls Silikat-bildende Eigenschaften besitzen. Abbildungsteil C) wie auch D) sind verändert Kröger *et al.*, 2008 entnommen [91].

Häufig werden *in vitro* die 5. Wiederholungseinheit des Silp – R5 (Abb. 1. 6 A) – oder Polyamine in der Analyse der Einflussmechanismen auf die Kieselsäurekondensation oder in Anwendungsbezogenen Versuchen genutzt. Aber auch günstige Alternativen wie die natürlich vorkommenden Oligoamine Spermin oder Spermidin oder das Arginin-reiche Protamin werden zur Silikatbildung verwendet (Abb. 1. 6 D). Die Mechanismen der biogenen Silikatbildung sind noch nicht vollständig aufgeklärt, es existieren allerdings gut begründete Hypothesen, die die Wirkungsweise von polykationischen Verbindungen dabei beschreiben.

1.7. Mechanismen der biogenen Silikatbildung

Der prinzipielle Verlauf der Silikatbildung aus Kieselsäure ist mit und ohne polykationischen Additiven grundsätzlich vergleichbar. Durch die Ausbildung einer Si-O-Si-Bindung, einer sog. Siloxanbindung, zwischen zwei Kieselsäuremolekülen bildet sich ein Dimer. In der fortschreitenden Kondensation treten häufig Zyklisierungen auf, die wohl die Grundlage für einen 1-2 nm großen Nucleus darstellen. Dieser Nucleus kann durch weitere anlagernde Kondensationen zu einem Elementarpartikel heranwachsen, der sich dann entweder weiter vergrößert oder mit anderen Elementarpartikeln zu einem verzweigten Netzwerk aggregiert (Abb. 1. 7) [98–100].

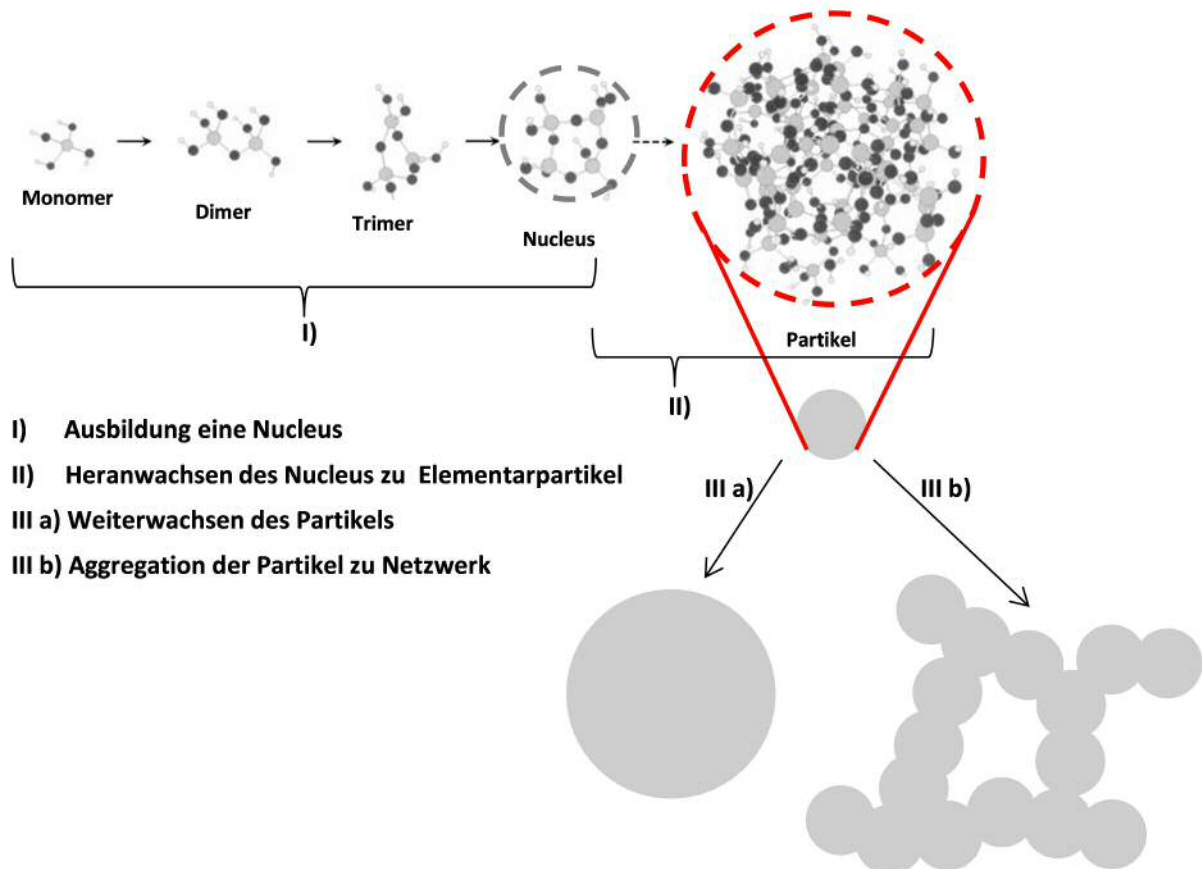


Abb. 1. 7: Prozess der Silikatbildung

Schematische Darstellung der Silikatbildung aus Kieselsäure in einem dreistufigen Prozess. Abbildung verändert und ergänzt nach Coradin *et al.*, 2003 [99].

Die Partikelbildung, die einer Reaktionskinetik zweiter Ordnung folgt, ist maßgeblich von der Kieselsäurekonzentration und der Temperatur abhängig [98]. Höhere Temperaturen führen zu kleineren Partikeln, was mit einer schnelleren und häufigeren Nucleusbildung begründet wird [101; 102]. Die Zugabe von polykationischen Verbindungen kann die Partikelbildung ebenfalls extrem beschleunigen. So kann in Kieselsäure-Konzentrationsbereichen, in denen ohne Zugabe von Additiven über lange Zeiträume keine Bildung von Partikeln beobachtet wird, schon nach kurzer Zeit eine solche Bildung auftreten [99]. Den polykationischen Verbindungen werden dabei vermutlich zwei Rollen zuteil: Zum einen können sie gut mit der Oberfläche der Silikate wechselwirken, deren negative Ladung mit zunehmendem Kondensationsgrad größer wird. Hierdurch findet eine Ladungsabschirmung der negativen Ladungen statt, so dass eine interpartikuläre Abstoßung abgeschwächt wird. Die polykationischen Moleküle bringen dabei die Partikel in räumliche Nähe, so dass die Ausbildung einer Siloxanbindung erleichtert wird [99; 100; 103; 104]. Auf molekularer Ebene wird ein Mechanismus vorgeschlagen, der auf Protonierung-Deprotonierungs-Mechanismen zwischen Silikat und Aminogruppen basiert. Eine Übertragung eines Silanolprotons auf ein freies Elektronenpaar einer Aminogruppe erhöht die Nucleophilie der dabei entstehenden Silanolatgruppe drastisch. Durch gleichzeitiges Protonieren einer Sila-

anolgruppe wird die Nucleofugie dieser erhöht, so dass im Wechselspiel der beiden Vorgänge eine erleichterte Ausbildung der Siloxanbindung auftritt (Abb. 1. 8 [104; 105]).

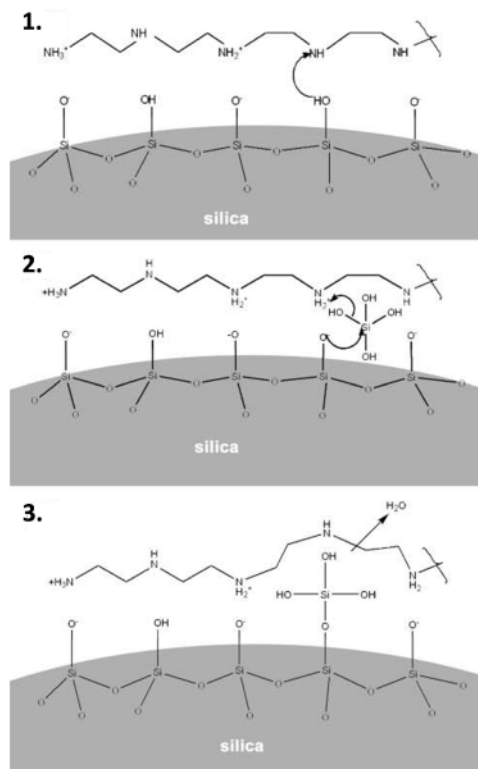


Abb. 1. 8: Säure-Base-katalysierte Kieselsäureverknüpfung
Hypothetischer Mechanismus der Verknüpfung von Kieselsäuremolekülen, hier vermittelt durch ein Polyamin. Abbildung verändert nach Belton *et al.*, 2005 [104].

Sehr häufig wird eine Aggregation der polykationischen Verbindungen als Grundvoraussetzung für ihr katalytisches Wirken genannt, da so eine stabiles Template sozusagen als „Hilfsnucleus“ bereitgestellt wird [95; 106–109].

Diese katalytischen Effekte der polykationischen Moleküle werden häufig für eine Silikatbildung unter sehr milden Bedingungen benutzt. Detergenz-gelöster rekombinanter LHCII kann durch einen Einschluss in ein Silikatnetzwerk immobilisiert und stabilisiert werden. Im Folgenden sind methodische Aspekte hierzu angerissen, die in den entsprechenden Kapiteleinleitungen tiefergehend vorgestellt werden. Dabei können die Verbindungen unabhängig von dem Zielmolekül in sog. Copräzipitationsreaktionen eingesetzt werden (für weitergehende Information: Kapitel II). Auch können die Zielmoleküle durch polykationische Verbindungen modifiziert werden, so dass diese Silikat-bildende Eigenschaften erhalten. Dies kann in Form einer genetischen Modifikation z.B. durch das R5-Gen geschehen (für weitergehende Information: Kapitel I) oder kovalent, beispielsweise durch ein polykationisches Protein wie Protamin (für weitergehende Information: Kapitel III). Die katalytischen Eigenschaften sind dabei nicht auf die Bildung von Silikat beschränkt. Viele dieser polykationischen Verbindungen sind auch in der Lage Titandioxid aus löslichen Vorläufermolekülen zu bilden und in dieses Fremdmoleküle einzuschließen (für weitergehende Information: Kapitel IV). Die Stabilisierung von Proteinen wie dem LHCII in Silikat basiert vermutlich auf einem Zusammenspiel verschiedener Mechanismen. Mit Hilfe chemisch inerte Wirtszetze wie Polyacrylamid (PAA) können die exclusi-

ven Eigenschaften von Silikat im Stabilisierungsprozess abgegrenzt werden (für weitergehende Information: Kapitel V).

2. Zielsetzung

Die Stabilität des rekombinanten LHCII gegenüber erhöhten Temperaturen limitiert seinen Einsatz in technischen Anwendungen. Im Rahmen dieser Dissertation sollte der Einschluss von rekombinantem LHCII in Silikat hinsichtlich des Stabilisierungspotentials gegenüber Wärme analysiert werden. Die Silikatbildung sollte dabei biomimetisch erfolgen, d.h. durch polykationische Moleküle, die auch in Organismen wie Kieselalgen für die Silikatbildung verantwortlich sind. Insgesamt drei Methoden wurden verwendet, um einen Einschluss der Komplexe zu erreichen: I.) Mittels Copräzipitation, bei der LHCII und das Oligoamin Spermin in Kieselsäure vermischt werden und dabei die Bildung eines Silikatpräzipitats erfolgt. II.) Mittels einer Modifikation des LHCP-Gens durch eine Gensequenz eines polykationischen Peptids, dem sog R5-Peptid, die zu einem polykationisch-modifizierten trimeren LHCII (R5LHCII) führen sollte, der entweder ohne weitere Zusätze in der Lage ist, Silikat zu bilden oder aber bei einer unterstützten Bildung strukturell direkt beteiligt ist. Dabei galt es die Protokolle sowohl der Überexpression und Aufreinigung als auch der Rekonstitution und Trimerisierung an die veränderten Eigenschaften des Membranproteins anzupassen. III.) Mittels kovalenter Modifikation eines trimeren Komplexes mit a) dem polykationischen Protein Protamin über einen Crosslinker, wobei dem Komplex wiederum die autogene Silikatfällungseigenschaft verliehen werden sollte. Sowie b) einer Modifikation mit dem Silanolgruppen-haltigen Molekül (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan (MPS). Für die beiden letzten Methoden galt es, entsprechende Modifikationsprocedere zu optimieren.

Die Methoden zum Komplexeinschluss sollten hinsichtlich zweier grundsätzlicher Fragestellungen bewertet werden: Welcher Anteil an eingesetzten Komplexen wird in das Silikatpräzipitat eingebaut (Einbaurate) und in welchem Maße werden die eingebauten Komplexe gegenüber Hitzebelastung stabilisiert?

Durch die Variation des verwendeten Puffers und des pH-Wertes sollten entsprechende Beeinflussungsmöglichkeiten des Einschlusses untersucht werden. Aus dessen Resultaten sollten Rückschlüsse auf den Einschlussprozess an sich gezogen werden. Mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) sollten die Silikatstrukturen aufgeklärt werden und etwaige Zusammenhänge zwischen Struktur und dem Ausmaß an Einbau und Stabilisierung analysiert werden. Aus diesen Erkenntnissen heraus sollten die Komplexeigenschaften im Silikat hinsichtlich Lokalisation, Aggregationszustand, Zugänglichkeit für destruiende Agenzien und der Fähigkeit zu inter-komplexärem Energietransfer untersucht werden. Die verwendeten Einschlussmethoden sollten des Weiteren daraufhin getestet werden, ob sie sich auch für einen Einschluss in andere anorganische Polymernetzwerke wie Titandioxid eignen. Mit der Oberflächenplasmonresonanz- (SPR-) Spektroskopie sollte außerdem eine spektroskopische Methode hinsichtlich ihres Potentials bewertet werden, Protein-assoziierte Biomineralisationsvorgänge auflös- und quantifizierbar zu machen.

3. Allgemeine Materialien und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Analytische HPLC	Entgaser: DG-2080-53	Jasco Labor- u. Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
	Gradientenmischer: LG-1580-04 Quaternay Gradient Unit	
	Pumpe: PU-1580 Intelligent Pump	
	Detektor: Diode Array Detector MD-1515	
	Software: Borwin-PDA, Version 1.50	Merck, Darmstadt
Autoklav	Säule: Chromolith Speed-Rod, RP 18E, Nr. 1.51450.0001, 4,6x50 mm	
	Varioklav Typ 500E Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH, München
	System DX-150	Systemec GmbH Labor- & Systemtechnik, Wettenberg
Biophotometer	Autoklaviertopf, Omni perfect	Blitz-Elektro-Erzeugnisse Manufaktur Handels-GmbH, Rosbach
	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Brutschrank	Küvetten: greiner bio-one Cuvettes, semi-micro	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
	Modell B50	Memmert GmbH, Schwabach
CD-Spektrometer	Spektrometer: Spektropolarimeter Modell j-810-S	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt
	Pelletier-Element: Modell CDF-426S	

	Software: Spectramanager V.1.60.00/1.40.00	
	Kühlung: Julabo F200	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
	Küvetten: Präzisionsküvetten aus optischem Spezialglas Typ 100-OS 2 mm	Hellmann GmbH & Co.KG, Mühlheim
	Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil® 1 mm	
Densitometrie	Fotoeinheit: VersaDoc Imaging System Model 3000	BioRad Laboratories GmbH, München
	Software: QuantityOne V 4.6.3	
Drehrad	Intelli-Mixer	NeoLab, Heidelberg
Fluoreszenz-Spektrometer	Spektrometer: Fluoromax-2 ISA SPEX	Jobin Yvon, Grasbrunn
	Software: Datamax Software Ver- sion 2.24	
	Kühlung: Ministat Compatible Control	Huber Kältemaschi- nenbau, Offenbach
Fotodokumentation	Canon Power Shot A710 IS	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Fotometrie	Fotometer: Jasco V-550 UV/Vis Spectrophotometer	Jasco Labor- und Da- tentechnik GmbH, Groß-Umstadt
	Software: Spectra manager V. 1.60.00 bzw. 1.40.00	
	<u>Küvetten</u> UV-Messung: Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil, Typ 104.00 2B-QS	Hellmann GmbH & Co.KG, Mühlheim
	Vis-Messungen: Präzisionsküvet- ten aus optischem Spezialglas Typ 104.00 2B-OS	
	Einmalküvetten: Plastibrand® Einmalküvetten, Acryl Cuvettes 67755	Brand GmbH & Co KG, Wertheim Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
French Press	French Pressure Cell Press, SLM Aminco	SLM Instruments, Inc., Rochester, USA

<u>Gelelektrophorese</u>		
Agarose-Gelelektrophorese	Elektrophoresekammer: Eigenbau Spannungsquelle: POWER PAC 3000	BioRad Laboratories; Hercules, CA, USA
Polyacrylamid- Gelelektrophorese	Gießapparatur: Midget-Systems	Hofer, Pharmacia Biotech Inc., San Fran- cisco, CA, USA
	Kammer: Mighty Small II SE 259/SE 260	
	Spannungsquelle: Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB
	Kühlung: Haake GH und D1 Modell Fisons	Haake Messtechnik GmbH, München
Gelarchivierung/ Probenentgasung	Geltrockner: Slab Gel Dryer 2003	LKB Produkter AB, Bromma, Schweden
	Vakuumpumpe: Edwards RV5	Crawley, Sussex GB
	Kühlfalle: KF-2-60	Bachofer GmbH, Reut- lingen
	Vacuum Concentrator Mini 20 BaVaCo	
Mischgeräte	Vortexer: MS2 Minishaker, Vortex Genie 2	IKA-Labortechnik, Wilmington USA Bachofer GmbH, Reut- lingen
	Magnetrührer: IKAMAG RCT	IKA-Labortechnik, Staufen
	Inkubationsschüttler: Certomat R/H	Firma B.Braun Biotech International GmbH, Melsungen
	Gelschüttler: Shaker DOS-10Lr	NeoLab, Heidelberg
	Rotationsvorrichtung: Kulturenrad Typ Rotator	Bachofer GmbH, Reut- lingen
	Thermoschüttler: Thermomixer comfort 5355	Eppendorf AG, Ham- burg
	Drehscheibe: Eigenbau Spannungsgeber: DC Power Supply PS152A	Voltcraft®, Hirschau

Mixer	Heavy Duty Blender CB62T	Waring Commercial, New Hartford, CT, USA
SPR-Spektroskopie	Spektrometer: SR7000 DC Pumpe: SR7500 Halbautomatisches Injektionsventil: SR7300 Autosampler: SR7100 Diverter Valve: SR7600 Software: SPRAutolink v.1.1.9.N	Reichert Technologies Life Sciences, Buffalo, NY, USA
pH-Messungen	pH – Meter: Inolab pH Level 2 pH-Elektrode: SenTix81 pH-Papier: Neutralit® pH 5-10; 2,5-4,5; 6,5-10	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (WTW), Weilheim Merck KGaA, Darmstadt
Pipetten	Pipetman P2, P20, P200, P1000, P5000	Gilson Inc, Middletown, WI, USA
Plattenreader	infiniteR M1000 multimode microplate reader Software: Tecan i-control, 1.6.19.2 Mikrotiterplatten: UV-Star, 96-Well Flat Bottom	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Probenaufkonzentrierung	Vivaspin 500 30 kMCO PES Amicon Ultra 15 50 kMWCO	Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, Frankreich Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Rasterelektronenmikroskopie	Rasterelektronenmikroskop: Gemini 1530 Probenteller: 0,5" Aluminium Specimen Stubs Leit-Tabs: Leit-Tabs G3347	Carl Zeiss AG, Jena Agar Scientific, Stansted, England Plano GmbH, Wetzlar

EDX-Messungen	Mikroskopieeinheit: Nova 600 NanLab DualBeam™-SEM/FIB	FEI Company, Hillsboro, OR, USA
	EDX-Einheit : Sapphire Si(Li) Detecting Unit	EDAX Business Unit AMETEK GmbH, Wiesbaden
	Probenteller: 0,5" Aluminium Specimen Stubs	Agar Scientific, Stansted, England
	Graphit-Tabs: Spectro-Tabs	Plano GmbH, Wetzlar
	Cu-Waver: metallische Klebebänder Cu G253	
	Si-Waver: Silizium Träger glatt	
Reinstwasseranlage	Optilab-Standard	MembraPure, Lörweiler
Rotationsverdampfer	Rotator: Heidolph VV 2000	Heidolf Elektro GmbH, Kehlheim
	Heizbad: Heidolph VB 2000	
	Kühlung: Minichiller	Peter Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg
	Pumpe: CVC 2000	Vacuubrand GmbH&Co, Wertheim
Sterilbank	Laminar Flow Typ HLF H	SLEET Technik GmbH, Mainz
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 102 H	Bandelin Electronic GmbH, Berlin
Ultraschallstab	V1A, V9906 Vibra Cell	Sonic&Materials Inc., Danbury, CT, USA
Waagen	Analysenwaage: Analytik A 200 S	Sartorius Stedim Biotech S.A., Göttingen
	Präzisionswaagen: BP 2100 S bzw. L610	
	GT2100	Ohas Corp., Florham Park, NJ, USA
Wärmeschrank	T 5042	Heraeus GmbH, Hanau
Wasserbad	Thermomix MM	B.Braun Biotech International GmbH,

		Melsungen
Wasserkocher	HB4 Basic	IKA Labortechnik, Staufen
<u>Zentrifugen</u>		
Tischzentrifugen	Bachofer Tischzentrifuge	Bachofer Laboratori- umsgeräte, Reutlingen
	EBA 12	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
	Mikro 120	
Kühlzentrifugen	Mikro 22 R Typ 1110 Rotoren: 1015, 1195, 1016	
	Rotina 38R Typ 11707 Rotoren: 1792, 1789-L	
	Avanti J-26 XP Rotoren: JLA-10.500, JA 20	Beckmann Coulter GmbH & Co. KG, Krefeld
Ultrazentrifugen	Optima LE-80K	
	Optima L-90K	
	Optima XL-100K	
	Rotoren: SW 40, SW41ti, SW 60 UZ-Röhrchen: SW41 Polyallo- mer, SW60 Polyallomer	
Thermo-Cycler	Primus 25 Legal PCR System, Modell 5524	MWG Biotech, Ebers- berg
UV-Lampe	HL-6-KM	Bachofer GmbH, Reut- lingen

3.1.2. Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer höchst möglichen Reinheit benutzt. Der Bezug erfolgte über folgende Hersteller:

- Agilent Technologies, Waldbronn
- Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- Avanti Polar-Lipids, Alabaster, USA
- BASF, Ludwigshafen

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
 Biomol, Hamburg
 Bio-Rad, München
 Boehringer, Mannheim
 Fermentas, Sankt Leon-Rot
 Invitrogen, Karlsruhe
 Macherey-Nagel, Düren
 Merck KGaA, Darmstadt
 Molecular Probes Inc., Eugene, USA
 New England Biolabs GmbH, Frankfurt
 Novagen, Darmstadt
 Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
 PerkinElmer Life Science, Waltham, MA, USA
 Pierce, Rockfort, USA
 Roth GmbH, Karlsruhe
 SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
 SIGMA-Aldrich, München
 Strem Chemicals Inc., Newburyport, MA, USA
 Thermo Scientific, Bonn
 VWR International GmbH, Frankfurt

Die Lösungsmittel Aceton und Diethylether wurden vor ihrer Verwendung destilliert. Das Deriphat-Rohmaterial wurde wie in 3.2.1.6 F) beschrieben aufgereinigt.

3.1.3. Längenstandards

Um eine Zuordnung der Proteinbandengewichte bei denaturierender Gelelektrophorese vornehmen zu können, wurden Referenzmarker verwendet. Für die Auftrennung von niedrig-molekularen Proteinen wurde eine Tris-Tricin Gelelektrophorese nach Schaeffer und von Jagow durchgeführt [110], für die der Ultra Low Marker der Firma Sigma-Aldrich, München, verwendet wurde:

Triosephosphat-Isomerase (Kaninchenmuskel)	26,6 kDa
Myoglobin (Pferdeherz)	17 kDa
α -Lactalbumin (Kuhmilch)	14,2 kDa
Aprotinin (Rinderlunge)	6,5 kDa
Insulin (oxidierte B-Kette, Rind)	3,496 kDa
Bradykinin	1,06 kDa

In einer PPAA-Gelelektrophorese wurde der Marker Protein Test Mix 6 der Firma ServaElectrophoresis GmbH, Heidelberg, verwendet:

Phosphorylase B	97,4 kDa
Albumin, Rind (BSA)	67 kDa
Albumin, Hühnerei	45 kDa
Carboanhydrase	29 kDa
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	21 kDa
Cytochrom C	12,5 kDa
Trypsin-Inhibitor (bovine lung)	6,5 kDa

3.1.4. LHCII-Varianten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Varianten des LHCII verwendet. Tab. 3. 1 gibt eine Übersicht über diese Varianten.

Tab. 3. 1: LHCII-Varianten

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten LHCII-Varianten mit den Abweichungen vom murenen Komplex und den entsprechenden sind mit den jeweiligen Herstellern angegeben. Nähere Informationen zum Herstellungsweg sind in den jeweiligen Arbeiten zu finden.

Name	Beschreibung	Hersteller
C3.2h	Maturer LHCII, C-terminaler His ₆ -Tag	Kosemund, 1999
C79Sh	Austausch Cys 79 gegen Ser, C-terminaler His ₆ -Tag	Müller, 2008
S3Ch	Austausch Cys 79 gegen Ser und Ser 3 gegen Cys, C-terminaler His ₆ -Tag	Huschenbett, 2001
S106Ch	Austausch Cys 79 gegen Ser und Ser 106 gegen Cys, C-terminaler His ₆ -Tag	Storf, 2001
V151Ch (CC5)	Austausch Cys 79 gegen Ser und Ser 151 gegen Cys, C-terminaler His ₆ -Tag	Arndt, 2011
S160Ch (Hu10)	Austausch Cys 79 gegen Ser und Ser 106 gegen Cys, C-terminaler His ₆ -Tag	Huschenbett, 2001
Be1	Austausch Cys 79 gegen Ser und Ser 3 und 160 gegen Cys, C-terminaler His ₆ -Tag	Bender, 2004
Be2	Austausch Cys 79 gegen Ser und Ser 106 und 160 gegen Cys, C-terminaler His ₆ -Tag	Bender, 2004
3xCh	Austausch Cys 79 gegen Ser und Ser 3, 106 und 160 gegen Cys, C-terminaler His ₆ -Tag	Wiegand, 2008
ΔN11-h	N-terminale Deletion der ersten 11 Aminosäuren, C-terminaler His ₆ -Tag	Werwie, 2013

Es wurden ausgehend von der Variante C3.2h verschiedene R5-modifizierte LHCII Varianten hergestellt. Eine Zusammenfassung zu diesen Varianten ist in Tab. I.2 zu finden. Ebenfalls in Kapitel I beschrieben sind die Vektorsysteme, in denen sich die lhcp-Gene befinden. Die in Tab. 3. 1 beschrie-

benen Varianten sind alle im pDS12-RBSII-Vektor lokalisiert (I.2.1.4.1) und werden in Ampicillin-resistenten *E.coli*-Zellen des Stamms JM101 überexprimiert.

3.2. Methoden

3.2.1. Darstellung von trimeren LHCII-Varianten

Die Herstellung rekombinanter trimerer LHCII gliedert sich in mehrere Einzelschritte. Das Apoprotein (LHCP) wird in *E.coli* überexprimiert, isoliert und aufgereingt. Hieraus erhält man sog. Proteineinschlusskörperchen (Inclusion Bodies [IBs]), die solubilisiert und durch Pigmentzugabe und Austausch des Detergenz zu monomeren Komplexen rekonstituiert werden können. Aus diesen Monomeren lassen sich mittels Ni^{2+} -Chelating-Sepharosesäulen Trimere bilden, die anschließend in Saccharosedichtegradienten aufgereinigt werden können.

3.2.1.1. Herstellung von LHCP-Einschlusskörperchen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Varianten des LHCP überexprimiert: S3Ch, S106Ch, V151Ch, S160Ch, Be1, Be2, 3xCh, C79Sh und C3.2h (zur näheren Charakterisierung der einzelnen Varianten siehe Tab. 3. 1). Die folgende Beschreibung der Versuchsdurchführung ist auf jede dieser LHCP-Varianten übertragbar. Polykationisch-veränderte LHCP wurden nach einem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Protokoll hergestellt, das in Kapitel I nachzulesen ist.

A) Herstellung von Kulturmedien und -platten

Lysogeny Broth- (LB-) Medium

Bacto-Tryptone	1,0 % (w/v)	
Yeast-Extract	0,5 % (w/v)	
NaCl	1,0 % (w/v)	
mit NaOH	5 M	auf pH 7,5 einstellen
die LB-Lösung wird autoklaviert; falls LB-Platten benötigt werden:		
Agar	1,5 % (w/v)	

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml
------------------	-----------

Zur Herstellung von Flüssigkulturmedien wurden die Komponenten wie oben beschrieben zusammengegeben und autoklaviert. Die Gefäße wurden bis zur Verwendung gelagert und die Amp-Zugabe erfolgte kurz vor der Überführung der Bakterien (1/1000 x Vol.). Bei der Herstellung von Kulturplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren Agar zugeführt. Die Lösung wurde im Wasserbad auf etwa 50°C abgekühlt und 1/1000 des Gesamtvolumens an Antibiotikum hinzupipettiert. Daraufhin wurden ca. 25 ml der Lösung unter der Laminaflow in Einmalpetrischalen ausgegossen und hier ausgehärtet. Die Lagerung der Platten fand im Kühlraum statt.

B) Überexpression und Aufarbeitung der LHCP-IBsDetergentienpuffer

NaCl	0,2 M
Desoxycholsäure	1 % (w/v)
Triton-X-100	1 % (w/v)
Tris-HCl pH 7,5 (Tris ^{7,5})	0,02 M
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	2 mM
β-Mercaptoethanol	0,01 M

Tritonpuffer

Triton-X-100	0,5 % (w/v)
EDTA	1 mM
Tris ^{7,5}	0,02 M

Trispuffer

Tris ^{8,0}	0,05 M
EDTA	1 mM

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	1 M
Dithiothreitol (DTT)	1 M
DNase I	1 bzw. 5 mg/ml

Lysispuffer (für Lysozym-Frier-Tau-Zellaufschluss)

DTT	0,8 mg/ml
Tris ^{8,0}	0,05 M
EDTA	1 mM
Lysozym	0,5 mg/ml (frisch gelöst als 5 mg/ml, dann Zugabe)

MgCl ₂	1 M
-------------------	-----

Die gewünschte LHCP-Mutante wurde aus der entsprechenden Dauerkultur auf LB-Amp-Platten vereinzelt und über Nacht (üN) bei 37°C bebrütet. Am folgenden Tag wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine Einzelkolonie in 800 ml LB-Amp-Medium überimpft und auf dem Schüttler bei 37 °C und 190 Umdrehungen pro Minute (Upm) üN inkubiert. Zum Start der Überexpression wurde am Folgemorgen 1/1000 x Vol. IPTG zugegeben ($c_{\text{end}} = 1 \text{ mM}$). Nach 4,5 Stunden weiterer Inkubation wurde der Ansatz in Zentrifugenbecher überführt und bei 4 °C und 12000 x g für 5 min zentrifugiert (diese Bedingungen gelten für alle weiteren Zentrifugationsschritte). Die Zentrifugationsgeschwindigkeit lag damit höher als allgemein üblich für Bakterienkulturen, was zu einer schlechteren Resuspendierbarkeit des Bakterienpellets führen kann. Der Überstand wurde verworfen und autoklaviert. Das Pellet wurde in 30 ml H₂O_{dest} mit 24 mg DTT ($c_{\text{end}} = 5 \text{ mM}$) resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µg DNase I konnte die Probe in zwei bis drei Durchgängen in der French Press aufgeschlossen werden.

Alternativ fand der Aufschluss mittels Lysozymverdau und anschließenden Frier-Tau-Zyklen statt. Hierbei wurde das Pellet in 30 ml Lysispuffer, dem das Lysozym erst im Anschluss an diese Resus-

pendierung zugegeben wurde, resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur (RT) ruhen gelassen. Danach wurde so viel MgCl_2 zugefügt, dass die Endkonzentration 5 mM betrug und anschließend 100 μg DNase I hinzupipettiert und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde dann in flüssigem N_2 durchgefroren (ein vollständiges Durchfrieren ist unabdingbar für einen erfolgreichen Zellaufschluss, daher mindestens 10 min Verweildauer), danach im Ultraschallbad bei 40°C aufgetaut und vollständig resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt.

Das Zelllysat wurde abzentrifugiert, das Pellet in 16 ml Detergentienpuffer resuspendiert und wiederum abzentrifugiert. Das nun fast weiße Pellet wurde in 8 ml Tritonpuffer aufgenommen und üN bei 4°C im Rotator gedreht. Am darauf folgenden Morgen erfolgte eine erneute Zentrifugation. Das Pellet wurde erneut in 8 ml Tritonpuffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Das nun vollständig weiße Pellet (sollte dies nicht der Fall sein, wurden die Arbeitsschritte ab der Zugabe von Detergentienpuffer wiederholt) wurde in 8 ml Trispuffer aufgenommen und zentrifugiert. Nach Aufnahme des Pellets in 4 ml Trispuffer waren die LHCP-IBs lagerungsfertig (-20°C).

C) Bestimmung der IB-Proteinkonzentration

<u>A₂₈₀-Puffer</u>	
Tris ^{6,8}	0,01 M
Natriumdodecylsulfat (SDS)	2 % (w/v)
β -Mercaptoethanol	1 mM (frisch vor jeder Messung zugegeben)

10 μl der LHCP-IB-Suspension wurden in 990 μl A₂₈₀-Puffer gegeben und für fünf Minuten gekocht (pro Probe drei Parallelansätze vorbereiten). Als Referenz wurden 990 μl A₂₈₀-Puffer und 10 μl Trispuffer zusammenpipettiert und genauso wie die IB-Proben behandelt. Die abgekühlten Ansätze wurden in Küvetten gegeben und nach 30 s wurde ein Spektrum von 200 – 500 nm aufgenommen. Aus der Extinktion bei 280 nm konnte die IB-Konzentration in der Suspension über den Zusammenhang, dass eine OD_{280 nm} von 0,1 einem Proteingehalt von 52 $\mu\text{g}/\text{ml}$ entspricht, berechnet werden.

3.2.1.2. Pigment-Totalextrakt aus Erbsen

Zur Rekonstitution des LHCII sind neben dem entsprechenden Apoprotein auch Pigmente notwendig. Diese werden aus etwa 14 Tage alten Pflanzen von *Pisum sativum* isoliert.

A) Isolierung und Aliquotierung der Pigmente

<u>Isolationsmedium</u>	
Sorbit	0,33 M
Tris ^{7,5}	0,025 M
DTT	1 mM

Aceton_{wasserfrei}

Ether

NaCl

5 M, 3 M, 1 M

Es wurden etwa 2 kg (entspricht etwa vier Schalen) *Pisum sativum* geerntet (nur die obere Hälfte der Erbsenpflanzen) und grob mit einer Schere in kleinere Stücke zerteilt. Portionsweise wurde das Material mit Isolationsmedium (etwa 1,8 l auf 2 kg Blattmaterial) in einem Mixer zerkleinert. Um das Material nicht zu heiß werden zu lassen, war darauf zu achten, dass nur in 3 s Impulsen gearbeitet wurde. Das Homogenat wurde durch drei Lagen Baumwollgaze und eine Lage feine Nylongaze filtriert und auf große Zentrifugenbecher verteilt. Es folgt eine zehnmünütige Zentrifugation bei 4 °C und 12000 x g. Die Pellets wurden so in Aceton aufgenommen, dass das Gesamtvolumen auf zwei neue Zentrifugenbecher verteilt werden konnte ($V_{\max} = 800$ ml). Diese wurden für 5 min im Ultraschallbad behandelt, um die Pigmente zu extrahieren. Anschließend erfolgte nach den bereits beschriebenen Bedingungen eine erneute Zentrifugation.

Die Überstände wurden in einem Becherglas vereinigt und in einen 2 l-Scheidetrichter überführt. Es wurden 250 ml Ether hinzugefügt und vorsichtig geschwenkt. Dabei war darauf zu achten, dass stets entlüftet wurde. Es folgte die Zugabe von 125 ml 5 M NaCl-Lösung und vorsichtiges Schwenken. Hierzu wurde solange H_2O_{dest} zugegeben bis sich in der Hypophase ein durchsichtiger Schlier bildete. Nach erfolgter Phasentrennung wurde die Hypophase entfernt. Danach wurde dieser Schritt noch zweimal mit 3 und 1 M NaCl wiederholt und dazwischen jeweils die Hypophase entfernt. Zuletzt wurde mit H_2O_{dest} so lange ausgeschüttelt bis das Volumen der Epiphase konstant war. Danach konnte die wässrige Phase vollständig abgelassen und die Etherphase in einen Rundkolben gegeben werden. Der Ether wurde am Rotationsverdampfer vollständig entfernt. Der pigmentbeschichtete Kolben wurde mit Stickstoff beschickt und $\bar{u}N$ eingefroren.

Die eingefrorenen Pigmente wurden in 100 ml Aceton (absolut wasserfrei) aufgenommen. Die Lösung wurde mittels analytischer Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) (3.2.1.2.B) auf ihren Pigmentgehalt hin getestet. Von diesem Messergebnis ausgehend konnte festgelegt werden, wie viel des Pigmenttotalextraktes verwendet werden musste, um einen Aliquot mit einer Chlorophyllmenge von 2,5 mg zu erhalten. Das entsprechende Volumen wurde jeweils in Eppendorfgefäße gefüllt und im Stickstoffstrom getrocknet. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Pigmentaliquots bei -20 °C gelagert.

B) Vermessung der Totalextrakte mittels analytischer HPLC

Die Konzentration und Qualität der Pigmente wurde mittels analytischer HPLC überprüft. Für die HPLC wurde mit 80 %-igem Aceton eine 1:1000 Verdünnung der in 100 %-igem Aceton gelösten Pigmente verwendet, die auf eine Chromolith Speed RCD, RP 18E, 50-4,6 mm Säule (Probenschleifenvolumen 20 μ l) aufgetragen wurde. Die Elution erfolgte in einem hinsichtlich der Hydrophobizität ansteigendem Gradienten (von 70 auf 100 % Aceton ansteigend). Dadurch wurden die unterschiedlichen Pigmente voneinander getrennt und fotometrisch detektiert (440 nm). Die Quantifizierung erfolgte

te mittels Pigmenteichgerade automatisch. Unter Beachtung der Verdünnung und des Probenschleifenvolumens konnte der Gehalt der Pigmente in den Probenaliquots errechnet werden.

3.2.1.3. Rekonstitution und Trimerisierung von LHCII

Für die Rekonstitution von monomeren LHCII wird das Prinzip eines Detergenzwechsels benutzt. Dabei folgt der partiellen Denaturierung durch Lithiumdodecylsulfat (LDS) und Auflösung möglicher Disulfidbrücken mit Hilfe von β -Mercaptoethanol die native Faltung und der Einbau der Pigmente in Octyl- β -D-glucopyranosid- (OG-) Micellen. Die Trimerisierung wird auf einer Ni^{2+} -Chelating-Sepharosesäule durchgeführt, an die die Proteine über ihren Hexahistidyl- (His_6 -) Tag gebunden werden. Durch die hohe räumliche Nähe findet eine Lipid-vermittelte Trimerisierung statt.

Im Folgenden wird das Vorgehen für 7 mg Protein beschrieben. Werden andere Mengen verwendet, müssen die Angaben entsprechend angepasst werden.

A) Rekonstitution zu Lichtsammelkomplexen

2x Solubilisierungspuffer

Tris ^{9,0}	0,2 M
ϵ -Aminocaprinsäure	0,01 M
Benzamidin	2 mM
Saccharose	25 % (w/v)
LDS	4 % (w/v)
β -Mercaptoethanol	14 M
Ethanol	p.A.
OG	10 % (w/v)
KCl	2 M

Aus den IB-Suspensionen wurde eine solche Menge heraus pipettiert, die einer Proteinmasse von 7 mg entspricht. Hierzu wurden 8,75 ml des 2x Solubilisierungspuffers und 8,75 ml – V (IB) $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ hinzugegeben und sowohl vor als auch nach H_2O -Zugabe gründlich gevortext. Der Lösung wurden 3,2 μl β -Mercaptoethanol beigefügt und anschließend 5 min gekocht, nach Abkühlen wurden nochmals 3,2 μl β -Mercaptoethanol zugefügt. Aus dieser Lösung wurden 15 ml (entsprechen 6 mg Apoprotein) entnommen und hiermit die Rekonstitution durchgeführt.

15 mg der eingetrockneten Pigmente wurden in 1500 μl kaltem Ethanol aufgenommen und sofort unter vortexen zur Proteinlösung hinzugefügt. Nach 5-minütiger Ruhephase bei RT wurden 2064 μl OG ebenfalls unter vortexen (30 s lang) und nach weiteren 5 min bei RT 2064 μl KCl zugegeben. Die Proben wurden für mindestens 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 19000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort dekantiert und auf die vorbereiteten Säulen für die

Trimerisierung aufgetragen. Alternativ konnten die Rekonstitutionsansätze bis zur weiteren Verwendung in flüssigem N₂ schockgefroren und gelagert werden.

B) Trimerisierung der rekonstituierten Lichtsammelkomplexe

OG-Puffer

OG	1 % (w/v)
Tris ^{9,0}	0,1 M
Saccharose	12,5 % (w/v)

TX-Puffer

Triton-X-100	0,05 % (w/v)
PG	0,1 mg/ml
Tris ^{7,5}	0,1 M

Eluat-Puffer

Triton-X-100	0,05 % (w/v)
PG	0,1 mg/ml
Tris ^{7,5}	0,01 M
Imidazol	0,3 M

NiCl₂ 0,3 M

Tris^{7,5} 0,05 M

Vorbereitung der Ni²⁺-Chelating-Sepharose-Säulen (Ni-Säulen):

Pro mg Apoprotein wurden jeweils 0,6 ml Chelating-Sepharosesäulen vorbereitet. Das Material wurde in separate Biorad-Kartuschen pipettiert und das Ethanol ablaufen gelassen. Auf jede Säule wurde 1 ml NiCl₂ appliziert. Anschließend wurden jeweils 2,5 ml Tris^{7,5} aufgetragen. Diese beiden nickelhaltigen Durchläufe wurden gesondert aufgefangen und entsorgt. Durch die Zugabe von jeweils 1 ml OG-Puffer wurden die Säulen gebrauchsfertig gemacht. Dieser Schritt, wie auch alle nachfolgenden der Trimerisierung, erfolgten im Kühlraum.

Trimerisierung:

Die Zentrifugationsüberstände aus B) wurden gleichmäßig auf die vorbereiteten Säulen verteilt. Nach dem vollständigen Einlaufen der Proben wurden jeweils mit 1,2 ml OG-Puffer und 1,2 ml TX-Puffer nachgewaschen. Die Elution erfolgte mit jeweils 2 ml Eluat-Puffer. Nach wenigen Tropfen farbloser Lösung wurden die dunkelgrünen Eluate aufgefangen bis diese deutlich heller wurden (ca. 800 µl). Die Eluate werden bei 4 °C im Dunklen gelagert und anschließend auf Saccharosedichtegradienten aufgetrennt.

C) Aufreinigung durch Saccharosedichtegradienten-Ultrazentrifugation

Um die trimeren von den monomeren Komplexen zu trennen und die nicht gebundenen Pigmente zu entfernen, wurde eine Ultrazentrifugation in linearen Saccharosedichtegradienten durchgeführt.

Diese linearen Gradienten entstehen durch langsames Auftauen einer gefrorenen Saccharose-haltigen Lösung bei 4°C. Die Auftrennung erfolgt auf Grund der unterschiedlichen Gewichte der Moleküle im Gradienten, wobei sich schwerere Moleküle weiter im immer dichter werdenden Gradienten fortbewegen.

Herstellung der Saccharosegradienten:

analytische Gradientenlösung (SW60 Rotoren)

Saccharose	0,65 M
Puffer (Tris oder Phosphat*)	0,05 M (pH-Wert nach anschließender Verwendung)
LM	0,1 % (w/v)
Triscarboxyethylphosphin**	2 mM pro Cystein (wenn Cysteine vorhanden)

präparative Gradientenlösung (SW41/41 Rotoren)

Saccharose	0,3 M
Puffer (Tris oder Phosphat*)	0,05 M (pH-Wert nach anschließender Verwendung)
LM	0,1 % (w/v)
Triscarboxyethylphosphin**	2 mM pro Cystein (wenn Cysteine vorhanden)

* Schreibweise für Phosphat-Puffer bei einem bestimmten pH-Wert: Phosphat^{pH}

** (TCaEP)

Bei Verwendung von Triscarboxyethylphosphin wurde der pH-Wert der Lösung kontrolliert und eventuell nachkorrigiert. Der End-pH-Wert richtete sich dabei auch an die im Anschluss vorgesehene Verwendung der Komplexe und lag i.d.R. zwischen 6,0 und 7,5.

Die Gradientenlösungen wurden auf die entsprechenden Polyallomerröhrchen verteilt (5,5 ml der analytischen Lösung in SW60-Röhrchen, 11 ml in SW41-Röhrchen). Die Lösungen wurden bei -20/-80 °C eingefroren und etwa 3 h vor Benutzung im Kühlraum aufgetaut. Von den nun gebrauchsfertigen Gradienten wurde vorsichtig die obere Schicht der Lösung abpipettiert (etwa 350 µl), da diese nur sehr wenig Saccharose enthält. Würde man auf diese die Proben auftragen, so würden sie in die wässrige Schicht einsinken.

Auftrennung durch Ultrazentrifugation:

Die Trimerisierungseluate wurden mit einer Pipette vorsichtig auf die aufgetauten Gradienten aufgetragen. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass es zu keiner Durchwirbelung der Gradientenlösung kommt. Die mit Probe beschickten Gradienten wurden dann einer Ultrazentrifugation unterzogen.

Laufparameter SW40/41-Rotoren

Laufzeit:	16 h
Temperatur:	4 °C
Upm	36000

Laufparameter SW60-Rotoren

Laufzeit:	16 h
Temperatur:	4 °C
Upm	54000

Diese Parameter können den Rahmenbedingungen hinsichtlich Laufzeit und Umdrehungszahl angepasst werden. Eine Laufzeitverkürzung sollte eine Erhöhung der Umdrehungszahl nach sich ziehen, eine Verlängerung eine entsprechende Reduktion.

Nach der Zentrifugation sollten deutliche Banden im Gradienten zu erkennen sein. Die Banden wurden mit einer Spritze abgesaugt und in Eppendorfgefäßen bei 4 °C im Dunklen bis zur Verwendung gelagert.

D) Aufkonzentrierung und Pufferwechsel von LHCII-Lösungen

Die Aufkonzentrierung von Komplexlösungen erfolgte mittels Ultrazentrifugationseinheiten (z.B. Amicon Ultra MW 30). Eine Ausschlussgröße von 30 kDa konnte sowohl für Monomere als auch für Trimere verwendet werden. Die Proben wurden in die Filtereinheit gefüllt und bei 5000 x g zentrifugiert. Der Vorgang wurde regelmäßig unterbrochen, um den Füllstand der Lösung zu kontrollieren. Sollte nur aufkonzentriert werden, wurde der Vorgang abgebrochen wenn das gewünschte verbleibende Volumen in der Filtereinheit zurückgeblieben war. Sollten unerwünschte Gradientenlösungskomponenten entfernt werden, so wurde das Konzentrat wieder mit Pufferlösung (0,05 M) verdünnt und wieder aufkonzentriert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt bis man die erwünschte Restkonzentration an Komponente erreicht hat.

E) Quantifizierung von LHCII Monomeren bzw. Trimeren

Die Bestimmung der Konzentration an LHCII wurde mittels Fotometrie bei einer Wellenlänge von 670 nm durchgeführt. Als Referenz diente in jedem Fall die Lösung, in der die Komplexe für die Fotometrie verdünnt wurden bzw. bei unverdünnten Proben die Lösung, in der sich LHCII gerade befand. Der molare Extinktionskoeffizient wurde nach Butler *et al.* verwendet [111]. Die ermittelte Extinktion ermöglichte die Berechnung der Konzentration nach Lambert und Beer gemäß:

$$E_{670 \text{ nm}} = \varepsilon(\text{LHCII}) * c * d$$

mit c der Konzentration in $\text{mol} * \text{l}^{-1}$,

E der Extinktion bei 670 nm,

ε dem molaren Extinktionskoeffizient in $\text{l} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ und

d der Küvettendicke in cm.

Mit $\varepsilon(\text{LHCII}) = 546000 \text{ l} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ ergibt sich hieraus für die Konzentration:

$$c(\text{LHCII}) = E_{670 \text{ nm}} / 546000 \text{ l} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1} * d$$

Es war zu beachten, dass man bei der Vermessung der Trimere nicht die Gesamttrimerkonzentration erhielt, sondern die Konzentration der Monomere, die in den Trimeren vorliegen, weshalb die Trimerkonzentration nur einem Drittel der errechneten Konzentration entsprach.

3.2.1.4. Spektroskopische Analyse von LHCII

A) Fluoreszenzspektroskopie

Ist der LHCII korrekt gefaltet, nehmen alle Pigmente einen spezifischen Ort und damit eine bestimmte Orientierung zueinander ein. In diesem Zustand erfolgt ein quantitativer Energietransfer von Chlorophyll *b* auf Chlorophyll *a*. Dies kann man sich zunutze machen, um die Komplexintegrität zu überprüfen. Regt man Chlorophyll *b* bei 470 nm an und zeichnet ein Emissionsspektrum zwischen 600 und 750 nm auf, so emittiert nur Chlorophyll *a* bei 680 nm. Kommt es zu einer Störung des Energietransfers, so ist dies an einer Emission von Chlorophyll *b* bei (abhängig vom Lösungsmittel) etwa 653 nm zu erkennen.

Die Proben wurden – so weit nicht anders angegeben – in 5 mm Küvetten vermessen. In der Regel wurde hierbei der sog. 90°-Aufbau verwendet, bei dem Excitations- und Emissionsstrahl im 90° Winkel zueinander stehen. Bei sehr hoch konzentrierten Lösungen kam die Front-Face-Apparatur zum Einsatz.

Messparameter Fluoreszenzspektroskopie

Anregung:	470 nm
Detektion:	600–800 nm
Messstufen	1 nm
Integrationszeit:	0,5 s

B) CD-Spektroskopie

Grundsätzlich beruht die CD-Spektroskopie darauf, dass optisch aktive - also chirale - Moleküle, links- und rechtszirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren. Links- und rechtszirkular polarisiertes Licht wird durch eine Probe geschickt und anschließend die Intensität der links- bzw. rechtszirkular polarisierten Komponente der austretenden Welle gemessen. Das eigentliche Messsignal ergibt sich aus der Subtraktion der Absorption des rechtsdrehenden Lichtes von der des linksdrehenden Lichtes. Neben der Bestimmung von Protein-Sekundärstrukturen können mittels CD-Spektroskopie auch die Kopplung von chromophoren Gruppen in Biomolekülen durch Messungen im sichtbaren und im nahen Infrarotspektralbereich analysiert werden. Hierbei führen enge elektronische Kopplungen, wie sie z.B. zwischen den LHCII-gebundenen Pigmenten auftritt, zu einer Anhebung oder Absenkung von elektronischen Niveaus, welche im CD-Spektrum als deutliche positive bzw. negative Signale sichtbar werden. Liegen also alle Pigmente an der vorgesehenen Position innerhalb des Komplexes (entspricht einer korrekten Faltung), so können charakteristische Spektren aufgenommen werden. Anhand einer charakteristischen Absenkung des Signals bei 473 und einer Schulter im Bereich von etwa 642 nm lassen sich Trimere von Monomeren unterscheiden, bei denen diese Signale nicht auftreten.

Je nach Konzentration der Komplexe wurden entsprechende Küvettendicken verwendet: je verdünnter die Lösung war, desto größer sollte die Küvettendicke gewählt werden.

Messparameter CD-Spektroskopie

Wellenlängenbereich:	400 - 750 nm
Data pitch :	1 nm
Response:	4 s
Band Width:	4 nm
Accumulation:	1 (konnte bei sehr verrauschtem Signal höher gesetzt werden)
Sensitivity:	standard
Scanning speed	100 nm/min
Temperatur	4°C
N ₂ -Fluss:	2 l/min

3.2.1.5. Analyse von Silikat-eingeschlossenen LHCII

In den Kapitel I bis III der vorliegenden Arbeit wurde LHCII in verschiedenen Formen in Silikat eingeschlossen. Der Unterschied der Procedere lag dabei vor allem in der Wahl des Kieselsäure-kondensierenden Agens. Im Folgenden wird daher nicht genauer auf die Bedingungen der Fällung an sich eingegangen; entsprechende Versuchsanleitungen sind den jeweiligen Kapiteln zu entnehmen. Dargestellt werden die Bearbeitung der Pellets, die nachfolgenden Analysemethoden zur Bestimmung

der Einbaurrate, zum Testen des Stabilisierungsvermögens und die Vorbereitung der Proben zur bildlichen Darstellung.

A) Grundsätzliches Procedere

Waschpuffer (WP)

Puffer (Tris/Phosphat)	0,05 M	(pH-Wert an Anwendung angepasst)
LM	0,1 % (w/v)	

Inkubationspuffer (Herstellungsprocedere: siehe Fließtext)

Tris ^{7,0}	0,05 M
LM	0,1 %
Silikat	gesättigt

Nach der entsprechenden Reaktionszeit der Silikatfällung wurden die Proben bei 19000 x g für 2 min zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde fotografisch dokumentiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgehoben. Dieser Vorgang bedurfte besonderer Gründlichkeit, da hiervon die Folgeanalytik in B) abhing. Der Überstand wurde bei 4°C im Dunklen verwahrt. Das Pellet wurde mit Waschpuffer (WP) versetzt, wobei das Volumen dem 5-fachen des Fällungsansatzvolumens entsprach. Es wurde gründlich resuspendiert bis keine Partikel mehr sichtbar waren. Unterstützt werden konnte dies durch auf- und abpipettieren. Es folgte ein Zentrifugationsschritt unter oben genannten Bedingungen. Der Überstand konnte verworfen werden, da sich weder Kieselsäure noch LHCII in diesem befanden. Das Pellet wurde in Inkubationspuffer resuspendiert und den unter D) beschriebenen Stabilitätsmessungen unterzogen. Das Volumen des Inkubationspuffers sollte für ein ausreichendes Messsignal mindestens 375 µl betragen (bei ausreichender Pelletmenge wurde stets in 450 µl resuspendiert). Wichtig war, dass das hier eingesetzte Volumen demjenigen entsprach, in dem das Pellet nach Hitzeinkubation vor der Fluoreszenzmessung resuspendiert wurde. Beim Inkubationspuffer handelte es sich um Silikat-gesättigten WP in Tris^{7,0}. Zur Herstellung dieses wurde eine LHCII-freie Copräzipitation mit Spermin durchgeführt und das Pellet wie in einer Stabilitätsmessung in 450 µl WP (Tris^{7,0}) präpariert. Es folgte eine Hitzeinkubation bei 50°C für 4 h. Anschließend wurde resuspendiert und bei 19000 x g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde als Inkubationspuffer abgezogen und bei 4°C gelagert.

B) Einbauratenbestimmung

Die Bestimmung der Einbaurrate erfolgte durch eine Differenzrechnung aus ursprünglich eingesetzter Komplexmenge und im Überstand verbleibender. Die sich daraus ergebende Menge an im Pellet eingebauten LHCII wurde anteilig an der ursprünglich eingesetzten Menge berechnet und als Einbaurrate definiert (Einheit: %). Da eine fotometrische Komplexquantifizierung in silikathaltiger Lösung wie dem Überstand aufgrund starker Lichtstreuung schlecht möglich war, erfolgte eine Quantifizierung mittels HPLC. Hierzu wurde der Überstand einer Butanolextraktion unterzogen (siehe C). Die

Mengen der Pigmente wurden auf das Gesamtvolumen des Extraktes hochgerechnet. Aus der Konzentration des Luteins konnte mit Hilfe des Zusammenhangs, dass pro Monomer zwei Luteine gebunden sind, die Monomerkonzentration bestimmt werden. Um die Validität der Einbauratenbestimmung zu erhöhen, wurde auch die Menge an ursprünglich eingesetzten Komplexen über Butanolextraktion und anschließender HPLC-Quantifizierung bestimmt. Hierzu wurde die in den entsprechenden Fällungen eingesetzte Menge an Komplexen mit 100 µl WP vermischt und eine Butanolextraktion durchgeführt. Diese Bestimmung erfolgte für jede in den Fällungen eingesetzte Charge an Komplexen neu.

C) Butanolextraktion

Butan-2-ol	p.A.
NaCl	5 M
Aceton	70 % (v/v)

Die Probe mit dem definierten Volumen X (die Volumenbestimmung der Überstände erfolgte gravimetrisch unter der Annahme einer Dichte von 1g/cm^3) wurde mit $2/3 \times \text{Vol. (X)}$ Butan-2-ol versetzt und gut vermischt. Hierzu wurden $1/3 \times \text{Vol. (X)}$ NaCl-Lösung gegeben und ebenfalls gut gevortext. Durch eine 30-sekündige Zentrifugation wurde die Phasentrennung erreicht. Die Butanolphase wurde nahezu vollständig entfernt und zur wässrigen Hypophase nochmals $1/3 \text{ V}$ Butan-2-ol zugefügt. Es wurde erneut gevortext und zentrifugiert, die Butanolphase abgezogen und mit der ersten vereinigt. Das Volumen wurde gravimetrisch über den Zusammenhang

$$V = m / 0,81 \text{ g/cm}^3$$

bestimmt. Es wurde noch das zweifache Volumen 70 %-iges Aceton zugegeben und die Probe mittels analytischer HPLC vermessen (Probenschleifenvolumen 20 µl). Das Gesamtvolumen der Probe errechnete sich aus $3 * V (\text{Butanolphase}) * 0,965$.

D) Stabilitätsmessungen

Für die Überprüfung der Stabilität der in Silikat eingeschlossenen Komplexe wurden die in Inkubationspuffer resuspendierten Pellets fluoreszenzspektroskopisch vermessen (Bedingungen siehe 2.2.1.4.A). Dabei war stets darauf zu achten, dass die Pellets sehr gründlich resuspendiert wurden und die Messung sofort nach Einfüllen in die Küvette gestartet wurde. Nur so konnte garantiert werden, dass sich in etwa die gleiche Komplexmenge im Lichtstrahl befand. Nach der Messung wurde die Probe mit einer Kunststoffpipette vollständig entfernt und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Dieses wurde für 4 min bei $17500 \times g$ zentrifugiert. Die Proben wurden dann in ein vortemperiertes Wasserbad platziert. In der Regel erfolgte die Hitzeinkubation für 24 h bei 50°C . Etwaige Abweichungen hiervon sind den jeweiligen Ergebnisteilen zu entnehmen. Nach der Inkubation wurde die Probe gevortext und für 2 min bei $17500 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und konnte wie in B) und C) beschrieben hinsichtlich seines Komplexgehaltes quantifiziert werden. Das Pellet wurde in

WP (gleiches Volumen wie das des Inkubationspuffers vor der Hitzeinkubation) resuspendiert und erneut fluoreszenzspektroskopisch analysiert. Aus den Daten der Spektren wurden die Extinktionswerte von Chlorophyll *a* (680 nm) und Chlorophyll *b* (655 nm) bestimmt und der Quotient $\text{EmChl } a/\text{EmChl } b$ (alternativ benannt als $\text{Em}_{680 \text{ nm}}/\text{Em}_{655 \text{ nm}}$) bestimmt. Für jede Probe existierten so zwei Quotientenwerte. Diese wurden auf den Wert vor Hitzeinkubation normiert. Der Wert nach Hitzeinkubation wurde so als relatives Maß an Stabilisierungsvermögen der Komplexe in Silikat unter gegebenen Fällungsbedingungen definiert.

E) REM-Aufnahmen und EDX-Messungen

REM- und energiedispersiven Röntgenspektroskopie- (EDX-) Messungen ist gemein, dass Primärelektronen, welche durch eine Glühkathode erzeugt werden, auf die zu untersuchende Probe geschossen werden. Bei den REM-Messungen werden Sekundärelektronen detektiert, die beim Auftreffen des Primärelektronenstrahls aus den Atomen der Probe herausgeschleudert werden. Diese Sekundärelektronen besitzen einen unterschiedlichen Energiegehalt, der sich bei der Bildgebung in Helligkeitsunterschieden widerspiegelt. So entsteht ein dreidimensionaler Eindruck von der Probenoberfläche. Bei den EDX-Messungen werden nicht die Sekundärelektronen, sondern Röntgenstrahlen detektiert, die dadurch entstehen, dass aus inneren Atomschalen der Probenatome durch den primären Elektronenstrahl Elektronen herausgeschleudert und die entstehenden Elektronenlücken durch Elektronen von weiter außen gelegenen Schalen aufgefüllt werden. Bei genau diesen Schalenübergängen geben die auffüllenden Elektronen Energie in Form von Röntgenstrahlung ab, deren Energiegehalt elementspezifisch ist. Es gelingt so, die Elementzusammensetzung der Probe bezüglich der prozentualen Atomanteile zu detektieren.

Die Proben wurden wie folgt präpariert: Der Reaktionsansatz wurde wie in A) beschrieben zentrifugiert und der Überstand entfernt. Nun folgten drei Waschschrte mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$. Grundsätzlich wurden 500 μl verwendet. Zeigten die Proben Auflösungserscheinungen, wurde das Volumen auf 100 μl reduziert. Zwischen den Waschschrten wurde jeweils für 2 min bei 19000 x g zentrifugiert. Als letztes wurde das Pellet in max. 20 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ resuspendiert und auf den Probensteller aufgebracht. Für REM-Aufnahmen wurde ein Kohlenstoffleittab auf den Probensteller aufgebracht, auf das wiederum ein Siliciumwaver geklebt wurde. Auf diesen wurde die Probe pipettiert und staubgeschützt unter dem Abzug üN eingetrocknet. Vor der jeweiligen Messung wurde die Probe mit Stickstoff abgepusst. Bei der Vorbereitung der EDX-Proben wurde das Procedere gleich durchgeführt. Lediglich wurde anstelle eines Siliciumwavers selbstklebendes Kupferband verwendet, auf dem die Proben getrocknet wurden.

Die Messungen wurden dankenswerter Weise am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz, durch Gunnar Glasser (REM) und Maren Müller (EDX) durchgeführt.

3.2.1.6. Gelelektrophorese

Bei elektrophoretischen Auftrennungen wandern Teilchen auf Grund ihrer Ladung in einem elektrischen Feld. Geschieht dies durch eine Gelmatrix, wird die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Größe der Teilchen und deren Eigenladung bestimmt. Bei einer denaturierenden SDS-Gelelektrophorese wird die Eigenladung durch Dodecylsulfat überdeckt und die Proteinstrukturen aufgelöst. Die Wanderung geschieht abhängig von der Masse der Teilchen. In schwach denaturierenden Gelelektrophoresen erfolgt keine Denaturierung und Überdeckung der Eigenladung. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Ladung des Teilchens und seiner Struktur.

A) SDS - PAA - Gelelektrophorese

SDS Laufpuffer

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
EDTA	500 µM

3-4x Sparmix

Tris ^{6,8}	0,1 M
β-Mercaptoethanol	1,4 M
SDS	4 % (w/v)
Glycerin	24 % (v/v)
Bromphenolblau	400 µM

Bei der Gelelektrophorese nach Laemmli wird mit Sammel- und Trenngel gearbeitet. Die Proben wurden mit 0,3 x Vol. 3-4x Sparmix versetzt und zur vollständigen Denaturierung für 2 min gekocht. Als Laufpuffer wurde ein SDS-Laufpuffer verwendet, der sowohl im Kathoden- als auch im Anodenraum genutzt wird. Nach Befüllung der Geltaschen liefen die Proben für etwa 20 min bei 60 V in das Sammelgel ein. Danach wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Für sämtliche das LHCP betreffende Analysen wurden 15 %-ige PAA-Gele verwendet. Die Gele wurden anschließend in Coomassie gefärbt. Für die Auftrennung in sehr niedrigen Molekulargewichtsbereichen (beispielsweise das Protein Sx3 in Kapitel V) wurde eine Tris-Tricin-Gelelektrophorese nach Schägger und von Jagow; Gelzusammensetzung und Durchführung sind der entsprechenden Referenz zu entnehmen [110].

B) Schwach denaturierende PAA-Gelelektrophorese („grünes Gel“)

Deriphatpuffer

Deriphat	0,15 % (w/v)
Tris	12 mM
Glycin	48 mM

Diese Art der Gelelektrophorese eignet sich besonders gut zur Untersuchung von rekonstituierten und trimerisierten Lichtsammelkomplexen. Hierbei werden die Proben nicht vollständig durch ein Detergenz oder Aufkochen denaturiert, sondern nativ auf die Gele aufgetragen. Da meist noch Saccha-

rose aus den Dichtegradienten in den Proben vorhanden war, war ein auftragsunterstützender Puffer nicht notwendig. Andernfalls wird 1/10 des Probenvolumens an 80 %-igem Glycerin hinzugegeben. Es wurde hier Deriphatpuffer in beiden Elektrophoresekammern verwendet. Unter Lichtausschluss liefen die Proben unter 4 °C-Kühlung bei 40 V in das Gel ein und anschließend dann bei einer Spannung von max. 80 V. Für native LHCII kamen 10 % PAA-Gele zum Einsatz. Die Gele konnten direkt nach dem Lauf bildlich dokumentiert werden und anschließend mit Coomassie gefärbt werden.

C) Herstellung der PAA-Gele

Durch die Variation des Anteils an Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA) konnten Gele mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad und daher unterschiedlichen Trenngrößebereichen hergestellt werden. Die Herstellung erfolgte gemäß dem für die Gießkammern üblichen Standardverfahren.

Zusammensetzung der PAA-Gelkomponenten

	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %	Sammelgel
AA/BAA (30 %/1 %)	18 ml	27,4 ml	6 ml
Tris ^{8,8} 1 M	22,6 ml	22,6 ml	-
Tris ^{6,8} 1 M	-	-	5,2 ml
H ₂ O _{dest}	11,2 ml	1,8 ml	23,4 ml
Glycerin 80 % (v/w)	3,4 ml	3,4 ml	5 ml
APS 10 %	0,4 ml	0,4 ml	0,2 ml
TEMED	0,026 ml	0,026 ml	0,02 ml

Die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED (Tetramethylethylendiamin) startete die Reaktion und sollte erst direkt vor dem Gießvorgang erfolgen. Das Gießen des Sammelgels erfolgt erst nach Auspolymerisierung des Trenngels.

D) Coomassiefärbung der PAA-Gele

Coomassie-Färbelösung

Serva Blue	0,125 % (w/v)
Ethanol	40 % (v/v)
Essigsäure	7 % (v/v)

1. Entfärber

Ethanol	10 % (v/v)
Essigsäure	7 % (v/v)

2. Entfärber

Essigsäure	10 % (v/v)
------------	------------

Der Nachweis der Proteinbanden auf den Gelen erfolgte mit Hilfe einer Coomassie-Färbelösung. Die Gele wurden direkt in die Färbelösung gelegt und für 60 min inkubiert, danach erfolgte eine 20-minütige Inkubation im 1. Entfärber, dem sich eine Entfärbung im 2. Entfärber anschloss, die solange durchgeführt wurde, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren bzw. die Gelmatrix komplett entfärbt war. Alternativ konnten die Gele im 2. Entfärber kurz in der Mikrowelle erhitzt werden, so dass der Entfärbungsvorgang beschleunigt wurde (Achtung: Siedeverzug). Die Zugabe eines Schwamms zum 2. Entfärber hatte außerdem einen positiven Effekt auf den Vorgang. Anschließend erfolgte die Dokumentation mittels Fotoapparat, Scanner oder VersaDoc.

E) Trocknung der Gele

Zur Archivierung wurden die Gele auf vorgequollene Cellophanfolie gelegt und auch mit dieser bedeckt. Unter Erwärmen wurde für 60 min unter Vakuum auf dem Geltdrockner, welcher mit einer Kühlfalle verbunden war, entgast und so getrocknet.

F) Aufreinigung des Deriphatrohmaterials

Deriphath C160	Industriequalität
Propan-1-ol	p.A.

Deriphath C160 wurde als unreiner Rohstoff von der Firma Cognis geliefert und musste in einem zweistufigen Procedere aufgereinigt werden. Hierzu wurde in einem ersten Schritt das Deriphatrohmateriale im Rotationsverdampfer bei RT und minimalem Druck von einer ersten Verunreinigungsfraction getrennt. Beim Absenken des Drucks kam es zu einem Phasenübergang von fest (weiß) zu flüssig (gelb). Nachdem unter diesen Bedingungen kein Destillat mehr überging, wurde der Kolben bei gleichbleibendem Minimaldruck erhitzt. Das Wasserbad wurde dabei zum Kochen gebracht und Wasser stets nachgefüllt. Dieser Vorgang wurde so lange durchgeführt bis lediglich ein weißer Feststoff im Kolben zurückblieb. Dieser wurde mit einem Spatel entfernt, im Mörser feinst möglich zerkleinert und im zweiten Aufreinigungsschritt verwendet. Bei diesem handelte es sich um eine Umkristallisation in Propan-1-ol. Hierzu wurden etwa 20 g des vorgereinigten Deriphaths mit 400 ml Propan-1-ol gekocht, bis sich der Großteil des Feststoffs gelöst hat. Diese Lösung wurde siedend über einen großen Faltenfilter gegeben und der Durchlauf aufgefangen und direkt wieder erhitzt. Mit einem Spatel wurde das im Filter befindliche Deriphath portionsweise zum siedenden Durchlauf hinzugefügt. Das Propan-1-ol-Volumen wurde durch Nachfüllen konstant gehalten. Nach der Zugabe des gesamten Deriphaths zum Durchlauf wurde für etwa eine halbe Stunde gekocht. Sollten noch partikuläre Rückstände verblieben sein, wurde die Lösung durch ein Teesieb filtriert. Ansonsten wurde sie auf der ausgeschalteten Heizplatte langsam abgekühlt (eingewickelt in Alufolie). Nach Erreichen von RT wurde das Gefäß im Kühlraum und anschließend bei -20°C herunter gekühlt. Der Feststoff wurde in einer gekühlten Filternutsche vom Überstand abgetrennt und im Rotationsverdampfer unter Minimaldruck und in siedenden-

dem Wasserbad für mindestens 24 h getrocknet. Anschließend konnte noch eine weitere Trocknung im Vakuum der SpeedVac angeschlossen werden. Das so aufgereinigte Deriphat konnte für den Deriphatpuffer zur schwach denaturierenden PAA-Gelelektrophorese verwendet werden.

4. Kapitel

Kapitel I: Fusionsprotein aus pflanzlichem Lichtsammelkomplex und polykationischem R5-Peptid

Kapitel II: Copräzipitation von LHCII und Spermin

Kapitel III: Kovalente Modifikation des LHCII und daraus resultierende Kieselsäurefällungseigenschaften

Kapitel IV: Fällungen von Titandioxid

Kapitel V: Weitere Versuche

I. Kapitel: Fusionsprotein aus pflanzlichem Lichtsammelkomplex und polykationischem R5-Peptid

1. Einleitung

Das R5-Peptid kann in nicht-modifizierter Form Kieselsäure zu Silikat kondensieren. Knecht und Wright geben die C-terminale Sequenz RRIL als entscheidenden Faktor für die Fähigkeit der Silikatbildung an [112]. Diese Sequenz soll eine Selbstassemblierung von R5 bedingen, die als Voraussetzung für die Unterstützung von Kondensationsprozessen gilt. Außerdem wurde eine Phosphatabhängigkeit der Silikatbildung durch das R5-Peptid postuliert. Das Phosphatmolekül besitzt eine hohe Ladungsdichte (überwiegend bei pH-Werten $> pK_{S2} = 7,2$) und ist so in der Lage durch elektrostatische Wechselwirkungen die geforderte Assemblierung von R5-Peptid zu unterstützen [113]. R5-Peptide können dazu genutzt werden, Enzyme oder Proteine in Silikat einzuschließen (Copräzipitation, siehe Kapitel II) [76]. Die erzielten Ausbeuten übertreffen hier die bei herkömmlichen Sol-Gel-Einschlüssen um ein Vielfaches (20 % [w/w] vs. 0,1-5 % [w/w] Gramm Protein pro Gramm Silikat). Das R5-Peptid wird dabei in hohen molaren Überschüssen mit dem zu immobilisierenden Enzym/Protein vermischt und Kieselsäure zugesetzt. Marner *et al.* konnten zeigen, dass im Falle von äquimolaren Mengen kein Silikat gebildet wird [114]. Es besteht die Möglichkeit, das Gen für das R5-Peptid mit dem Gen des entsprechenden Enzyms/Proteins zu fusionieren. Im Idealfall kann ein chimeres Produkt überexprimiert werden, das Silikat-fällende Eigenschaften besitzt. Das Enzym Phosphodiesterase konnte auf diesem Wege mit einer Einbaurate von 90 % und einer Ausbeute von 110 % [w/w] in Silikat eingeschlossen werden und wies eine erhöhte Stabilität gegenüber thermischem Stress im Vergleich zum nicht-eingeschlossenen Enzym auf [114]. Auch GFP (grünfluoreszierendes-Protein) konnte auf diesem Wege modifiziert und in Silikat eingeschlossen werden [115] sowie D-Aminosäureoxidase [116]. Das Fusionsenzym der Oxidase wurde vor der Silikatfällung an magnetische Nanopartikel gebunden und zeigte auch in diesem Partikel-gebundenen Zustand eine hohe Aktivität und war gegenüber thermischem Stress weniger anfällig als freies Enzym in Lösung.

Rekombinanter LHCII sollte N-terminal mit der R5-Peptidsequenz modifiziert werden. Aus diesem Grund sollte die R5-Gensequenz direkt vor das LHCP-Gen eingebaut werden. Ziel war es, mit den R5-modifizierten Trimeren autogene Kieselsäurekondensationen durchzuführen und die Produkte hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber thermischer Belastung zu testen. Hierzu mussten die Überexpression und Aufreinigung entsprechend an das Fusionsprotein angepasst und die Protokolle für Komplexrekonstitution und -trimerisierung optimiert werden.

2. Material und Methode

Die in diesem Kapitel erwähnten Materialien und Methoden finden spezifische Anwendung in diesem. Allgemeine Methoden sind unter Hauptabsatz „3. Allgemeine Materialien und Methoden“ zu finden.

2.1. Material

Ausschließlich in diesem Kapitel wurde molekulargenetisch gearbeitet. Aus diesem Grund sind im Folgenden die entsprechenden Materialien für diese Arbeiten zusammengefasst.

2.1.1. Fertig-Kits

Mini-Prep-Kit	peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (Classic-Line)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Midi-Prep-Kit	NucleoBond® Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Gelextraktions-Kit	peqGOLD Gel Extraction Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Quik Change-Mutagenese	Quikchange® II site-directed mutagenesis kit	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
Quik Change Multi-Mutagenese	QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis-Kit	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen

2.1.2. Restriktionsenzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme, die nicht aus den bereits erwähnten Kits stammen, wurden von der Firma New England BioLabs[®] inc, Ipswich, MA, USA, bezogen. Sie sind im Folgenden inkl. ihrer Schnittstellensequenz und optimalen Arbeitstemperatur aufgeführt.

BsrGI	5'-T'GTACA-3'	37°C
EcoRI HF	5'-G'AATTC-3'	37°C
SmaI	5'-CCC'GGG-3'	25°C
SphI-HF	5'-GCATG'C-3'	37°C

2.1.3. Primer

Im Zuge der molekulargenetischen Arbeiten in diesem Kapitel wurden verschiedene Primer zur i) Sequenzierung oder ii) Mutagenese verwendet. Sämtliche zur Mutagenese verwendeten Primer wur-

den von der Firma biomers.net GmbH, Ulm, bezogen. Tab. I.1 gibt einen Überblick über diese. Die Primer wurden bei Verwendung von Mutagenese-Kits den Hinweisen entsprechend designed.

Tab. I.1: Übersicht Primer

Zusammenfassung der für Sequenzierungen (LHCP757kurz und pET22b(+)*rev*) und Mutagenesen verwendeten Oligonucleotidprimer. Aufgeführt sind die Primer, die bei Mutagenesen vom Autor und DP zum Einsatz kamen. Mutageneseprimer wurden von Biomers.net GmbH, Ulm, bezogen. In rot markiert die Base, die im Vergleich zur Ausgangssequenz verändert wurde, bzw. bei einer Doppelmarkierung die Basen, zwischen denen eine Deletion eingefügt wurde.

Name	Sequenz	# der Nucleotide	Verwendung
LHCP757kurz	5'-TGGATCAAAGCTTCCACCTG-3'	20	Sequenzierung N-terminaler Bereiche des LHCI, vektorunabhängig
pET22b(+) <i>rev</i>	5'-GCTCAGCGGTGGCAGC-3'	16	Sequenzierung C-terminaler Bereich des LHCI im pET21(+)
R5SphI_F	5'-P _i -TCTTCCAAAAATCTGGTTCT TACTCTGGTTCCAAAGTTCCAAACG TCGTATCCTGAGCATG-3'	63	Hybridisiert zur Bildung des Inserts für R5C3.2h-Herstellung
R5SphI_R	5'-P _i -CTCAGGATACGACGTTTG GAACCTTTGGAACCAGAGTAAGAAC CAGATTTTTGGAAGACATG-3'	63	
R5TMut_F	5'-GGTTCCAAAGGTTCCA AACGTCGTATCCTGAGCATGCG-3'	38	Mutageneseprimer zur Entfernung der überschüssigen Thyminbase in R5C3.2h-Sequenz (Quikchange)
R5TMut_R	5'-CGCATGCTCAGGATACG ACGTTTGGAACTTTGGAACC-3'	38	
R5c32hBsrG1Fwd	5'-GGCAGCAAACGTCGTATCCTG TACATGCGTAAATCTGCTACCACC-3'	45	Mutageneseprimer zur Einführung einer BsrGI-Schnittstelle zwischen R5- und KHCI-Gen im R5C3.2h (Quikchange)
R5c32hBsrG1Rew	5'-GGTGGTAGCAGATTACGCATGT ACAGGATACGACGTTTGCTGCC-3'	45	
R5C32h2xcutFwd	5'-AATTCATTAAGAGGAGAACT TAAGCATGCTGATTCGCCGAAAAG CGGCAAATCTGGTAGCTATAGCGGT TCTAAAAAAGCTCTCT-3'	88	Hybridisiert zur Bildung des Inserts für 5RC3.2h-Herstellung
R5C32h2xcutrew	5'-GTACAGAGAGCTTTTTTAGAAC CGCTATAGCTACCAGATTTGCCGCTT TTGCGGCGAATCAGCATGCTTAAGTT CTCCTCTTAATG-3'	88	
160multiPhosph	5'-P _i -ATCCACTTACCAGGTGGAT GCTTTGATCCATTGGGCTTAGC-3'	43	Primer zur Einführung von Cys in R5C3.2h und C3.2hR5T mittels Quikchange®-Lightning Multi Site Directed-Kit
106multiPhosph	5'-P _i -AGGCAGGATCTCAAA TCTTTGTGAGGGTGGACTTGATTAC TTGG-3'	45	

2.1.4. Vektoren

2.1.4.1. pDS12-RBSII

Der ursprüngliche Vektor für LHCP-Varianten ist pDS12-RBSII. Bei diesem ist das LHCP-Gen in die multiple Klonierungsstelle eingefügt und steht unter Regulation einer *Lac I*-regulierten Promotor-Operator-Region. Die bakterielle RNA-Polymerase transkribiert das Zielgen vom starken T5-Promotor. Durch das β -Lactamase-Gen verleiht der Vektor transformierten Zellen eine Amp-Resistenz.

2.1.4.2. pET-21(+)

Der Vektor pET-21(+) besitzt eine T7-Promotorregion, welche keine Affinität zur bakteriellen RNA-Polymerase besitzt. Zur Expression des Zielgens (eingebracht in die multiple Klonierungsstelle) muss das Plasmid in Bakterienstämme transformiert werden, die in ihrer chromosomalen DNA für die T7-RNA-Polymerase codieren (DE3-Stämme). Sowohl das T7-Polymerase-Gen als auch das Zielgen stehen unter der Regulation einer *Lac I*-regulierten Promotor-Operator-Region. Auf dem Plasmid selbst befindet sich das β -Lactamase-Gen, das den transformierten Zellen eine Amp-Resistenz verleiht.

2.1.5. Übersicht R5-modifizierte LHCI

Ausgehend von C3.2h, einer rekombinanten LHCI-Variante, die eine dem nativen LHCIb entsprechende Aminosäuresequenz trägt und einen C-terminalen His₆-Tag hat, wurden Fusionsproteine hergestellt, die eine auf dem R5-Peptid basierende polykationische Modifikation tragen. Tab. I.2 gibt eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit direkt oder in betreuten Arbeiten hergestellten und verwendeten R5-modifizierten Fusionsproteine.

Tab. I.2: Übersicht R5-modifizierte LHCI

Die diversen R5-modifizierten Fusionskomplexe wurden durch den Autor dieser Arbeit (SR), Daniel Palm (DP) bzw. Katrin Brodbek (KB) hergestellt. Entsprechende Details sind den jeweiligen Arbeiten zu entnehmen. Es gelten die üblichen Kurzschreibweisen der Aminosäuren/Nukleobasen.

Name	Beschreibung	Ausgangsklon	Vektor	Hersteller
R5C3.2h	N-terminal angefügte R5-Sequenz (MSSKKSGSYSGSKGSKRRILMRKS...)	C3.2h	pET21(+)	SR
R5C3.2hBsrGI	R5C3.2h mit Punktmutation zwischen R5- und LHCI-Gen, so dass BsrGI-Schnittstelle zwischen den Genen entsteht	R5C3.2h	pET21(+)	SR
5RC3.2h	N-terminal angefügte R5-Sequenz im Vergleich zu R5C3.2h in umgekehrter Anordnung (MLIRRKSGKSGSYSGSKKSSLYMRKS...); Schnittstellen: 5' vom Startcodon AflI, zwischen den beiden Genen BsrGI	R5C3.2hBsrGI	pET21(+)	SR
R5S106Ch	R5C3.2h mit Cys an Position 106 statt Ser	R5C3.2h	pET21(+)	DP
R5S160Ch	R5C3.2h mit Cys an Position 160 statt Ser	R5C3.2h	pET21(+)	DP
R5S106/160Ch	R5C3.2h mit Cys an Position 106 und 160 statt Ser	R5C3.2h	pET21(+)	DP
2xC₁	Gensequenz des S106/160Ch im pET21(+)-Vektor	C3.2hPet	pET21(+)	DP
C3.2hR5T	R5-Sequenz 3' vom C-terminalen His ₆ -Tag eingefügt (...VPGKHHHHHHSSKKSGSYSGSKGSKRRIL)	C3.2hPet	pET21(+)	KB
2xC₁R5T	C3.2hR5T mit Cys an Position 106 und 160 statt Ser	C3.2hR5T	pET21(+)	DP
C3.2hR5	R5-Sequenz zwischen LHCI-Gen und His ₆ -Tag eingefügt (...VPGSSKKSGSYSGSKGSKRRIL)	C3.2hPet	pET21(+)	KB
C3.2hPet	Gensequenz des C3.2h im pET21(+)-Vektor; EcoRI- und BsrGI-Schnittstellen 5' von AUG	R5C3.2h	pET21(+)	KB

Folgende Anmerkungen gelten für die Nomenklatur der Fusionsproteine: Die Cystein-Varianten des R5LHCP, die mit eindeutigen Positionskennzeichnungen versehen sind, befinden sich in einem pET-21(+)-Vektor ohne BsrGI-Schnittstelle (gilt auch für LHCP-Cystein-Varianten im pDS12-Vektor). Sämtliche Mehrfachcystein-Varianten des LHCP, die diese N-terminale Schnittstelle besitzen und sich im pET-21(+)-Vektor befinden, tragen zur Unterscheidung eine abweichende Nomenklatur. Die Zahl der Cysteine ist vorangestellt („n“ x), gefolgt von einer Bezeichnung C für Cystein und einer tiefgestellten Ziffer. Die Ziffer spiegelt eine festgelegte Positionskombination wider. Im Falle der hier aufgeführten Varianten steht „1“ für die Kombination der Positionen 106 und 160.

2.1.6. DNA-Längenstandards

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA wurden zwei verschiedene Längenstandards der Firma New England Biolabs, Frankfurt, verwendet (Abb. I.2).

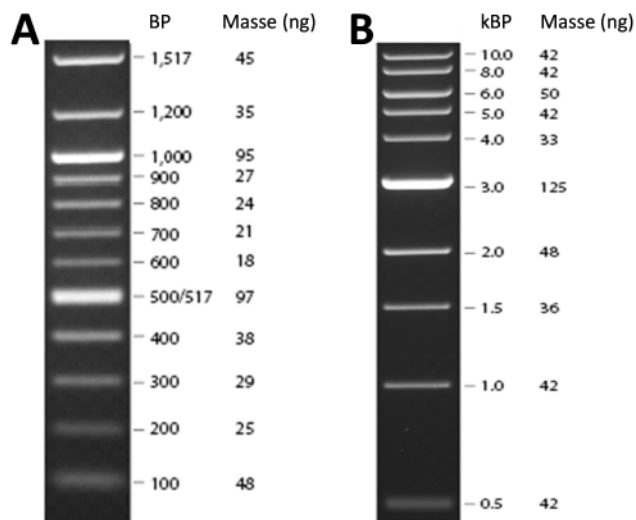


Abb. I.1: DNA-Längenstandards

Die Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz gekommenen DNA-Längestands der Firma New England Biolabs, Frankfurt, wurden in den Größenskalen 100 Basenpaare (Bp; A) und 1 kBp (B) verwendet. Abbildung verändert nach New England Biolabs.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekulargenetische Methoden

2.2.1.1. Plasmidisolation mittels Miniprep-Kit

Für die Isolation kleinerer Plasmidmengen wurde das „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (Classic-Line)“ der Firma Peqlab verwendet. Insofern sich das Plasmid in *E.coli* Zellen des Stammes JM101 befand, wurden diese aus einer Dauerkultur auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und üN bei 37°C kultiviert. Hiervon wurde eine einzelne Kolonie gepickt und in 10 ml Amp-haltigem Medium üN bei 37°C auf dem Schüttler (190 Upm) wachsen gelassen. Alternativ wurden Transformanten (siehe 2.2.1.5) von Mutageneseansätzen auch auf LB-Amp-Platten ausplattiert und einzelne Kolonien in flüssiges Amp-haltiges Medium (10 ml) überimpft. Die anschließende Präparation erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Abweichend wurde vor der Elution ein 15-minütiger Trockenschritt an der Luft eingefügt. Die Elution selbst erfolgte mit 60 µl etwa 60°C warmen H₂O_{reinst}.

2.2.1.2. Plasmidisolation mittels Midiprep-Kit

Für die Präparation größerer Plasmidmengen wurde das „NucleoBond® Xtra Midi Kit“ der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Kulturmedien wurden wie bei der Miniprep-Präparation (2.2.1.1) vorbereitet, jedoch betrug das Kulturvolumen 100 ml. Die eigentliche Plasmidisolation erfolgte nach

Anleitung des Herstellers. Die Elution erfolgte zweistufig mit jeweils 40 µl etwa 60°C warmen H₂O_{reinst}.

2.2.1.3. Quantifizierung von Plasmid-DNA

Für die Quantifizierung der Plasmid-DNA wird die Eigenschaft der aromatischen Nucleotidbasen, Licht bei 260 nm zu absorbieren, ausgenutzt. Bei einer Wellenlänge von 320 nm erwartet man keine Absorption dieser Basen mehr, so dass dieser Absorptionswert als Referenzwert gilt. Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, daher kann man aus dem Quotienten $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ das Maß der Probenverunreinigung durch Proteine abschätzen. Der Quotient sollte im Idealfall zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Für die Vermessung wurde das Biophotometer der Fa. Eppendorf verwendet. Die Plasmidproben wurden bei einem Mindestgesamtvolumen von 70 µl 1:35 in H₂O_{reinst} verdünnt und vermessen. Die Gesamt-DNA-Menge errechnet sich aus:

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

Die Proben konnten bei -20°C eingefroren und so bis zur ihrer Verwendung gelagert werden.

2.2.1.4. Agarose-Gelelektrophorese

10 x Tris-Acetat-EDTA- (TAE-) Puffer

Tris	0,4 M
Eisessig	1,14 % (v/v)
EDTA (pH 8,0)	2 mM

Minigelauftragspuffer

Bromphenol-Blau	0,025 % (w/v)
Xylencyanol	0,025 % (w/v)
Glycerin	50 % (v/v)
Tris ^{8,0}	0,05 M
EDTA	0,01 M

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese lässt sich DNA entsprechend ihrer Fragmentgröße auf-trennen. Die Dichte des Agarosenetzwerkes kann an die Größe der DNA-Fragmente angepasst wer-den. Zur Abschätzung der Fragmentgröße werden unterschiedliche Marker verwendet.

Für das Gießen der Gele wurden pro Gel 11 ml Lösung verwendet. Diese setzte sich aus 1/10 x Vol. 10 x TAE-Puffer und dem gewünschten Massenanteil an Agarose zusammen. Die Suspension wurde kurz in der Mikrowelle aufgeköcht, um die Agarose zu lösen. Nachdem die Lösung auf etwa 50°C abgekühlt war, wurden die Gele gegossen.

Die DNA-Proben wurden mit 1/9 x Vol. Minigelauftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pi-pettiert. Die Elektrophorese wurde bei 190 V für etwa 50 min durchgeführt.

Die Färbung der Gele fand mit Sybr® Green I bzw. Sybr® Safe statt. Die Stammlösungen der Farbstoffe wurden 1:10000 in 1 x TAE-Puffer verdünnt und pro Gel wurden zur 45-minütigen Färbung 70 ml Lösung verwendet. Unter der UV-Lampe konnte das entsprechende Bandenmuster sichtbar gemacht werden.

2.2.1.5. Transformationen

LB-Medium

Bacto-Trypton	1 % (w/v)
Yeast-Extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	1 % (w/v)
mit NaOH auf pH 7,5 einstellen	

SOC-Medium

Bacto-Trypton	2 % (w/v)
Yeast-Extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,05 % (w/v)
Glucose	0,02 M
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	0,01 M
mit NaOH auf pH 7,0 einstellen	

NZY⁺-Broth-Medium

NZ Amine, Casein Hydrol.	1 % (w/v)
Yeast-Extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
MgCl ₂	1,25 mM
MgSO ₄	1,25 mM
Glucose	0,02 M
mit NaOH auf pH 7,5 einstellen	

Die Bakterienzellen wurden 30 min vor ihrer Verwendung auf Eis aufgetaut. Erschütterungen sind generell im Umgang mit kompetenten Zellen zu vermeiden, um deren Kompetenz nicht zu verringern. Im Folgenden ist die Transformation für verschiedene *E-coli*-Stämme ab der Plasmidzugabe beschrieben. Die Mengen an zuzugebender DNA richteten sich nach deren Herkunft, d.h. bei Verwendung von Plasmiden aus einer Plasmidpräparation wurde weniger DNA benötigt als bei Zugabe aus einer Ligation. Außerdem richtete sich die Zugabemenge nach der spezifischen Kompetenz der verwendeten Charge an kompetenten Zellen. Aus diesem Grund sind die folgenden DNA-Mengen z.T. recht hoch angegeben, entsprechen aber so den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten.

A) Transformation in DH5a

2 - 100 ng Plasmid-DNA wurden vorsichtig zu 70 µl Zellen pipettiert und mit der Pipettenspitze vermischt. Es schloss sich eine 30-minütige Inkubation auf Eis an. Die eigentliche Aufnahme des Plasmids erfolgte bei einem 2-minütigen Hitzeschock bei 37°C. Hierzu wurden im Anschluss 450 µl 37°C warmes LB-Medium gegeben und vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde für 1 h bei 37°C

auf dem Drehrad inkubiert. 200 µl dieses Transformationsansatzes wurden auf LB-Amp-Platten ausplattiert und üN im Brutschrank wachsen gelassen.

B) Transformation in XL1blue

Wurde das Plasmid (unabhängig von der Natur des Vektors) aus einer Quikchange®-Mutagenese verwendet, so wurden 1 µl des DpnI-Verdau zu 25 µl Zellen gegeben (bei der Konstruktion von R5C3.2h wurde eine doppelte Ansatzgröße sowohl bei der Mutagenese als auch der Transformation benutzt, hier also 25 µl). Das Gemisch aus Plasmid und Bakterienzellen wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 45 s bei 42°C und eine 2-minütige Ruhephase auf Eis. Anschließend werden 250 µl NZY⁺-Medium zugefügt und 1 h auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die gesamte Lösung wird auf LB-Amp-Platten ausplattiert und üN im Brutschrank wachsen gelassen.

C) Transformation in BL21 (DE3)

5 - 50 ng Plasmid (pET-21(+)-Vektor) wurden vorsichtig zu 50 µl Zellen gegeben und nach Mischen 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 45-sekündiger Hitzeschock bei 42°C, dem sich eine 2-minütige Ruhephase auf Eis anschloss. Es wurden 450 µl SOC-Medium (37°C) zugegeben und für 1 h bei 37°C im Drehrad inkubiert. 200 µl der Transformation wurden auf LB-Amp-Platten ausplattiert und üN wachsen gelassen.

D) BL21 (DE3) pLysS

5 - 50 ng Plasmid (pET-21(+)-Vektor) wurden zu 20 µl Bakterien gegeben und 5 min auf Eis ruhen gelassen. Es folgte ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42°C mit anschließender Inkubation auf Eis für 2 min. Hierzu wurden 80 µl SOC-Medium (37°C) zugefügt und für 1 h am Drehrad bei 37°C wachsen gelassen. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf LB-Amp-Chloramphenicol- (Cam-) Platten gegeben und üN bei 37°C bebrütet.

E) Transformation in Rosetta (DE3)

50 µl Rosettazellen wurden mit 5 - 50 ng Plasmid (pET-21(+)-Vektor) vermischt und 10 min auf Eis gelagert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 s und eine 2-minütige Abkühlphase auf Eis. 225 µl SOC-Medium, vortemperiert auf 37°C wurden hinzugegeben und der Ansatz für 1 h am Drehrad bei 37°C inkubiert. 150 µl hiervon wurden auf LB-Amp-Cam-Platten gegeben und üN bei 37°C wachsen gelassen.

F) Transformation in XL10-Gold

Die Reaktionsprodukte aus einer Mutagenese mittels „QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit“ wurden in 25 µl XL10-Gold-Zellen transformiert. Diese wurden zuvor auf Eis auf-

getaut und 1,1 μl des im Kit enthaltenen β -Mercaptoethanol-Mix zugefügt. Der Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert und alle 2 min vorsichtig gemixt. Hierzu wurden 0,83 μl des DpnI-Verdauers der Mutagenese-Reaktion zugegeben, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42°C mit anschließender Ruhephase auf Eis für 2 min. 0,275 ml des auf 42°C vorgewärmten NZY⁺-Mixes wurden zugefügt und 1 h bei 37°C schütteln gelassen. 100 μl des Ansatzes wurden im Anschluss daran auf LB-Amp-Platten ausplattiert und üN bei 37°C wachsen gelassen.

2.2.1.6. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die DNA-Sequenzierungen zur Überprüfung des Mutageneseerfolges wurden bei der Firma GenTerprise GENOMICS bzw. StarSEQ, Mainz durchgeführt. Hierzu wurden 350 ng des zu sequenzierenden Plasmids, 1 μl des 10 μM Sequenzierprimers und ggf. $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ zum Auffüllen auf 7 μl in ein 200 μl PCR-Gefäß gegeben. Die Sequenzierprimer sind Tab. I.1 zu entnehmen und wurden entsprechend des zu sequenzierenden Genbereichs ausgewählt.

2.2.1.7. Mutagenesestrategie zur Herstellung des R5C3.2h

Die Strategie zur Herstellung des R5C3.2h bestand aus einer Restriktion des pDS12-Vektors, einer Insertion eines Primerhybrids mit R5-Gensequenz, Ligation und anschließender Transformation in DH5 α bzw. JM101. Es stellte sich jedoch heraus, dass der Wechsel des Plasmids nötig war, so dass das R5-LHCII-Fusionsgen (mit einer Leserasterverschiebung durch einen einfachen Baseninsert im R5-Gen) aus dem pDS12-Vektor herausgeschnitten wurde und in einen geöffneten pET-21(+) ligiert wurde. Anschließend wurde die duplizierte Base mittels „Quikchange® II site-directed mutagenesis kit“ entfernt und das Plasmid in XL1blue Zellen transformiert. Abb. I.2 fasst das letztendlich durchgeführte Procedere zur Generierung des fertigen Plasmides mit R5LHCP-Fusionsgen zusammen.

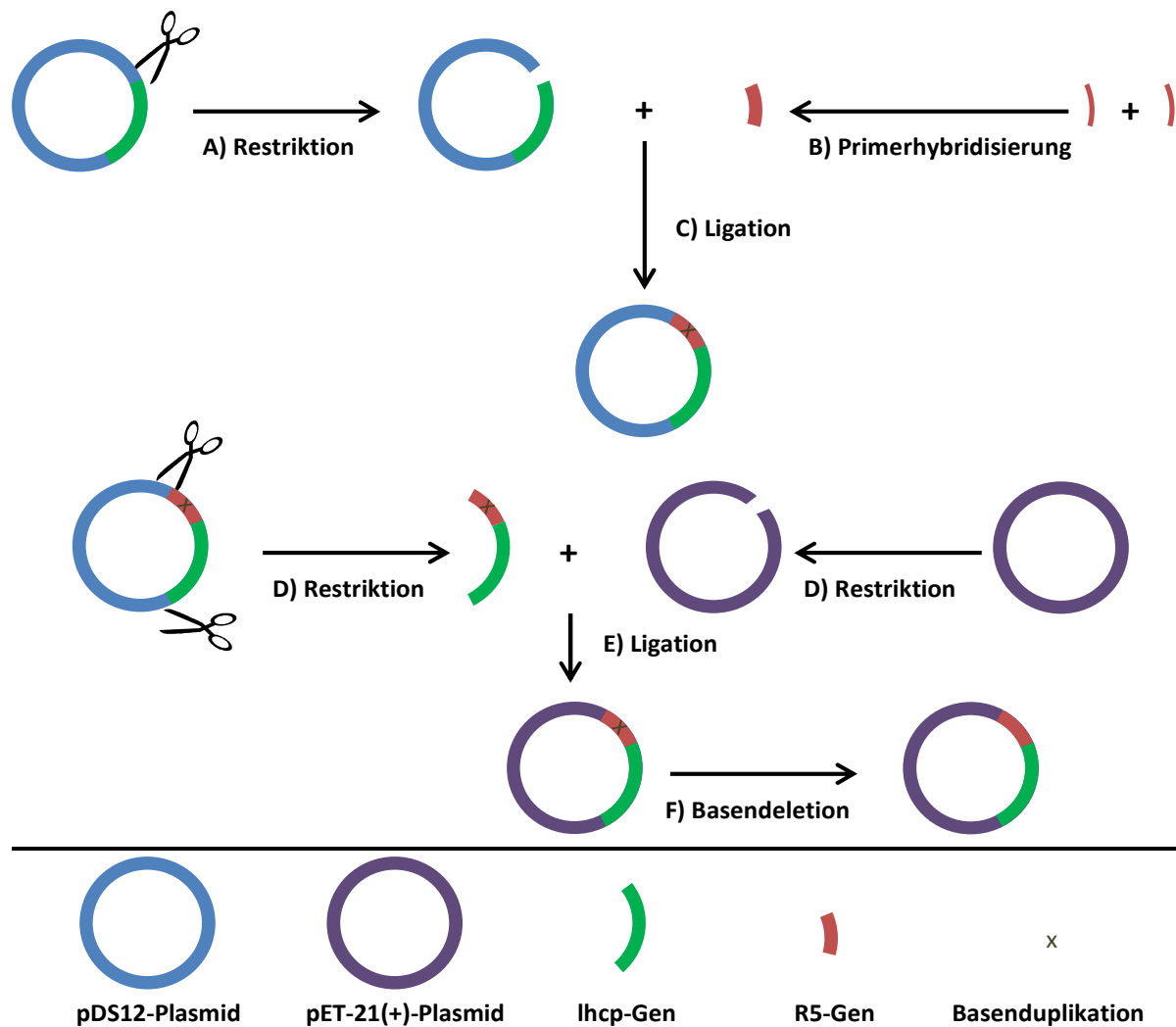


Abb. I.2: Mutagenesestrategie R5C3.2h

Im Folgenden werden die einzelnen Durchführungsschritte näher beschrieben.

A) Restriktion des pDS12-Vektors und dessen Isolation durch Gelextraktion

Für den initialen Verdau wurde die Mutante C3.2h auf dem pDS12-Vektor verwendet. Die Sequenz von C3.2h entspricht der nativen LHCII-Sequenz mit C-terminal angefügtem His₆-Tag. Im DNA-Sequenzbereich des Startcodons befindet sich eine SphI-Schnittstelle. Der Restriktionsansatz wurde gemäß Tab. I.3 angesetzt. Im Allgemeinen gilt, dass 1 U Restriktionsenzym 1 µg Plasmid-DNA in 1 h verdaut. SphI wurde hier im ungefähr 2,5-fachen Überschuss eingesetzt. Die Restriktion erfolgte für 3 h bei 37°C. Das Restriktionsenzym wurde bei 65°C für 20 min inaktiviert. Zur Dephosphorylierung des 5'-DNA-Endes im geöffneten Vektor wurden 17 U Calf Intestinal Phosphatase ([CIP], 17 U/µl) zum Ansatz hinzugegeben und 60 min bei 37°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1/10 x Vol. Minigelauftragspuffer. Die Probe wurde auf die Geltaschen eines 1 %-igen Agarosegels aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt (vgl. 2.2.1.4). Die Färbung des Gels erfolgte mittels Sybr® Green I. Unter der UV-Lampe wurde die entsprechende Bande des restringierten Plasmids ausgeschnitten.

Tab. I.3: Restriktionsansatz zur Insertion eines R5-Primerhybrids

Komponente	Menge
Plasmid DNA	8 µg
SphI	20 U
NEB2-Puffer	1/10 V _{end}
H ₂ O _{reinst}	ad V _{end}

Aus den entsprechenden Gelstücken wurde die DNA mittels „peqGOLD Gel Extraction Kit“ der Firma Peqlab extrahiert. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben, wobei die Elution mit 2 x 30 µl H₂O_{reinst} vorgenommen wurde. Das restringierte Plasmid wurde auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt und die Plasmidmenge aufgrund der Bandenstärke abgeschätzt.

B) Primerhybridisierung

5 x Annealing Buffer

Tris ^{7,5}	0,2 M
MgCl ₂	0,1 M
NaCl	0,25 M

Um die R5-Gensequenz in den Vektor einbringen zu können, wurde ein doppelsträngiges DNA-Insert des R5-Gens durch Primerhybridisierung hergestellt. Die überlappenden Enden des Hybrids wurden so konstruiert, dass sie in die SphI-Schnittstelle des geöffneten pDS12-Vektors ligiert werden konnten.

Jeweils 4 µl des sense- und antisense Primers (R5SphI_F/R, 100 pM, am 5'-Ende phosphoryliert) wurden mit 2 µl 5 x Annealing Buffer vermischt und hybridisiert. Hierfür wurde das Programm „Primhyp.cyc“ (Tab. I.4) im Thermo-Cycler verwendet.

Tab. I.4: Primerhybridisierung (Primhyb.cyc)

Aktivität	Temperatur [°C]	Dauer
Aufheizen	100	10 min
Abkühlen	auf 50	in 0,1°C/s-Schritten

Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

C) Ligation von Primerhybrid und pDS12-Vektor

Die Ligase besitzt die Fähigkeit, ein phosphoryliertes 5'-Ende eines Nucleotidstranges mit der Hydroxygruppe eines 3'-Endes zu verknüpfen. Sie wurde dazu benutzt, das doppelsträngige R5-Insert aus B) in den geöffneten Vektor aus A) einzufügen.

Vektor und Insert wurden in einem stöchiometrischen Verhältnis von 0,5 verwendet, wobei die Gesamtvektormenge 250 ng betrug. Die Ansätze wurden gemäß Tab. I.5 zusammenpipettiert und für 25

min bei RT reagieren gelassen. Es folgte eine Transformation in DH5a, wobei 1/5 des Reaktionsansatzvolumens und 70 µl kompetente Zellen verwendet wurden (vgl. 2.2.1.5 A).

Tab. I.5: Ligation von Insert und Plasmid

Komponente	Menge
Plasmid DNA	250 ng
Insert	2 * n (Plasmid)
Quick T4-Ligase	1/10 V _{end}
2 x Quick Ligase-Puffer	½ V _{end}
H ₂ O _{reinst}	ad V _{end}

Von den entsprechenden Transformationsplatten wurden Kolonien in flüssige üN-Kulturen überimpft und eine Plasmidisolierung durchgeführt (vgl. 2.2.1.1). Zur Überprüfung des Mutageneserfolges wurde ein Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen SphI und PvuI durchgeführt. Bei einer korrekten Insertion - also bei erfolgreicher Konstruktion des R5C3.2h-Gens - sollte bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Restriktionsprodukte ein etwas höhermolekulareres Produkt auftreten im Vergleich zum Verdau eines unmodifizierten C3.2h-tragenden Plasmids. Aufgrund des Gelbildes wurden die Transformanten bestimmt, deren Plasmide sequenziert werden sollten (vgl. 2.2.1.6).

Die Sequenzierung einer ganzen Reihe von Transformanten ergab kein positives Mutagenesergebnis. Wie in 3.1.1 näher erläutert, wurde entschieden, ein fehlerhaftes Konstrukt, bei dem es zu einer Thyminduplikation im Insert kam, dazu zu nutzen, es in ein anderes Vektorsystem zu übertragen.

D) Plasmidwechsel

Beim Wechsel des Plasmids wurde zuerst das Zielplasmid geöffnet und zur Insertion vorbereitet. Anschließend wurde das fehlerhafte R5C3.2h-Genkonstrukt aus dem pDS12-Vektor herausgeschnitten.

Die Vorbereitung des pET21(+)-Vektors wurde von K. Müller im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt [117]. Das Plasmid wurde durch einen HindIII-Verdau geöffnet, die überhängenden Enden mittels Klenow-Fragment in glatte Enden überführt und durch CIP am 5'-Ende dephosphoryliert. Es erfolgte ein zweiter Verdau mit EcoRI und eine Aufreinigung des geöffneten Plasmids.

Das fehlerhafte R5C3.2h-Genkonstrukt wurde mittels Doppelverdau mit SmaI, das hinter dem 3'-Ende des Konstrukts und EcoRI, das vor dem 5'-Ende schneidet, restringiert. Aufgrund unterschiedlicher Temperaturoptima musste der Doppelverdau zweistufig durchgeführt werden. Nach einem zweistündigen Verdau durch SmaI bei 30°C wurde EcoRI zugefügt und die Temperatur für weitere zwei Stunden auf 37°C erhöht. Der verwendete Gesamtansatz ist Tab. I.6 zu entnehmen.

Tab. I.6: Doppelverdau fehlerhafter R5C3.2h auf pDS12-Vektor

Komponente	Menge
Plasmid DNA	3750 ng
NEB4-Puffer	1/10 V _{end}
SmaI	110 U
EcoRI	40 U
H ₂ O _{reinst}	ad V _{end}

Es erfolgte eine Auftrennung des Restriktionsansatzes mittels Gelelektrophorese auf 1 %-igen Agarosegelen und eine Extraktion des Konstrukts wie in A) beschrieben.

E) Ligation von fehlerhaftem R5C3.2h-Konstrukt und pET21(+)-Vektor

Die Ligation wurde wie in C) beschrieben durchgeführt. Es wurden 100 ng geöffnetes Plasmid und 53 ng Insert (2,9-facher molarer Überschuss über Plasmidmenge) verwendet (Tab. I.5). Die Reaktionszeit betrug 10 min bei RT. Abweichend von üblichen Mengen wurden 10 µl des Ansatzes in DH5α transformiert. Von den Transformantenplatten wurden die Kolonien in flüssige üN-Kulturen überführt und die Plasmide wie in 2.2.1.1 beschrieben isoliert und anschließend sequenziert (vgl. 2.2.1.6).

Die Plasmide mit korrekt eingebautem Konstrukt wurden anschließend einer weiteren Mutagenese unterzogen, bei der das duplizierte Thymin entfernt wurde.

F) Basendeletion mittels Quikchange® II site-directed mutagenesis

Die Entfernung des verdoppelten Thymins, das eine Verschiebung des Leserasters bedingte, wurde mittels punktspezifischer Mutation mit Hilfe des „Quikchange® II site-directed mutagenesis kit“ der Firma Agilent durchgeführt. Dieses Kit arbeitet nach folgendem Prinzip:

Es werden ein sense- und ein antisense-Primer so konstruiert, dass sie komplementär zur Matrizen-DNA sind und lediglich im entsprechend zu verändernden Bereich der DNA die modifizierte Sequenz tragen. Das Matrizen-Plasmid wird bei 95°C denaturiert, woraufhin die Temperatur auf 55°C abgesenkt wird, damit sich die Primer komplementär anlagern können. Es folgt eine Elongation bei 68°C durch die *Pfu Ultra HF DNA Polymerase*, wobei die Dauer der entsprechenden Plasmidgröße angepasst werden muss (1,5 min pro 1 kB Plasmid). Nach der eigentlichen Mutagenese-Polymerasekettenreaktion (PCR) wird der Ansatz unter Zugabe der Endonuklease *DpnI* für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Hierbei wird spezifisch die methylierte Matrizen-DNA abgebaut. Es bleiben ausschließlich genickte DNA-Stränge erhalten, die die Primersequenz inkl. entsprechender Mutation enthalten. Diese werden in superkompetente XL1blue Zellen transformiert, wo die Ligation und Amplifikation des mutierten Plasmids stattfindet.

Von dem isolierten Konstrukt aus D) wurden 25 ng eingesetzt und der Mutageneseansatz wie Tab. I.7 zusammengestellt (Primer: R5TMut_F/R). Die Elongationszeit wurde an die Größe des pET21(+)-

Vektors angepasst, die mit 6,2 kB deutlich größer ist als ein vergleichbares Konstrukt in einem pDS12-Vektor. Die Durchführung erfolgte mittels Programm „petquik.cyc“ (vgl. Tab. I.8) im Thermo-Cycler. Es bleibt anzumerken, dass bei der erfolgreichen Durchführung einmalig ein Ansatz mit verdoppelten Mengen Plasmid, Primer und Polymerase benutzt wurde.

Tab. I.7: Reaktionsansatz Quikchange®-Mutagenese
50 ng Plasmid in 50 µl Reaktionsansatz

Komponente	Menge
Plasmid DNA	25 ng
Reaktionspuffer	1/10 V _{end}
Sense-Primer	62,5 ng
Antisense-Primer	62,5 ng
Pfu Ultra HF DNA-Polymerase	1,25 U
dNTP-Mix	1/50 V _{end}
H ₂ O _{reinst}	ad V _{end}

Tab. I.8: Quikchange PCR-Programm pet21(+)-Vektor (petquik.cyc)

Aktivität	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Deckel aufheizen	110	30 s	-
Aktivierung	95	30 s	1
Denaturierung	95	30 s	14
Anlagerung	55	1 min	
Amplifikation	68	9 min 20 s	
Lagerung	8	unendlich	

Anschließend wurden 1 µl dieses Ansatzes in XL1blue Zellen transformiert, ausplattiert, kultiviert und der Mutageneseerfolg mittels Sequenzierung überprüft (siehe dazu 2.2.1.5, 2.2.1.1, 2.2.1.6).

Im Anschluss daran wurde das Plasmid mit korrekter Sequenz in die Bakterienstämme BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS und Rosetta transformiert (vgl. 2.2.1.5) und die Fähigkeit zur Expression des Fusionsproteins R5C3.2h überprüft (vgl. 2.2.2.1).

2.2.1.8. Herstellung von Cysteinmutanten des R5C3.2h

Eine kovalente Funktionalisierung bzw. Modifizierung von Proteinen kann beispielsweise über eine Thiolgruppe eines Cysteins durchgeführt werden. Um solche Reaktionen auch am R5C3.2h durchführen zu können, sollten Cysteine an den Positionen 106 und 160 eingeführt werden, genau wie in einem weiteren R5-modifizierten LHCP (C3.2hR5T). Außerdem sollten die Cysteine in einen C3.2h eingefügt werden, der in den pET21(+)-Vektor inseriert worden war.

Die Verwendung des Quikchange®-Lightning Multi Site Directed Mutagenese-Kits erlaubt es, in einer Mutagenese mehrere Stellen im Plasmid zu verändern. Hierzu wird pro Mutation nur ein Primer

benötigt, der die Mutation trägt. Es ist einzig darauf zu achten, dass alle verwendeten Primer an denselben DNA-Strang binden. Der grundsätzliche Ablauf der Mutagenese entspricht mit Anpassungen bezüglich Reaktionstemperaturen und Zeiten dem des QuikChange®-Kits aus 2.2.1.7 F).

Das Design der Primer (160multiPhosph und 106multiPhosph) erfolgte nach Vorgaben des Herstellerprotokolls. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze erfolgte gemäß Tab. I.9 und die Parameter des Programm „multiqc.cyc“ der PCR sind Tab. I.10 zu entnehmen.

Tab. I.9: Reaktionsansatz Quikchange®-Lightning Multi Site Directed Mutagenese
100 ng Plasmid in 25 µl Reaktionsansatz

Komponente	Menge
Plasmid DNA	100 ng
Reaktionspuffer	1/10 V _{end}
Mutageneseprimer	je 100 ng
QC Lightning Multi Enzym Mix	1/25 V _{end}
dNTP-Mix	1/25 V _{end}
H ₂ O _{reinst}	ad V _{end}

Tab. I.10: Quikchange Multi Site PCR-Programm pET21(+)-Vektor (multiqc.cyc)

Aktivität	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Deckel aufheizen	110	30 s	-
Aktivierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	20 s	30
Anlagerung	55	30 s	
Amplifikation	65	3 min 10 s	
	65	5	1
Lagerung	8	Unendlich	

Es folgte ein DpnI-Verdau mit der im Kit enthaltenen Nuclease für 5 min bei 37°C. Das Produkt wurde gemäß 2.2.1.5 F) in XL10-Gold Zellen transformiert und der Mutageneseerfolg mittels Sequenzierung überprüft.

Die Variante R5S160Ch wurde mittels Quikchange® II site-directed mutagenesis hergestellt. Das Vorgehen entsprach dem in 2.2.1.7 F) beschriebenen.

2.2.1.9. Mutagenesestrategie zur Herstellung der Mutante 5RC3.2h

Eine weitere Variante eines polykationischen Fusionsproteins aus LHCP und R5 sollte ausgehend vom bereits existierenden R5C3.2h hergestellt werden: 5RC3.2h. Bei diesem sollte die Aminosäuresequenz des R5-Peptids am N-Terminus des LHCII in umgekehrter Reihung vorliegen. Die Mutagenesestrategie ausgehend vom R5C3.2h beinhaltete vier Teilschritte: Durch eine Punktmutation sollte im Übergangsbereich zwischen R5- und LHCII-Gen eine BsrGI-Schnittstelle geschaffen werden. Das R5-

Gen sollte mittels Doppelverdau an dieser neuen Schnittstelle und der 5' vom Gen lokalisierten EcoRI-Schnittstelle entfernt werden. Aus zwei hybridisierten Primern mit der entsprechend umgekehrten R5-Gensequenz (Nomenklatur 5R) wurde die neue Gensequenz in die Schnittstelle hinein ligiert. Die Primer wurden so konstruiert, dass 5' vom 5R-Gen eine AflI und zwischen 5R und LHCII-Gen eine BsrGI Schnittstelle vorliegen.

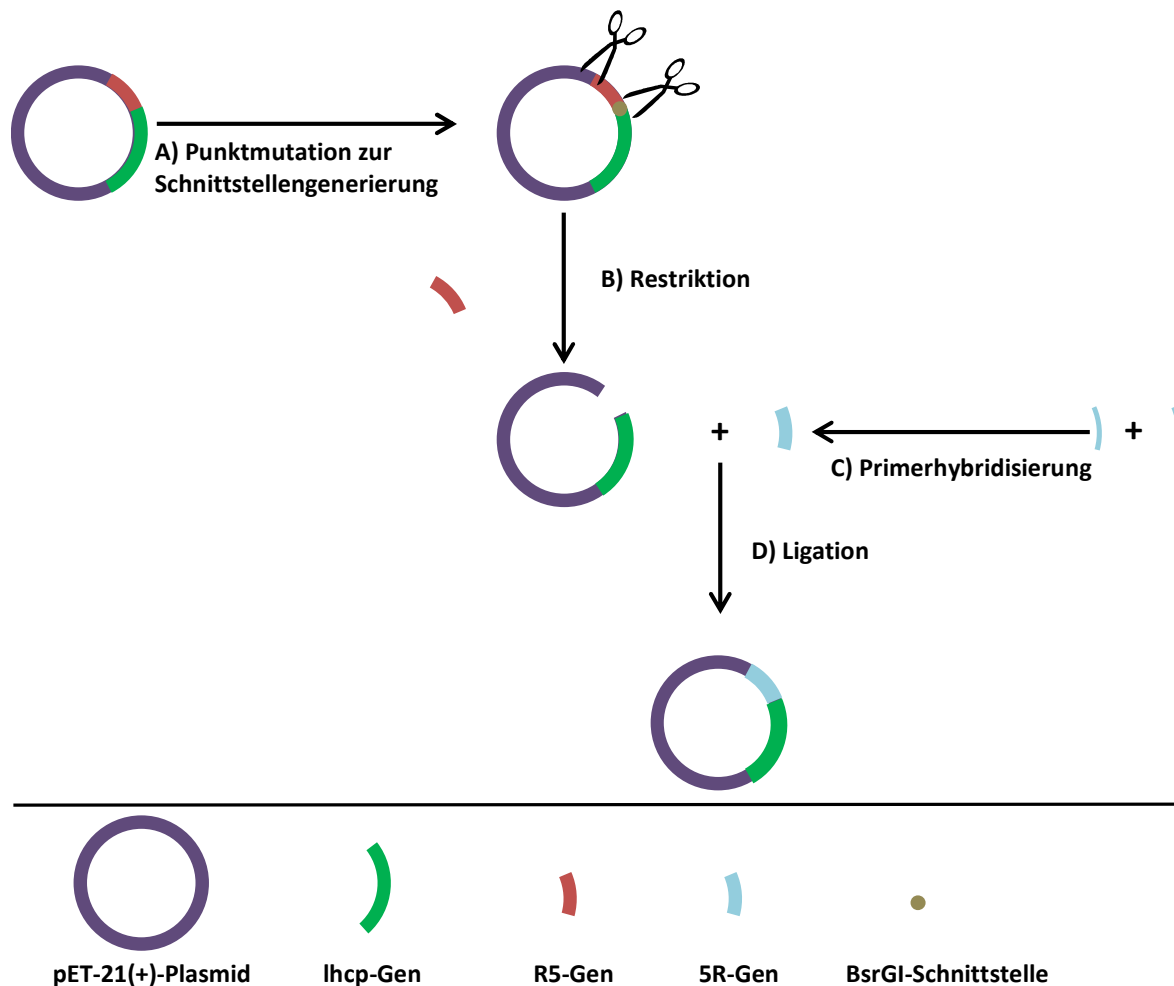


Abb. I.3: Mutagenese-strategie 5RC3.2h

Die Schritte A), C) und D) wurden wie in 2.2.1.7 F), B) und C) beschrieben durchgeführt. Zum Einfügen der BsrGI-Schnittstelle wurden die Primer R5C3.2hBsrGFwd/Rew verwendet. Von der hieraus erhaltenen Mutante R5C3.2hBsrGI wurden Dauerkulturen hergestellt und eine Plasmidpräparation für B) durchgeführt. Der Doppelverdau in B) erfolgte nach der in Tab. I.11 beschriebenen Zusammensetzung und wurde für knapp 2 h bei 37°C im Drehrad durchgeführt.

Tab. I.11: Doppelverdau R5C3.2hBsrGI auf pET21(+)-Vektor

Komponente	Menge
Plasmid DNA	7520 ng
NEB2-Puffer	1/10 V _{end}
BsrGI	45 U
EcoRI	45 U
BSA	1/100 V _{end}
H ₂ O _{reinst}	ad V _{end}

Die Proben wurden gelelektrophoretisch getrennt und das geöffnete Plasmid wie beschrieben aus dem Gel extrahiert. Zur Hybridisierung wurden die Primer R5C3.2h2xcutFwd/Rew verwendet, die anschließend in den geöffneten Vektor ligiert wurden. Das Ligationsprodukt wurde in DH5 α transformiert, die Zellen kultiviert und die präparierten Plasmide sequenziert. Nach Bestätigung der korrekten Sequenz wurde das Plasmid in Rosetta-Zellen transformiert und auf die Expressionskompetenz hin überprüft.

2.2.1.10. Herstellung von Dauerkulturen

Zur Langzeitlagerung der Bakterien wurden Dauerkulturen hergestellt. *E.coli*-Zellen des Stamms Rosetta tragen neben dem entsprechend transformierten Plasmid noch ein weiteres Plasmid, auf dem die Geninformationen für sechs seltene t-RNAs lokalisiert sind. Eine Plasmidpräparation für Mutagenesen ist deshalb aus Rosetta-Zellen ungeeignet. Aus diesem Grund werden von jeder Mutante Rosetta-Dauerkulturen und Dauerkulturen in XL1blue bzw. DH5 α hergestellt.

Es wurden 400 μ l einer entsprechenden \bar{u} N-Bakterienkultur mit 600 μ l 80 %-igem Glycerin vermischt und bei -70°C gelagert.

2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1. Totalproteinbestimmung

TCP (total cell protein)-Puffer

Tris ^{7,5}	50 mM
MgCl ₂	10 mM
MnCl ₂	1 mM

Um den gesamten Proteingehalt von *E.coli*-Zellen analysieren zu können, wurde eine Totalproteinbestimmung durchgeführt. Diese eignet sich dazu, das Expressionsvermögen der Bakterienzellen hinsichtlich IPTG-induzierter Proteine zu analysieren. Dazu werden die Zellen vor und nach der IPTG-Induktionsphase untersucht.

1 ml der Bakterienkultur wurde in flüssigem N₂ eingefroren und nach dem Auftauen für 2 min bei 17530 x g zentrifugiert. Zum Pellet wurden 400 μ l TCP-Puffer zugegeben und gründlich resuspen-

diert. 7 μ l dieser Proben wurden mit 3-4x Sparmix versetzt, für 2 min gekocht und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.2.2. R5-LHCII angepasste Inclusion Body Herstellung

IPTG	1 M
Amp	100 mg/ml (pH 8,0)
Cam	34 mg/ml (pH 8,0)

Wie sich herausstellte, war die Herstellung von R5-LHCP-Fusionsprotein-IBs nicht mit befriedigenden Ausbeuten mit der Standardmethode für LHCP-IBs darstellbar. Aus diesem Grund wurde die in 3.2.1.1.B) (Allgemeine Materialien und Methoden) verwendete Methode wie folgt modifiziert:

Die entsprechenden Rosetta-Dauerkulturen wurden auf LB-Amp-Cam-Platten (für alle folgenden Antibiotikaangaben gilt: Es wurden 1/1000 x Vol. zugefügt) ausgestrichen. Hiervon wurde eine Kolonie in 25 ml LB-Amp-Cam-Medium überimpft und üN bei 37°C und 190 Upm inkubiert. Am folgenden Morgen wurde die Kultur bei 4500 x g für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 25 ml frischem LB-Amp-Cam-Medium resuspendiert und in ein 800 ml LB-Amp-Cam-Medium überführt. Die Kultur wurde bei 37°C und 190 Upm wachsen gelassen und die optische Dichte bei 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) fotometrisch kontrolliert. Bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ zwischen 0,6 und 1 wurde die Proteinüberexpression durch Zugabe von 1/1000 x Vol. IPTG induziert. Nach 4,5 h wurde die Kultur bei 12000 x g für 5 min abzentrifugiert und anschließend die Zellen wie in 3.2.1.1.B) beschrieben aufgeschlossen. Dabei war zu beobachten, dass das Aufschlussverfahren nicht die Ausbeuten beeinträchtigte und deshalb nach standardisiertem Protokoll verfahren wurde.

2.2.2.3. R5-LHCP angepasste Rekonstitution, Trimerisierung und Aufreinigung

LiCl	4,5 M
------	-------

Ähnlich wie bei der oben erwähnten Herstellung der IBs schien der polykationisch-modifizierte N-Terminus auch die Rekonstitution, die Trimerisierung und die anschließende Auftrennung mittels Saccharosedichtegradienten zu beeinflussen. Die standardisiert für LHCII verwendeten Protokolle mussten aus diesem Grund umfangreich modifiziert werden. Ergebnisse zu diesem Optimierungsprozess: siehe I.3.3. Allgemein ist anzumerken, dass alle verwendeten Lösungen immer mit H_2O_{reinst} angesetzt und in Kunststoffgefäßen gelagert wurden. Im Folgenden werden die Abweichungen zum Standardprotokoll 3.2.1.3 (allgemeine Materialien und Methoden) aufgeführt.

Die Solubilisierung und Pigmentzugabe wurden nicht verändert. Nach letzterer erfolgt eine 5-minütige Ruhephase, nach der pro mg eingesetztem Apoprotein 354 μ l LiCl zugefügt werden (entspricht 0,5 M LiCl). Dieser Zugabe folgt eine weitere Ruhephase von 5 min. Danach verläuft die Rekonstitution unverändert.

Sämtliche in der Trimerisierung eingesetzte Puffer (OG-, TX- und Eluatpuffer) werden dahingehend modifiziert, dass sie 0,25 M NaCl enthalten, wobei alle übrigen Komponenten nicht verändert werden.

Bei der Herstellung der Saccharosedichtegradienten wurde unterschieden, ob analytische (SW60) oder präparative (SW41) Gradienten verwendet wurden. Während analytische Gradienten mittels Frier-Tau-Zyklus gute Ergebnisse erbrachten, fanden im präparativen Maßstab häufig selbstgegossene Gradienten eine Anwendung (Bei Cys-Varianten wurden standardmäßig präparative Frier-Tau-Gradienten benutzt). Tab. I.3 fasst die Zusammensetzungen der Gradienten zusammen. Wurden Cys-Varianten des R5C3.2h verwendet, so wurde die Pufferkonzentration auf 0,05 M erhöht und 4 mM TCaEP zugefügt und der pH-Wert kontrolliert.

Tab. I.12: Zusammensetzung Saccharosedichtegradienten für R5C3.2h-Aufreinigung

Abhängig von den Folgeverwendungen konnte die Art des Puffers und sein pH-Wert verändert werden. Der Zugabe von TCaEP (4 mM) folgte eine Erhöhung der Pufferkonzentration auf 0,05 M.

Komponente	Analytischer Gradient	Präparativer Gradient (Frier-Tau)	Präparativer Gradient (selbst gegossen)	
			Komponente 1	Komponente 2
Saccharose	0,65 M	0,3 M	0,8 M	0,1M
Tris ^{7,5}	0,01 M	0,01 M	0,01 M	0,01 M
LM	0,1 % (w/v)	0,2 % (w/v)	0,2 % (w/v)	0,2 % (w/v)
NaCl	0,5 M	0,5 M	0,5 M	0,5 M

Die selbstgegossenen Gradienten wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers hergestellt (die genaue Anwendung ist der Staatsexamensarbeit von CE, 2012, zu entnehmen).

2.2.2.4. Schmelzkurven von R5C3.2h

Um einen eventuellen Einfluss des polykationischen N-Terminus auf die Stabilität der trimeren Komplexe zu analysieren, wurden diese in einem Temperaturgradienten zwischen 20 - 80°C CD-spektroskopisch vermessen. Hierzu wurden R5C3.2h und als Kontrolle C79Sh in gleichen Konzentrationen in detergenzhaltiger Pufferlösung analysiert. Die Temperatur wurde um 1°C pro Minute erhöht und das CD-Signal beim komplextypischen Minimums-Peak bei 492 nm verfolgt (Messparameter siehe Tab. I.13). Die erhaltenen Daten wurden mittels der Software Table Curve 2D sigmoidal approximiert. Der Wendepunkt der Kurve stellte dabei die Schmelztemperatur der Komplexe dar.

Tab. I.13: Messparameter Schmelzkurvenbestimmung mittels CD-Spektroskopie

Parameter	Einstellung
Wellenlänge	492 nm
Spaltbreite	2 nm
Temperaturbereich	20 – 80°C
Datenpunkte	0,2°C
Temperaturerhöhung	1°C/min
Response	2 s
Sensitivität	standard

2.2.2.5. Silikatfällungen von R5C3.2h

Kieselsäurelösung 0,2 M (aus mit 1 mM HCl hydrolysiertem TMOS)

Durch die Einführung des R5-Peptids am N-Terminus des LHCII sollte ermöglicht werden, dass der Fusionskomplex eigenständig Kieselsäure zu Silikat verknüpfen kann und sich dabei in das sich bildende Silikat einschließt.

Die entsprechenden R5LHCII-Komplexe wurden in Saccharosedichtegradienten mit dem gewünschten Puffer aufgetrennt und mittels Ultrazentrifugationseinheiten (z.B. Amicon Ultra MW 30) wurde die Komplexkonzentration auf etwa 10 μ M gebracht. In den Fällungen wurden unterschiedliche Konzentrationen an Trimeren verwendet. Die Pufferkonzentrationen betragen 0,05 M bei einem pH-Wert von 7,5. Als letzte Komponente wurde den Ansätzen Kieselsäure zugefügt auf eine Endkonzentration von 0,02 M (nach vorangegangener 30-minütiger TMOS-Hydrolyse mit 1 mM HCl). Die Fällung wurde bei 23°C auf dem Thermoschüttler bei 1400 Upm für 30 min durchgeführt bzw. für 16 h bei 8°C. Anschließend wurde für 2 min bei 19000 x g zentrifugiert. Das eventuell entstandene Präzipitat wurde vom Überstand abgetrennt und wie in 3.2.1.5 (Allgemeine Materialien und Methoden) beschrieben weiterbehandelt und analysiert.

3. Ergebnisse

Am N-Terminus des rekombinanten LHCII sollte eine polykationische Peptidsequenz eingefügt werden, um eine komplexnahe Polymerisation von Kieselsäure zu ermöglichen. So sollte ein effizienter Einschluss und damit eine signifikante Stabilisierung in Silikat erreicht werden. In späteren Kapiteln sollte auch die Interaktion dieser Modifikation mit sich bildendem oder bereits gebildetem Silikat untersucht werden (Kapitel II). Hierzu wurde ein Primerhybrid der Basensequenz des R5-Peptides direkt am 5'-Ende des LHCP-Gens in eine Restriktionsschnittstelle eingefügt. Der polykationische Charakter dieser Peptidsequenz erforderte die Optimierung sämtlicher standardmäßig für den rekombinanten LHCII verwendeter Methoden zur Gewinnung von IBs, der Rekonstitution und Trimerisierung der Komplexe und der Aufreinigung der selbigen durch Saccharosedichtegradienten.

3.1. Herstellung von R5-LHCII-Fusionsklonen mittels Primerhybrid-Insertion

3.1.1. Konstruktion des Klons R5C3.2h

Als Ausgangsvariante für die Herstellung eines R5-LHCP-Fusionsklons wurde C3.2h, inseriert in einem pDS12-Vektor, genutzt. Dieser besitzt die native Aminosäuresequenz mit zusätzlichem C-terminalem His₆-Tag. Das Plasmid wurde mittels SphI restringiert. In diese Schnittstelle wurde das für die R5-Gensequenz codierende Primerhybrid ligiert. Es folgte eine Transformation in DH5 α mit anschließender Plasmidpräparation und deren Sequenzierung.

43 Transformanten wurden mittels Kontrollverdau überprüft (hier keine nähere Erläuterung), von denen 14 ein Bandenmuster aufwiesen, das auf einen positiven Mutageneseerfolg hinwies. Diese wurden mittels Sequenzierung auf ihre DNA-Sequenz hin überprüft. Es konnte hierbei kein Plasmid mit der korrekten Gensequenz eines R5-LHCII-Fusionsklons nachgewiesen werden. Zusammenfassend traten die folgenden fünf Fehler in den Sequenzen auf:

- a) Insert mit korrekter Orientierung eingebaut, aber Verlust der Pribnow-Box (1);
- b) Insert nicht eingebaut und Verlust der Pribnow-Box (3);
- c) Insert nicht eingebaut, Pribnow-Box vorhanden (1);
- d) Insert in falscher Orientierung eingebaut, Pribnow-Box vorhanden (8);
- e) fehlerhaftes Insert (Baseninsertion) korrekt orientiert eingebaut, Pribnow-Box vorhanden (1).

Bedingt durch den Verlust der Promotorregion (a), das Fehlen des R5 Gens (b) oder die Verschiebung des Leserasters (c und d), war in keinem Fall die Überexpression des Fusionsproteins möglich.

Offenbar wurden schon auf der Transformationsplatte solche Kolonien selektiert, die keine Expression erlaubten. Eine Basalexpression des Zielgens, welche im pDS12-Vektorsystem auf Grund des starken viralen T5-Promotors möglich ist und wie in Abb. I.6 ersichtlich auch abläuft (C79Sh zeigte

schon vor IPTG-Induktion (C79Sh -/-) eine deutliche Bande im Bereich von etwa 25 kDa), könnte positiven Transformanten einen Selektionsnachteil schaffen. Aus diesem Grund wurde ein Ausplattieren der Transformanten auf glukosehaltigen (1 % [w/v]) Nährmedien getestet, das die Basalexpression unterdrücken sollte. Auch dieses Verfahren erbrachte keine Klone mit korrekter Gensequenz.

Um mögliche Selektionsnachteile einer solchen Basalexpression auszuschließen, sollte das Fusionsgenkonstrukt in das pET-21(+)-Vektorsystem inkloniert werden. In diesem transkribiert die T7-RNA-Polymerase das Zielgen. Sowohl deren Überexpression als auch die des Zielgens sind dabei unter Kontrolle einer Promotor-Operator-Region (Lac I-Repressor) und finden IPTG-induziert statt. Hierzu wurde eines der bereits beschriebenen fehlerhaften Konstrukte (Leserasterverschiebung durch Thyminduplikation) durch einen doppelten Restriktionsverdau vor dem 5'-Ende des R5-Gens und nach dem 3'-Ende des lhcp-Gens aus dem pDS12-Vektorsystem isoliert und in die geöffnete multiple cloning site des pET-21(+)-Vektors ligiert. Das duplizierte Thymin wurde im Anschluss mittels Punktmutation (Quikchange® II site-directed mutagenesis kit) entfernt. Das Plasmid wurde in XL1-Blue Zellen transformiert und hieraus die Plasmide zur Sequenzierung isoliert. Nach der Bestätigung der korrekten Gensequenz wurde das Fusionsgenkonstrukt in *E.coli*-Zellen der Stämme BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS und Rosetta transformiert und die Expression des R5-LHCP-Fusionsproteins (systematische Bezeichnung: R5C3.2h) durch IPTG-Induktion überprüft (Abb. I.4).

Das Totalprotein der drei transformierten *E.coli*-Zelllinien wurde vor (-) und nach (+) einer vierstündigen Induktionsphase gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei konnte in BL21 (DE3) und der entsprechenden pLysS-Variante keine Expression des Fusionsproteins nachgewiesen werden.

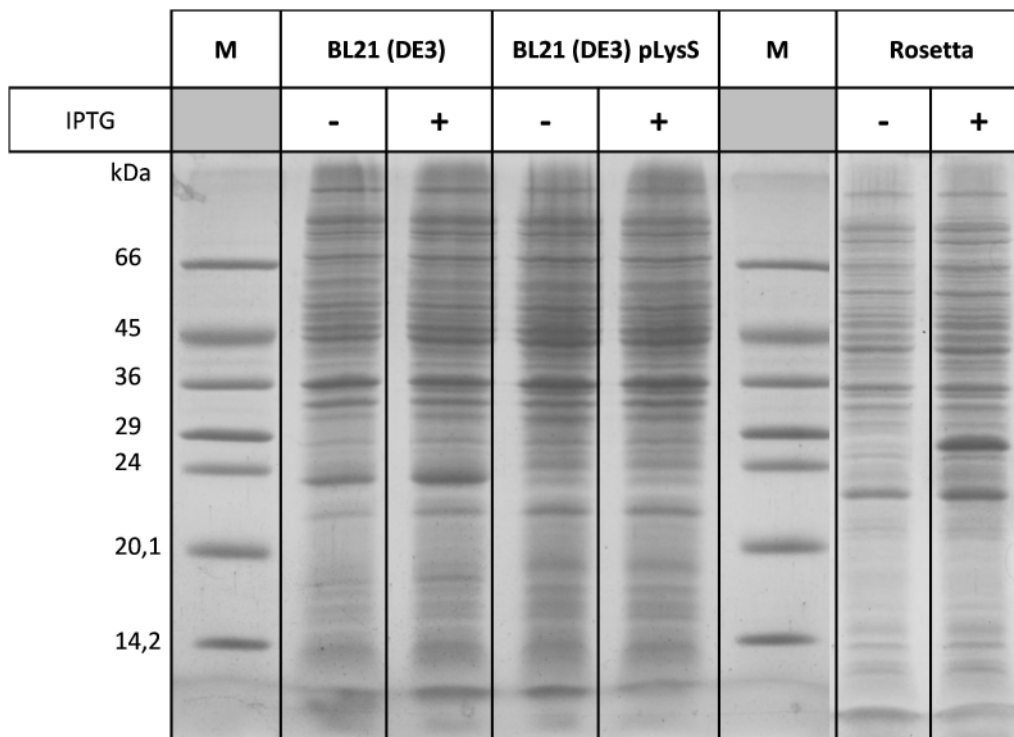


Abb. I.4: R5C3.2h-Überexpressionstest in verschiedenen *E. coli*-Stämmen

Das Fusionsgenkonstrukt aus R5- und lhcp-Gen im pET 21(+)-Vektor wurde in die *E. coli*-Stämme BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS und Rosetta transformiert und ü.N. kultiviert. Mit der Zugabe von 1 mM IPTG wurde eine vierstündige Expressionsphase gestartet. Vor (-) und nach (+) Induktion wurden je 1 ml Bakterienkultur für eine Totalproteinbestimmung entnommen, aufgeschlossen und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Beim Stamm Rosetta ist ein Unterschied zwischen dem Totalprotein vor und nach Induktion zu erkennen. Im Molekulargewichtsbereich von knapp 29 kDa tritt nach Induktion eine deutliche Bande zu Tage. Das Molekulargewicht dieses Proteins entspricht dem erwarteten für das Fusionsprotein R5C3.2h.

3.1.2. Konstruktion des Klons 5RC3.2h

Der bereits beschriebene Klon R5C3.2h sollte noch in einer abgewandelten Form dargestellt werden, bei der sich die Aminosäuresequenz des R5-Peptides in exakt umgekehrter Reihenfolge am N-Terminus des LHCII befindet. Hierzu wurde zwischen die Gensequenzen des R5- und lhcp-Gens mittels Punktmutation eine BsrGI-Schnittstelle eingefügt, so dass durch Doppelverdau mit BsrGI und EcoRI die r5-Sequenz entfernt werden konnte. In diesen geöffneten Bereich des Plasmides wurde im Anschluss daran ein Primerhybrid mit der 5R-Gensequenz hineinligiert.

Die Sequenzierung zeigte eine erfolgreiche Mutagenese. Es erfolgte eine Transformation in Rosetta und eine erfolgreiche Proteinexpression durch die Zugabe von IPTG konnte erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Eine zu R5C3.2h analoge Darstellung von IBs war möglich (Abb. I.5 B).

3.2. Optimierung der R5C3.2h-Apoprotein-Herstellung

Die Herstellung einer breiten Palette an LHCII-Apoprotein-Variationen in Form von IBs wird nach einem standardisierten Procedere vorgenommen (3.2.1.1.B)). Dabei wird eine antibiotikumhaltige \bar{u} N-Kultur nach einer Wachstumszeit von etwa 16 h mit 1 mM IPTG für 4,5 h induziert, worauf der Zellaufschluss und die Aufarbeitung der IBs folgen.

Dieses Procedere führte im Falle von R5C3.2h zu einer relativ schlechten Ausbeute. Bei einem Kulturvolumen von 800 ml konnten etwa 40 mg IBs gewonnen werden. Die Ausbeute lag damit bei weniger als einem Drittel im Vergleich zur Ausbeute bei herkömmlichen LHCP-Varianten. Zwei mögliche Gründe könnten für diese reduzierte Ausbeute verantwortlich sein: Durch die Erweiterung des N-Terminus um das R5-Peptid wird das Gesamtprotein deutlich hydrophiler und im Rahmen der Aufarbeitung der IBs kommt es zu einem erheblichen Verlust an Apoprotein in die Detergenzienpuffer- und Tritonpufferwaschüberstände. Ein weiterer möglicher Grund könnte der Zeitpunkt der Überexpressionsinduktion sein. Nach 16-stündigem Wachstum befinden sich die Zellen einer Bakterienkultur nicht mehr in ihrer stoffwechselaktivsten Lebensphase. Die Synthese des Fusionsproteins, dessen Vorhandensein sich möglicherweise nachteilig auf die Zellen auswirkt, findet also unter suboptimalen Bedingungen statt.

Zur Klärung der Hypothese einer gesteigerten Löslichkeit wurden die Waschüberstände der Apoproteinaufarbeitung hinsichtlich ihres Proteingehaltes gelelektrophoretisch analysiert (Abb. I.5 A). Im Überstand nach Zellaufschluss mittels French Press (1) sind eine Vielzahl an Proteinbanden zu erkennen, die sich über den gesamten Bereich der Gelbahn erstrecken. Im Überstand der Detergenzienpufferwaschung (2) zeigen sich eine deutliche Bande im Bereich von 36 kDa und zwei schwächere Banden bei etwa 29 und unterhalb von 24 kDa. Im Überstand der ersten Tritonwaschung (3) tritt erneut die Bande bei 36 kDa zu Tage, während die schwache Bande bei etwa 29 kDa als einzige im zweiten Tritonüberstand auftaucht. Die IB-Probe zeigt außer der deutlichen Bande bei 29 kDa, die dem R5C3.2h Apoprotein zuzuordnen ist, noch eine schwache bei etwa 50 kDa.

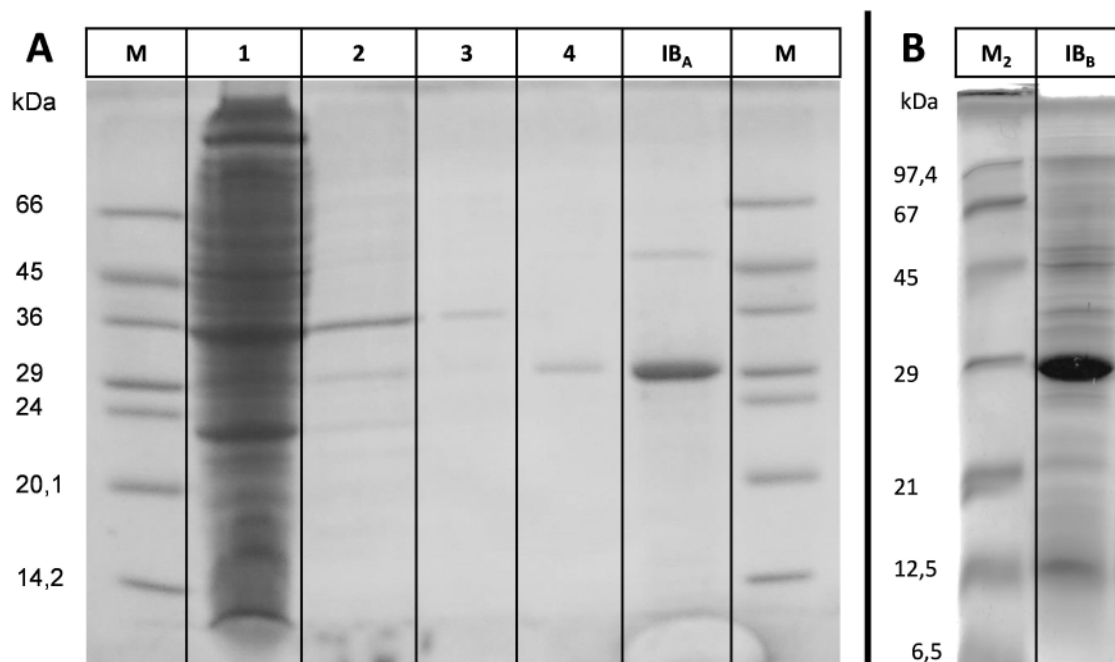


Abb. I.5: Herstellung und Aufreinigung von R5C3.2h und 5RC3.2h IBs

Von R5C3.2h (A) und 5RC3.2h (B) wurden Überexpressionskulturen geerntet und IBs nach Standardprotokoll aufgearbeitet. Es wurden der Zellaufschlussüberstand (1), der Überstand nach Detergenzienpuffer (2), die Überstände der ersten (3) und zweiten (4) Tritonwaschung und die IBs (IB_A bei R5C3.2h und IB_B bei 5RC3.2h) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zellaufschluss erfolgte in A mittels French Press, in B mittels Lysozym. Es wurden in 2 1/1600, in 3 und 4 1/800 des Gesamtvolumens aufgetragen. Die IBs wurden auf 4 µg Protein verdünnt.

Deutlich mehr Proteinbanden sind bei der Analyse der 5RC3.2h IBs zu erkennen (Abb. I.5 B). Neben der dem Apoprotein des R5C3.2h (R5LHCP) zuordenbaren Bande bei 29 kDa treten deutliche Banden bei 12,5, 21 und 45 kDa auf. Insgesamt kann bei der standardisierten Aufarbeitung des Zellaufschlusses kein signifikanter Verlust an R5C3.2h Apoprotein verzeichnet werden.

Zum anderen wurde getestet, ob eine Modifikation der Kultivierungs- und Überexpressionsbedingungen zu höheren R5LHCP-Ausbeuten führen kann.

Verglichen wurde dabei der standardmäßig in sehr hohen Ausbeuten gewinnbare C79Sh im Stamm JM101 mit R5C3.2h in Rosetta. Hierbei wurde zum einen das üblicherweise verwendete Procedere der direkten IPTG-Zugabe zur üN-Kultur mit dem Verfahren der Vorkultivierung verglichen. Dabei wurde eine 50 ml üN-Kultur nach etwa 16-stündigem Wachstum abzentrifugiert, in neuem antibiotikahaltigem Medium aufgenommen und in 800 ml Kulturmedium überimpft. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch verfolgt und die IPTG-Induktion erfolgte bei einer OD_{600 nm} 0,6 und 1. Die Überexpressionszeit betrug in beiden Fällen 4,5 h. Das Totalprotein wurde gelelektrophoretisch vor der Induktion (-/-), nach 4,5-stündiger Expression ohne (-/+) und mit (+/+) Vorkultur analysiert (Abb. I.6).

Deutlich zu erkennen ist, dass C79Sh (auf dem Vektor pDS12) auch ohne Induktion schon eine dominante Bande im Molekulargewichtsbereich von etwa 25 kDa aufweist, die dem LHCP entspricht. Eine entsprechende Bande ist bei R5C3.2h (auf dem pET-21(+)-Vektor) nicht zu erkennen. Nach IPTG-Induktion dominiert diese Bande bei C79Sh weiterhin, wobei etliche Banden im höheren Molekulargewichtsbereich auftreten, die auch entsprechend in der Gelbahn vor Induktion zu sehen sind.

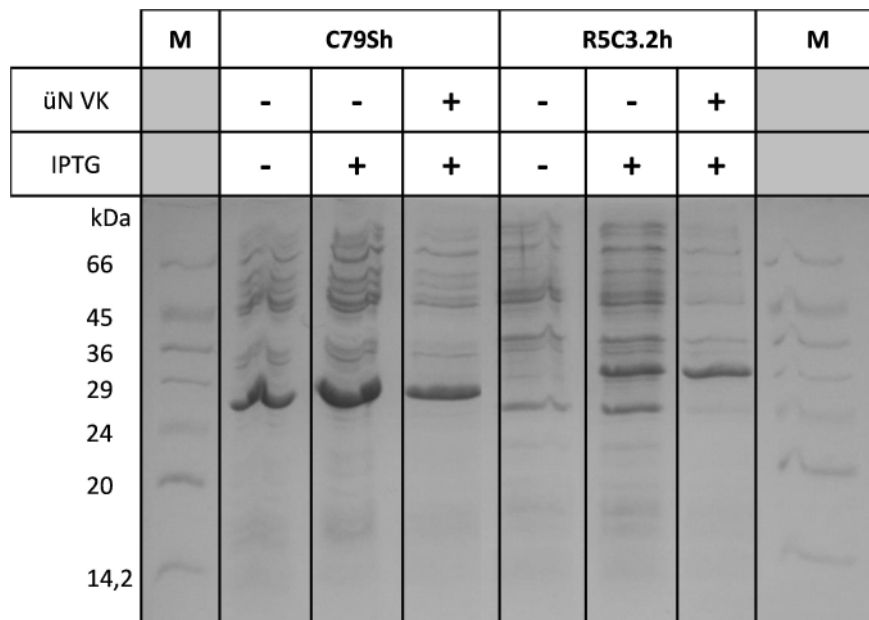


Abb. I.6: Vorkultureinfluss auf R5C3.2h-Expression

Eine nicht-induzierte üN-Kultur (-/-), eine induzierte Übernachtkultur (-/+) und eine induzierte Kultur, die aus einer üN-Vorkultur (VK) angesetzt wurde (+/+), wurden für C79Sh und R5C3.2h hinsichtlich ihres Totalproteingehaltes analysiert. Überexpressionszeit war in allen Fällen 4,5 h. Kulturen aus Vorkultur wurden in frisches LB-Medium überimpft und bis zu einer $0,6 < OD_{600\text{ nm}} < 1$ wachsen gelassen.

Abbildung verändert nach CE.

Bei R5C3.2h tritt die dem R5-LHCP zuzuordnende Bande bei etwa 29 kDa nach Induktion auf. Eine deutliche Bande bei etwa 24 kDa und weitere etwas schwächere Banden im höhermolekularen Bereich sind zu erkennen, welche bereits ohne Induktion im Totalprotein von R5C3.2h sichtbar sind. Auffällig ist, dass bei R5C3.2h nach Induktion anders als bei C79Sh die R5LHCP-Bande nicht klar dominiert. Dies ist erst bei der Analyse des Totalproteins mit Vorkultur der Fall. Sowohl bei R5C3.2h als auch bei C79Sh sind die jeweiligen Apoproteinbanden bei etwa 29 respektive 25 kDa deutlich erkennbar, während weitere Banden nur sehr schwach in Erscheinung treten.

Auffällig war zudem, dass die Zellkultur der Rosetta-Zellen (R5C3.2h) nach Überimpfen in frisches Medium deutlich schneller wuchsen als JM101-Zellen (C79Sh), die mit rund 180 min bis zum Erreichen der erwünschten Zelldichte etwa 50 % länger benötigten als die Rosettazellen.

Die Gesamtmenge an IBs beim Vorgehen über Vorkultur lag bei etwa 120 mg pro 800 ml Hauptkulturvolumen, was in etwa einer dreifachen Menge an IBs entspricht im Vergleich zum Procedere mit direkter Induktion der Kultur. Diese Ausbeuten waren mit R5C3.2h nicht erzielen. Aus 800 ml Hauptkultur konnte man auch mit Vorkultur nur etwa 35 mg IBs gewinnen.

Getestet wurde weiterhin, ob die Art des Zellaufschlusses einen Einfluss auf die Gesamtapoproteinausbeute hat. Beiden bereits erwähnten Kultivierungsmethoden wurde entweder ein Aufschluss mittels French Press oder Frier-Tau-Zyklen, denen ein Lysozym-Verdau voranging, angeschlossen. Dabei zeigte sich, dass die Aufschlussmethode keinerlei Einfluss auf die Ausbeuten besitzt, jedoch zeigen die mit Frier-Tau-Zyklen und Lysozym behandelten IB-Proben stets eine Fremdproteinbande im Bereich von ungefähr 14 kDa, die man auf nicht-entferntes Lysozym zurückführen kann (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde überprüft, ob die Art des Zellaufschlusses die Rekonstitution von R5C3.2h beeinträchtigt. Auch hier konnte keine signifikante Differenz der Methoden hinsichtlich des Einflusses auf die Rekonstitution festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Durch Optimierung der Kultivierungsmethode ließen sich also IBs in ausreichenden Ausbeuten für eine Rekonstitution und Trimerisierung des Fusionsproteins herstellen. Durch die polykationische Modifikation des N-Terminus war zu überprüfen, ob diese methodischen Schritte ähnlich der IB-Herstellung Modifikationen bedurften.

3.3. Optimierung der Rekonstitution und Trimerisierung von R5C3.2h

Die N-terminale Addition von 22 zusätzlichen Aminosäuren, wovon 6 basischen Charakter besitzen, ist ein erheblicher Eingriff in die Primärstruktur des LHCP. Ein möglicher Einfluss dieser Modifikation auf Faltungs- und Assemblierungsvorgänge musste überprüft werden.

Eine Rekonstitution und Trimerisierung nach standardisiertem Protokoll (siehe 3.2.1.3 im allgemeinen Material und Methoden-Teil) führte zu einer minimalen Ausbeute an Monomeren und nahezu keinen Trimeren bei der Auftrennung im Saccharosedichtegradienten. Augenscheinlich war eine sehr starke Bildung von Aggregaten am Boden der Zentrifugationsröhrchen (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden Rekonstitution, Trimerisierung und Aufreinigung durch Saccharosedichtegradienten systematisch auf mögliche Optimierungen untersucht. Dabei wurden pH-Wertvariationen, Einflüsse von ionischen Additiven und die Wahl der Puffer analysiert.

3.3.1. Einfluss des Rekonstitutions-pH-Wertes

Der Solubilisierungspuffer zum solubilisieren der LHCII-IBs wird standardisiert bei pH 9,0 eingesetzt. Um den pH-Werteinfluss auf die Rekonstitution von R5C3.2h zu analysieren, wurde Solubilisierungspuffer bei verschiedenen pH-Werten (8,0; 8,2; 9,0 und 9,5) verwendet. Die Rekonstitutionen wurden mittels Saccharosedichtegradienten aufgetrennt und ausgewählte Banden durch eine schwach denaturierende PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. I.7 A) und CD- sowie fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Das Bandenmuster der Saccharosedichtegradienten unterscheidet sich bei den pH-Werten 8,2; 9,0 und 9,5 kaum. Bei geringer Laufweite zeigt sich eine breite inhomogen gefärbte Bande, die bei zur Kontrolle verwendeten C79Sh nicht so deutlich in Erscheinung tritt. Nach etwa einem Drittel des Gradienten findet sich eine deutlich abgesetzte Bande, die bei pH 8,0 etwas weniger

weit lief als bei den übrigen pH-Werten (markiert mit rotem x) und der C79Sh Kontrolle. Kurz vor dem Bodenbereich des Röhrchens tritt eine weitere Bande auf, jedoch etwas weniger stark als bei der Kontrolle. Die markierten Banden wurden aus dem Gradienten isoliert und einer schwach denaturierenden PAA-Gelelektrophorese unterzogen (Abb. I.7 B).

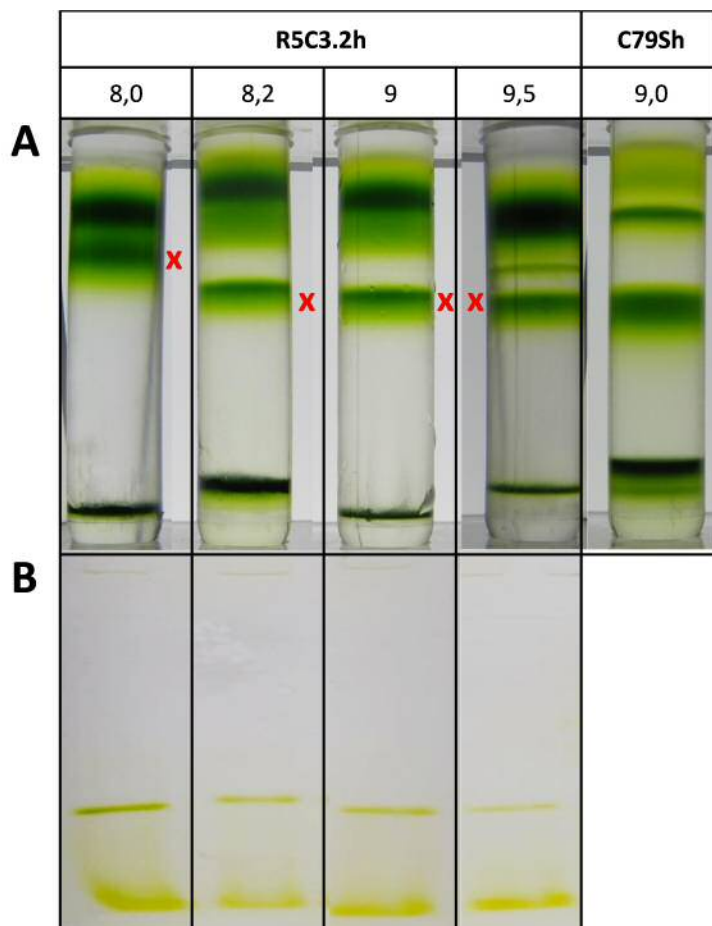


Abb. I.7: pH-Wert-Einfluss auf die Rekonstitution von R5C3.2h.

R5C3.2h wurde bei unterschiedlichen pH-Werten rekonstituiert und auf 0,65 M Saccharosedichtegradienten (0,1 % LM, 5 mM Tris^{8,5}, 0,5 M NaCl) aufgetrennt (A). Die mit x markierten Banden wurden mittel schwach denaturierender PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Kontrolle diente ein Rekonstitutionsansatz von C79Sh. Abbildung verändert nach CE.

Unabhängig vom pH-Wert des Solubilisierungspuffers befinden sich eine etwas diffusere Bande im Bereich der Lauffront und jeweils eine scharfe darüber. Bei ersterer handelt es sich um freies Pigment, bei zweiterer um Monomere, was sich durch ein monomertypisches CD-Spektrum bestätigen ließ. Im Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600\text{--}750 \text{ nm}$) zeigte sich eine typische Energieweiterleitung intakter Komplexe (Spektroskopiedaten nicht gezeigt). Für die weiteren Versuche wurde der standardmäßig verwendete Solubilisierungspuffer (pH 9,0) eingesetzt, da sich ein Einfluss des pH-Wertes nicht erkennen ließ.

3.3.2. Einfluss der Puffer in Saccharosedichtegradienten

In einem Puffersystem liegen eine schwache Säure und das Salz der korrespondierenden Base bzw. eine schwache Base und das Salz der korrespondierenden Säure pH-wertabhängig in bestimmten Verhältnissen vor. Je nach pK_s - und eingestelltem pH-Wert tragen die Puffermoleküle spezifische Ladungen und könnten somit über die Ionenstärke im Medium Einfluss haben auf das Verhalten der rekonstituierten und trimerisierten R5C3.2h Komplexe während der Auftrennung im Saccharosedichtegradi-

enten. Trimerisierungsproben wurden auf analytische Saccharosedichtegradienten mit unterschiedlichen Puffern aufgetragen, wobei Pufferkonzentration ($c_{\text{end}} = 5 \text{ mM}$) und pH-Wert (7,5) in allen Fällen identisch war. Außerdem wurde bei Tris die LM-Konzentration und der NaCl-Gehalt variiert. Aus den Gradienten (Abb. I.8 AI) wurden verschiedene Banden sowie die Pelletablagerungen am Gefäßboden abgesaugt (Abb. I.8 AII) und auf schwach denaturierenden PAA-Gelen analysiert (Abb. I.8 B).

Ein Teil der Rekonstitution und des Ni-Säulendurchflusses wurde ebenfalls auf dem schwach denaturierenden Gel analysiert. Bei der Rekonstitutionsprobe zeigten sich freies Pigment, Aggregate in der Geltasche und eine klar definierte Bande auf monomertypischer Laufhöhe. Diese tritt auch bei der Durchflussprobe auf, ist hier jedoch in Relation zum freier Pigment deutlich schwächer, so dass von einer Bindung der R5C3.2h Monomer an das Säulenmaterial ausgegangen werden kann.

Bei allen Gradienten zeigt sich eine intensive Bande, die im obersten Bereich auftauchte. Diese soll für die weitere Besprechung ohne Relevanz sein. Bei Mops- und Acetat-Puffer ist eine Bande im oberen Bereich des Gradienten zu erkennen, die auch bei allen anderen Ansätzen auftritt. Das Gel zeigt bei dieser Bande 1, dass es sich um freies Pigment handelt. Bei Mops findet man eine schmale Bande kurz oberhalb des Bodens (2), die außer bei Acetat auch bei Phosphat und den drei Tris-Ansätzen (5, 8, 11) auftritt. Auf den Gelbahnen 2, 5, 8 und 11 erkennt man, dass sich in den Taschen eine Grünfärbung zeigt und auf der restlichen Gelbahn keine Färbung zu sehen ist. Bei Mops (3) und Acetat (6) finden sich nur noch Aggregate am Boden des Gefäßes wieder, die auch bei allen anderen Proben auftreten. Bei Tris ist zu erkennen, dass das Pellet ohne Zugabe von Salz und Erhöhung der LM-Konzentration am größten ist (4). Bei Salzzugabe (12) ist es noch deutlicher zu erkennen als bei erhöhter LM-Konzentration (9) (auf Grund unterschiedlicher Fotografiewinkel ist der Unterschied nicht augenscheinlich). Das Gel zeigt bei den Proben aus Bande 3, 4, 6, 9 und 12 vergleichbare Bilder: eine diffuse Bande durch freies Pigment in der Lauffront, eine scharfe Bande etwas darüber bei einer monomertypischen Laufweite, eine Bande bei mittlerer Laufweite, die nach oben hin verschmiert (in etwa der erwarteten Laufweite von Trimeren) und deutliche Rückstände in den Geltaschen.

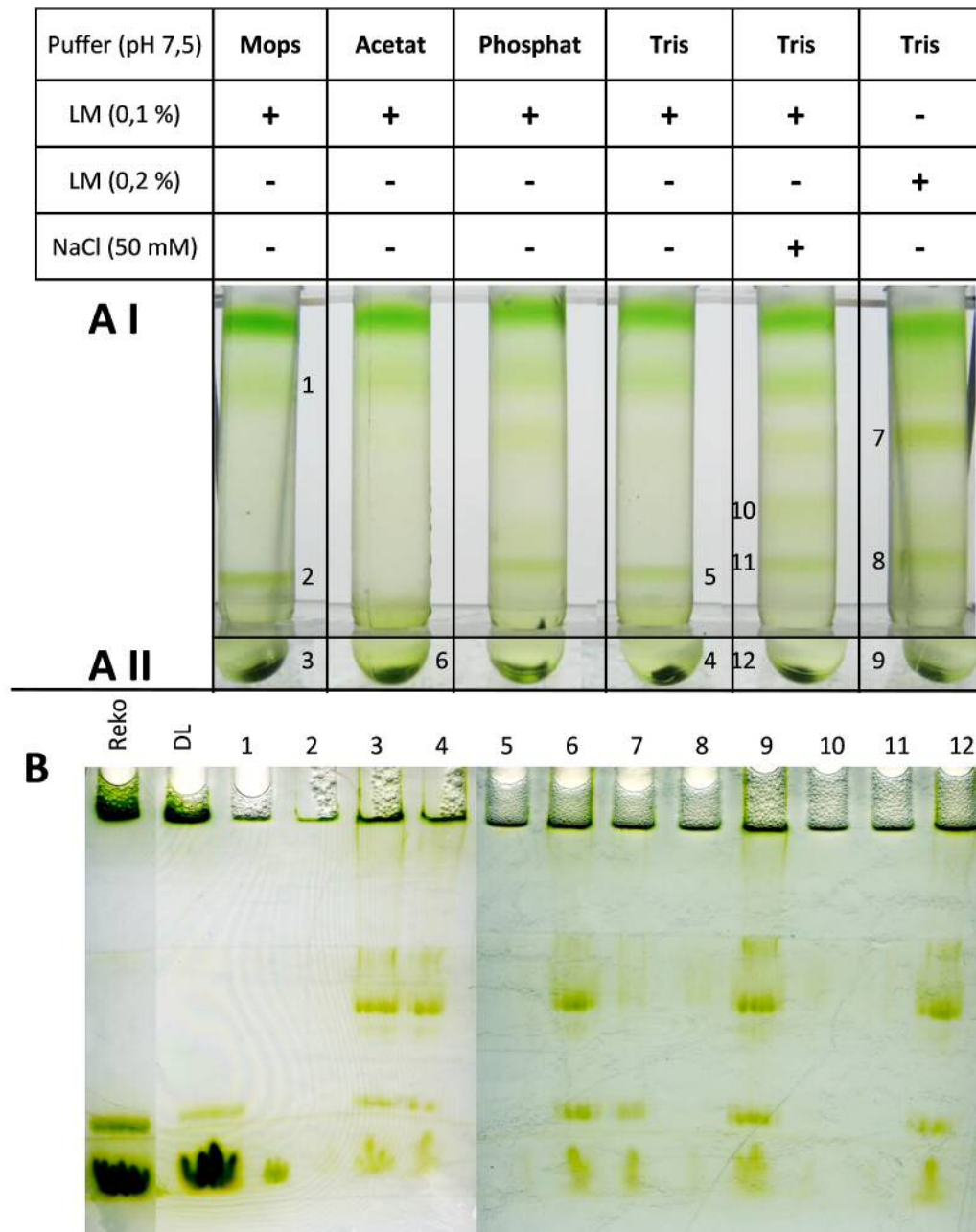


Abb. I.8: Puffereinfluss auf die UZ-Aufreinigung von R5C3.2h

Verschiedene Puffer wurden bei gleicher Konzentration (5 mM) und gleichem pH-Wert (7,5) in 0,65 M Saccharosedichtegradienten verwendet (SW 60). Zusätzlich wurde bei der Verwendung von Tris die LM-Konzentration variiert und NaCl zugesetzt. Aus den Gradienten wurden die markierten Banden bzw. die in A II fokussierte Pelletregion auf 10 % PAA Gele unter schwach denaturierenden Bedingungen aufgetragen (B). Hier wurden zudem 15 μ l des Rekonstitutionsansatzes (Reko) und des Durchflusses nach Auftrag auf die Ni-Säule (DL) appliziert. Rekonstitution und Trimerisierung erfolgten ohne jegliche Salzzugabe.

Bei Phosphat- und allen Tris-Gradienten tritt am Ende des oberen Drittels eine schwache Bande auf (7), die auf dem Gel eine Bande in der Lauffront und eine weitere kurz darüber auf monomertypischer Laufhöhe ergibt. Sie ist bei der erhöhten LM-Konzentration in Tris aber deutlich intensiver als bei den übrigen Ansätzen. Im Gradienten mit zusätzlichem NaCl tritt etwas unterhalb der Mitte eine weitere sehr schwache Bande in Erscheinung, die auf dem Gel zwei sehr schwache Banden in der Lauffront

und auf mittlerer Höhe ergibt. Als Schlussfolgerung aus diesen Versuchen wurde bei weiteren Experimenten sowohl zusätzliches NaCl als auch LM den Gradienten beigefügt.

3.3.3. Einfluss von Salzzugabe auf die Rekonstitution und Trimerisierung

3.3.3.1. Einfluss von NaCl in den Trimerisierungspuffern

Bei der Durchführung der R5C3.2h Rekonstitution und Trimerisierung traten zwei Phänomene auf: Auf dem Ni-Säulenmaterial lagerte sich stets eine dunkelgrüne, unlösliche Schicht ab, die nicht einlief und die Säuleneluat zeigte ein kolloidales Verhalten. Beides deutete auf ein starkes Maß an Aggregation hin, was sich auch in den großen Mengen Aggregat in den Saccharosedichtegradienten (Abb. I.8 A II) widerspiegelt. Aus diesem Grund sollte durch die Zugabe von Salz die Bildung von Aggregaten verhindert werden.

Die Zugabe von 0,25 M NaCl zu den drei bei der Trimerisierung verwendeten Puffern verringerte die auf dem Säulenmaterial niedergeschlagene Schicht deutlich und vor allem zeigten die Säuleneluat keine kolloidale Trübung mehr; sie waren dunkelgrün und klar. Die Eluate wurden auf analytische Saccharosedichtegradienten (Tris mit zusätzlichen 0,25 M NaCl) aufgetragen (Abb. I.9 A) und die Banden 1-4, das Pellet und das in salzhaltiger Detergenzienlösung rückgelöste Pellet CD-spektroskopisch (Abb. I.9 B) und auf einem schwach denaturierenden PAA-Gel (Abb. I.9 C) analysiert.

Es zeigt sich ein klareres Bandenmuster als zuvor. Im oberen Gradientendrittel sind zwei Banden zu sehen, wobei die untere (1) bei der CD-Messung ein monomertypisches Spektrum besitzt und auf dem Gel in der Lauffront freies Pigment und etwas darüber eine scharfe Bande, die ebenfalls monomertypische Eigenschaften hat, zeigt. In der Mitte des Gradienten tritt eine weitere klar abgegrenzte Bande (2) auf, in deren CD-Spektrum bei 473 nm ein negativer Peak auftritt, der bei Bande 1 nicht zu erkennen ist. Auf dem Gel sind freies Pigment und zwei Banden etwa auf halber Laufstrecke zu sehen, die sich jedoch klar voneinander trennen. Im unteren Gradientenbereich treten noch zwei weitere Banden (3 und 4) auf.

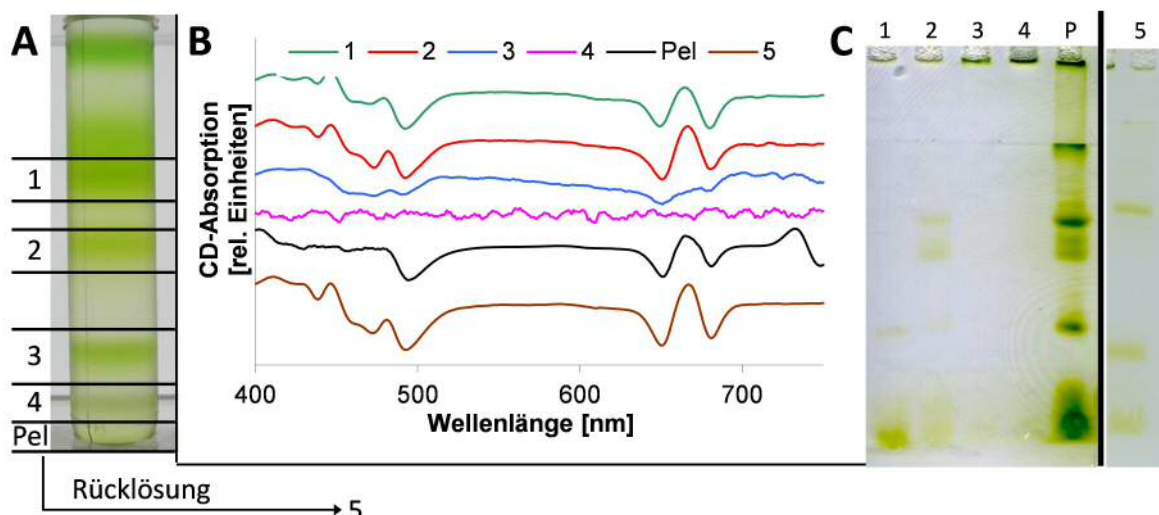


Abb. I.9: Einfluss salzhaltiger Trimerisierungspuffer auf R5C3.2h-Trimerisierung

Den Puffern zur Trimerisierung von R5C3.2h wurden jeweils 0,25 M NaCl zugesetzt. Das Eluat wurde auf 0,65 M Saccharosedichtegradienten (5 mM Tris^{8,5}, 0,1 % LM) aufgetragen (A). Die markierten Banden 1-4 und das Pellet (Pel) wurden abgesaugt und CD-spektroskopisch (B) und auf einem schwach denaturierenden PAA-Gel (C) untersucht. Das Pellet wurde zusätzlich in detergentzhaltiger Salzlösung (0,25 M NaCl, 0,2 % LM) resuspendiert und ebenfalls vermessen (5).

Bande 3 weist im CD-Spektrum einen komplexähnlichen Verlauf auf, jedoch fehlen klare positive und negative Peaks im Bereich zwischen 470 - 500 nm und auch 640 – 690 nm, während Bande 4 kein erkennbares spektrales Profil liefert. Die Vermessung des resuspendierten Pellets (Pel) hat bei 733 nm ein lokales Maximum. Der Bereich zwischen 640 und 690 nm ähnelt stark dem Spektrum von Bande 2, insbesondere die Peakaufweitung in Richtung kürzerer Wellenlängen. Im Gegensatz dazu ist im blauen Bereich nur ein lokales Minimum bei 494 nm zu sehen, ohne weitere definierte Profilierung im kürzerwelligen Bereich. Die gelelektrophoretische Analyse zeigt bei den Banden 3 und 4 und dem Pellet deutliche Rückstände in den Geltaschen. Bei 3 und 4 sind keine weiteren Banden zu erkennen. Das Pellet weist neben einer großen Menge freiem Pigment in der Geltasche drei weitere klare Banden auf und nahezu über die gesamte Laufweite einen grünen Schmier. Die unterste Bande liegt auf Laufweite der Bande aus 1, die mittlere hat die gleiche Laufweite wie die obere Bande aus 2 und die dritte Bande befindet sich am Übergang von Trenn- und Sammelgel.

Wird das Pellet für mehrere Minuten in einer Detergenz- und Salz-haltigen Lösung (0,2 % LM, 0,25 M NaCl) gevortext und anschließend zentrifugiert, so weist der Überstand ein komplextypisches CD-Spektrum auf. Besonders auffällig ist der negative Peak bei 474 nm, der im Gegensatz zum Spektrum von Bande 1 existent, jedoch im Vergleich zum Spektrum von Bande 2 verhältnismäßig schwächer ist. Auf dem Gel sind nur noch drei gefärbte Bereiche zu erkennen. Die Lauffront mit freiem Pigment, eine Bande auf Höhe der monomertypischen Bande aus 1 und eine weitere auf Höhe der Bande aus 2, wobei die Intensität der oberen stärker ist als die der mittleren.

Zusammenfassend ließ sich durch die Zugabe von NaCl zu den Trimerisierungspuffern eine bessere Trennleistung im Gradienten erzielen. Es zeigte sich aber, dass ein hoher Anteil an gefalteten Kom-

plexen aggregiert im Pellet auftrat. Die Banden 1 und 2 wiesen klar monomer- bzw. trimertypische Eigenschaften auf und konnten ebenfalls im Pellet als Aggregate nachgewiesen werden. Zur Verbesserung der Komplexausbeuten mussten also die Prozesse optimiert werden, die eine Aggregation bedingten.

3.3.3.2. Salzhaltige Saccharosedichtegradienten und LiCl-Zugabe zur Rekonstitution

Durch die Zugabe von NaCl zu den Trimerisierungspuffern ließ sich die Menge an Aggregat auf dem Ni-Säulenmaterial verringern (vgl. 3.3.3.1). Aus diesem Grund wurden verschiedene NaCl-Konzentrationen auch in den Saccharosedichtegradienten überprüft und dem Rekonstitutionsansatz LiCl zugefügt, so dass eine bereits stärker salzhaltige Lösung auf die Ni-Säule aufgetragen wurde. Hierbei wurden auch verschiedene Konzentrationen getestet.

Analytischen Gradienten wurde NaCl in verschiedenen Endkonzentrationen zugesetzt ($c_{\text{end}} = 0$; 0,25; 0,5; 0,75 M) und zusätzlich wurde die Rekonstitution von R5C3.2h mit (+) oder ohne (-) 0,25 M LiCl durchgeführt. Die Banden der Gradienten (Abb. I.10 A) wurden nach Auftrennung CD (Abb. I.10 B)- und fluoreszenzspektroskopisch (Abb. I.10 C) analysiert. Grundsätzlich zeigte sich, dass die Anwesenheit von LiCl dazu führte, dass die Größe der dunkelgrünen Schicht auf dem Ni-Säulenmaterial deutlich reduziert wurde. Außerdem ist die Gesamtintensität der Banden in der oberen Gradientenhälfte stärker und im Bodenbereich sind schwächere Banden bzw. Pellets festzustellen.

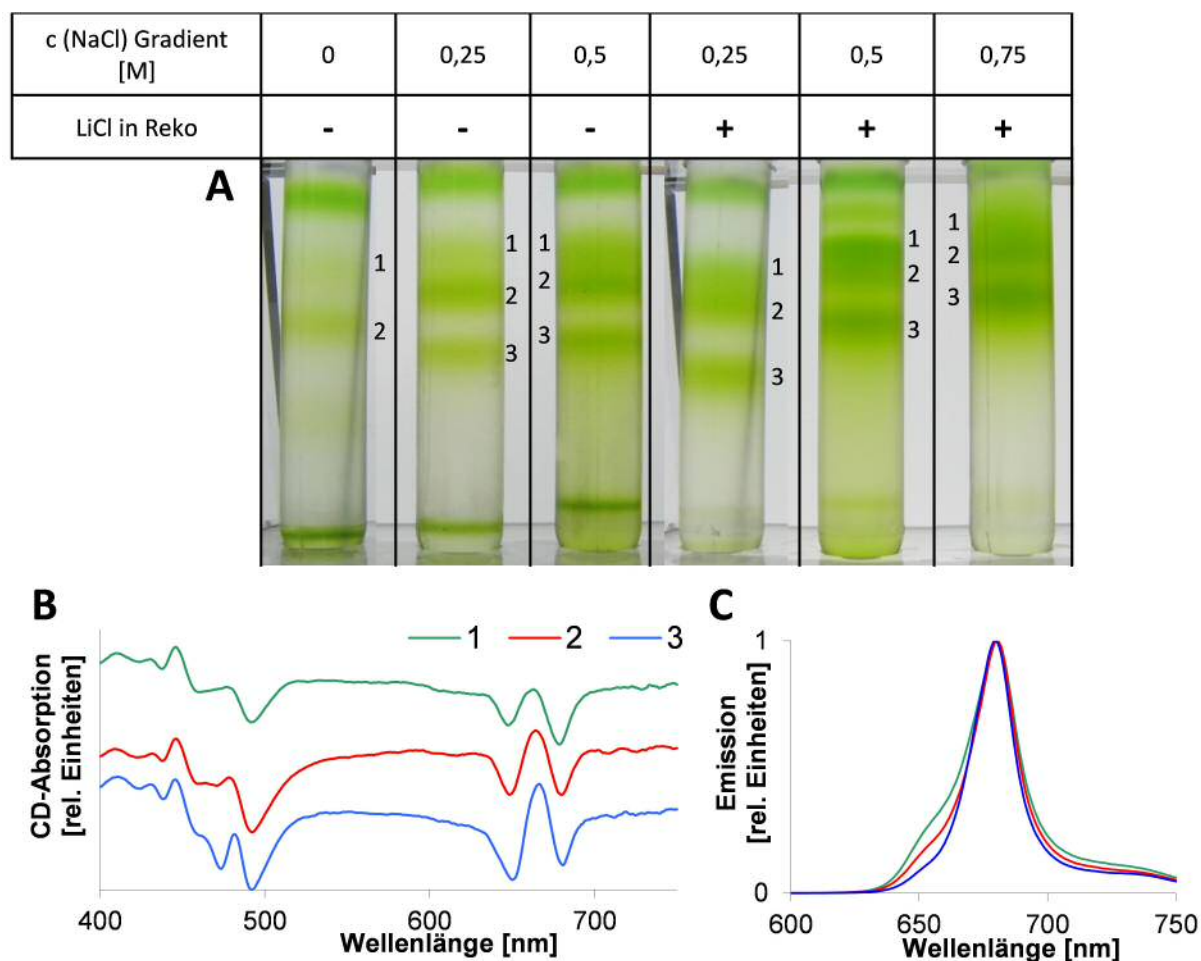


Abb. I.10: Einfluss von Salz in Gradienten und Rekonstitution bei R5C3.2h-Präparation

Trimerisierte R5C3.2h wurden auf 0,65 M Saccharosedichtegradienten (0,1 % LM, 5 mM Tris^{8,5}) mit unterschiedlichen NaCl-Gehalten aufgetragen (A). Die Rekonstitution wurde mit (+) bzw. ohne (-) 0,25 M LiCl durchgeführt. Den Trimerisierungspuffern war NaCl mit einer Konzentration von 0,25 M zugesetzt. Die Banden 1,2 und 3 wurden CD-(B) und fluoreszenz-(C)-spektroskopisch analysiert. Gezeigt sind nur die Spektrospiedaten von „0,25/+“, die den Spektren der anderen Banden entsprechen.

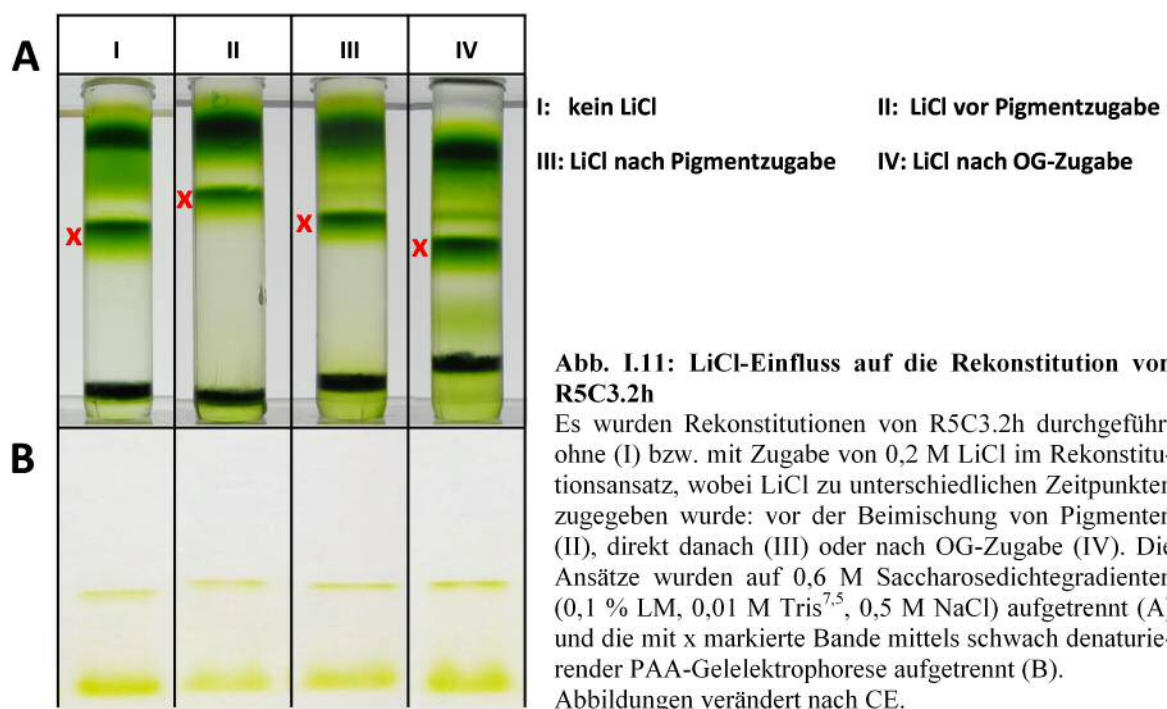
Ohne zusätzliches Salz im Gradienten treten nur zwei schwache Banden im oberen Drittel auf, eine sehr schwache im Übergang zum unteren Drittel des Gradienten und relativ viel Aggregat. Die Anwesenheit von NaCl führt dazu, dass sich in der oberen Gradientenhälfte drei Banden herausdifferenzieren, wobei die Trennung mit steigendem Salzgehalt unschärfer wird. Diese Unschärfe kann durch eine deutlich beschleunigte Auftauzeit der Gradienten durch die Zugabe von NaCl erklärt werden, was in einem weniger scharfen Gradienten resultiert.

Die Banden 1 – 3 konnten isoliert und spektroskopisch analysiert werden. Da sich die Spektren der mit gleichen Zahlen gekennzeichneten Banden nicht unterschieden, sind in Abb. I.2 die Spektren des Ansatzes 0,25 M NaCl und LiCl in Rekonstitution gezeigt. Die Banden 1 und 2 zeigen monomertypische CD-Spektren, wobei die relative Höhe des lokalen Maximums bei 668 nm bei 1 geringer war als bei 2. Bande 3 weist einen deutlichen Peak bei 473 nm auf, so dass man von einem trimertypischen Spektrum sprechen kann. Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung, bei der das Vermögen der Energieweiterleitung innerhalb der Komplexe untersucht wird, ergibt eine deutliche Schulter im Be-

reich von 650 nm bei der Probe aus Bande 1, die bei Bande 2 sehr viel schwächer erkennbar ist und bei Bande 3 fehlt.

Auf Grund der spektroskopischen Untersuchung konnte man folgende Komplexzuordnung der Banden durchführen: Bande 1 beinhaltet nicht korrekt gefaltete Monomere, während Bande 2 die korrekt gefalteten Monomere repräsentierte. Aus Bande 3 konnte man Trimere isolieren. Auf die Ausbeuten an Trimeren wirkten sich also zusammenfassend die Zugabe von NaCl zu den Saccharosedichtegradienten und auch die LiCl-Zugabe zur Rekonstitution positiv aus.

Um die Rolle des LiCl bei der Verhinderung von Aggregaten genauer zu untersuchen, wurden R5C3.2h Rekonstitutionen durchgeführt und 0,2 M LiCl zu verschiedenen Zeitpunkten zum Ansatz zugefügt, anschließend erfolgte eine Auftrennung in analytischen Saccharosedichtegradienten (Abb. I.11 A).



Die Saccharosedichtegradienten zeigen alle ein sehr ähnliches Bandenmuster: Im oberen Drittel sind mehrere ineinander gehende Banden unterschiedlicher Intensität zu sehen. Kurz vor der Hälfte tritt in allen Ansätzen eine klar definierte Bande (markiert durch ein rotes X) auf, die sich hinsichtlich ihrer Intensität nicht signifikant unterscheiden. Aufgetragen auf ein schwach denaturierendes PAA-Gel (Abb. I.11 B) zeigt sich, dass diese Bande freies Pigment (in der Lauffront) und einen Komplex mit monomertypischem Laufverhalten beinhaltet. Die entsprechenden CD- und Fluoreszenzspektren entsprechen denen von Bande 2 aus Abbildung Abb. I.10 (B und C Bande 2) und sind deshalb nicht gezeigt.

Die Anwesenheit von LiCl schien sich nicht auf die Rekonstitution an sich auszuwirken, weshalb dessen positiver Effekt beim Einlaufen in das Ni-Säulenmaterial liegen musste.

Die Menge an verwendetem LiCl sollte außerdem hinsichtlich des Einflusses auf die Trimerisierungsausbeuten untersucht werden. Hierzu wurden Rekonstitutionsansätzen nach der Pigmentbeimengung unterschiedliche Mengen LiCl zugefügt, anschließend trimerisiert und auf analytischen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt (Abb. I.12 A).

Die Gradienten zeigen, dass bei einer Beimengung von 0,2 M LiCl (I) zwei Banden in der oberen Gradientenhälfte zu sehen sind, wobei die Intensität der unteren etwas höher ist als die der oberen. Dieser Intensitätsunterschied verstärkt sich deutlich bei der Verwendung von 0,4 M LiCl (II). Eine weitere Erhöhung der LiCl-Konzentration erbrachte keine Verbesserung (Daten nicht gezeigt).

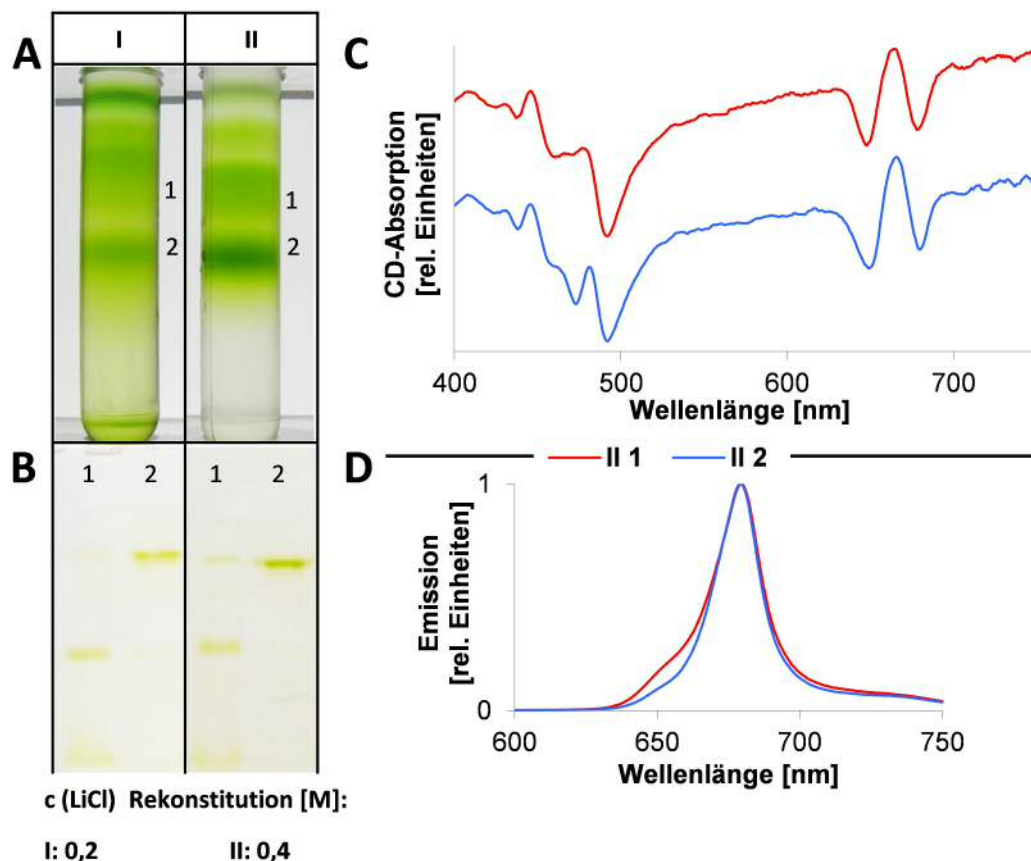


Abb. I.12: LiCl-Konzentrationsabhängigkeit der R5C3.2h-Trimerisierung

Bei der Rekonstitution von R5C3.2h wurden nach der Pigmentzugabe 0,2 (I), 0,4 (II) und 0,6 (III) M LiCl zugefügt. Anschließend erfolgte eine Trimerisierung mit NaCl-haltigen Puffern und eine Auftrennung in 0,6 M Saccharosedichtegradienten (0,1 % LM, 0,01 M Tris^{7,5}, 0,25 M NaCl) (A). Die Banden 1 und 2 wurden mittels schwach denaturierender PAA-Gelelektrophorese (B), CD-(C) und Fluoreszenzspektroskopie (D) charakterisiert. C und D zeigen exemplarisch die Spektren von II, die sich nicht von den Spektren von I 1+2 und III 1+2 unterscheiden. Abbildungen verändert nach CE.

Die Banden 1 und 2 wurden isoliert, auf schwach denaturierenden PAA-Gelen aufgetragen (Abb. I.12 B) und sowohl CD- (Abb. I.12 C) als auch fluoreszenzspektroskopisch (Abb. I.12 D) analysiert. Da sich keinerlei Unterschiede zwischen den Banden aus I, II und III ergaben, ist in C und D die Analyse aus I gezeigt. Die Gradientenbanden 1 weisen im Gel freies Pigment auf und eine monomertypische Bande, deren Charakter sich auch im CD-Signal widerspiegelt. Das Fluoreszenzsignal lässt auf eine korrekte Faltung der Komplexe schließen, da sich nur eine sehr schwache Schulter im Bereich

von 650 nm zeigt, die sich mit freiem Pigment erklären lässt. Die Gradientenbanden 2 zeigen am Gel eine intensive Bande in trimertypischer Laufweite, wobei sich der trimere Charakter auch CD-spektroskopisch durch die Anwesenheit des lokalen Minimums bei 473 nm bestätigt. Im Fluoreszenzspektrum ist keine Schulter im Signalbereich um 650 nm zu identifizieren.

Aus der Gesamtheit der vorangegangenen Versuche etablierte sich ein Protokoll, bei dem durch die Zugabe von LiCl zur Rekonstitution, der Verwendung von NaCl in den Trimerisierungspuffern und Tris-gepufferten analytischen Saccharosedichtegradienten aufgereinigte, trimere Komplexe des R5C3.2h isolierbar waren. Um die Ausbeuten an Trimeren zu erhöhen, sollte das Protokoll auf präparative Ansätze übertragen werden.

3.3.4. Präparative Herstellung von R5C3.2h-Trimeren

Zur Darstellung größerer Mengen an R5C3.2h Trimeren war die Nutzung von präparativen Saccharosedichtegradienten notwendig. Die direkte Übertragung der Gradientenoptimierung aus 3.3.2 und 3.3.3.2 gelang nicht mit ausreichendem Erfolg. Aus diesem Grund wurden die Parameter NaCl- und LM-Gehalt variiert.

Wie in Abb. I.13 A ersichtlich ist, wirkte sich die Abwesenheit von zusätzlichem NaCl bei durch Frier-Tau-Zyklus (FT) hergestellten Gradienten nachteilig auf die klare Bandenmusterung aus. Man kann keine klaren Banden erkennen, die Monomeren und Trimeren zuzuordnen wären. Durch die Anwesenheit von 0,5 M NaCl zeigen sich zwei Banden 1 und 2 in der oberen Gradientenhälfte, wobei auf dem schwach denaturierenden PAA-Gel (Abb. I.13 B) bei 1 freies Pigment und eine monomertypische Bande und bei 2 eine definierte Trimerbande auftritt. Bande 1 überwiegt bezüglich der Intensität deutlich Bande 2 und eine klare Trennung ist nicht deutlich zu erkennen.

Um ein schärferes Bandenmuster zu erreichen, wurden die Saccharosedichtegradienten mit dem Gradientenmischer hergestellt (SG), da dieses Vorgehen eine gleichmäßige Verteilung der beteiligten Komponenten (Puffer-, Salz- und LM-Moleküle) garantiert. Bei der Verwendung von 0,5 M NaCl und 0,2 % LM sieht man eine klarere Trennung der beiden Banden im oberen Drittel als bei den FT-Gradienten. Diese tritt auch bei den anderen SG-Gradienten auf. Hier erkennt man jedoch in der unteren Gradientenhälfte weitere Banden, die besonders bei 0,5 M NaCl und 0,1 % LM ausgeprägt sind. Bei 1 M NaCl sieht man sowohl bei 0,1 als auch bei 0,2 % LM zwei schwache Banden, eine am oberen Ende des unteren Drittels und eine kurz vor dem Boden. Die Analyse der beiden Banden 1 und 2 lieferte bei allen SG-Gradienten vergleichbare Ergebnisse.

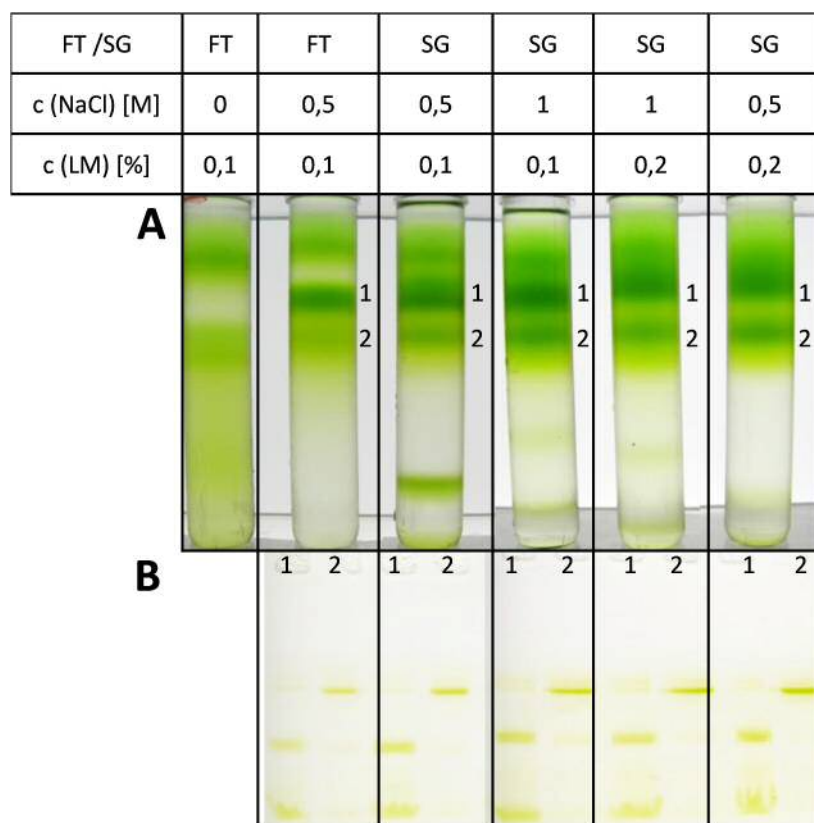


Abb. I.13: Optimierung der präparativen R5C3.2h-Herstellung

Mittels optimiertem Protokoll rekonstituierte und trimerisierte R5C3.2h wurden auf unterschiedlichen präparativen Saccharosedichtegradienten (SW 41) aufgetrennt (A). Die Gradienten wurden entweder durch Frier-Taumethode (FT) oder mit dem Gradientenmischer (SG) gegossen. Des Weiteren wurde die LM- und NaCl-Konzentration wie in A angegeben variiert. Die Banden 1 und 2 wurden unter schwach denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt (B).

Unter allen Bedingungen fand man jedoch weiterhin Aggregate auf dem Boden der Gradientenröhrchen. Um deren Auftreten zu verringern, wurde dem Ni-Säuleneluat zusätzlich LM zugefügt ($c_{\text{end}} = 0,3$ bzw. $0,6$ %). Dies führte dazu, dass am Boden keinerlei Aggregate mehr auftraten. Jedoch verringerte sich auch gleichzeitig die Ausbeute an Trimeren, besonders drastisch im Verhältnis zu Monomeren (Daten nicht gezeigt). Dies hätte man damit erklären können, dass es sich bei den Aggregaten mehrheitlich um Monomere handelte. Aus Abbildung Abb. I.9 B-5 ist jedoch ersichtlich, dass das Verhältnis eher leicht zu Trimeren verschoben war. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Erhöhung der LM-Konzentration im Ni-Säuleneluat eine vermehrte Auflösung des trimeren Zustandes begünstigte.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse wurde die präparative R5C3.2h Trimerengewinnung mit $0,5$ M NaCl/ $0,2$ % LM Saccharosedichtegradienten ($0,05$ M Tris^{7,5}, hergestellt mit Hilfe des Gradientenmischers) durchgeführt.

3.4. Rekonstitution und Trimerisierung von 5RC3.2h

Die in Kapitel I.3.3 beschriebene Optimierung der Rekonstitution und Trimerisierung von R5C3.2h sollte auch auf den zweiten N-terminal modifizierten Fusionskomplex übertragen werden (Abb. I.14).

Während der Rekonstitution verhielt sich der 5RC3.2h (II) vergleichbar zu R5C3.2h (I). Beim Pelletieren von Kaliumdodecylsulfat (KDS) blieb der Überstand intensiv grün gefärbt und keine signifikante Menge an Aggregaten schlug sich auf dem KDS-Pellet nieder. Die Analyse der Rekonstitution auf Saccharosedichtegradienten ergab ähnliche Bandenmusterung auf den analytischen Saccharose-

dichtegradienten (Abb. I.14A), wobei insbesondere die mit x markierte Bande bei 5RC3.2h deutlich schwächer ausgeprägt war.

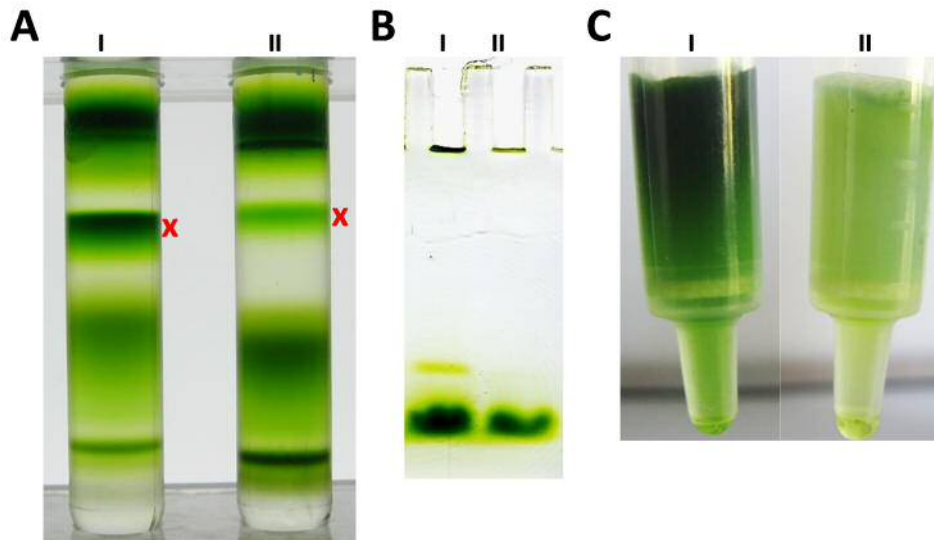


Abb. I.14: Rekonstitution und Trimerisierung von 5RC3.2h

5RC3.2h wurde gemäß des Standardprotokolls für R5C3.2h parallel zu diesem rekonstituiert und trimerisiert. Ein Teil der Rekonstitution wurde mittels 0,65 M Saccharosedichtegradienten (0,1 % LM, 0,05 M Tris^{7,0}, 0,5 M NaCl) aufgetrennt (A) und auf einem schwach denaturierenden PAA-Gel getrennt (B). Der Rest wurde zur Trimerisierung auf Ni-Säulen aufgetragen (C). Zu sehen sind die Säulen nach Waschung mit OG-Puffer. Die mit x markierten Banden wurden CD-spektroskopisch untersucht (Daten nicht gezeigt).

Die markierte Bande ergab bei der schwach denaturierenden PAA-Gelelektrophorese bei 5RC3.2h lediglich eine freie Pigmentbande in der Lauffront, währenddessen bei R5C3.2h eine monomertypische Bande etwas oberhalb auftrat (Abb. I.14 B). Die Vermessungen der Banden mittels CD- und Fluoreszenzspektroskopie ergaben für R5C3.2h monomertypische Spektren, bei 5RC3.2h ergab sich kein charakteristisches Spektrum und ein sehr deutliches Fluoreszenzsignal bei 650 nm trat auf (Daten nicht gezeigt). Auch beim Auftragen auf die Ni-Säulen konnte kein Verhaltensunterschied festgestellt werden. Allerdings entfärbte sich die Ni-Säule beim Waschen mit OG-Puffer nahezu vollständig bei 5RC3.2h, während bei R5C3.2h das Säulenmaterial intensiv dunkelgrün gefärbt blieb (Abb. I.14 C). Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine korrekte Rückfaltung bei 5RC3.2h nicht stattfand.

3.5. Cysteinhaltige R5-LHCII-Komplexe

Die Einführung von Cysteinen in die Aminosäuresequenz des LHCII führt dazu, dass über diese eine Funktionalisierung stattfinden kann z.B. in Form einer Anbindung von Protamin (siehe III.3.1). In R5C3.2h sollte an den Aminosäurepositionen 106 und 160 Serin gegen Cystein ausgetauscht werden. Hierbei ging es um die Herstellung der Einzel- (Nomenklatur: R5S106Ch bzw. R5S160Ch) wie auch Doppelcysteinvarianten (R5S106/160Ch). Außerdem sollte in der Variante C3.2hR5T, bei der die R5-Modifikation C-terminal hinter dem His₆-Tag liegt, die beiden Cysteine eingeführt werden (Nomenklatur: 2xC₁R5T). Die Mutagenese erfolgte mittels Quikchange®-Lightning Multi Site Directed Mu-

tagenese-Kit und die gewünschten Mutanten konnten hergestellt werden (näheres hierzu siehe Staatsexamensarbeit D. Palm). Auch die Herstellung von IBs konnte erfolgreich durchgeführt werden. Diese wurden in Rekonstitutionen und Trimerisierungen eingesetzt und in Saccharosedichtegradienten aufgetrennt (Abb. I.15 A, verwendetes Protokoll entsprechend optimierte Vorschrift für R5C3.2h). Es zeigte sich eine klare Auftrennung in zwei Banden. Die Untersuchung dieser auf schwach denaturierenden PAA-Gelen (Abb. I.15 B) zeigte, dass die Gradientenbanden 1 bei allen Varianten in der Lauf-front freies Pigment aufwiesen und darüber eine monomertypische Bande. Gradientenbande 2 wies ein trimertypisches Laufverhalten auf, wobei bei R5S106Ch auch kleine Mengen Pigment und eine monomertypische Bande zu erkennen waren, die vermutlich auf unsauberes Absaugen der Gradientenbande zurückzuführen waren.

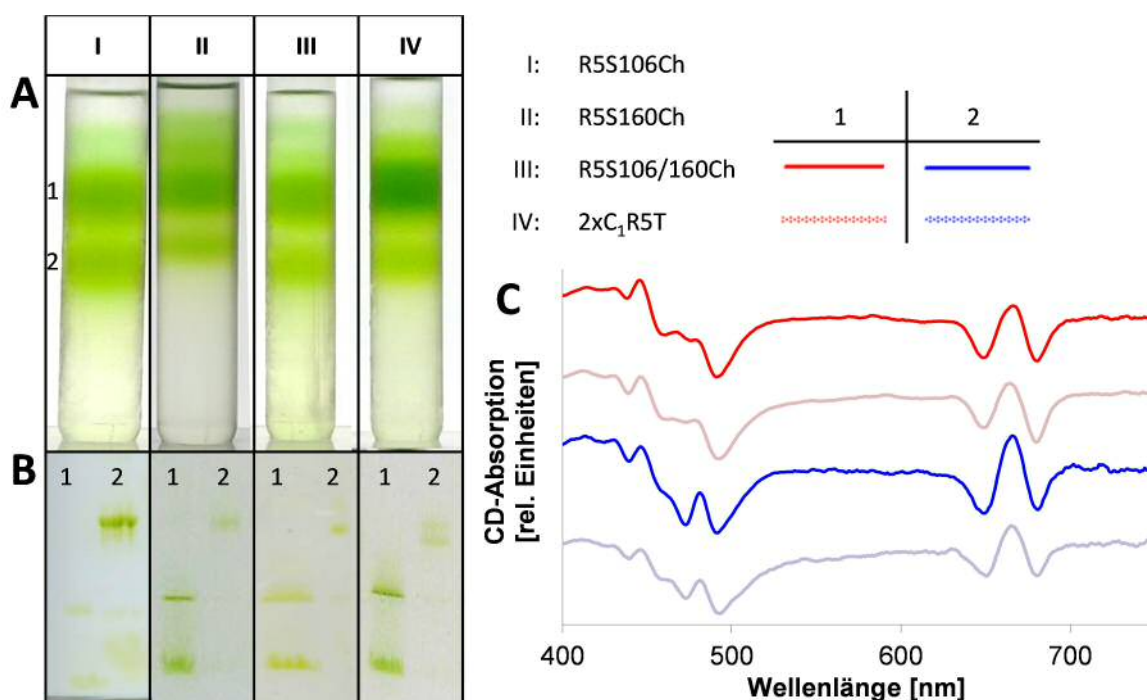


Abb. I.15: Präparation verschiedener Cysteinvarianten des R5C3.2h

R5S106Ch (I), R5S160Ch (II), R5S106/160Ch und 2xC₁R5T wurden rekonstituiert und trimerisiert und auf Saccharosedichtegradienten (A) aufgetrennt. Die Banden 1 und 2 wurden aus allen Proben abgesaugt und auf schwach denaturierenden PAA-Gelen gelelektrophoretisch aufgetrennt (B) und auch CD-spektroskopisch analysiert (C). Im Spektrum entsprechen volle Linien den R5S106/160Ch Proben bzw. gestrichelte 2xC₁R5T und rote Proben aus Bande 1 und blaue Proben aus Bande 2.

Bei der CD-spektroskopischen Analyse der Gradientenbanden 1 und 2 (Abb. I.15 C) ergaben sich für die Bande 1 monomertypische Spektren und für Bande 2 trimertypische, die denen von R5C3.2h entsprachen (siehe Abb. I.12). Auch die fluoreszenzspektroskopische Analyse ließ auf eine korrekte Faltung der Komplexe schließen (Daten nicht gezeigt).

3.6. Eigenschaften des R5C3.2h

3.6.1. Komplexstabilität anhand von Schmelzkurven

Die Addition einer polykationischen Peptidsequenz am N-Terminus ist ein erheblicher Eingriff in die Komplexstruktur, der möglicherweise die grundsätzliche Stabilität des trimeren Komplexes beeinflussen könnte. Aus diesem Grund wurde die Schmelztemperatur von R5C3.2h mittels Verfolgung der CD-Absorption bei 492 nm in einem Temperaturgradienten von 20 bis 80°C untersucht. Als Referenz wurden Trimere des C79Sh eingesetzt (Tab. I.14).

Tab. I.14: Schmelztemperatur R5C3.2h

Trimere Komplexe von R5C3.2h und C79Sh als nicht-modifizierte Kontrolle wurden mittels CD-Absorption bei 492 nm in einem Temperaturgradienten von 20 – 80°C vermessen. Der Wendepunkt der approximierten Sigmoidfunktionen entspricht der jeweiligen Schmelztemperatur (Programm Table Curve 2D). Die Temperaturen ergeben sich jeweils als Mittelwert aus 2 Messungen.

Das Bestimmtheitsmaß r^2 lag bei allen Messungen $> 0,988$.

Trimere von...	Schmelztemperatur [°C]
C79Sh	54,4
R5C3.2h	56,8

Die Schmelztemperatur des trimeren R5C3.2h lag mit 56,8°C um 2,4°C höher als die der Kontrollkomplexe.

3.6.2. Silikatfällungsverhalten des R5C3.2h

Die R5-Peptidsequenz am N-Terminus sollte dem R5C3.2h die Eigenschaft verleihen, autonom Kieselsäure zu Silikat zu polymerisieren und dabei in dieses entstehende Netzwerk eingeschlossen zu werden. Die so eingeschlossenen Komplexe sollten gegenüber thermischem Stress dann stabiler sein als freie Komplexe.

Trimere R5C3.2h wurden aus Saccharosedichtegradienten isoliert und durch mehrmaliges Aufkonzentrieren und Verdünnen von Saccharose und überschüssigem Salz befreit. Dabei wurden die Komplexe in den Pufferlösungen verdünnt, die auch bei den Silikatfällungsversuchen verwendet werden sollten (Pufferkonzentration = 0,05 M).

Die Komplexe wurden in den Fällungsansätzen bei Endkonzentrationen von 1; 2,5; 5 und 7,5 μM eingesetzt, wobei Tris und Phosphat bei einem pH-Wert von 7,0 als Puffer benutzt wurden. Die Kieselsäurekonzentration betrug 0,02 M.

Bei einer 30-minütigen Inkubation bei 23°C bildeten sich in keinem Ansatz präzipitierbare Silikatstrukturen. Die Ansätze wurden daraufhin bei 8°C für weitere 15,5 h inkubiert. Bei einer Komplexkonzentration von 1 μM kam es in beiden Puffern zu keiner Bildung von präzipitierbaren Strukturen,

was auch für den Ansatz mit 2,5 μM Komplexen in Phosphat galt. Bei allen übrigen Ansätzen entstanden intensiv grün gefärbte Präzipitate (Abb. I.16).

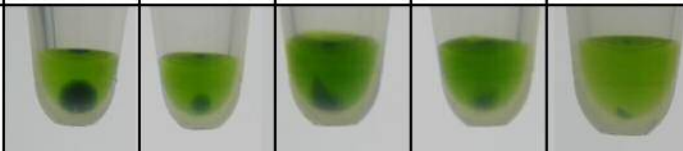
Puffer	P_i	P_i	Tris	Tris	Tris
Konzentration R5C3.2h [μM]	7,5	5	7,5	5	2,5
					

Abb. I.16: Silikatfällungsverhalten von R5C3.2h

R5C3.2h wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 2,5, 5, 7,5 μM) in Silikatfällungen eingesetzt. Sowohl Tris- als auch Phosphatpuffer ($c_{\text{end}} = 0,05 \text{ M}$) wurden bei pH 7,0 eingesetzt. Inkubation erfolgte für 30 min bei 23°C, danach für weitere 15,5 h bei 8°C.

Es ist zu erkennen, dass die Pellets bei einer Komplexkonzentration von 7,5 μM am größten und die in Phosphat gefällten Präzipitate größer als die in Tris gefällten waren. Bei einer Komplexkonzentration von 2,5 μM in Tris ist nur noch ein sehr kleines Pellet zu sehen. Ein analoger Kontrollversuch, bei dem anstelle des R5C3.2h der nicht-polykationisch veränderte C79Sh eingesetzt wurde, zeigte nach 16-stündiger Inkubation keine Bildung von präzipitierbaren Strukturen.

Um die Integrität der Komplexe während des Einschlussprozesses zu überprüfen, wurden die Pellets von ihrem Überstand befreit und das in frischem Puffer resuspendierte Präzipitat fluoreszenzspektroskopisch untersucht (Abb. I.17). Exemplarisch gezeigt sind die Spektren für die beiden 7,5 μM Ansätze.

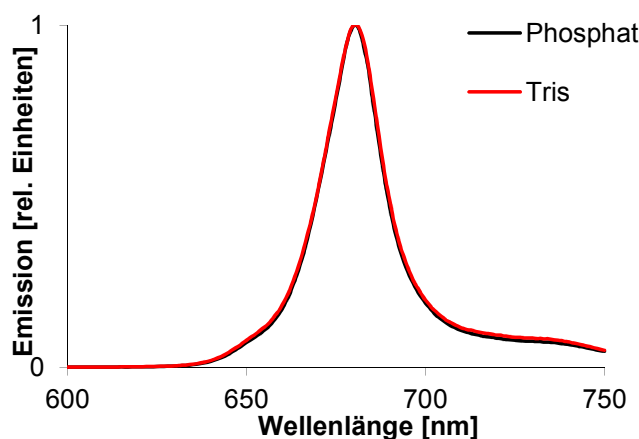


Abb. I.17: R5C3.2h Trimer-Integrität nach Silikateinschluss

R5C3.2h Trimere wurden in Tris bzw. Phosphat ($c_{\text{end}} = 0,05 \text{ M}$) bei einem pH-Wert von 7,0 mit 0,02 M Kieselsäure umgesetzt. Reaktionsdauer war 30 min bei 23°C und anschließend 15,5 h bei 8°C. Die Komplexe wurden vom Überstand befreit, gewaschen und die in frischem Puffer resuspendierten Präzipitate fluoreszenzspektroskopisch vermessen ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 600\text{-}750 \text{ nm}$).

Es ist klar zu erkennen, dass keine Chlorophyll *b*-bedingte Emission auftritt, so dass man davon ausgehen kann, dass der Silikatcondensationsprozess nicht die Stabilität der Komplexe negativ beeinträchtigt. Diese Präzipitate lösten sich unter thermischen Stressbedingungen trotz silikatgesättigtem Inkubationspuffer stark auf (vor allem bei den unter Tris geführten Fällungen). Die Fluoreszenzmessungen ergaben, dass die Energieweiterleitung innerhalb der Komplexe stark gestört war, was sich in einem Chlorophyll *b*-Signal zeigte, dass nahezu die Intensität des Chlorophyll *a*-Signals erreichte (Daten nicht gezeigt).

Die Struktur des Silikats unterschied sich in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. I.18) sehr deutlich von der Struktur, die sich bei Copräzipitationen bildete (vgl. II.3.20). Man erkennt keine partikulären Silikatstrukturen, die sich zu einem größeren Netzwerk zusammenlagern, sondern eher eine massive Verschmelzung.

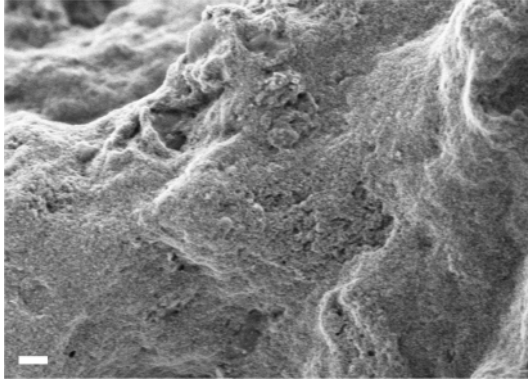


Abb. I.18: REM-Aufnahmen von R5C3.2h gefällten Silikatstrukturen

7,5 μM R5C3.2h wurden in 0,05 M Phosphat^{7,5} und 0,02 M Kieselsäure für 16 h bei 8°C umgesetzt. Das Pellet wurde zweimal mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gewaschen und auf Siliciumwavern für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen getrocknet. Größenskala = 200 nm.

R5C3.2h wurde in weiteren Fällungsversuchen eingesetzt (siehe hierzu: Copräzipitation Kapitel II; Protamin-Modifikation Kapitel III).

4. Diskussion

4.1. Auf dem Weg zu R5C3.2h Inclusion Bodies

Die Modifikation des LHCP-Gens durch die R5-Sequenz beeinflusste sowohl die Mutagenese des Fusionsgens als auch die Gewinnung der IBs negativ. Die IB-Herstellung von LHCP verläuft standardmäßig über eine Induktion einer etwa 16 h alten üN-Kultur mit IPTG. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Bakterienkultur in einem Zustand, der weit nach der exponentiellen Phase liegt, in der die Zellen ihre höchste Vitalität zeigen. Die Herstellung von R5C3.2h-IBs nach diesem Protokoll führte bei gleichem Kulturvolumen zu Proteinausbeuten, die weit unter denen von nicht-polykationisch modifizierten LHCP lagen. Wurde das Protokoll dahingehend verändert, dass eine üN-Vorkultur verwendet wurde, welche in frisches Medium überimpft wurde und deren Induktion in der photometrisch nachgewiesenen exponentiellen Wachstumsphase lag ($OD_{600\text{ nm}}$ zwischen 0,6 und 1), erhöhte sich die Ausbeute an R5C3.2h-IBs um einen Faktor 3. Die polykationische Modifikation des LHCII scheint einen nachteiligen Einfluss auf die Bakterienzellen auszuüben, der besonders in nicht-idealen Vitalitätszuständen ungünstig zum Tragen kommt. Der genaue Hintergrund dieses negativen Einflusses ist nicht aufgeklärt. Es ist bekannt, dass sowohl polykationische Peptide - sog. Defensine, die eine amphiphile Tertiärstruktur einnehmen – als auch kationische amphiphile Chemikalien eine breit gefächerte antimikrobielle Wirkung aufweisen. Man geht bei beiden Stoffklassen von einer Assoziation der kationischen Bereiche mit der negativ geladenen Membran aus, dem eine Insertion der hydrophoben Komponenten in den inneren Membranbereich folgt. Diese stört die Membranstruktur derart, dass es zu einem Funktionsverlust kommt und die Auswirkungen auf den Mikroorganismus letal sind [118; 119]. Für Defensine ist darüber hinaus bekannt, dass ihre Membranintegration zu einem Verlust der Koloniebildung von Bakterien führt [120]. Auch das Fusionsprotein R5C3.2h hat eine ähnliche amphiphile Struktur. Die Apoproteine bilden normalerweise IBs, bei denen sich die hydrophoben (im gefalteten Komplex transmembranen) Bereiche zusammenlagern. Möglicherweise assoziiert R5C3.2h-Apoprotein mit seiner R5-Sequenz ebenfalls mit der Membran und die hydrophoben Bereiche wechselwirken mit dem hydrophoben Membraninneren. Diese Auswirkungen können aber nicht ausschließliches Ereignis sein, denn a) lassen sich in der exponentiellen Wachstumsphase ausreichende Mengen Apoprotein gewinnen und b) liegen diese in Form von IBs vor. Dennoch können möglicherweise auch nur wenige solcher Interaktionen in suboptimalen Lebensphasen zu deutlichen Einschränkungen der Zellentwicklung führen.

Auch die frühe Wachstumsphase von Bakterien nach einer Transformation ist eine nicht optimale Phase des Bakterienstoffwechsels und könnte die Erklärung für die auftretenden Probleme bei der Selektion der Transformanten sein. Ursprünglich wurde das R5-LHCII-Fusionsgen im pDS12-Vektor konstruiert. Alle isolierten Transformanten wiesen im Gen oder in der Promotor/Operator-Region Veränderungen auf, die eine Expression verhinderten. Zu beachten ist bei diesem Vektorsys-

tem, dass es zu einer deutlichen Basalexpression des unter Kontrolle der Promoter-Operator-Region stehenden Strukturgens kommt (Abb. I.6). Der vorliegende T5-Promotor hat eine hohe Affinität zur bakteriellen RNA-Polymerase, was diese Basalexpression erklären kann. Mutationsereignisse im Bereich des Repressorgens können nicht ausgeschlossen werden, wurden allerdings nicht überprüft. Unter der oben gemachten Annahme, dass exprimierte R5C3.2h-Apoproteine sich nachteilig auf die Zellvitalität auswirken, führt eine unkontrollierte Basalexpression des Fusionsproteins bei korrekten Transformanten zu einem Selektionsnachteil. Dies spiegelt sich vermutlich in einem drastisch reduzierten Wachstum während des betrachteten Zeitintervalls wider. Zellen ohne diese Basalexpression – sprich ohne den negativen Selektionsdruck – können sich in der Wachstumsphase nach Transformation erfolgreicher entwickeln. Dabei ist es egal, ob dies an einem nicht-eingebauten R5-Gen, einem fälschherum eingebauten R5-Gen, welches ein Stoppcodon an der 13. Triplettposition trägt, einer duplizierten Base, die eine Leserasterverschiebung bedingt oder einer fehlenden Pribnow-Box liegt. Während die ersten drei Fehlervarianten erwartbar waren, ist letzterer Fall etwas ungewöhnlich. Die Pribnow-Box im pDS12-Vektor ist direkt 5' und 3' von einer doppelten Operatorsequenz (gleich ausgerichtete 16 Basenpaar-lange Wiederholungseinheit) flankiert. Ging die Pribnow-Box verloren, so fehlte auch eine dieser Operatoreinheiten. Ein solcher Verlust wird mit einem auf Plasmid-Dimeren basierenden Deletionsereignis begründet, bei dem, wie im hier vorliegenden Fall, eine der Wiederholungseinheiten gemeinsam mit der Sequenz zwischen den Einheiten verloren geht (sog. 1+2-Deletion) [121; 122]. Der Wechsel des Plasmids führte dazu, dass korrekte Transformanten generiert werden konnten. Bei dem neuen Vektorsystem handelte es sich um den pET21(+)-Vektor. In diesem erfolgt die Transkription durch die T7-Polymerase, die in der chromosomalen DNA der verwendeten Expressionsstämme codiert ist (sog. DE3-Stämme) und deren Proteinbiosynthese wie das Zielgen selbst durch IPTG induzierbar ist. Eine Basalexpression wird hier nicht erwartet und konnte auch nicht beobachtet werden (vgl. Rosetta Abb. I.4 und R5C3.2h Abb. I.6). Die Frage, warum die Überexpression in Rosetta-Zellen induzierbar war, jedoch nicht in BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS, kann abschließend nicht geklärt werden. Die *E.coli*-Stämme unterscheiden sich im Vorhandensein des Plasmids für sechs seltene t-RNAs. In der Gensequenz des R5-Peptids und seinem Übergang in das LHCP-Gen finden sich jedoch keine seltenen Codons. Im LHCP-Gen jedoch befinden sich zwei seltene Codons für Arginin. Dies scheint in *E.coli*-Stämmen ohne pRARE-Plasmid bei einem unmodifizierten LHCP-Gen keinen negativen Einfluss zu haben. Möglicherweise tritt bei der Kombination aus Modifizierung mit R5-Gen und seltenen Codons im LHCP-Gen, die zu einer Translationsverzögerung führen, ein nachteiliger Effekt auf die Proteinexpression auf. Vorstellbar wäre, dass bei Erreichen des seltenen Codons (Triplet 95 des R5C3.2h-Gens) eine Verzögerung der Translation einen negativen Einfluss des bereits gebildeten polykationischen N-terminalen Bereichs auf das Ribosom und den Expressionsprozess auswirkt und dieser so abgebrochen wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die R5-Gen-Modifikation am LHCP-Gen einen negativen Einfluss auf Wirtszellen besitzt, welcher sich bei einer vorhandenen Basalexpression auf die Transformation genetisch erwünschter Mutageneseprodukte negativ auswirken kann und auch die IPTG-induzierte Proteinüberexpression besonders in nicht-optimalen Lebensstadien der Bakterien beeinflusst.

4.2. Präparation trimerer R5C3.2h

Eine Frage, die es zu beantworten galt, war, ob der N-terminal um das R5-Peptid verlängerte R5C3.2h weiterhin das Vermögen besitzt, zu rekonstituieren. Dass ein verlängerter N-Terminus die Rekonstitution nicht beeinflusst, war schon durch den Vorläufer-LHCII (pLHCP) bekannt, der auch mit dem vorhandenen Präpeptid für den Chloroplastenimport erfolgreich rekonstituiert werden kann [43] und auch in Chloroplasten-Lysaten korrekt in der Thylakoidmembran assembliert wird [123]. Jedoch besitzt die R5-Peptidsequenz eine besonders hohe Dichte an positiven Ladungen (4 Lysine und 2 Arginine), die möglicherweise elektrostatische Wechselwirkungen mit Bereichen hoher negativer Ladungsdichte des LHCII eingehen können (hier z.B. der Bereich zwischen Aminosäure 145 und 172: 6 saure Aminosäuren). Die polykationische Modifikation hat allerdings keinen negativen Einfluss, da sich R5C3.2h rekonstituieren lässt (vgl. Abb. I.7). Bei der Auftrennung von R5C3.2h-Rekonstitutionsansätzen im Dichtegradienten zeigten sich dem C79Sh vergleichbare Bandenmuster und auf dem schwach denaturierenden PAA-Gel trat eine monomertypisch laufende Bande auf, deren CD-spektroskopische Untersuchung das Vorhandensein eines korrekt gefalteten monomeren Komplexes bestätigte (vgl. Abb. I.12).

Dass eine polykationische Modifikation des N-Terminus einen negativen Einfluss haben kann, zeigt die Mutante 5RC3.2h. Diese trägt eine in ihrer Abfolge umgekehrte R5-Sequenz. Die Umkehrung bedingt eine terminale Verschiebung von positiven Ladungen; vier der ersten acht Aminosäuren vom N-Terminus betrachtet haben basischen Charakter (bei R5C3.2h nur zwei unter den ersten zehn). Je weiter man sich N-terminal des LHCII bewegt, desto größere Flexibilität erwartet man von diesem Bereich. Möglicherweise trägt die Sequenzumkehr dazu bei, dass elektrostatische Wechselwirkungen derart ausgebildet werden können, dass das Konstrukt deshalb nicht rekonstituieren kann (vgl. Abb. I.14). Die Tatsache, dass im Gradienten der Rekonstitution vergleichbare Banden (X-markiert) auftreten, legt nahe, dass es zu einer Assoziation von 5RC3.2h-Apoprotein und Pigmenten kommt, die Pigmente jedoch nicht in ein gefaltetes Proteingerüst eingelagert werden. Im schwach denaturierenden PAA-Gel ist auf Laufhöhe des Coomassie-gefärbten Apoproteins keine grüne Pigmentierung zu erkennen. Eine Trennung dieser instabilen oder unspezifischen Protein-Pigment-Assoziation scheint auch durch den OG-Waschpuffer während der Reinigung auf der Ni-Säule stattzufinden.

Die Darstellung von R5C3.2h-Trimeren konnte dennoch nicht nach Standardprotokoll erfolgen, da sowohl beim Einlaufen in die Ni-Säule, bei der Elution von selbiger und der Auftrennung im Saccharosedichtegradienten Aggregate auftraten (vgl. 3.2, 3.3.3.1). Die Behandlung solcher Aggregate aus einem Saccharosedichtegradienten mit salzhaltiger Detergenzienlösung (vgl. Abb. I.9) zeigte im schwach denaturierenden Gel, dass diese aus freiem Pigment, Monomeren und Trimeren bestehen. Auch das CD-Spektrum deutet in die Richtung, dass es korrekt gefaltete Komplexe sind, die sich in den Aggregaten befinden (der nur schwach ausgeprägte Peak bei 474 nm weist auf eine Mischung von Monomeren und Trimeren hin). Anders als bei in der Literatur häufig beschriebenen Aggregationen, die auf einer Zusammenlagerung aus einer nicht-nativen Konformation beruht und nahezu irreversibel ist [124], aggregieren hier die Komplexe aus ihrer nativen Konformation heraus und die Rücklösung ist möglich.

Wodurch ist die Aggregation im Falle von R5C3.2h bedingt? Es ist bekannt, dass es durch anisotrope Ladungsverteilungen zu elektrostatischen Protein-Protein-Wechselwirkungen kommen kann, die in einer Aggregation münden, insofern die Anziehungskraft intermolekulare Abstoßungen überlagert [125; 126]. Eine solche anisotrope Ladungsverteilung ist schon in der nativen Struktur LHCII gegeben: Sechs der ersten 23 N-terminalen Aminosäuren (stromale Seite des LHCII) besitzen basischen Charakter und bedingen in diesem Bereich eine positive Ladungsdichte (Abb. I.19, blaue Bereiche), während die stromale Schleife (~ Position 145 bis 172) mit sechs sauren Aminosäuren eine negative Ladungsdichte aufweist (rote Bereiche).

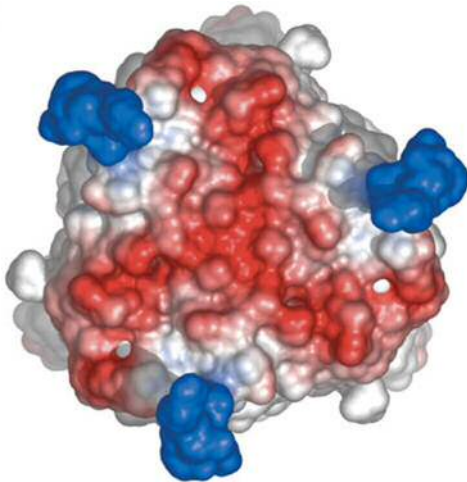


Abb. I.19: Stromale Ladungsdichteverteilung des LHCII
Positive Ladungsdichten sind blau, negative rot gekennzeichnet. Die Lage des N-Terminus (Aminosäure 1-9) ist modelliert aus dem sequenzgleichen ribosomalen Protein L39E. Abbildung aus: Standfuss *et al.* [24].

Standfuss *et al.* postulieren für diese beiden Bereiche eine entscheidende Rolle in der Stapelung der Granathylakoide durch elektrostatische Wechselwirkungen [24]. Eine intertrimere Wechselwirkungsmöglichkeit wird im R5C3.2h vermutlich deutlich verstärkt, da die Einführung der R5-Sequenz sechs zusätzliche basische Aminosäuren mit sich bringt und so die N-terminale positive Ladungsdichte deutlich erhöht. Dieser Effekt der Aggregation tritt bei nicht-R5-modifiziertem LHCII nicht auf, so dass dieser maßgeblich der R5-Sequenz zugeschrieben werden kann. Eine auf elektrostatischer Attraktion beruhende Agglomeration von Komplexen ist daher sehr wahrscheinlich. Hierfür spricht auch die Tat-

sache, dass die Aggregation reversibel durch Erhöhung der Ionenstärke auflösbar ist und durch direkte Beigabe von LiCl bzw. NaCl zu den Rekonstitutions- und Trimerisierungsansätzen sowie den Saccharosedichtegradienten drastisch reduziert wird. Bei der Rekonstitution der Komplexe spielen diese elektrostatischen Komponenten keine Rolle, da diese unabhängig von LiCl zu monomeren Komplexen führt (vgl. Abb. I.11). Die Wirkung des LiCl kommt bei der Bindung der Komplexe an der Ni-Säule zum Tragen. Kommt es ohne LiCl noch zu massiver Aggregatbildung am oberen Rand des Säulenmaterials, wird dies in Anwesenheit von LiCl drastisch reduziert. Die zusätzlichen Salzionen führen an dieser Stelle vermutlich dazu, dass eine intertrimere elektrostatische Interaktion von N-Terminus und stromaler Schleife nicht ausreichend ausgebildet wird. Li^+ -Ionen haben bedingt durch ihren geringen Ionenradius eine hohe Ladungsdichte. Diese führt zu einer starken Hydratisierung. Die Carboxylatgruppen von Aspartat und Glutamat besitzen einen ähnlich hohen Grad an Hydratisierung, weshalb sie ein idealer Wechselwirkungspartner für Li^+ sind. Bei den Cl^- -Ionen liegt eine eher schwache Hydratisierung vor, welche sehr gute Interaktionsmöglichkeiten mit den ebenfalls schwach hydratisierten Arginin- und Lysinresten bietet [127]. Durch diese beiden ionischen Abschirmungseffekte sowohl im stromalen Schleifenbereich als auch am N-Terminus sind deren intermolekulare Ladungswechselwirkungen stark vermindert. Kommen die Komplexe jetzt beim Einlaufen in die Säule in enge räumliche Nähe, wird die Tendenz zur Aggregation durch LiCl deutlich vermindert. Während der Trimerisierung und der Auftrennung der Komplexe in Saccharosedichtegradienten liegt der pH-Wert bei 7,5 und damit über dem pI des Komplexes (für R5C3.2h etwa 6,7 => zur Bestimmung siehe Anhang 8.1). Unter diesen Bedingungen spielt vor allem die Interaktion von Cl^- mit den positiv geladenen Aminogruppen der N-terminalen Aminosäuren eine entscheidende Rolle in der Ladungsabschirmung¹²⁸. Es ist bekannt, dass NaCl bei einer ganzen Reihe von Enzymen (sowohl bei saurem als auch basischem pI des Proteins) ab einer gewissen Mindestkonzentration ($\sim 0,3$ M) zu einer konzentrationsunabhängigen Protein-Protein-Abstoßung führt [129].

Da unter den gegebenen Bedingungen die direkte Hofmeister Reihe gilt¹²⁸, könnte der kosmotrope Effekt der Ionen HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} und Acetat in den jeweiligen Gradientenpuffern (vgl. Abb. I.8) ein Erklärungsansatz für die starke Aggregation der Komplexe in den entsprechenden Gradienten sein. Überlagern diese die Eigenladung des Proteins, so können sie über ihre Gegenionen eine Protein-Protein-Interaktion herbeiführen. Es ist hier allerdings anzumerken, dass die Pufferkonzentration relativ gering war und die Menge an zusätzlich appliziertem NaCl um einen Faktor fünf unterschritt.

An dieser Stelle muss einschränkend beachtet werden, dass Protein-Protein-Interaktionen nicht nur auf elektrostatischen Wechselwirkungen und Hydratationseffekten beruhen, sondern auch van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen beinhalten, die ein Aggregationsverhalten beeinflussen. Hinzu kommt, dass in den meisten Studien die salzabhängige Löslichkeit eines bestimmten Proteins diskutiert wird. Diese kann allerdings nicht direkt auf andere Proteine übertragen werden [129].

Ein generelles Problem bei der Verwendung von höheren Salzkonzentrationen in Frier-Tau-Dichtegradienten besteht darin, dass der Schmelzpunkt herabgesetzt wird. Dies spiegelt sich in einer deutlich verkürzten Auftauphase der Saccharosedichtegradienten wider. Diese verkürzte Auftauzeit kann dazu führen, dass die Trennschärfe der Saccharosegradienten deutlich schlechter wird. Als Folge daraus findet eine suboptimale Auftrennung von Monomeren und Trimeren statt (vgl. Abb. I.10). Der Effekt der Schmelzpunktniedrigung durch Salzzugabe ist bei präparativen Gradienten größer als bei analytischen. Bei den präparativen Gradienten entspricht die Zugabe von 0,5 M NaCl einer Erhöhung der osmotisch aktiven Teilchen um den Faktor 4,2, bei den analytischen nur um den Faktor 2,4. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass die Trennschärfe bei präparativen Gradienten stärker negativ beeinflusst wird durch Salzzugabe als bei analytischen. Die refraktometrische Bestimmung der Saccharosekonzentration ergab, dass diese im Trimerbandenbereich bei präparativen Gradienten nur etwa bei $3/8$ der Konzentration der entsprechenden analytischen Gradienten lag. Die niedrigere Saccharosekonzentration an sich könnte sich bereits nachteilig auf das Verhindern von Aggregaten auswirken. Es ist bekannt, dass Saccharose einen stabilisierenden, also aggregationseinschränkenden, Effekt auf Proteine ausüben kann [130;131]. Dieser Effekt nimmt mit steigender Saccharosekonzentration zu. Letztendlich würde eine R5C3.2h-Aggregation bevorzugt in niedrigerer Saccharosekonzentration, also in präparativen Gradienten, ablaufen.

Hinzu kommt, dass sich innerhalb der Lösung auch ein Gradient an Detergenz einstellen kann (unveröffentlichte Daten S. Hobe), was die Löslichkeit des LHCII in einer ganz anderen Hinsicht als oben diskutiert negativ beeinträchtigen kann. Durch die Verwendung von selbstgegossenen Gradienten wird verhindert, dass sich ein Gradient anderer Stoffe innerhalb des Saccharosegradienten einstellen kann.

Unter Verwendung salzhaltiger Lösungen während der Rekonstitution, der Trimerisierung und der Auftrennung bilden sich zwei klare Komplexbanden im Saccharosegradienten und die Aggregation wird minimiert. Die Analyse der Banden ergab CD-Spektren, die einen jeweils für monomere und trimere LHCII typischen Verlauf aufweisen. Auch die Energiweiterleitung innerhalb der Komplexe von Chlorophyll *b* auf Chlorophyll *a* ist quantitativ und auf dem schwach denaturierenden PAA-Gel ist das typische Laufverhalten von Monomeren und Trimeren zu erkennen (vgl. Abb. I.10, Abb. I.12., Abb. I.13). Die N-terminale Addition der R5-Sequenz erlaubt also eine erfolgreiche Gewinnung von Trimeren. Auch ist die Integrität des Komplexes durch das Vorhandensein der polykationischen Modifikation bei thermischen Belastungen nicht negativ beeinflusst, denn die mittels CD-Spektroskopie im Temperaturgradienten ermittelte Schmelztemperatur weicht nicht von der des C79Sh nach unten ab.

Damit stehen polykationisch modifizierte Komplexe zur Verfügung, die auf ihr Vermögen hin getestet werden sollen, Silikat eigenständig zu formen und so einen Selbsteinschluss in dieses zu ermöglichen.

4.3. Silikatfällungseigenschaften des R5C3.2h

R5C3.2h sollte sich selbstständig in eine Silikatmatrix einbetten. Mit löslichen Proteinen/Enzymen ist dieses Procedere hinlänglich bekannt [116; 102; 115; 114]. Die Gemeinsamkeit dieser Publikation ist, dass lösliche Proteine/Enzyme mit der polykationischen R5-Sequenz fusioniert sind. Bei R5C3.2h handelt es sich allerdings um einen Detergenz-gelösten Membrankomplex. Des Weiteren wurde in den vorliegenden Versuchen nur bei einem Fünftel der Kieselsäurekonzentration gearbeitet, um die Konzentration des TMOS-Hydrolysebeiprodukts Methanol möglichst gering zu halten und einen autopolykondensatorischen Effekt zu vermindern.

Bei einer 30-minütigen Inkubation von R5C3.2h wurde keine Bildung von präzipitierbarem Silikat festgestellt. Wurde diese Reaktionszeit auf 16 h ausgedehnt, konnten bei erhöhter R5C3.2h-Konzentration die Bildung von Präzipitaten beobachtet werden (Abb. I.16). Diese fand sowohl im kationischen Puffer Tris als auch im anionischen Phosphatpuffer statt (bei 7,5 und 5 μ M Komplexkonzentration, bei 2,5 μ M nur in Tris). Eine Inkubation unter gleichen Bedingungen mit dem nicht-R5-modifizierten Komplex C79Sh führte unter keinen Bedingungen zu einer Präzipitatbildung. Damit kann die Silikatformation und der damit verbundene Einschluss an Komplexen in die Silikatstrukturen direkt dem Vorhandensein der R5-Sequenz zugeordnet werden. Die Integrität des Komplexes wird bei dem Prozess des Silikateinschlusses nicht beeinflusst, da eine quantitative Energieweiterleitung auf Chl *a* gegeben ist. Problematisch waren in diesen Experimenten der Nachweis des Stabilisierungsvermögens gegenüber thermischen Belastungen, da die Probenumfänge sehr klein waren und die Tendenz zur Auflösung des Silikats deutlich gegeben war (Näheres zur Auflösung des Silikats: Kapitel II). Insgesamt zeigten die Komplexe nach 24-stündigem Stress bei 50°C eine deutliche Chl *b*-Schulter, die auf eine Schädigung des Komplexes hinweist. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Reaktionstemperatur sein: Auch in Copräzipitationsansätzen konnte beobachtet werden, dass bei RT eingeschlossene LHCIi deutlich stabiler gegenüber dem nachfolgenden Hitzestress waren als die in der Kälte präzipitierten (vgl. Kapitel II 3.1.1). Die REM-Aufnahme des Präzipitates zeigte, dass sich keine klar definierten partikulären Strukturen bildeten, wie sie bei den Copräzipitationen in Kapitel II auftraten. In einer solchen eher massiven Silikatstruktur scheint die lokale Umgebung des LHCIi nachteilig für dessen Integrität während Hitzeinkubation zu sein. Nimmt man die Hypothese aus Kapitel II an, dass sich die Komplexe in den Interpartikularräumen befinden, so ist das Fehlen dieser eine mögliche Erklärung für die ausbleibende Stabilisierung der Komplexe in der nicht-partikulären Silikatstruktur. Dennoch zeigte R5C3.2h, wie in Kapitel II dargestellt, durchaus vorteilhafte Eigenschaften hinsichtlich Silikateinschlussverbindungen: In Spermin-induzierten Copräzipitationen war das Ausmaß des Einbaus signifikant erhöht und das Maß der Stabilisierung unter bestimmten Pufferbedingungen auch gesteigert.

Zu klären bleibt, warum im Vergleich zur Literatur (hier: 2 min [102; 114] bzw. 5 min [115]) eine drastisch erhöhte Reaktionszeit von Nöten ist, um erfolgreich Selbsteinschlussverbindungen zu gene-

rieren. Dabei spielt sicherlich eine Rolle, dass die Ansätze hier bei deutlich geringeren Konzentrationen – sowohl von Fusionsprotein als auch von Kieselsäure - durchgeführt wurden als in der Literatur beschrieben: Marner *et al.* setzten sämtliche Fusionsproteine/-enzyme in Konzentrationen über 100 μM ein [114], Nam *et al.* liegen zwar mit 21,5 μM deutlich niedriger [115], dennoch einen Faktor drei über den höchsten R5C3.2h Konzentrationen. Die Kieselsäurekonzentration lag auch um einen Faktor fünf niedriger in den R5C3.2h-Ansätzen. Letzteres wirkt sich direkt auf die Kinetik der Silikat Kondensation aus, da eine Konzentrationsabhängigkeit der Kinetik und Thermodynamik chemischer Reaktionen besteht. Verstärkt wird dieser Effekt durch die Absenkung der Reaktionstemperatur zum Schutz des Lichtsammelkomplexes vor thermischen Schädigungen im nicht-silikateingeschlossenen Zustand.

Die Analyse der Funktion des R5C3.2h ist nicht trivial, da seine Rolle im Reaktionssystem n Kieselsäure \Rightarrow Silikat_n schwierig festzulegen ist. Dabei werden den polykationischen Aminoverbindungen generell zwei grundsätzliche Rollen zugesprochen: Ein Deprotonierungs-Protonierungsmechanismus von Silanolgruppen soll die nucleophile Substitution einer Kieselsäure-Hydroxylgruppe durch eine Silanolgruppe erleichtern, was zur Ausbildung einer Siloxanbindung führt (katalytischer Effekt). Zum anderen sollen die polykationischen Agenzien dazu beitragen, dass kleine Silikatspezies in räumliche Nähe gebracht werden und so ihre intermolekulare Abstoßung aufgehoben und eine Formation größerer Partikel möglich wird [132]. Für das R5-Peptid wird sowohl ein Zusammenspiel beider Mechanismen postuliert [100] als auch eine hervorgehobene Rolle in der Unterstützung der Aggregation von niedermolekularen Silikatspezies [133]. Hierbei wird eine phosphatabhängige Selbstassemblierung des R5-Peptides beschrieben, die dazu führt, dass es Silikat präzipitiert [95; 113]. In allen erwähnten Publikationen, die lösliche Fusionsproteine/-enzyme in Silikat einschlossen, wurde entsprechend Phosphatpuffer verwendet [102; 114; 115; 116]. R5C3.2h zeigt neben einer Silikatbildung in Phosphat jedoch auch eine Bildung präzipitierbarer Strukturen im phosphatfreien Tris-Ansatz (die pH-Werte entsprachen sich bei Phosphat und Tris, ein pH-Einfluss ist daher auszuschließen). Für freies R5-Peptid wurde postuliert, dass besonders das Motiv „RRIL“ als Assemblierungssequenz dient [112]. Allerdings schränken Bassindale *et al.* diese Argumentation dahingehend ein, dass sie eher die Rolle der beiden Arginine in der Bereitstellung positiver Ladungen sehen. Sie geben an, dass Enzyme mit einem $pI > 10,5$ Silikatpräzipitation zeigen; der pI des R5 ohne das RRIL-Motiv lediglich diese Grenze unterschreite, wodurch es zu einem Funktionsverlust komme [134].

Hieraus ergeben sich für den R5C3.2h zwei Fragen: Wie kann es im Fusionsprotein zu einer R5-Assemblierung kommen, vor allem unter phosphatfreien Bedingungen und wie kann ein Kondensationsereignis eintreten, wo der R5C3.2h- pI bei etwa 6,7 und damit deutlich unter dem postulierten Wert von 10,5 liegt? Zur Erläuterung des Assemblierungspotentials des R5C3.2h sollte man sich die Struktur des trimeren Komplexes vor Augen führen. Der N-Terminus eines jeden Monomers liegt auf der stromalen Seite des Komplexes, d.h. alle R5-Modifikationen befinden sich per se auf der gleichen Seite des detergentzelösten Trimers. In der Kristallstruktur konnte allerdings nicht die genaue Positio-

nierung der ersten neun Aminosäuren aufgelöst werden [24], was vermutlich an einer erhöhten Flexibilität dieses Bereichs liegt. Dies konnte durch eine breite Abstandsverteilung in EPR-Vermessungen N-terminaler Bereiche bestätigt werden [40]. Nimmt man die Position der 10. Aminosäure Alanin in der Kristallstruktur als fix an, so beschreiben diese ein gleichseitiges Dreieck mit einer Kantenlänge von etwa 63 Å. Hieraus resultiert eine minimale Distanz zum Schwerpunkt des Dreiecks von etwa 36 Å. Diese Distanz kann hypothetisch von den 9 restlichen LHCII-Aminosäuren und den 19 Aminosäuren des R5-Peptides überbrückt werden. Die Möglichkeit zur Interaktion der R5-Sequenzen sollte also theoretisch gegeben sein.

Da es aber unabhängig von der Anwesenheit des als Interaktionsvermittlers geltenden Phosphats zu einer Bildung von präzipitierbarem Silikat kommt, ist es fraglich, ob eine solche Assemblierung überhaupt notwendig ist. Möglicherweise ist es ausreichend, wenn auf der stromalen Seite des Komplexes nach und nach niedermolekulare Silikatspezies durch die R5-Sequenzen zur Reaktion gebracht werden. Im Laufe der relativ langen Reaktionsdauer kann es so zu einer lokalen Anhäufung von Silikat kommen, die irgendwann die kritische Partikelgröße zur Präzipitation überschreitet. Dieser Prozess wird dadurch unterstützt, dass mit zunehmendem Oligomerisierungsgrad des Silikats der pK_s -Wert der Silanolgruppen sinkt und so die Ausbildung von Siloxanbindungen erleichtert wird. Bleibt zu diskutieren, wie ein Proteinkomplex mit einem Gesamt-pI von etwa 6,7 dennoch in der Lage ist, Silikat zu präzipitieren, was der Hypothese von Bassindale *et al.* widerspricht ($pI > 10,5$ nötig für Kondensation) [134]. Allerdings ist in genannter Arbeit auch ein Enzym (*Candida antarctica* Lipase A) mit einem pI von 7,5 beschrieben, das Silikat präzipitiert. Begründet sei dies durch eine lokale Ladungsdichteverteilung. Dies dürfte auch für R5C3.2h gelten, denn die isolierte Betrachtung der ersten 51 Aminosäuren des Komplexes ergibt einen pI von etwa 10,9. Damit dürften auf der stromalen Seite des Komplexes Bereiche existieren, die die Bildung von Silikat im gegebenen Reaktionszeitraum ermöglichen. Dies unterstützt zudem die Hypothese der lokalen Anreicherung von Silikatpartikeln bis zum Überschreiten einer kritischen Partikelgröße.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Modifikation des LHCII mit der polykationischen R5-Sequenz diesem silikatfällende Eigenschaften verleiht. Die Art und Weise des Einschlusses der Komplexe führt allerdings nicht zu einer signifikanten Stabilisierung hinsichtlich thermischer Belastungen. Diese kann allerdings – auch bzw. vor allem mit R5-modifiziertem LHCII – durch Copräzipitationen mit Spermin erreicht werden, was im folgenden Kapitel dargestellt wird.

II. Kapitel: Copräzipitation von LHCII und Spermin

1. Einleitung

Für die Immobilisierung von Enzymen/Proteinen mittels Sol-Gel-Prozess werden relativ hohe Mengen an Kieselsäurevorläufern wie TMOS eingesetzt (im molaren Bereich, siehe allgemeine Einleitung). Bei deren Hydrolyse können Enzym-schädigende Nebenprodukte (hier Methanol) entstehen. Ein Einschluss unter Verwendung polykationischer Verbindungen als Katalysator für die Kieselsäurekondensation ermöglicht eine drastische Reduzierung der Vorläufer-Konzentration bei gleichwohl schneller Polymerisation. Dabei wird das zu immobilisierende Enzym/Protein einfach mit der polykationischen Verbindung vermischt und die Reaktion durch Kieselsäurezugabe gestartet. Bei dem anschließenden Silikatbildungsprozess werden die Enzyme/Proteine in hohen Ausbeuten immobilisiert, wobei ihre Aktivität erhalten bleibt und ein gesteigerter Schutz vor thermischer Inaktivierung besteht [76; 135; 136]. Als Substanzen zur Silikatbildung kommen dabei sowohl Peptide wie R5 oder verschiedene Polyamine zum Einsatz. Auch natürlich vorkommende Oligoamine wie Spermin besitzen Silikat-fällende Eigenschaften [104]. Spermin ist ein natürlich vorkommendes polykationisches Oligoamid, das maßgeblich zur Stabilisierung der DNA in Spermien beiträgt (siehe Abb. 1. 6 D). Der Vorteil von Spermin ist, dass es kostengünstig in reiner Form erworben und so direkt eingesetzt werden kann. Belton *et al.* wiesen für Spermin und andere polykationische Oligoamine nach, dass durch die Variation des N:Si-Verhältnisses – ergo Oligoamin zu Kieselsäure-Verhältnis – die Partikelgröße gelenkt werden kann (steigendes Verhältnis führt zu größeren Partikeln) [104].

Abb. II.1 zeigt den prinzipiellen Ablauf einer Copräzipitation von rekombinantem LHCII und Spermin in Kieselsäurelösung. Der Einschluss von rekombinantem LHCII in einer Spermin-vermittelten Copräzipitation sollte optimiert werden. Die eingeschlossenen Partikel sollten auf ihr Immobilisierungsvermögen und ihre Thermostabilität hin getestet werden. Hierbei sollten Zusammenhänge mit den Silikatstrukturen analysiert und Beeinflussungsmöglichkeiten der Silikatstruktur aufgezeigt werden.

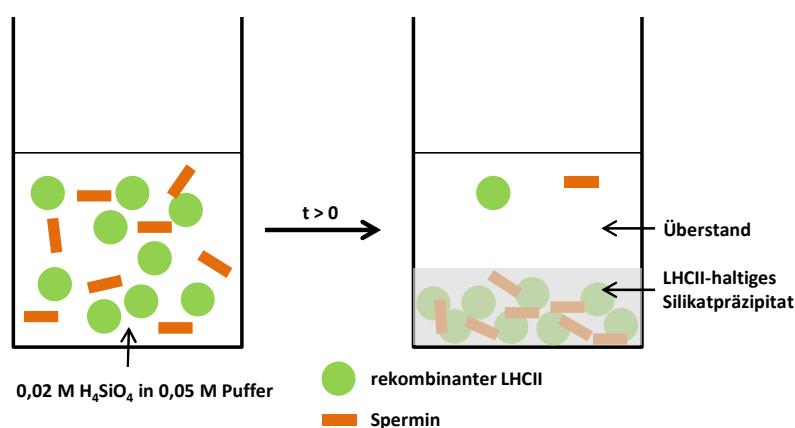


Abb. II.1: Copräzipitation von LHCII und Spermin

Prinzipieller Ablauf einer Copräzipitation von rekombinantem LHCII (grün) und Spermin (orange) in Kieselsäurelösung.

2. Material und Methode

2.1. Material

2.1.1. Farbstoff

LHCP wurde mit dem Farbstoff DY-731 (Abb. II.2) der Firma Dyomics GmbH, Jena, markiert. Der Farbstoff besitzt einen molaren Extinktionskoeffizienten von $240000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ in Ethanol. In diesem Lösungsmittel absorbiert er maximal bei 736 nm und emittiert maximal bei 760 nm. Löslichkeit besteht in Wasser, Methanol, Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid. Im Rahmen dieser Arbeit wurde DY-731 mit einer Maleimid-Funktionalisierung verwendet, um an Cysteine gebunden zu werden.

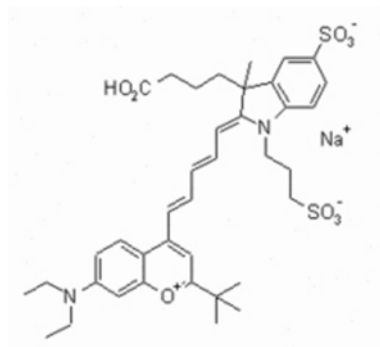


Abb. II.2: Grundstruktur des Farbstoffs DY-731

Farbstoff DY-731 ohne funktionelle Gruppe dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit mit einer Maleimid-Funktion verwendet. Abbildungsquelle: Dyomics GmbH, Jena.

2.1.2. LHCII-Varianten

In diesem Kapitel wurden drei Varianten des LHCII verwendet, die in Tab. II.1 zusammengefasst sind.

Tab. II.1: Übersicht verwendeter LHCII-Varianten Kapitel II

Variante	Beschreibung
C79Sh	Entspricht der nativen LHCP-Sequenz mit Austausch Cys an Position 79 gegen Ser und C-terminalem His ₆ -Tag
R5C3.2h	Entspricht der nativen LHCP-Sequenz mit C-terminalem His ₆ -Tag und N-terminal angehängter Sequenz des R5-Peptides (siehe Kapitel I)
ΔN11-h	N-terminale Deletion der ersten 11 Aminosäuren, C-terminaler His ₆ -Tag

Zur Übersichtlichkeit und Verständlichkeit für externe Leser wurde im Rahmen dieses Kapitels C79Sh auch als LHCII, R5C3.2 als R5LHCII und ΔN11-h als ΔNLHCII bezeichnet.

2.2. Methoden

In diesem Kapitel befindet sich die Veröffentlichung „Silica encapsulation of a recombinant light-harvesting complex (LHCII) yields energy conducting hybrid material with significant heat stability“

eingefügt. Die methodischen Durchführungen zu Copräzipitation, Nachbindung von Komplexen an Silikat, Farbstoffmarkierung von LHCII, Präparation von REM-Proben, Quantifizierung von LHCII mittels analytischer HPLC und Berechnungen der Einbauraten sind entsprechend dort nachzulesen. Im Folgenden sind die Methoden zusammengefasst, die für die weiteren Versuchsergebnisse dieses Kapitels von Relevanz sind.

2.2.1. Molybdat-Blau-Test

NaOH	1 M	
<u>Molybdat-Mischreagenz</u>		
1 Teil Molybdatlösung	0,16 M	$[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{27} \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$
1 Teil H_2SO_4	3,6 M	
Oxalsäure	0,79 M	
Ascorbinsäure	0,1 M	

Für die Quantifizierung von Silikat wurde der Molybdat-Blau-Test nach Iler verwendet [98]. Hierbei werden monomere oder dimere Silikatspezies nachgewiesen, die einen Komplex mit Molybdat eingehen. Dabei bildet sich ein gelber Heteropolysäurekomplex, der durch Ascorbinsäure zur blauen Form reduziert wird. Dieser ist bei 810 nm fotometrisch quantifizierbar. Silikate höheren Grades können durch NaOH depolymerisiert werden und so ebenfalls nachgewiesen werden. Durch die Unterscheidung von hydrolytischen (+ NaOH) und nicht-hydrolytischen Bedingungen (- NaOH) können Rückschlüsse auf die Silikatspezies einer Lösung gezogen werden. Der Molybdat-Blau-Test wurde im Rahmen dieser Arbeit entweder in 1 cm Glasküvetten am Fotometer oder in 96-Well-Mikrotiterplatten im Plattenreader quantifiziert. Die Methoden unterscheiden sich chemisch nicht, lediglich die Vorgehensweise ist etwas unterschiedlich und soll nachfolgend differenziert werden.

Grundsätzlich werden drei Parallelansätze für jede zu vermessende Probe durchgeführt. Zu 5 μl der zu quantifizierenden Lösung wurden 5 μl NaOH (hydrolytisch, dies ergibt eine Endkonzentration von 0,5 M in 10 μl , was für die Reaktionen hier ausreichend ist. Generell sollte die Konzentration an NaOH 1 M in 10 μl betragen) bzw. $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ (nicht-hydrolytisch) gegeben und für 30 min inkubiert. Hierzu wurden im Anschluss 990 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ und 20 μl Molybdat-Mischreagenz hinzugefügt und vermischt. Den Ansatz ließ man für 15 min ruhen, bevor je 20 μl Oxalsäure- und Ascorbinsäurelösung bei zwischenzeitlichem Vortexen hinzugegeben wurden. Nach weiteren 20 min Inkubationszeit konnte die fotometrische Vermessung der Proben bei einer Wellenlänge von 810 nm durchgeführt werden. Im Fotometer wurden 1 cm Küvetten verwendet und eine entsprechende Eichgerade für diese Bedingungen aufgenommen. Bei der Verwendung des Tecan infinite M1000 wurden exakt 200 μl der Lösung in die Mikrotiterplatten pipettiert. Die entsprechende Eichgerade wurde mit dem gleichen Volumen erstellt. Dieses Vorgehen war nur bei Verwendung von Detergenz-freien Proben möglich, da deren An-

wesenheit konzentrationsabhängig die Oberflächenspannung beeinflusste und daher auch die Weglänge des Messstrahls.

Die Referenz für die Vermessung wurde exakt so angesetzt wie für die Probenbearbeitung beschrieben, da schon eine kleine Abweichung hinsichtlich der NaOH-Konzentration zu starken Verzerrungen der Messergebnisse führt. Besonders entscheidend war, dass die entsprechenden Puffer gemäß ihrer Konzentration in diesen Referenzen verwendet wurden.

Die Eichgerade wird nach folgendem Prinzip erstellt:

Zunächst wird ein Si-Standard mit der Konzentration 1 mM in alkalischer Lösung (NaOH) angesetzt. Von dieser werden 0-10 µl mit 1 M NaOH auf 10 µl aufgefüllt und die Nachweisreagenzien wie oben beschrieben hinzugefügt. Mit dieser Probenreihe kann fotometrisch (s.o.) die Eichgerade erstellt werden. Die für die Auswertungen verwendete Eichgerade befindet sich im Anhang.

2.2.2. Pigmentextraktion aus LHCII-Silikat-Copräzipitaten

Lösepuffer (Lp)

Tris ^{9,5}	0,05 M
LM	0,1 %

Butan-2-ol	p.A.
------------	------

Die Methode der Extraktion von Komplexen aus Silikat wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Die optimierte Methode soll im Folgenden zusammengefasst werden. Es handelt sich dabei nicht um eine Extraktion von intakten Komplexen, sondern vielmehr um das Herauslösen der Pigmente, welche anschließend mittels analytischer HPLC (siehe 3.2.1.2.B)) quantifiziert wurden. Die Komplexmenge wurde über den Gehalt an Lutein und die Stöchiometrie von 2 Luteinen pro Monomer bestimmt.

Das Pellet eines 100 µl-Fällungsansatzes (hier in 1 µM LHCII; 0,02 M Kieselsäure) wurde in 250 µl Lp gründlich resuspendiert. Hierzu wurde das gleiche Volumen Butan-2-ol gegeben und erneut gründlich gevortext. Das Eppendorfgefäß wurde auf dem Kopf stehend für drei Stunden geschüttelt und anschließend für 2 min mit 17500 x g zentrifugiert. Hierbei trat eine Phasentrennung zwischen pigmenthaltiger Butanolphase und wässriger Hypophase auf. Das Pellet sollte sich während der Inkubation auflösen bzw. vollständig entfärben. Die Butanolphase wurde anschließend einmal mit 400 µl H₂O_{dest} versetzt und gevortext. Nach der Phasentrennung (30-sekündige Zentrifugation bei 17530 x g) wurde die Butanolphase abgezogen und gravimetrisch quantifiziert. Die anschließende Analyse erfolgte wie in einer Standard-Butanolextraktion (beschrieben in 3.2.1.5.B)).

2.2.3. Zugänglichkeitsexperimente

Um zu testen, wie gut zugänglich Silikat-eingebetteter LHCII ist, wurden verschiedene Substanzen mit diesem inkubiert, deren negative Effekte auf den Komplex bekannt sind. Hierzu wurde LHCII wie

in II.3.2 beschrieben unter Tris^{6,0} und Phosphat^{7,5}-Bedingungen copräzipitiert. Die Pellets wurden in 100 µl WP (0,05 M Tris^{7,0}, 0,1 % LM) resuspendiert und in 96-Well Mikrotiterplatten gegeben. Es wurde im Tecan infinite M1000 ein Fluoreszenzspektrum von 600 – 750 nm aufgenommen ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm). Anschließend wurden hierzu 100 µl der verschiedenen Substanzen gegeben und gründlich gemischt. Zu definierten Zeitpunkten wurden erneut Fluoreszenzspektren gemessen. Vor jeder dieser Messungen wurde das Pellet neu resuspendiert. Mit Hilfe der manuellen Z-Positionsfestlegung wurde die Z-Position ebenfalls vor jeder Messung neu definiert, um zu garantieren, dass eine optimale Menge an Komplexen in der Messebene zu finden ist. Die Proben wurden nach der Inkubation in ein Eppendorfgefäß überführt, zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in frischem WP resuspendiert und erneut fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Folgende Agenzien kamen bei den Zugänglichkeitstests zum Einsatz; in Klammern sind dabei die Endkonzentrationen in 200 µl und die Inkubationstemperatur angegeben:

LDS	(5 % w/v, RT)
Ethanol	(30 % v/v, 50 %, RT)
Butan-2-ol	(50 % v/v, RT)
Proteinase K	(17,25 µM, 37°C)

3. Ergebnisse

Rekombinanter LHCII sollte durch Copräzipitation mit dem Tetraamin Spermin in Silikat eingeschlossen werden. Die Einschlussreaktion sollte hinsichtlich ihrer Einbaurate an LHCII, der Ausbeute an gefälltem Silikat und vor allem ihrem Potential, LHCII zu stabilisieren, charakterisiert werden.

3.1. Copräzipitation und dessen Charakterisierung

3.1.1. Präparative Aspekte

Im Rahmen dieses Unterkapitels sollen einige präparative Aspekte zusammengefasst werden, deren Ursprünge in Versuchsreihen liegen, die unter noch nicht-optimierten Bedingungen ausgeführt wurden, aber generelle Bedeutung haben bzw. zur Methodenoptimierung beitragen.

Das Tetraamin Spermin hat bei einer Konzentration von 0,1 M einen Lösungs-pH-Wert von 12. Bei der Zusammenstellung der Fällungsansätze wurde in der Regel eine Spermin-Endkonzentration von 1 mM eingestellt. Dies beeinflusste den pH-Wert der Lösung, auch bei Pufferung, vor allem wenn dieser außerhalb des optimalen Pufferbereichs lag. Bei Verwendung von 0,05 M Tris bei pH-Wert 6,0 wurde der Wert um 0,6 Einheiten im Gesamtfällungsansatz erhöht. Dieser Effekt ist bei pH 7,5 auf 0,3 pH-Einheiten reduziert. Der Effekt bei Phosphat ist etwas abgeschwächt, da der optimale Pufferbereich näher an den verwendeten pH-Werten liegt.

Coprazipitationsansätze mit gleicher Zusammensetzung wurden bei RT und bei 4°C ausgeführt. Dabei ließ sich feststellen, dass die bei 4°C gefällten Proben stets ein signifikant geringeres Vermögen besaßen LHCII zu stabilisieren (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Coprazipitationen generell bei RT durchgeführt.

Für die Vermessung der in Silikat eingeschlossenen Komplexe wurden diese sehr gründlich resuspendiert und in Glasküvetten fluoreszenzspektroskopisch vermessen. Maß man eine einmalig resuspendierte Probe, die bereits thermischem Stress unterzogen wurde, mehrfach hintereinander, so erhöhte sich die Chlorophyll *b*-Fluoreszenz kontinuierlich mit jeder Messung. Nach mehreren Messungen war zu beobachten, dass sich die grünen Silikatstrukturen am Küvettenboden angesammelt hatten. Der Überstand war dennoch grün gefärbt. In den Proben befanden sich folglich zwei verschiedene Spezies an LHCII: In Silikat eingeschlossene und herausgelöste. Wurden die Proben vor der Messung zentrifugiert, so stellte sich diese Trennung folglich ein. Vermaß man den Überstand, so detektierte man ein Fluoreszenzspektrum, das einen hohen Anteil an Chlorophyll *b*-Fluoreszenz zeigte und durch die gestörte Energieweiterleitung auf geschädigte Komplexe hinwies. Das Präzipitat wurde in frischem WP resuspendiert und vermessen. Hierbei zeigte sich, dass (innerhalb des für die entsprechenden Versuche gewählten zeitlichen Rahmens) keine signifikante Chlorophyll *b*-Fluoreszenz auftrat, die im Silikat verbliebenen Komplexe ergo keine gestörte Energieweiterleitung zeigten. Als Konsequenz daraus

wurden die Copräzipitationsansätze nach thermischem Stress (50°C) stets zentrifugiert und in frischem Puffer aufgenommen, bevor sie fluoreszenzspektroskopisch vermessen wurden.

An dieser Stelle blieb die Frage offen, ob sich LHCII während des thermischen Stresses aus dem Silikat herauslöste oder ob sich das Silikat auflöste und dabei Komplexe freisetzte. Um dies näher zu charakterisieren, war es notwendig, die Menge an gefällttem ebenso wie die Menge an nach thermischem Stress eventuell freigesetztem Silikat zu quantifizieren.

3.1.2. Quantifizierung von Silikat

Zur Quantifizierung von Silikat wurde der von Iler *et al.* etablierte Molybdat-Blau-Test verwendet [98]. Die entsprechenden Proben wurden sowohl in 1 cm Halbmikroküvetten und einem herkömmlichen Fotometer als auch in Mikrotiterplatten im Tecan Infinete M1000 Plattenreader vermessen. Letzterer kam immer dann zum Einsatz, wenn die zu vermessenden Lösungen nicht Detergenz-haltig waren. Detergenzien führten dazu, dass sich abhängig von ihren Konzentrationen die Oberflächenspannung änderte, was die Ausprägung des Meniskus und damit die zu vermessende Weglänge beeinflusste. Somit war eine auf ein bestimmtes Volumen und Füllhöhe eingestellte Eichgerade nicht mehr verwendbar.

3.1.2.1. Silikatfällungsausbeuten

Die Copräzipitation von LHCII und Spermin wurde sowohl in Tris als auch in Phosphat durchgeführt. Beide Puffer wurden mit einem pH-Wert von 6,0 und 7,5 verwendet. Die Überstände der Copräzipitationen wurden nach Zentrifugation und Abtrennung des Silikatpellets hinsichtlich ihres Silikatgehaltes quantifiziert. Aus der Differenz zwischen ursprünglich eingesetzter Menge Kieselsäure und der im Überstand detektierten wurde die im Pellet eingebaute Menge bestimmt. Dabei war zu beachten, dass Phosphatpuffer trotz der Verwendung von Oxalsäure im Molybdat-Blau-Test einen positiven Silikatnachweis ergab. Aus diesem Grund wurde für jede Einzelbedingung eine separate Referenz erstellt und vom Messwert subtrahiert. Der Anteil an ins Präzipitat eingebaute Kieselsäure ist in Abb. II.3 wiedergegeben.

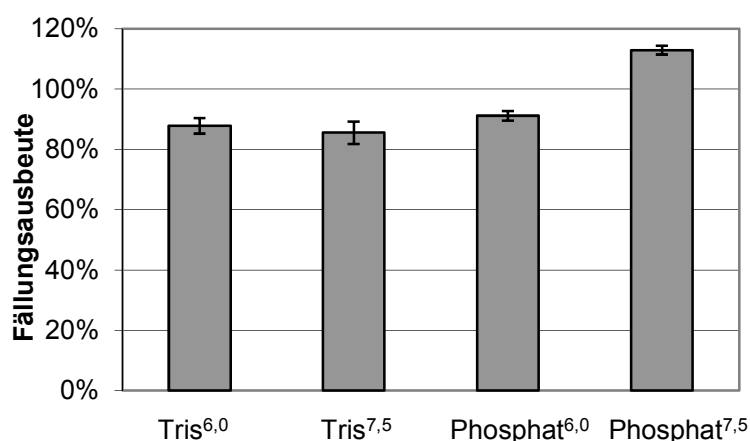


Abb. II.3: Pufferabhängige Silikatfällungsausbeuten

Aus den Überständen von Copräzipitationsansätzen bei unterschiedlichen Pufferbedingungen wurde mittels Molybdat-Blau-Test (siehe II.2.2.1) die Menge ungefällter Kieselsäure bestimmt und aus der Differenz zur ursprünglich eingesetzten Kieselsäuremenge (2 µmol in 100 µl, 1mM Spermin) die Fällungsausbeute errechnet. Es erfolgten Extinktionskorrekturen mit Silikat-freien Molybdat-testläufen. Probenumfang: Tris^{6,0} n = 9; Tris^{7,5} n = 5; Phosphat^{6,0} und Phosphat^{7,5} n = 4.

In Tris wurden relativ ähnliche Mengen an Kieselsäure in das Silikatnetzwerk eingebaut (87,9 % bei pH 6, respektive 85,6 % bei pH 7,5). Geringfügig mehr wurde bei der Verwendung von Phosphatpuffer bei pH 6,0 (91,2 %) gefällt. Einen signifikant höheren Messwert erreichte die Fällung in Phosphat bei pH 7,5, der deutlich über 100 % lag. Dies ist vermutlich darin zu begründen, dass schon Silikat-freie Ansätze bei der Verwendung von Phosphatpuffer einen starken positiven Nachweis ergaben, der zwar über spezifische Referenzen subtrahiert wurde, dennoch zu Werten über 100 % führte.

Die oben beschriebene Bestimmung der Fällungsausbeuten fand unter Verwendung von NaOH zur Hydrolyse von oligomeren Silikatpartikeln statt. Dies war notwendig, da nur monomere und dimere Spezies positiv im Molybdat-Blau-Test reagieren. So konnten alle löslichen Kieselsäure und Silikatspezies im Überstand erfasst werden. Parallel wurde aus dem gleichen Probenvolumen auch ein Test unter nicht-hydrolytischen Bedingungen durchgeführt. Aus dem entsprechenden Differenzbetrag ließ sich errechnen, dass nur noch $71,3 \pm 21,2$ % an Monomeren und Dimeren nachweisbar waren. Im Umkehrschluss bedeutete dies, dass etwa 30 % der nicht präzipitierten Kieselsäuremoleküle schon in oligomeren Silikatzuständen vorlagen.

3.1.2.2. Auflösung des Silikats während Hitzeinkubation

Um zu überprüfen, ob der Verlust an LHCII während der Hitzeinkubation (50°C) auf einem Herauslösen der Komplexe aus dem Silikatnetzwerk basiert oder ob eine Auflösung des Silikats eine Freisetzung von Komplexen bedingt, wurden die Inkubationsüberstände auf ihren Silikatgehalt hin zu bestimmten Zeitpunkten quantifiziert. Dabei wurde der pH-Wert der Inkubationslösung variiert. Das Pellet wurde vor der Inkubation zentrifugiert. Aus den Silikatmengen im Überstand wurde der Anteil an verbleibendem Silikat im Pellet bestimmt (Abb. II.4).

Es zeigte sich bei pH-Werten von 7 oder darüber, dass gerade innerhalb der ersten drei Stunden ein starker Übergang von Silikat in den Inkubationsüberstand zu verzeichnen war. In den folgenden 21 Stunden veränderte sich die Menge kaum. Bei saurer werdenden pH-Werten nahm diese Tendenz der raschen Silikatauflösung ab. Abhängig vom pH-Wert verblieb eine unterschiedlich große Menge an Silikat im Pellet. Lösten sich bei pH 4,0 insgesamt weniger als 7 % des Pellets auf, so waren es bei pH 5,0 gut 19 %, bei pH 6,0 knapp 24 % und bei pH 7,0 gut 25 %. Die stärkste Auflösung war bei einem Inkubations-pH-Wert von 7,5 zu verzeichnen mit fast 34 % Pelletaflösung binnen 24 h Hitzeinkubation.

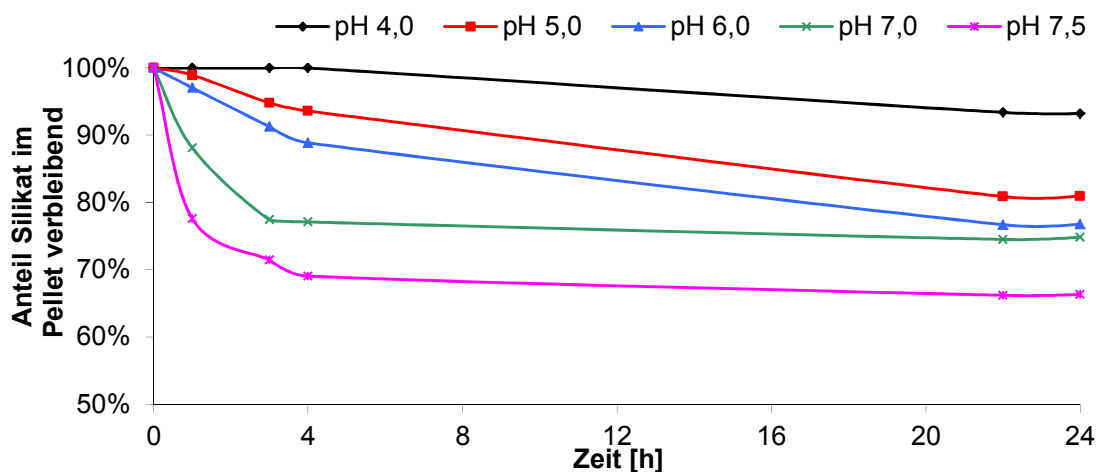


Abb. II.4: pH-Wert-abhängige Silikatauflösung

Die Silikatpellets aus einer LHCII-freien Copräzipitation (Pufferbedingung Tris^{6,0}) wurden in unterschiedlich gepufferten Überständen (Acetat pH 4,0 und 5,0; Tris pH 6,0, 7,0 7,5; $c_{\text{end}} = 0,05 \text{ M}$, 0,1 % LM, $V = 450 \mu\text{l}$) bei 50°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurde der Silikatgehalt im Überstand mittels Molybdat-Blau-Test (siehe II.2.2.1) quantifiziert und aus der Ursprungsmenge (1,7 μmol) der verbleibende Anteil an Silikat im Präzipitat bestimmt. Messung erfolgte mittels Tecan infinite M1000.

Mit steigendem pH-Wert schien sich die Sättigung des Überstandes schneller einzustellen. Die Endkonzentrationen an Silikat im Überstand betragen nach 24 h bei pH 4,0 0,26 mM, bei pH 5,0 0,73 mM und damit 0,16 mM weniger als bei pH 6,0. Die höchsten Konzentrationen wurden erwartungsgemäß bei pH 7,0 mit 0,96 mM und bei pH 7,5 mit 1,29 mM erreicht.

In einer Vergleichsuntersuchung wurde analysiert, welche Silikatspezies dabei in den Überstand übergehen. Wie in II.3.1.2.1 beschrieben, wurden die Proben hierzu unter hydrolytischen und nicht-hydrolytischen Bedingungen im Molybdat-Blau-Test verwendet. Die Messwerte ergaben keine Differenzen, woraus geschlossen werden konnte, dass sich im Überstand ausschließlich monomere bzw. dimere Silikatspezies befanden.

LHCII-haltige Silikatpellets ergaben das gleiche Ergebnis. Auch hier wurde kein Messunterschied zwischen hydrolytischen und nicht-hydrolytischen Bedingungen festgestellt. Tab. II.2 fasst den im Pellet verbleibenden Silikatanteil während einer Inkubation (50°C) bei einem pH-Wert von 6,0 zusammen.

Tab. II.2: Silikatauflösung LHCII-haltiger Pellets

Ein LHCII-haltiger Copräzipitationsansatz (Pufferbedingung Tris^{6,0}) wurde in WP ($c(\text{Puffer}) = 0,05 \text{ M}$, 0,1 % LM) bei 50°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurde der Silikatgehalt im Überstand mittels Molybdat-Blau-Test (siehe II.2.2.1) quantifiziert und aus der Ursprungsmenge der verbleibende Anteil an Silikat im Präzipitat bestimmt. Messung erfolgte im Fotometer. Probenumfang $n = 4$ ($t = 345, 1440$); 2 ($t = 120$).

Zeit [min]	120	345	1440
verbleibender Silikatanteil [%]	92 ± 3	86 ± 5	76 ± 7

Es zeigte sich, dass in vergleichbaren Zeiträumen innerhalb der Fehlertoleranz vergleichbare Mengen an Silikat aus dem LHCII-haltigen Pellet gelöst wurden wie bei LHCII-freien (hier betrug der Anteil an verbleibendem Silikat im Pellet 77 %).

Verglich man die totale Fluoreszenz der in Silikat-eingeschlossenen LHCII, so stellte man eine deutliche Abnahme nach Hitzeinkubation im Vergleich zu vorher fest. Es galt zu klären, ob dies einzig mit der Auflösung des Silikats und der damit einhergehenden Freisetzung an LHCII zu erklären war oder ob andere Mechanismen den Verlust der Fluoreszenzintensität bedingten.

3.1.3. Charakterisierung des Fluoreszenzverlustes

Nur etwa ein Sechstel der ursprünglichen Fluoreszenzintensität blieb bei der fluoreszenzspektroskopischen Vermessung der LHCII-Silikat-Einschlussverbindungen nach 24-stündiger Hitzeinkubation bei 50°C erhalten. Hierbei kam es nur zu einer geringfügigen Störung der Energieweiterleitung innerhalb des Komplexes (siehe hierzu II.3.2), so dass eine Abnahme der Chlorophyll *a*-Fluoreszenzintensität (bei gleichzeitiger Zunahme der Chlorophyll *b*-Fluoreszenz) nicht mit einer verringerten Energieweiterleitung erklärt werden konnte. Ein Ansatz wäre der im vorangegangenen Unterkapitel beschriebene Komplexverlust aus dem Präzipitat, doch auch eine Fluoreszenzlöschung beruhend auf der Aggregation von LHCII wäre eine naheliegende Begründung. Daher galt es zuerst, die Auflösung und den damit einhergehenden Komplexverlust zu minimieren, um danach eine Aggregation der Komplexe im Pellet auszuschließen. Hierzu sollte direkt die Menge an verbleibenden Komplexen mit der Ausgangskomplexmenge verglichen und mit der Abnahme der Fluoreszenzintensität korreliert werden.

3.1.3.1. Minimierung der Silikatauflösung

Die Auflösung des Silikats sollte minimiert werden, um so nach der Inkubationsphase ein geringeres Ausmaß an Fluoreszenzverlust zu erreichen. Ein erster Ansatz zur Verbesserung war es, die Proben vor Hitzeinkubation für 4 min zu zentrifugieren. Bei gleichen Inkubationsbedingungen wurden etwa 4 Prozentpunkte mehr Fluoreszenz erhalten nach 24 h (Tab. II.3). Wurde anschließend nur eine Messung vor dem Stressintervall und eine nach 24 h bei gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt, stieg der Fluoreszenzerhalt auf 28,8 % an. Dieses Ergebnis geht mit der Beobachtung einher, dass bei allen Messschritten eine gewisse Menge Präzipitat an Küvette und Pipette hängen blieb und auch durch mehrmaliges Spülen mit der gleichen Lösung nicht verringert werden konnte. Die Benutzung von Plastikpipetten konnte den Verlust zumindest beim Pipettieren etwas verringern, aber nicht vollständig verhindern. Wie in II.3.1.2.1 beschrieben nahm die Auflösung des Silikats mit dem pH-Wert ab. Eine Absenkung des Inkubationspuffer-pH-Wertes erbrachte aber keine Verbesserung des Fluoreszenzerhalts; sie nahm unter vergleichbaren Bedingungen sogar ab. Bei sinkendem pH-Wert (< 5,0) konnte man zudem feststellen, dass sich die Pellets von grün ins gelbliche gehend verfärbten. Eine weitere Beobachtung in den Silikatauflösungsversuchen war, dass sich eine Sättigung des Überstandes nach

etwa 4 h einstellte. Danach schien sich ein Gleichgewicht zwischen löslichem und ungelöstem Silikat eingestellt zu haben. Aus diesem Grund wurden LHCII-freie Pellets für 5 h im gewünschten WP inkubiert, zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen und als Inkubationspuffer für LHCII-haltige Proben verwendet. Trotz des erhöhten pH-Wertes von 7,0 konnte der Fluoreszenzerhalt so auf 35,6 % gesteigert werden.

Tab. II.3: Fluoreszenzerhalt in Abhängigkeit des Inkubationspuffers (IP)

LHCII wurde copräzipitiert (Pufferbedingung Tris^{6,0}) und das Pellet vor und nach 24 h Inkubation bei 50°C vermessen. Anzahl Zwischenmessungen = Anzahl der Messungen zwischen den Zeitpunkten $t = 0$ und $t = 24$ h; Silikat-haltige IP: Herstellung siehe 3.2.1.5.A). Zentrifugation: 4 min bei 17500 x g; Anteil des erhaltenen Fluoreszenzmaximums: Emissionscounts $\lambda_{680\text{ nm}}$ ($t = 24$ h)/ Emissionscounts $\lambda_{680\text{ nm}}$ ($t = 0$).

Anzahl der Messungen, aus denen sich der Mittelwert ergibt (von links nach rechts der Tabelle entsprechend): $n = 3, 2, 2, 5, 14$

pH-Wert IP	5,0	6,0			7,0
Anzahl Zwischenmessungen	1	1	1	0	0
Silikat im IP	-	-	-	-	+
Zentrifugation vor Hitzeinkubation	+	-	+	+	+
Anteil des erhaltenen Fluoreszenzmaximums [%]	16,1 ± 4,3	16,9 ± 3,9	20,8 ± 5,3	28,8 ± 5,3	35,6 ± 10,4

Als Konsequenz aus diesen Versuchsergebnissen wurde in den im weiteren Verlauf dargestellten Experimenten zur Auswirkung von thermischem Stress auf Silikat-eingeschlossene LHCII stets mit Silikat-gesättigten Inkubationspuffern gearbeitet, die vor der Inkubation zentrifugiert wurden. Zwischenmessungen wurden zudem vermieden. Trotzdem gingen fast zwei Drittel der Fluoreszenzintensität während der Inkubation verloren, so dass eine mögliche Komplexaggregation zu untersuchen war.

3.1.3.2. Untersuchung möglicher LHCII-Aggregation der Silikatmatrix

Um eine mögliche Komplexaggregation zu untersuchen, sollte der Komplexgehalt im Pellet vor und nach Hitzeinkubation (50°C) gemessen und mit der Fluoreszenzabnahme verglichen werden. Da während der Pipettier- und Messvorgänge ein Verlust an Präzipitat auftrat, musste die genaue Menge an Komplexen aus dem Pellet am Ende der Stressphase bestimmt werden. Photometrisch war eine solche Quantifizierung nicht möglich. Auch der Rückschluss über die im Inkubationspuffer gelösten Komplexe auf die im Pellet verbleibende Menge war aus den oben genannten Verlusten zu ungenau. Aus diesem Grund sollten die Komplexe nach der Fluoreszenzmessung aus dem Pellet herausgelöst und quantifiziert werden. Dabei galt es zunächst optimierte Bedingungen zur Auflösung des Silikats herauszufinden.

Die Auflösung der Silikatschalen von Kieselalgen wird häufig durch Zugabe von NH_4F erreicht, das deutlich milder als HF wirkt. LHCII-freie Silikatpellets wurden mit NH_4F in unterschiedlichen Konzentrationen (1 – 9 M in 1 M-Schritten) bei 15°C inkubiert. In bestimmten Zeitabständen wurden

die Proben zentrifugiert und die Pellets überprüft. Erst ab Konzentrationen oberhalb von 7 M konnte überhaupt eine Verkleinerung der Pellets festgestellt werden. Selbst nach einer 1N-Inkubation wurden die Pellets nicht vollständig aufgelöst. Ein Herauslösen der Komplexe unter diesen milden Bedingungen schien also nicht zielführend.

Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung von LHCII kann über die Konzentration der Pigmente - insbesondere des Luteins – durchgeführt werden (vgl. 3.2.1.5.B)). Hierzu ist es nicht notwendig, dass die Komplexe beim Herauslösen erhalten bleiben.

In einem ersten Ansatz sollten die Pellets durch einen erhöhten pH-Wert (8,5) und Wärme (75°C) aufgelöst werden. Nach dreistündiger Inkubation zeigte sich eine deutliche Verkleinerung des Pellets, allerdings verfärbte es sich dunkelgrünlich-schwarz und war nicht mehr resuspendierbar. Von einer vollständigen Extraktion der Pigmente konnte unter diesen Umständen nicht ausgegangen werden.

In einem weiteren Versuch sollten die Pigmente durch eine Kombination aus Verwendung von Lösungsmitteln und erhöhtem pH-Wert extrahiert werden. Die Pigmente sollten sich dabei aus dem Pellet herauslösen und in die Lösungsmittelphase übergehen, so dass sie einfacher isoliert werden konnten. Kriterien für ein erfolgreiches Protokoll waren dabei ein farbloses Pellet und eine Phasentrennung. Es wurde Butan-2-ol, ein Lösepuffer (Lp; 0,05 M Tris^{9,5}, 0,1 % LM) und ein Lösemittel (Lm; 33 % Butan-2-ol, 47 % Aceton, 20 % H₂O) verwendet. Tab. II.4 fasst die Ergebnisse des Versuches zusammen: Eine zweistündige Inkubationsphase unter Schütteln führte bei Butan-2-ol (V), genau wie bei der reinen Verwendung des Lps (IV) nicht zu einer Entfärbung des Pellets. Bei der Verwendung des Lm (III), einer 1:1 Mischung von Lp und Lm (II) und einer 1:1 Mischung aus Lp und Butan-2-ol (I) kam es unter gleichen Inkubationsbedingungen zu einer Entfärbung des Pellets. Jedoch trat nur im Falle der Lm-Butan-2-ol-Mischung auch eine Phasentrennung nach der sich der Inkubation anschließenden Zentrifugation auf.

Tab. II.4: Optimierte Pigmentextraktion aus Silikat

Die Pellets aus Copräzipitationen (Pufferbedingung: Tris^{6,0}) wurden mit 500 µl der unterschiedlichen Inkubationskomponenten versetzt, resuspendiert und für 2 h bei 30°C inkubiert. Lösepuffer (Lp) bestand aus 0,05 M Tris^{9,5}, 0,1 % LM; Lösemittel (Lm) setzte sich aus 33 % Butan-2-ol, 47 % Aceton, 20 % H₂O zusammen. Nach 2-stündiger Inkubation bei 30°C unter Schütteln wurden die Proben für 2 min zentrifugiert.

	Inkubationskomponenten	2 h, 30°C, schütteln	
		Pellet farblos?	Phasentrennung?
I	Lp + Butan-2-ol (1:1)	ja	ja
II	Lp + Lm (1:1)	ja	nein
III	Lm	ja	nein
IV	Lp	nein	nein
V	Butan-2-ol	nein	ja

Für die Aufklärung der Korrelation zwischen Anteil an verbleibenden Komplexen im Pellet und dem Erhalt an Fluoreszenzmaximum wurden die Pellets nach fluoreszenzspektroskopischer Vermessung mit einem 1:1-Gemisch aus Lp und Butan-2-ol inkubiert. Verbessert wurde dies zudem dadurch, dass die Reaktionsgefäße (Eppendorf 1,5 ml) während der Extraktion auf den Kopf gestellt wurden.

Würden die Komplexe während der Hitzeinkubation im Silikat aggregieren, so würde man eine überproportionale Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Anteil der im Pellet verbleibenden Komplexe erwarten. Die LHCII-haltigen Pellets wurden im optimierten Extraktionsmedium inkubiert und die in der Butanol-Phase befindlichen Pigmente mittels analytischer HPLC quantifiziert. Die Menge an Komplexen wurde über die Normierung auf Lutein bestimmt und mit den vor Hitzeinkubation im Pellet befindlichen Komplexen verglichen.

In keiner der analysierten Proben zeigte sich, dass der Anteil an verbliebenen Komplexen höher lag als man aufgrund des verbleibenden Fluoreszenzmaximums erwarten würde.

3.2. Publikationsmanuskript

Silica encapsulation of a recombinant light-harvesting complex (LHCII) yields energy conducting hybrid material with significant heat stability

Sebastian Roeder

Institut für Allgemeine Botanik

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Johannes-von-Muellerweg 6

55099 Mainz, Germany

roeders@uni-mainz.de

Stephan Hobe

Institut für Allgemeine Botanik

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Johannes-von-Muellerweg 6

55099 Mainz, Germany

hobe@uni-mainz.de

Harald Paulsen (corresponding author)

Institut für Allgemeine Botanik

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Johannes-von-Muellerweg 6

55099 Mainz, Germany

paulsen@uni-mainz.de

Fax: +49 6131-23787

Tel: +49 6131-39-24633

Abstract

The major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHCII) of the photosynthetic apparatus in green plants consists of a membrane protein and numerous non-covalently bound pigments that make up about one third of the molecular mass of the pigment-protein complex. Due to this high pigment density, LHCII is potentially interesting as a light-harvesting component in synthetic constructs. However, for such applications its stability needs to be significantly improved. In this work, LHCII was dramatically stabilized by encapsulating it in polymerizing colloidal silica. The encapsulated LHCII stayed functional at 50 °C for up to 24 h instead of a few min in detergent solution. Encapsulation efficiency was enhanced by a polycationic peptide attached to the N terminus. Both the extent of stabilization and the yield of encapsulation strongly increased with decreasing diameters of the silica particles. The light-harvesting capacity of encapsulated LHCII was further enhanced by efficient energy transfer between trimeric complexes.

Keywords: light harvesting; spermine; coprecipitation; protein stability; silica; biomineralization

1. Introduction

All existing photosynthetic apparatus contain light-harvesting components indicating that this function is indispensable for efficient photosynthesis. In higher plants the major light harvesting complex of photosystem II (LHCII), the most abundant membrane protein on earth, conducts its excitation energy towards the photosynthetic reaction centers where photochemical energy conversion takes place. An exceptional feature of LHCII is its high pigment density (~ 0.3 mol/l chlorophyll) with eight chlorophyll *a*, six chlorophyll *b*, and four xanthophyll molecules per monomer, all of which are non-covalently bound to the apoprotein [^{1; 2}]. Also the native, trimeric state is a non-covalent complex of three nearly identical subunits. LHCII can be assembled *in vitro* in its monomeric or trimeric form from its fully denatured, bacterially expressed apoprotein and plant pigments [^{3; 4}]. Recombinant LHCII is structurally nearly identical to the native one and shows very similar biochemical and spectroscopic properties, including a virtually 100 % internal energy transfer from chlorophyll *b* to chlorophyll *a*. This internal energy transfer serves as a convenient functional test for the proper assembly of recombinant LHCII [⁵]. Apoprotein modification, for instance by attaching fluorescent dyes, can be used to expand the absorption range of recombinant pigment-protein complex [⁶]. Furthermore, an efficient energy transfer from recombinant LHCII to type II quantum dots has been shown that are able to undergo charge separation [⁷]. LHCII has even been reported to serve as a photosensitizer, next to its light-harvesting function, in a Grätzel-type, dye-sensitized biosolar cell system [⁸]. All these features make LHCII an interesting candidate as a light harvesting component in technical applications. However, this potential is limited by its relatively low thermal stability, leading to the dissociation of pigments and denaturation of the apoprotein upon prolonged exposure to elevated temperatures.

Several functional proteins have been stabilized by enclosing them in silica structures. Braun *et al.* [⁹] entrapped alkaline phosphatase into silica and reported an increase in thermal

stability but the enzyme's activity dropped to 30 %. Since then many other soluble enzymes have been subjected to sol-gel entrapment to preserve their activities and to increase their lifetimes and stress resistance under conditions such as extreme pH values and high temperatures (for a detailed review see Ruiz-Hitzky, 2011 [10]). The porous nature of amorphous SiO₂ obviously is an advantage when substrate molecules need to get to their binding sites in entrapped enzymes. Moreover, the optical transmittance allows for spectroscopic diagnostics [11; 12].

Sol-gel experiments take advantage of autopolycondensation at high silicic-acid concentration. This process is fast and therefore hard to control; consequently, the properties of the resulting silica precipitate cannot easily be optimized with regard to the preservation of the enclosed protein. If autopolycondensation starts out from the hydrolysis of precursors such as tetraethoxysilane (TEOS) and tetramethoxysilane (TMOS), ethanol or methanol will be formed in substantial amounts which may destroy the structure and/or activity of enclosed proteins [13; 14].

In diatoms and sponges silica condensation takes place at much lower concentrations compared to those needed for autopolycondensation, catalyzed and controlled by polycationic molecules [15]. Polycationic proteins such as silaffins and silaffin-derived peptides as well as polyamines facilitate silica condensation. A wide range of synthetic polyamines but also naturally occurring ones such as spermine or spermidine have been investigated with respect to their ability to precipitate silica [16-18]. This led to new procedures for encapsulating proteins in silica. In most cases, the proteins were coprecipitated with silica in the presence of polycationic molecules. This encapsulation has been shown to increase the lifetime significantly of a number of proteins [19-21]. A fusion of silaffin derived R5 peptide and D-amino acid oxidase provided a recombinant enzyme with the ability of silica self-encapsulation without any other polycationic molecule [22].

Several membrane proteins and membranous components of the photosynthetic apparatus have been successfully stabilized by silica entrapment [23–26]. Even whole photosynthetic organisms were encapsulated into silica without losing their biological activity [27]. All of these approaches used sol-gel or sol-gel derived methods. To our knowledge no coprecipitation with silica of a membrane protein has been described so far that was triggered by polycationic molecules at low precursor (TEOS, TMOS) concentration. The present results show the significantly increased heat stability of detergent-solubilized LHCII conferred by encapsulation into amorphous silica.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Spermine and TMOS were purchased from Sigma-Aldrich (St.-Louis, MO, USA). All solutions were prepared with ultrapure water.

Four different recombinant variants of LHCII were used, all of which are derivatives of Lhcb1*2 from *Pisum sativum* [28]. All of them were C-terminally His₆-tagged. In one, native Cys79 is exchanged against Ser [29]; this derivative is referred to as LHCII in the following. For dye-labelling experiments a variant of LHCII was used in which Ser160 is exchanged against Cys (CysLHCII) [30]. The variant Δ N11LHCII lacks eleven N-terminal amino acids, its sequence starting with RGS AWY instead of SGSPWY [7]. R5LHCII has the LHCII sequence described above without the amino acid exchange in position 79 and with an R5-peptide fused to the N-terminus. The genes of all except the last variant are inserted in pDS12-RBSII vectors, R5LHCII gene is located in pET 21(+).

2.2 Methods

Construction of R5LHCII

R5LHCII was constructed by inserting a primer hybrid (5'TCTTCCAAAAATCTGGTTCTTACTCTGGTTCCAAAGGTTCCAAACGTCGTATCCTGAGCATG3'; 5'CTCAGGATACGACGTTTGGAACCTTTGGAACCAGAGTAAGAACCAGATTTTTTGGAAGACATG-3') into an SphI cleavage site directly located at the start codon of the lhcp gene.

LHCII preparation and spectroscopic measurements

The apoproteins of LHCII, CysLHCII and Δ N11LHCII were expressed in *Escherichia coli* strain JM101 and R5LHCII apoprotein in Rosetta DE3 as described earlier [3]. Total pigment extract was isolated from *Pisum sativum* thylakoids [31]. Monomers were reconstituted by the detergent exchange method [32] and trimerization was obtained by affinity chromatography [4]. The protocols for reconstitution and trimerization had to be modified for R5LHCII because it tended to form aggregates, presumably due to the positively R5 peptide electrostatically interacting with negatively charged domains in LHCII. During reconstitution LiCl was added to a final concentration of 0.4 M after mixing solubilized apoprotein and pigments. NaCl (250 mM) was added to all trimerization buffers whereas sucrose gradients for ultracentrifugation contained 500 mM NaCl.

Dye labeling of CysLHCII apoprotein

CysLHCII apoprotein was labeled with DY-731 (Dyomics GmbH, Jena, absorption and emission maxima in ethanol 736 and 760 nm, respectively) as described earlier [6].

Spectroscopic characterization of trimeric LHCII

Concentrations of LHCII in detergent solution were determined by absorption ($\epsilon_{670 \text{ nm}, 1 \text{ cm}} = 546000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [³³] (Jasco V-550 UV/Vis spectrophotometer). In fluorescence measurements the excitation wavelength was 470 nm and fluorescence emission was recorded between 600 and 750 nm and between 600 and 850 nm for dye-labeled samples. Sample volumes were 450 μl for experiments in the Fluoromax-2 (ISA SPEX, Jobin Yvon) and 200 μl in the Tecan infinite M1000 (Tecan group Ltd., Maennedorf, CH), used for dye-labeled LHCII.

Coprecipitation

LHCII (1 μM) was dissolved in 100 μl of 0.25 M sucrose, 1 % [w/v] n-dodecyl β -D-maltoside (LM), 50 mM buffer (tris buffer [Tris] or phosphate buffer [PB] at different pH values) and 1 mM spermine (N,N'-bis(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine). Silicic acid (1 M stock solution of TMOS, prehydrolysed for > 30 min in 1 mM HCl) was added to a final concentration of 20 mM. Precipitation took place at 23°C for 30 min with shaking. The precipitate was collected by centrifugation (two min at 15000 g). The supernatant was removed and stored for LHCII quantitation. The precipitate was washed two times with washing buffer (50 mM Tris pH 6.0; 0.1 % LM) and collected again by centrifugation.

Energy-transfer experiments

For energy transfer experiments dye-labeled and non-labeled LHCII were mixed at different ratios (1, 0.75, 0.5, 0.25, 0) to a final concentration of 1 μM . Coprecipitation was performed as described above. In solution the final total LHCII concentration was varied from 1 to 38 μM .

Post-precipitation binding experiments

Precipitation was performed without LHCII as described above. The washed precipitates were resuspended thoroughly and incubated with LHCII-solution (total concentration 1 μ M; 50 mM Tris pH 6.0, 0.1 % LM) for 30 min. The precipitate was collected by centrifugation (two min at 15000 g). The supernatant was removed and stored for LHCII quantification; the precipitate was treated as described below.

Heat incubation and stability measurements

To avoid silica hydrolysis at elevated temperature, the incubation buffer for heat treatment of encapsulated LHCII contained saturating amounts of soluble silica. This buffer was obtained by pre-incubation of an LHCII-free precipitate at 50°C for four h in 50 mM Tris at pH 7.0 and 0.1 % LM. After centrifugation (15000 g, two min) the supernatant was removed and stored at 4°C (incubation buffer). The silica/LHCII-precipitate was suspended in incubation buffer and a fluorescence spectrum was recorded. Then the sample was centrifuged at 15000 g for four min and incubated at 50°C (24 h), vortexed and centrifuged for two min. The supernatant was separated from the precipitate and stored for LHCII quantitation. The precipitate was suspended in washing buffer and a further fluorescence spectrum was recorded.

LHCII quantification by butanol extraction and HPLC

The amount of LHCII remaining in the supernatant of coprecipitation reactions was quantified by HPLC of butanol-extracted pigments and the amount of enclosed complexes was taken to make up the difference to the initial LHCII amount. For pigment isolation from a supernatant, the latter was mixed with two-thirds volume sec-butanol and one third volume 5 M NaCl. After 30 s centrifugation (15000 g at room temperature) the butanol phase was removed

and the water phase was mixed with another one-third volume sec-butanol. Both butanol extracts were combined (Extraction method adopted from [34]).

To quantify the amount of remaining encapsulated LHCII after heat incubation the precipitate was mixed with 250 μ l sec-butanol and 250 μ l washing buffer (Tris pH 9.5, 0.1 % [w/v] LM). After three h of gentle shaking all pigments were removed from the precipitate and the butanol phase was separated and washed once with H₂O. The volume of all butanol phases was determined gravimetrically and 2 volumes of 70 % acetone were added before HPLC analysis (column: Chromolith Speed RCD, RP 18E, 50 x 4.5 mm, Merck, Germany). Pigments were eluted by a linear gradient from 70 – 100 % acetone at a flow rate of 1.5 ml/min within 6.5 min, identified by their retention time and absorption spectrum, and quantified by their absorption at 440 nm.

Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX)

For SEM imaging (Zeiss Gemini 1530) samples were dried on silica wavers for at least 12 h. For EDX analysis (Hitachi SU8000 with Bruker AXS XFlash® 5010) samples were dried on copper band.

3. Results

Structure of precipitate and yield of encapsulation

Recombinant trimeric LHCII was encapsulated by spermine-mediated silicic acid polymerization in various buffers at different pH values. After centrifugation and removal of non-encapsulated pigment-protein complexes in the supernatant the collected precipitates (Fig. 1, panels A-D) were resuspended thoroughly in washing buffer with no loss of LHCII. Without spermine neither turbidity nor formation of silica structures occurred within 30 min under the precipitation conditions used that could be collected by centrifugation at 15000 g.

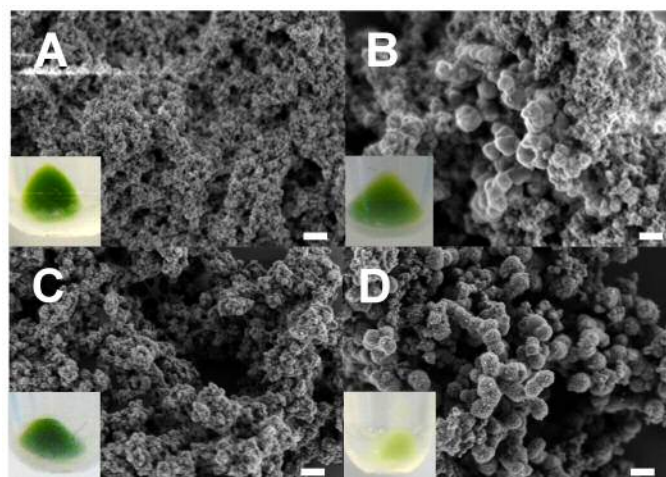


Fig. 1: Photographs (inserts) and SEM images of silica pellets precipitated under different pH and buffer conditions.

Precipitation of LHCII (1 μ M) was done in the presence of spermine (1 mM) and A) Tris pH 6.0, B) Tris pH 7.5, C) PB pH 6.0, D) PB pH 7.5. Silicic acid concentration was 20 mM in all cases. Bars in SEM pictures: 200 nm.

As is obvious from the precipitate color intensity in Fig. 1 A-D, the yield of encapsulated LHCII depended on both the type of buffer and the pH value applied (Fig. 2). About the same percentage of LHCII was encapsulated in the presence of Tris and PB at pH 6 or Tris at pH 7.5 (75 ± 4 %, 73 ± 5 %, and 73 ± 7 %, respectively). By contrast, PB pH 7.5 yielded a significantly lower amount of encapsulation (29 ± 5 %).

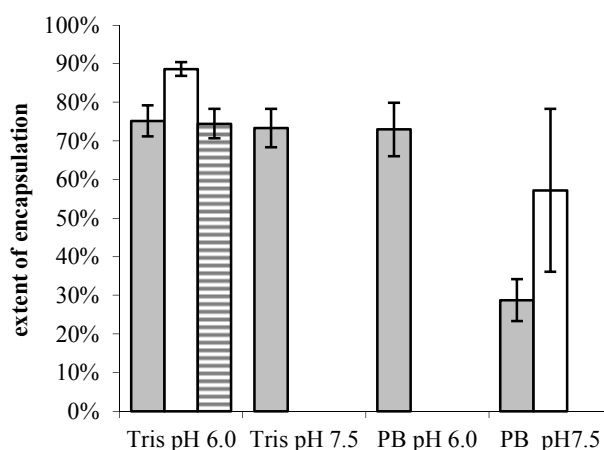


Fig. 2: Extent of LHCII encapsulation in dependence on pH and buffer.

Precipitation was done in the presence of 1 mM spermine and 20 mM silicic acid in different buffers (Tris pH 6.0, Tris pH 7.5, PB pH 6.0 and PB pH 7.5). The concentrations of R5-LHCII (white bars), LHCII (grey bars) and Δ N11LHCII (striped bar) was 1 μ M in all cases. Amount of encapsulated LHCII was calculated from its concentration in the supernatant after precipitation.

The yield of LHCII encapsulation was calculated from the difference between its total

amount for coprecipitation and its amount in the supernatant after centrifugation. This indirect determination was valid as no loss of LHCII from the precipitate during washing steps was detected. Scanning electron microscopic (SEM) images of the precipitates showed different silica structures also depending on the type of buffer and pH value. Very small, nearly monodisperse particles with diameters less than 20 nm were produced if precipitation took place in Tris at pH 6.0. These particles build up a network of silica spheres, enclosing empty spaces of different size ranging from the size of individual spheres up to about 200 nm (Fig. 1 A). Similar structures were seen in PB at pH 6.0 and Tris at pH 7.5 but less monodisperse and larger structures up to 200 – 250 nm occurred (Fig. 1 C and B). These large particles, apparently formed by the fusion of small sized spheres, dominate silica formed by precipitation in PB at pH 7.5 (Fig. 1 D). It should be noted that silica structures were the same whether or not LHCII was present during spermine induced polymerization of silica (ESI†, Fig. S 1) and that EDX measurements proved the inorganic-organic mixed character of the particles, represented by carbon, nitrogen and silicon signals (ESI†, Fig. S 2). To determine whether the relatively low LHCII encapsulation yield seen in PB, pH 7.5, was due to the particularly large silica particles formed (Fig. 1 D) the silica particle size was tuned by varying the N:Si ratio [¹⁶] in Tris at pH 6.0. Silicic acid was kept at 20 mM while spermine concentration varied between 0.5 mM and 5 mM, thereby changing the N:Si ratio from 0.1 to 1. A low N:Si ratio led to small monodisperse particles (ESI†, Fig. S 3) comparable to the ones described above (Fig. 1A), where N:Si was 0.2. The yield of encapsulated LHCII was 70 % (data not shown) for these precipitates, similar to the one seen in Fig. 1A. An increased N:Si ratio induced the formation of larger particles. At N:Si = 1.0 the silica spheres were clearly defined with diameters of approximately 200 nm and the encapsulation yield dropped to 28 % (ESI†, Fig. S 3). The observation that under identical buffer and pH conditions the yield of LHCII encapsulation again was strongly correlated with the size of particles clearly shows that within the pH range

tested it is the size of silica particles which is crucial for effective encapsulation.

Interaction of silica with LHCII

Encapsulation rates of about 75 % (Fig. 2) of LHCII within a precipitate volume of roughly 1/50 of the original solution clearly cannot be the result of a random entrapment of solubilized LHCII. Since the surface of SiO₂ is negatively charged due to dissociation of silanolate groups, basic amino acids side chains on the surface of LHCII are potential partners for electrostatic interactions. LHCII carries four positively charged amino acid side chains in its N-terminal domain (positions 1-8). We checked the influence of these positive charges by comparing three different LHCII variants both with respect to their encapsulation in coprecipitation assays and their binding to preformed silica spheres. A truncated version of LHCII missing eleven N-terminal amino acids (Δ N11LHCII) thereby lacking nine positively charged amino acids per trimer, and a variant with an N-terminal cationic extension of R5-peptide, a silaffin-derived peptide from diatoms, carrying six additional positive charges (R5LHCII) were analyzed in comparison to LHCII with its wildtype N-terminal domain. The yield of encapsulation into nascent silica was not influenced by the lack of four charges in Δ N11LHCII (75 ± 4 % in Tris pH 6.0) but was clearly enhanced by the cationic R5 moiety in R5LHCII to 89 ± 2 % in Tris, pH 6.0) (Fig. 2). In contrast, wildtype LHCII and R5LHCII did not differ significantly (47.4 ± 19.4 % and 41.5 ± 7.3 %) when LHCII was bound to the surface of preformed silica precipitated by spermine in Tris pH 6.0 in the absence of pigment-protein complexes (ESI†, Fig. S 4). In this assay, Δ N11LHCII binding was clearly decreased (20 %) albeit at a large standard deviation. Possible implications on the different roles of cationic charges in these two assays will be discussed below.

Integrity and stabilization of LHCII in precipitates

The structural integrity of encapsulated LHCII can be judged by means of its spectral properties. In intact LHCII excitation of chlorophyll *b* ($\lambda_{\text{ex}}=470$ nm) leads to a quantitative energy transfer to chlorophyll *a* which fluoresces at 680 nm. Structural disorder disturbs this energy transfer leading to increased chlorophyll *b* fluorescence ($\lambda_{\text{em}}= 655$ nm). Thus a decreased ratio between the emissions at 680 nm and 655 nm ($\text{Em}_{680}/\text{Em}_{655}$) reflects disintegrating LHCII. Fluorescence measurements with LHCII-containing silica precipitates showed no significant chlorophyll *b* emission; this was true for all precipitation conditions (ESI†, Fig. S 5A-D solid lines). Thus the encapsulation process does not have any negative impact on the LHCII structure. Next we tested the thermal stability of encapsulated LHCII upon prolonged heat incubation in comparison to the stability of detergent-solubilized ones (“free LHCII”). $\text{Em}_{680}/\text{Em}_{655}$ was measured after incubation at 50°C for 24 h in the dark and was normalized to the ratio as measured directly after precipitation. This normalized value then reflects the extent of stabilization after heat stress. While solubilized LHCII showed a significant loss of energy transfer within a few min at 50°C (Fig. 3 B and ESI†, Fig. S 5 E), encapsulated LHCII was significantly more stable towards thermal dissociation (Fig. 3 A).

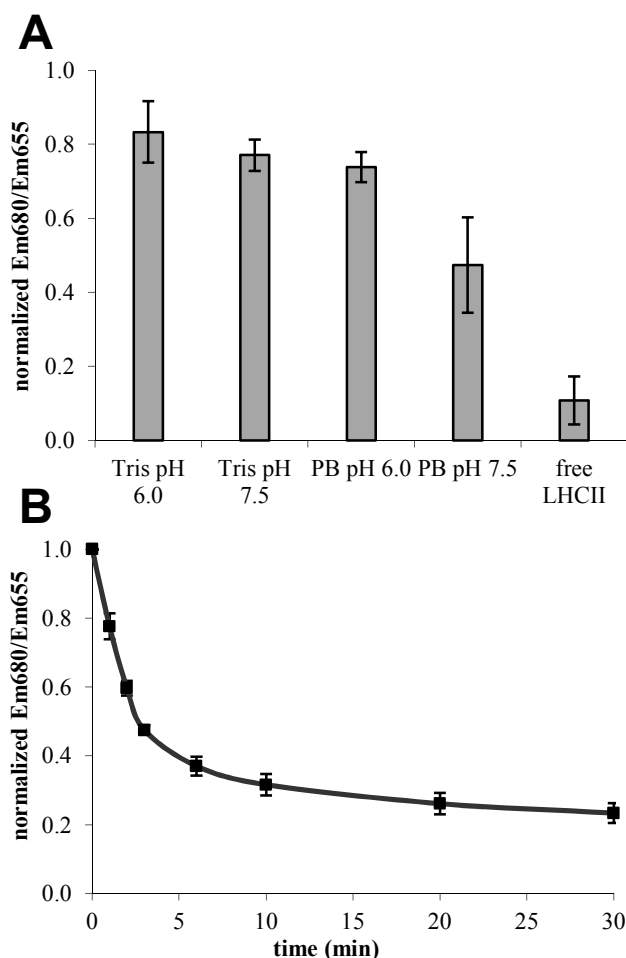


Fig. 3: Extent of LHCII stabilization by precipitation under different pH and buffer conditions.

Silica-encapsulated LHCII was excited at 470 nm and emission spectra were recorded (600-750 nm). Em_{680}/Em_{655} was normalized to the results before heat-incubation.

A) Normalized Em_{680}/Em_{655} after 24 h at 50°C. Control = solubilized LHCII (“free LHCII”)

B) Normalized Em_{680}/Em_{655} of solubilized LHCII at 50 °C recorded over a time span of 30 min.

This was particularly true in Tris pH 6.0 ($Em_{680}/Em_{655} = 0.83 \pm 0.08$) and to a lesser extent in Tris pH 7.5 and PB pH 6.0 ($Em_{680}/Em_{655} = 0.77 \pm 0.04$ and 0.74 ± 0.04 , respectively). Coprecipitation in PB pH 7.5 had the lowest stabilizing effect ($Em_{680}/Em_{655} = 0.47 \pm 0.13$) (fluorescence data see ESI†, Fig. S 5 A-D). Apparently, larger silica spheres not only lead to a lower yield of coprecipitated LHCII but also have a less pronounced stabilizing effect on the pigment-protein complex. This also holds true for large and small spheres obtained by changing N:Si ratios as described above (data not shown).

The influence of charge-dependent interaction between LHCII and silica surfaces on the extent of stabilization was also tested with R5LHCII and $\Delta N11$ LHCII encapsulated by co-

precipitation. Both variants showed a normalized Em_{680}/Em_{655} similar to that of LHCII under the same precipitation and heat incubation conditions (data not shown). Interestingly, LHCII bound to preformed silica (see above) exhibited a significantly reduced heat resistance ($Em_{680}/Em_{655} = 0.58 \pm 0.07$) as compared to the encapsulated material but still enhanced with respect to detergent-solubilized LHCII. This indicates that the effect of stabilization cannot be explained by mere surface interaction but crucially depends on the actual encapsulation of the pigment-protein complex (see discussion).

Energy-transfer between encapsulated LHCII

During coprecipitation the local LHCII concentration significantly increases (up to 38-fold) which may enable energy transfer between trimers. But at high concentrations LHCII tends to form aggregates that are no longer fluorescent but rapidly dissipate their excitation energy into heat [³⁵]. The LHCII fluorescence intensity is about the same in the coprecipitate before and after heat incubation finely dispersed to the same overall concentration. This indicates that even at the high local LHCII concentration within the precipitate under heat influence no aggregation occurs. .

High LHCII concentrations within silica precipitates imply short inter-trimer distances. To check whether these distances are short enough for inter-trimer energy-transfer, different mixtures of dye-labeled and non-labeled LHCII were encapsulated and their fluorescence behavior compared to the same mixture in solution. Energy transfer between LHCII and an acceptor dye occurs if the donor (chlorophyll *a* of LHCII) fluorescence spectrum overlaps with the acceptor dye absorption and distances are short enough. In DY731-labeled LHCII excited at 470 nm near the chlorophyll *b* absorption maximum, the chlorophyll *a* fluorescence emission at 680 nm is almost completely quenched (compare dashed lines in panels A and E in Fig. S6, ESI). At the same time, the acceptor dye exhibits sensitized emission at 760 nm (not shown).

This indicates virtually 100 % efficient energy transfer from chlorophylls to the dye within LHCII [36]. If labeled LHCII is mixed in detergent solution with non-labeled LHCII at various ratios then the fluorescence emission spectrum of each mixture corresponds to a combination of the spectra of labeled and non-labeled LHCII at the same ratio (Fig. S6, ESI, dashed lines). This is to be expected since in detergent solution the average distances between individual complexes are too large for inter-complex energy transfer to take place. However, if the same mixtures of labeled and unlabeled LHCII are coprecipitated with silica, much of the fluorescence emission at 680 nm of the unlabeled LHCII is quenched and additional sensitized fluorescence of the acceptor dye appears at 760 nm. This indicates that in the coprecipitate not only intra-complex energy transfer from chlorophylls to the dye takes place but also inter-complex energy transfer from non-labeled to labeled LHCII. When 75 % of the LHCII complexes are unlabeled, more than 80 % of their fluorescence is quenched (panel D in Fig. S 6 and Fig. 4). We conclude that each labeled LHCII is able to collect the excitation energy of several of its non-labeled neighbouring complexes.

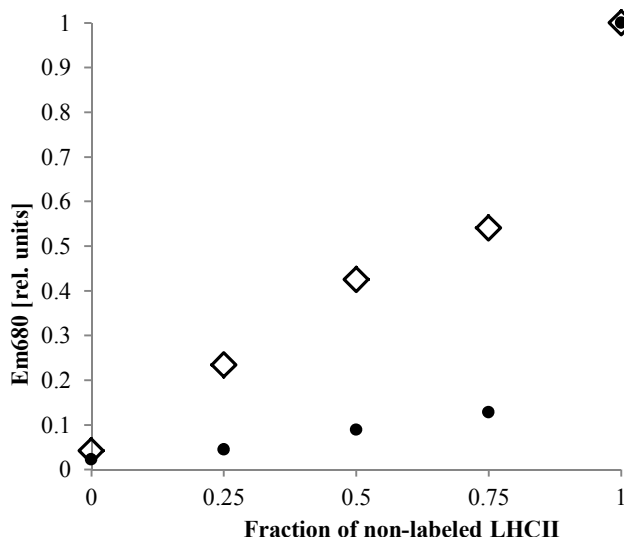


Fig. 4: Dy-731 labeled LHCII efficiently collect excitation from non-labeled LHCII.

Fluorescence emission spectra of pure Dy-731-labeled and non-labeled LHCII and different mixtures of both were recorded after excitation at 470 nm. Spectra (600-850 nm) were normalized to the same area and Em_{680} was taken from these spectra after subtraction of a small offset for solubilized non-labeled LHCII. '0' represents dye-labeled LHCII only, '1' represents non-labeled LHCII only. Open squares = solubilized LHCII; filled circles = LHCII encapsulated by coprecipitation assays.

It should be noted that irrespective of the relative mixtures the remaining chlorophyll *a* emission from encapsulated LHCII constantly peaks at 681 nm and the geometry of emission bands stays virtually unchanged (see ESI†, Fig. S 7). This implies that we observe energy transfer rather than re-absorption of emitted light within the sample, which would most likely distort the fluorescence emission band (see discussion).

4. Discussion

The data presented clearly show that the size of silica particles directly influences the yield of encapsulation and the extent of stabilization of LHCII. The size of silica spheres can be manipulated in two different ways: The first one depends on the choice of buffer and its pH value. Presumably the interaction of spermine with buffer molecules and condensing silica is controlled by pH leading to different sizes of silica spheres. It was shown before that the role of small amines in silica precipitation is to support aggregation of soluble oligomeric silica species rather than to condense orthosilicic acid [37, 38]. Autopolycondensation of orthosilicic acid is expected at concentrations greater than about 2 mM [39] and thus soluble silica oligomers are expected to form at the monomer concentration ($c=20$ mM) used in our coprecipitation assays. Apparently, condensation does not proceed within 30 min reaction time to larger particle sizes since we never collected a precipitate by centrifugation at 15.000 g unless a silica-precipitating substance such as spermine was present. It is a well-known behavior of bivalent anions such as phosphate or sulphate to aggregate polyamines [40]. In our experiments spermine itself could aggregate to different extents in dependence on the differently charged buffer molecules. At pH 7.5 HPO_4^{2-} accounts for about two thirds of phosphate molecules, presumably causing the formation of large spermine aggregates which then induce the formation of larger silica spheres. At pH 6.0 where the monovalent anion H_2PO_4^- prevails (~94 %) aggregation of spermine should not be expected and consequently, smaller particles domi-

nate the precipitate. Consistently, assays buffered with Tris did not show larger silica spheres formed by a pre-aggregation of spermine at either pH because no interaction between the positively or non-charged Tris molecules and spermine is expected. In a second approach to manipulating silica particle sizes we varied the N:Si ratio (spermine to silicic acid ratio [silicic acid concentration in all cases 20 mM]) at constant pH and buffer conditions. Low N:Si ratios (< 0.5) produced small particle sizes while higher ratios gave rise to larger particles [¹⁶]. An N:Si ratio of 1 caused particle sizes comparable to the ones at PB pH 7.5. Regardless of whether particle sizes were determined by buffer and pH or N:Si ratio variation small spheres caused high yields of encapsulation as well as a high extent of stabilization whereas bigger particles (app. 200 nm) induced significantly reduced values in both cases.

The localization of LHCII between silica spheres cannot be solely dependent on an unspecific entrapment into the polymerizing SiO_2 since we clearly observe a concentration effect, taking into account that 75 % of the LHCII dissolved in a 100 μl coprecipitation assay end up in the silica pellet making up only approximately 2 μl . We suggest an interaction between LHCII and silica during aggregation of small silica particles. Besides ion-ion-interactions hydrogen-bonds, ion-dipole, dipole-dipole and van-der-Waals interactions can promote peptide-silica binding [^{41; 42}]. These interactions enable a LHCII entrapment into inner gaps of silica network. The localization in inter-particle gaps in silica precipitates has been proposed for other proteins before [^{20; 43}]. The localization into inner gaps limits diffusion processes significantly and makes a LHCII loss from gaps improbable in silica networks with small particle sizes (for a detailed scheme see ESI†, Fig. S 8). This idea is supported by similar yields of encapsulation for LHCII and $\Delta\text{N11LHCII}$ that differ in nine positively charged amino acids at the N-termini per trimer. The lack of strong ion-ion-interactions between silica and $\Delta\text{N11LHCII}$ is compensated for by inhibition of LHCII diffusion and encapsulation into close gaps. In contrast to this, binding to preformed silica is poorer for all LHCII variants, especial-

ly for Δ N11LHCII. The effective surface of preformed silica decreases as inner gaps cannot be reached by diffusion. Thus, for LHCII immobilization on preformed silica, stronger binding interactions are required than for efficient entrapment. Therefore, Δ N11LHCII with its fewer positive charges is efficiently entrapped but binds only weakly to pre-formed silica. This model may also explain, at least in part, the decreased yield of encapsulation for silica networks consisting of larger (200 nm) silica particles as well. Here, the gaps formed are significantly larger than those in small particle networks. The size of these gaps is larger than that of the LHCII-micelles. Thus LHCII can diffuse out of the coprecipitate more easily.

How can we explain that R5LCHII shows higher yields of encapsulation but comparable results for post-precipitation binding? The R5 moiety was shown before to precipitate silicic acid [15; 44]. Due to its concentration in the lower micromolar range R5-LHCII did not precipitate detectable amounts of SiO₂ under the conditions applied in the present paper. However, when polycondensation was promoted by spermine in a R5-LHCII solution the R5 moiety presumably took part in the spermine aggregation or silica condensation process leading to an enhanced yield of encapsulation. By contrast, for the binding to preformed silica the silica-precipitating activity of the R5 moiety does not play a role. Whereas LHCII binds better than Δ N11LHCII because it has three more positive charges per protein monomer, the additional positive charges in R5-LHCII apparently make no difference any more.

Also for the stabilization of LHCII against thermal stress, its encapsulation into small inner gaps of the silica precipitate appears to be an advantage. In detergent solution membrane proteins are envisioned as being embedded in a detergent micelle that forms a belt covering the hydrophobic surfaces that in a biomembrane would face the hydrophobic interior of the lipid bilayer [45]. In case of LHCII chlorophylls cover large areas of these lateral surfaces and, thus, can easily dissociate from the protein. Isolated micelle-enclosed LHCII complexes in aqueous solution are fairly stable since the dissociated pigments have nowhere to go because of their

poor water solubility and, therefore, are likely to re-bind. However, if “empty” detergent micelles are added, an exchange of dissociated pigments between micelles is thought to take place, causing the LHCII to disintegrate.

Smaller silica particles forming smaller inter-particle gaps are likely to create a stronger diffusion barrier also for “empty” detergent micelles, thus protecting the entrapped LHCII from getting in contact with and losing their pigments to these micelles (Fig. 5 A).

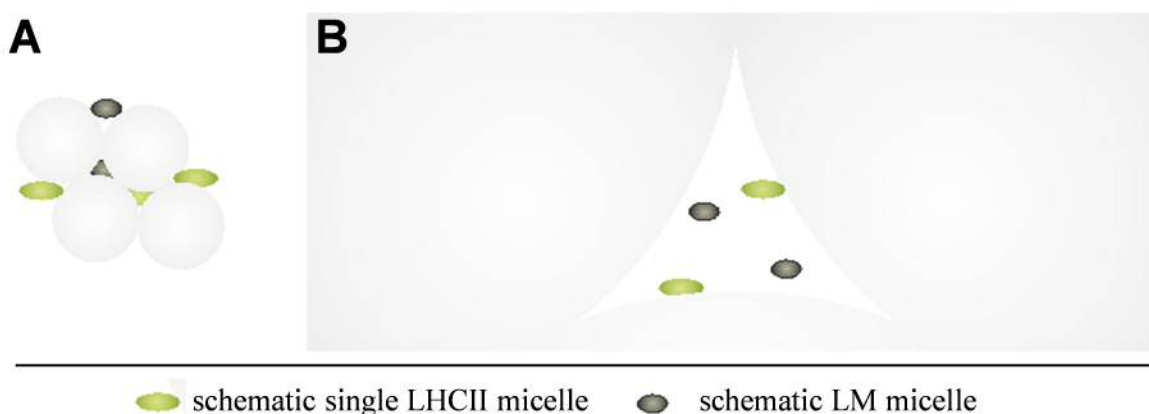


Fig. 5: Size relationship between an LM/LHCII micelle (green, 10 x 4 nm), a LM micelle (black, 7 x 4 nm [46]) and silica spheres.

In A) silica sphere diameter is 20 nm in B) 200 nm. In A) diffusion of micelles is limited by the small inter-particle spaces. Inter-particle spaces in B) allow contact between single LM/LHCII micelles as well as contact to LM micelles.

Encapsulation of LHCII within the narrow spaces between small scale silica spheres not only leads to stabilization but also seems to prevent aggregation of LHCII. On the other hand, LHCII within the precipitate do transfer their excitation energy to neighboring complexes as was shown by the DY-731 labeled LHCII which efficiently quench chlorophyll *a* emission of non-labeled ones. Steady state fluorescence data show that irrespective of the ratio of labeled and unlabeled LHCII within the precipitate the emission at 680 is not shifted. This excludes that we observe fluorescence quenching due to reabsorption events. We estimated a theoretical LHCII concentration of about 38 μM in a 2 μl precipitate for the case of LHCII localization in the water phase of the precipitate. The approximate inter-LHCII distance of evenly dispersed complexes in a 38 μM solution is 35 nm. The critical Foerster distance R_0 at which

an energy transfer efficiency of 50 % is expected, is ~ 5 nm for the donor/acceptor pair LHCII/Chlorophyll *a* [³⁶]. Thus, inter-LHCII distance in solution is too far for fluorescence energy transfer (FRET). In contrast, a calculation of LHCII distances for binding to idealized, spherical particles without inter-particle connections was performed (ESI†, page 149). The overall surface of a 20 nm diameter silica particle is 1256 nm². On this surface 4.3 LHCII have to be spread. As a result, on an idealized 2-dimensional surface inter-LHCII distances can be computed to 9 nm which is within the limit of $2R_0$ for FRET (detailed information concerning this estimate see ESI†, page 149). This calculation and the obvious energy transfer between LHCII within the precipitate underline our hypothesis of LHCII binding to silica particles.

Thus silica encapsulation of LHCII not only increases thermal stability substantially but also allows for efficient intertrimeric energy transfer without any LHCII aggregation despite its high concentration. So our silica based green nanomaterial not only has a very high absorption capacity due to its high pigment density and extinction coefficients, but should also be capable of energy transfer towards potential acceptors such as photochemically active chromophores.

Conclusions

In conclusion, LHCII to our knowledge is the first membrane protein that has been stabilized against thermal stress by coprecipitation with an amine in silica. The size of silica spheres is inversely related to the yield of LHCII stabilization and encapsulation and can be influenced by the N:Si ratio or the charge of buffer molecules in dependence on the pH-value. Spatial separation of detergent micelles as a consequence of LHCII interacting with the silica surface and sequestration into confined nano compartments is interpreted as the underlying principle of LHCII stabilization, preventing the intermicellar exchange of hydrophobic pig-

ments. Since LHCII within the amorphous silica show efficient transfer of excitation energy towards low energy acceptors, this kind of hybrid material not only contains significantly stabilized light harvesting components but also offers potential as an energy conducting nanomaterial.

Acknowledgements

We thank Gunnar Glasser from the Max Plank Institute for Polymer Research (Mainz) for preparing REM-pictures and EDX-spectra. S.R. thanks the *Studienstiftung des deutschen Volkes* for his doctoral fellowship. Thanks to Christoph Eckrich, Franziska Reuter and Daniel Palm for helping with some experiments. Thanks to Andre H. Mueller, now Stanford CA, for creating Cys-free LHCII variant C79Sh.

Notes

† Electronic Supplementary Information (ESI) available

References

- [¹] Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., Chang, W. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, 428, 287–292.
- [²] Standfuss, J., van Terwisscha Scheltinga, A. C., Lamborghini, M., Kühlbrandt, W. (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J*, 24, 919–928.
- [³] Paulsen, H., 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.
- [⁴] Rogl, H., Kosemund, K., Kühlbrandt, W., Collinson, I. (1998) Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Letters*, 432, 21–26.
- [⁵] Hobe, S., Pryttulla, S., Kuehlbrandt, W., Paulsen, H. (1994) Trimerization and crystallization of reconstituted Light-harvesting chlorophyll a/b complex. *EMBO JOURNAL*, 13, 3423–3429.
- [⁶] Gundlach, K., Werwie, M., Wiegand, S., Paulsen, H. (2009) Filling the "green gap" of the major light-harvesting chlorophyll a/b complex by covalent attachment of Rhodamine Red. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787, 1499–1504.
- [⁷] Werwie, M., Xu, X., Haase, M., Basché, T., Paulsen, H. (2012) Bio Serves Nano: Biological Light-Harvesting Complex as Energy Donor for Semiconductor Quantum Dots. *Langmuir*, 28, 5810–5818.

- [⁸] Nagata, M., Amano, M., Joke, T., Fujii, K., Okuda, A., Kondo, M., Ishigure, S., Dewa, T., Iida, K., Secundo, F., Amao, Y., Hashimoto, H., Nango, M. (2012) Immobilization and Photocurrent Activity of a Light-Harvesting Antenna Complex II, LHCII, Isolated from a Plant on Electrodes. *ACS Macro Lett.*, *1*, 296–299.
- [⁹] Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D., Ottolenghi, M. (1990) Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes. *Materials Letters*, *10*, 1–5.
- [¹⁰] Ruiz-Hitzky, E., Aranda, P., Darder, M., Ogawa, M. (2011) Hybrid and biohybrid silicate based materials: molecular vs. block-assembling bottom-up processes. *Chem. Soc. Rev.*, *40*, 801.
- [¹¹] Portaccio, M., Lepore, M., Della Ventura, B., Stoilova, O., Manolova, N., Rashkov, I., Mita, D. G. (2009) Fiber-optic glucose biosensor based on glucose oxidase immobilised in a silica gel matrix. *J Sol-Gel Sci Technol*, *50*, 437–448.
- [¹²] Schuleit, M., Luisi, P. L. (2001) Enzyme immobilization in silica-hardened organogels. *Biotechnology and Bioengineering*, *72*, 249–253.
- [¹³] Coiffier, A., Coradin, T., Roux, C., Bouvet, O. M. M., Livage, J. (2001) Sol-gel encapsulation of bacteria: a comparison between alkoxide and aqueous routes. *J. Mater. Chem.*, *11*, 2039–2044.
- [¹⁴] Meunier, C. F., van Cutsem, P., Kwon, Y.-U., Su, B.-L. (2009) Investigation of different silica precursors: Design of biocompatible silica gels with long term bio-activity of entrapped thylakoids toward artificial leaf. *J. Mater. Chem.*, *19*, 4131.
- [¹⁵] Kröger, N., Deutzmann, R., Sumper, M. (1999) Polycationic Peptides from Diatom Biosilica That Direct Silica Nanosphere Formation. *Science*, *286*, 1129–1132.
- [¹⁶] Belton, D. J., Patwardhan, S. V., Perry, C. C. (2005) Spermine, spermidine and their analogues generate tailored silicas. *J. Mater. Chem.*, *15*, 4629.
- [¹⁷] Lutz, K., Gröger, C., Sumper, M., Brunner, E. (2005) Biomimetic silica formation: Analysis of the phosphate-induced self-assembly of polyamines. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *7*, 2812.
- [¹⁸] Belton, D. J., Patwardhan, S. V., Annenkov, V. V., Danilovtseva, E. N., Perry, C. C. (2008) From biosilicification to tailored materials: Optimizing hydrophobic domains and resistance to protonation of polyamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*, 5963–5968.
- [¹⁹] Luckarift, H. R., Spain, J. C., Naik, R. R., Stone, M. O. (2004) Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nat Biotech*, *22*, 211–213.
- [²⁰] Forsyth, C., Yip, T. W. S., Patwardhan, S. V. (2013) CO₂ sequestration by enzyme immobilized onto bioinspired silica. *Chem. Commun.*, *49*, 3191.
- [²¹] Forsyth, C., Patwardhan, S. V. (2013) Controlling performance of lipase immobilised on bioinspired silica. *J. Mater. Chem. B*, *1*, 1164.
- [²²] Chien, L.-J., Lee, C.-K. (2008) Biosilicification of dual-fusion enzyme immobilized on magnetic nanoparticle. *Biotechnol. Bioeng*, *100*, 223–230.
- [²³] Wu, S., Ellerby, L. M., Cohan, J. S., Dunn, B., El-Sayed, M. A., Valentine, J. S., Zink, J. I. (1993) Bacteriorhodopsin encapsulated in transparent sol-gel glass: a new biomaterial. *Chem. Mater*, *5*, 115–120.
- [²⁴] Besanger, T. R., Easwaramoorthy, B., Brennan, J. D. (2004) Entrapment of Highly Active Membrane-Bound Receptors in Macroporous Sol-Gel Derived Silica. *Anal. Chem.*, *76*, 6470–6475.

- [²⁵] O'Neill, H., Greenbaum, E. (2005) Spectroscopy and Photochemistry of Spinach Photosystem I Entrapped and Stabilized in a Hybrid Organosilicate Glass. *Chem. Mater.*, *17*, 2654–2661.
- [²⁶] O'Dell, W. B., Beatty, K. J., Kuo-Hsiang Tang, J., Blankenship, R. E., Urban, V. S., O'Neill, H. (2012) Sol-gel entrapped light harvesting antennas: immobilization and stabilization of chlorosomes for energy harvesting. *J. Mater. Chem.*, *22*, 22582.
- [²⁷] Rooke, J. C., Léonard, A., Sarmiento, H., Meunier, C. F., Descy, J.-P., Su, B.-L. (2011) Novel photosynthetic CO₂ bioconverter based on green algae entrapped in low-sodium silica gels. *J. Mater. Chem.*, *21*, 951.
- [²⁸] Cashmore, A. R. (1984) Structure and Expression of a Pea Nuclear Gene Encoding a Chlorophyll a/b-Binding Polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*, 2960–2964.
- [²⁹] Kosemund, K., Geiger, I., Paulsen, H. (2000) Insertion of light-harvesting chlorophyll a/b protein into the thylakoid. *European Journal of Biochemistry*, *267*, 1138–1145.
- [³⁰] Horn, R. (2004) Early Steps in the Assembly of Light-harvesting Chlorophyll a/b Complex: Time-Resolved Fluorescence Measurements. *Journal of Biological Chemistry*, *279*, 44400–44406.
- [³¹] Booth, P. J., Paulsen, H. (1996) Assembly of Light-Harvesting Chlorophyll a/b Complex in Vitro Time-Resolved Fluorescence Measurements †. *Biochemistry*, *35*, 5103–5108.
- [³²] Paulsen, H., Finkenzeller, B., Kuhlein, N. (1993) Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *Eur J Biochem*, *215*, 809–816.
- [³³] Butler, P. J. G. a. K. W. (1988) Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex from chloroplast membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*, 3797–3801.
- [³⁴] Martinson, T., Plumley, F. (1995) One-Step Extraction and Concentration of Pigments and Acyl Lipids by sec-Butanol from in Vitro and in Vivo Samples. *Analytical Biochemistry*, *228*, 123–130.
- [³⁵] Horton, P., Ruban, A. V., Rees, D., Pascal, A. A., Noctor, G., Young, A. J. (1991) Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll—protein complex. *FEBS Letters*, *292*, 1–4.
- [³⁶] Lauterbach, R., Liu, J., Knoll, W., Paulsen, H. (2010) Energy Transfer between Surface-Immobilized Light-Harvesting Chlorophyll a / b Complex (LHCII) Studied by Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Spectroscopy (SPFS). *Langmuir*, *26*, 17315–17321.
- [³⁷] Patwardhan, S. V., Clarson, S. J., Perry, C. C. (2005) On the role(s) of additives in bioinspired silicification. *Chem. Commun*, 1113.
- [³⁸] Patwardhan, S. V., Tilburey, G. E., Perry, C. C. (2011) Interactions of Amines with Silicon Species in Undersaturated Solutions Leads to Dissolution and/or Precipitation of Silica. *Langmuir*, *27*, 15135–15145.
- [³⁹] Iler, R. K. (1979) The Chemistry of Silica. 1st ed., Hoboken, *John Wiley & Sons*.
- [⁴⁰] Brunner, E., Lutz, K., Sumper, M. (2004) Biomimetic synthesis of silica nanospheres depends on the aggregation and phase separation of polyamines in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *6*, 854.
- [⁴¹] Patwardhan, S. V., Emami, F. S., Berry, R. J., Jones, S. E., Naik, R. R., Deschaume, O., Heinz, H., Perry, C. C. (2012) Chemistry of Aqueous Silica Nanoparticle Surfaces and the Mechanism of Selective Peptide Adsorption. *J. Am. Chem. Soc.*, *134*, 6244–6256.

- [⁴²] Puddu, V., Perry, C. C. (2012) Peptide Adsorption on Silica Nanoparticles: Evidence of Hydrophobic Interactions. *ACS Nano*, 6, 6356–6363.
- [⁴³] Cardoso, M. B., Luckarift, H. R., Urban, V. S., O'Neill, H., Johnson, G. R. (2010) Protein Localization in Silica Nanospheres Derived via Biomimetic Mineralization. *Adv. Funct. Mater.*, 20, 3031–3038.
- [⁴⁴] Knecht, M. R., Wright, D. W. (2003) Functional analysis of the biomimetic silica precipitating activity of the R5 peptide from *Cylindrotheca fusiformis*. *Chem. Commun.*, 3038.
- [⁴⁵] Roth, M.; Lewit-Bentley, A.; Michel, H.; Deisenhofer, J.; Huber, R.; Oesterhelt, D. (1989) Detergent structure in crystals of a bacterial photosynthetic reaction centre. *Nature*, 340, 659–662.
- [⁴⁶] Dupuy, C., Auvray, X., Petipas, C., Rico-Lattes, I., Lattes, A. (1997) Anomeric Effects on the Structure of Micelles of Alkyl Maltosides in Water. *Langmuir*, 13, 3965–3967.

Electronic Supplementary Information (ESI)**Silica encapsulation of a recombinant light-harvesting complex (LHCII) yields energy conducting hybrid material with significant heat stability**

Sebastian Roeder, Stephan Hobe and Harald Paulsen

Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz Johannes-von-Muellerweg 6, 55099 Mainz, Germany. Fax: +49 6131-23787; Tel: +49 6131-39-24633; E-mail: paulsen@uni-mainz.de

Statistical Information:

Fig 2: Data of non-modified LHCII averaged from 14 (Tris pH 6.0) and 4 (Tris pH 7.5, PB 6.0, PB 7.5) independent measurements. R5 modified LHCII precipitation was performed four times at Tris pH 6.0 and eight times at PB pH 7.5. Coprecipitation of N-terminal deficient LHCII took place in Tris pH 6.0 two times.

Fig 3 A: Data averaged from 12 (Tris pH 6.0), 3 (Tris pH 7.5, PB 6.0, PB 7.5) and 4 (free LHCII) independent measurements.

Fig 3 B: Data averaged from 3 independent measurements.

Additional results:

Coprecipitation was performed without LHCII under different buffer conditions (Tris at pH 6.0 and 7.5 and PB at the same pH values). Precipitates were washed in water and dried on silica wavers for at least 12 h (Fig. S1).

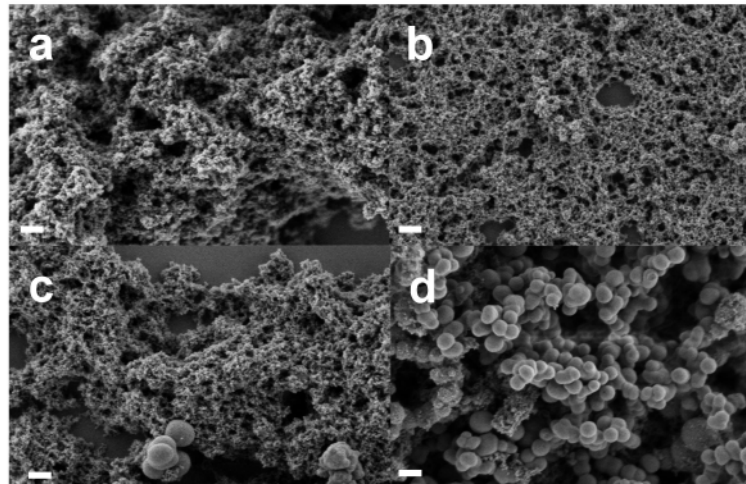


Fig. S 1: SEM pictures of LHCII-free silica precipitates.

Precipitation with spermine (1 mM) was done in a) Tris at pH 6.0, b) Tris at pH 7.5, c) PB at pH 6.0, d) PB at pH 7.5. Silicic acid concentration was in all cases 20 mM. Bars 200 nm

The composition of precipitates was assessed by EDX measurement (Fig. S2).

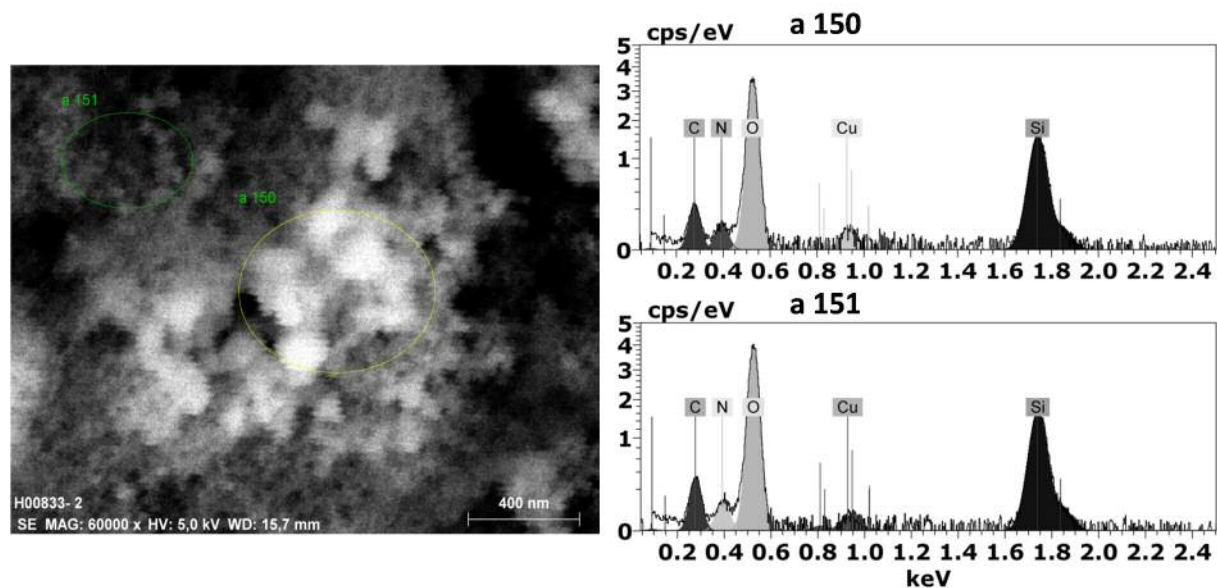


Fig. S 2: EDX measurement and element characterization.

Representative sample of a Tris at pH 7.5 precipitation was dried on copper band and afterwards examined with EDX. Two areas (a150 and a151) were analyzed with respect to their element composition.

As is shown in Fig. 1 and 3 in the main text, smaller particle sizes lead to higher extents of stabilization. Since different sizes were produced by variation of buffer and pH stabilization of LHCII might also be affected by these parameters. In order to exclude this coprecipitation was performed under constant buffer conditions (50 mM Tris pH 6.0) but with varying ratios of amine nitrogen / silicic acid (N:Si-ratio). It has been shown before that this ratio influences the particle size [¹⁶]. We applied a constant silicic acid concentration of 20 mM and varied the spermine concentration from 0.5 mM (N:Si = 0.1) to 5 mM (N:Si = 1). We measured Em_{680}/Em_{655} of encapsulated LHCII before (reference = 1) and after 24 h thermal stress at 50°C. These results were normalized to the results at a N:Si-ratio of 0.2 (1 mM spermine, corresponding to the results shown in main text) (Fig. S 3). An increase of N:Si leads to significantly larger silica particles with diameters of approximately 200 nm at N:Si = 0.5 and 1. At N:Si = 0.25 the particles are comparable to the ones in PB pH 6.0 and Tris pH 7.5. At a N:Si-ratio of 0.1 very small monodisperse particles occur. The extent of stabilization is the same at a N:Si-ratio of 0.1 and 0.2. Any further increase of this ratio also produces larger spheres with a concomitant loss of LHCII stability. This further corroborates the crucial function of mere sphere size for LHCII stabilization.

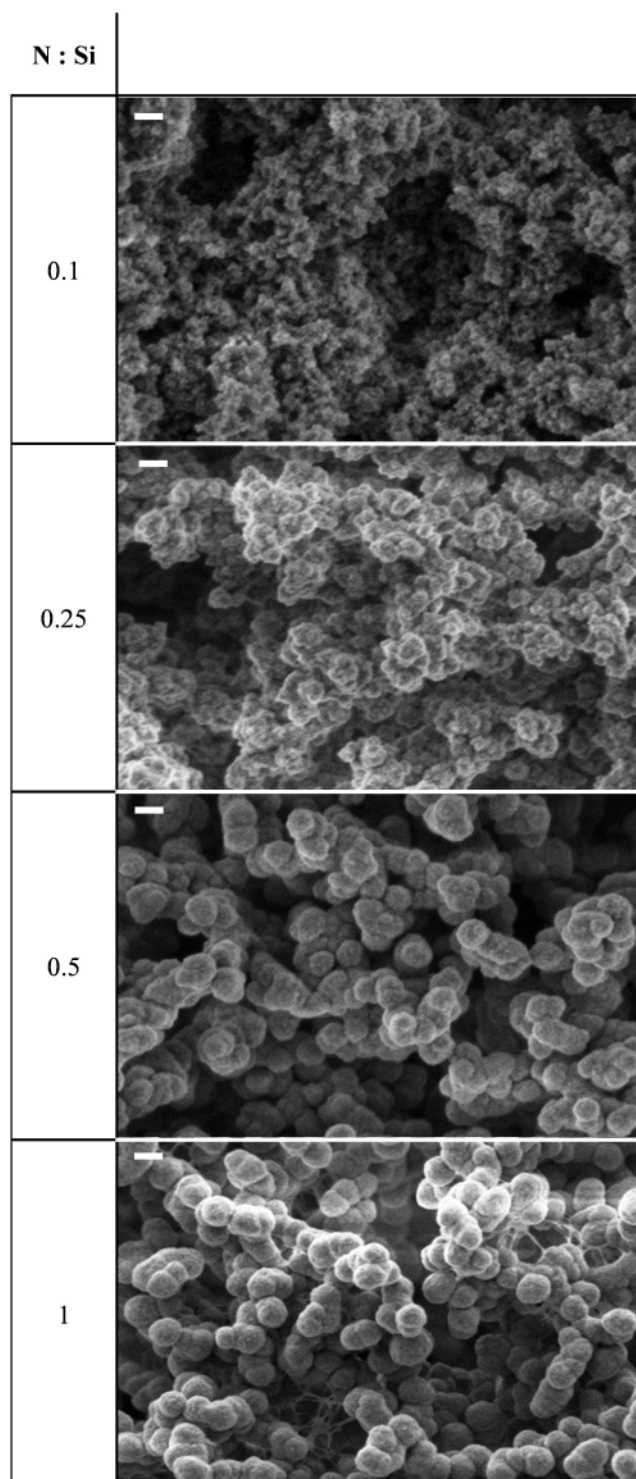


Fig. S 3: Coprecipitation of LHCII at different N:Si ratios.

Coprecipitation of LHCII was performed at pH 6.0 (50 mM Tris) with 20 mM silicic acid and spermine concentration was varied to adjust N:Si ratios between 0.1 and 1. White bars = 200 nm.

Silica precipitation was performed without LHCII. The precipitates were washed and resuspended in a buffered solution [Tris pH 6.0] of LHCII, R5-LHCII or Δ N11LHCII ($c_{\text{end}} = 1 \mu\text{M}$) for 30 min. Afterwards the precipitates were separated by centrifugation. LHCII binding to silica was calculated from its concentration in the supernatant (Fig. S 4).

41 and 48 % of R5-LHCII and LHCII respectively was bound to preformed silica, however with largely overlapping standard deviations. Δ N11LHCII binding apparently was less efficient (20 %) but also less well defined as indicated by an even larger relative deviation. This implies that binding to preformed silica is charge-dependent since Δ N11LHCII misses nine basic amino acids per trimer. This is in contrast to the extent of encapsulation during coprecipitation, where no significant difference between LHCII and Δ N11LHCII was observed (Fig. 2).

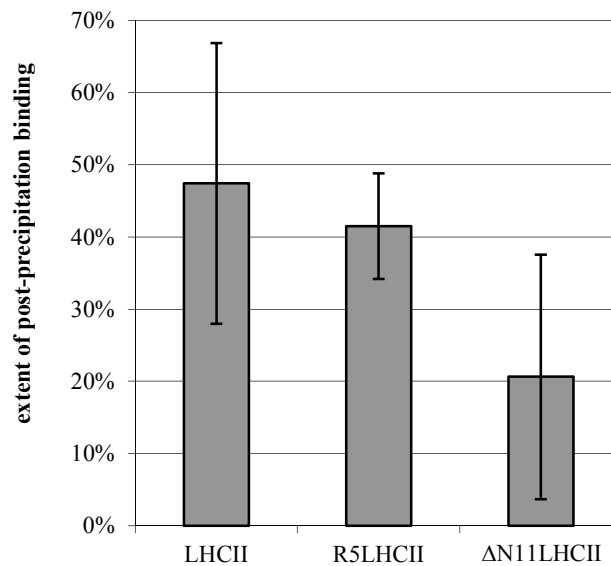


Fig. S 4: Post-precipitation LHCII binding.

An LHCII-free precipitation of silica was performed in Tris pH 6.0, 0.1 % LM, 1 mM spermine and 20 mM silicic acid. The washed precipitates were incubated with complex (LHCII, R5-LHCII or Δ N11LHCII, $c_{\text{end}} = 1 \mu\text{M}$) solution (buffered in Tris pH 6.0 and 0.1 % LM). Binding was quantified by determination of LHCII concentration in the supernatant after 30 min incubation. Results are averaged from four (LHCII) or three (derivatives) independent measurements.

The calculation of Em_{680}/Em_{655} was done from emission spectra as shown in Fig. S 5.

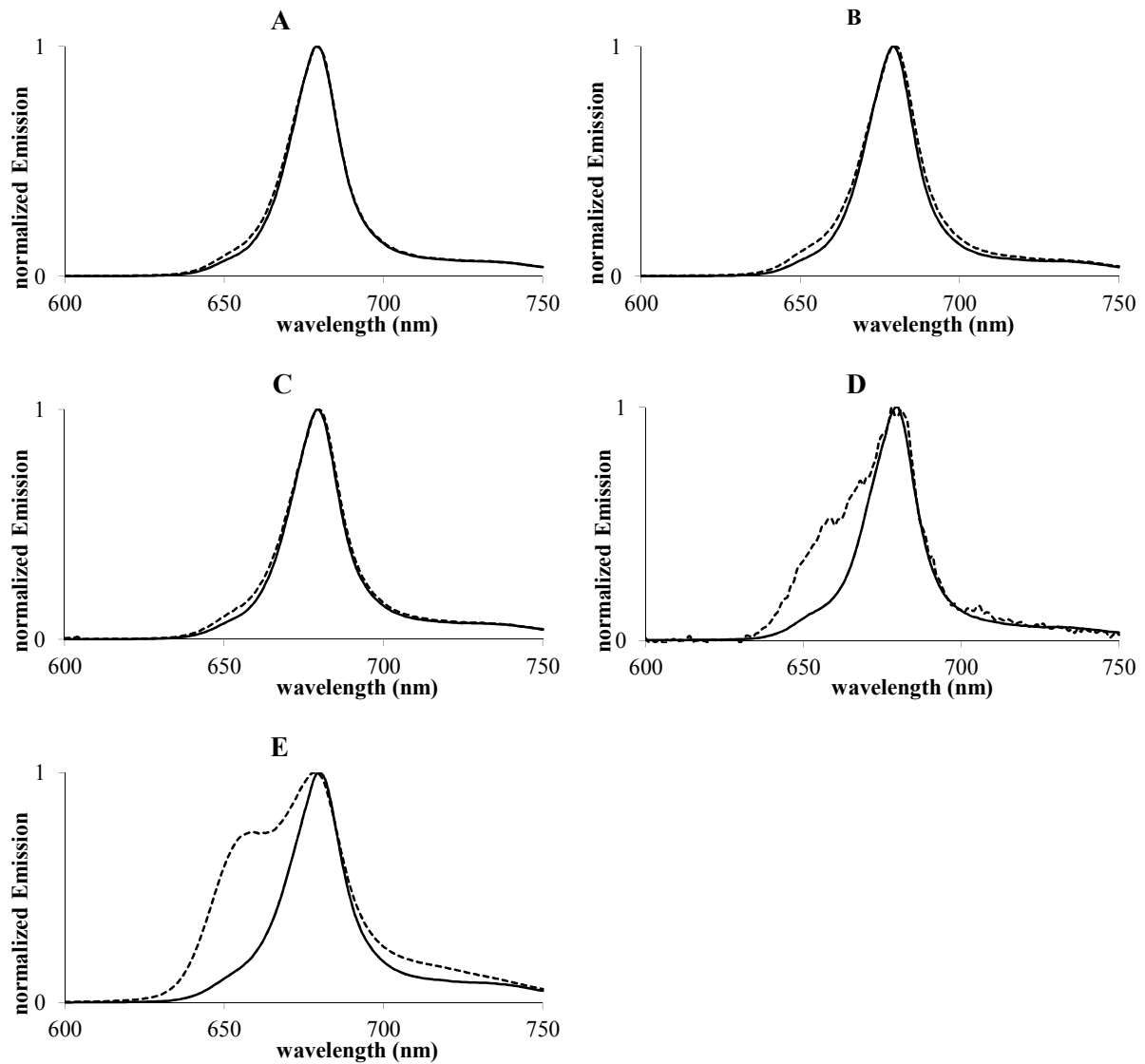


Fig. S 5: Fluorescence spectra of LHCII at different conditions.

Fluorescence spectra of silica enclosed LHCII before (solid lines) and after (dotted lines) 24 h heat incubation. Dashed graphs show spectra of LHCII before coprecipitation. Precipitation of LHCII ($1\mu\text{M}$) was done in the presence of spermine (1 mM) and

Tris pH 6.0 (A),

Tris pH 7.5 (B),

PB pH 6.0 (C),

PB pH 7.5 (D). Silicic acid concentration was 20 mM in all cases.

E: Solubilized LHCII before (solid) and after (dotted) 30 min heat incubation

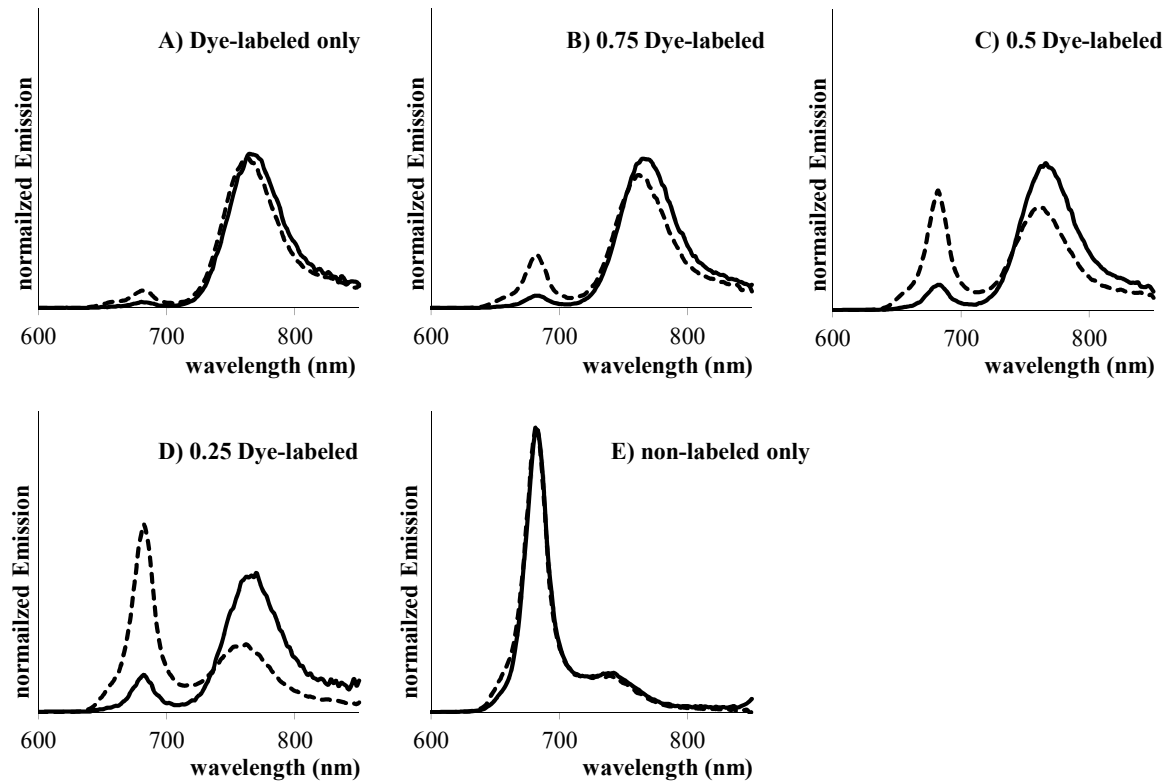


Fig. S 6: Encapsulation of LHCII into SiO₂ promotes inter-LHCII energy transfer.

Dye731-labeled LHCII and non-labeled LHCII were mixed at different ratios and fluorescence emission spectra were taken either in solution (dashed line) or after coprecipitation (solid line), excitation was at 470 nm. All spectra were normalized to the same area between 600 and 850 nm.

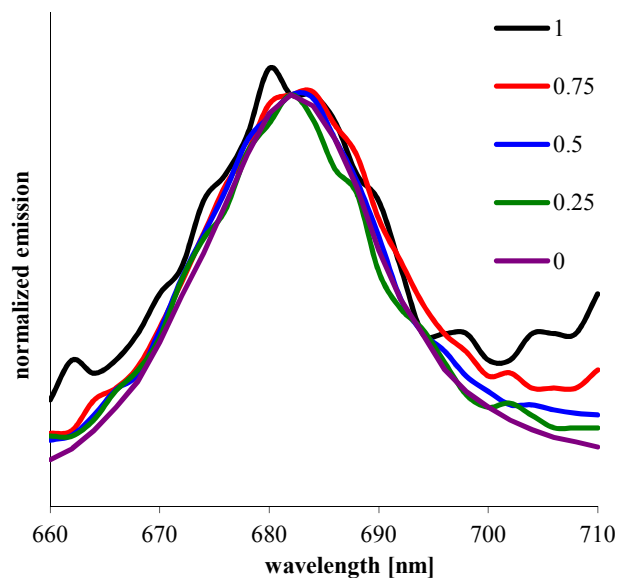


Fig. S 7: Normalized emission of encapsulated dye-labeled complexes.

Dye-labeled and non-labeled LHCII were mixed in the described stoichiometries and were encapsulated into silica by spermine induced coprecipitation (Tris at pH 6.0). Emission spectra were recorded ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) and normalized to the emission of chlorophyll *a*.

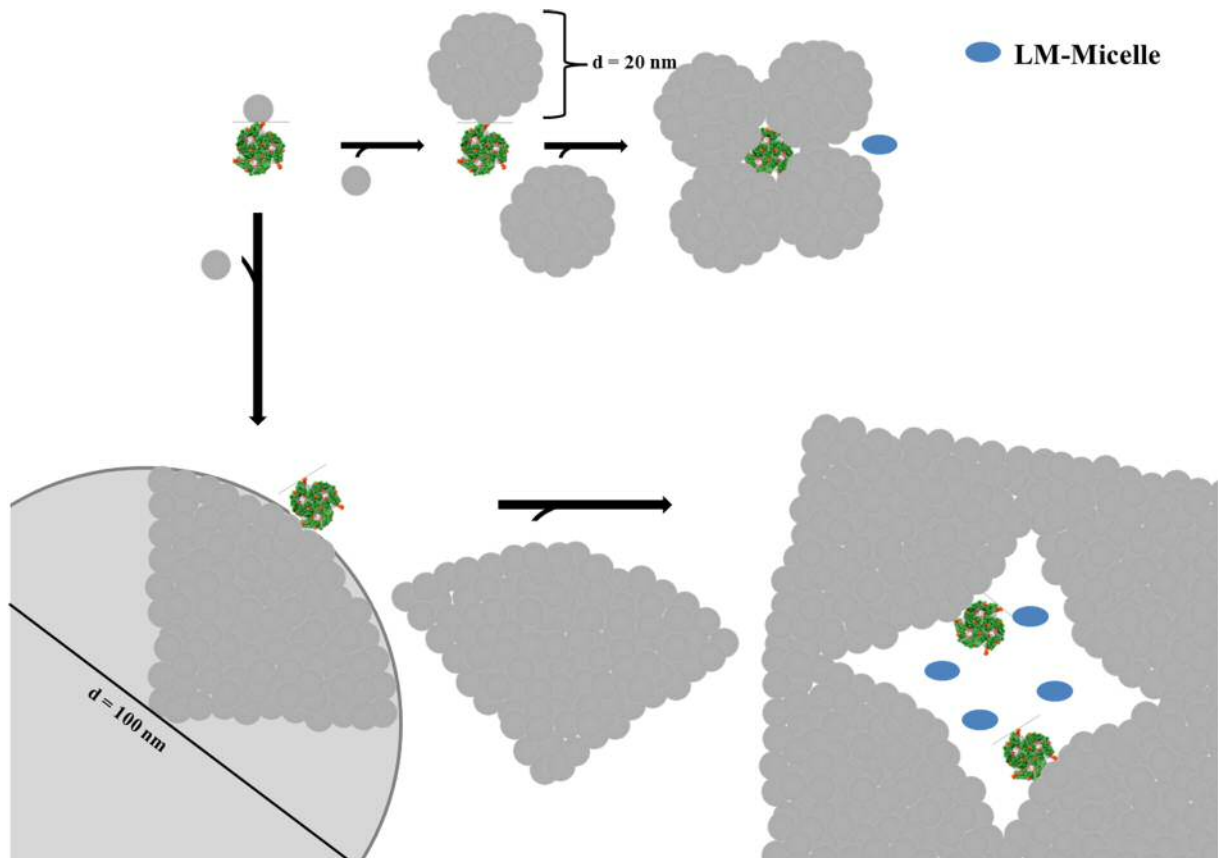


Fig. S 8: Scheme of hypothetical encapsulation process into small silica particles (upper pathway) and large particles (lower pathway).
LHCII diameter is 10 nm.

Inter-LHCII distance calculation:

Amount of silica precipitated during coprecipitation = 1.6 μmol = 96 μg

With a density of 2.2 $\text{g}/\text{cm}^3 \Rightarrow$ total volume of silica = 43.6 nl = $4.4 \times 10^{+16} \text{ nm}^3$

Volume of a 20 nm (d = diameter) ideal silica particle: $V = 1/6 * \pi * d^3 = 4190 \text{ nm}^3$

Amount of silica particles = total volume of silica / volume of a sphere = $4190 \text{ nm}^3 / 4.4 \times 10^{+16} \text{ nm}^3 = 1.0 \times 10^{+13}$ spheres

Surface of one 20 nm (d = diameter) ideal particle: $A = \pi * d^2 = 1260 \text{ nm}^2$

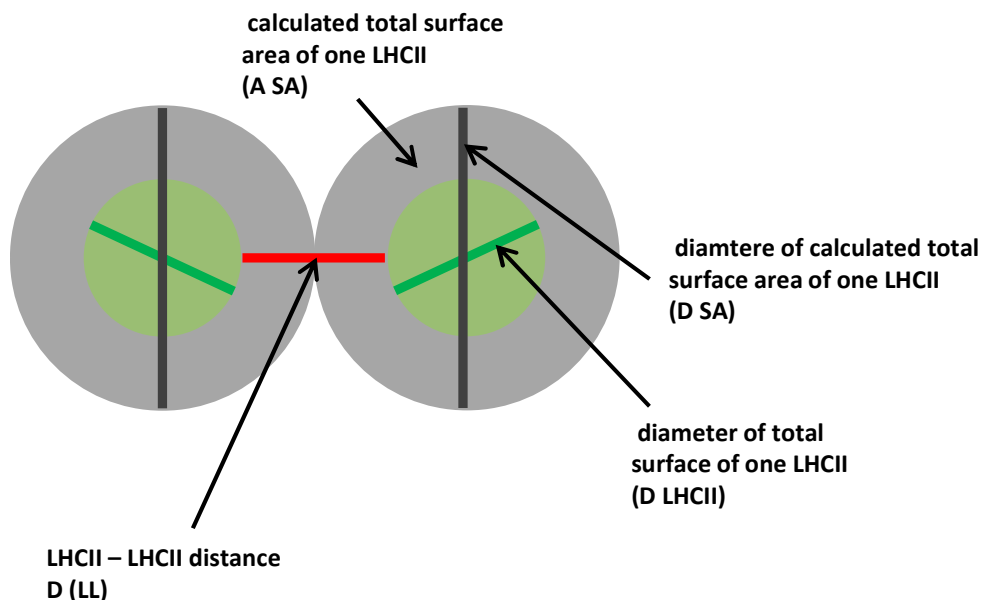
Amount of LHCII = $7.5 \times 10^{-11} \text{ mol} = 4.5 \times 10^{+13}$

LHCII per silica particle = $4.5 \times 10^{+13} / 1.0 \times 10^{+13} = 4.3$

Surface area available for of one LHCII = A (SA) = particle surface / LHCII per particle
 = $1260 \text{ nm}^2 / 4.3$
 = 290 nm^2
 \Rightarrow circle diameter = D (SA) = 19.2 nm

Diameter of one LHCII micelle = D (LHCII) = 10 nm

Inter LHCII distance = D (LL) = D (SA) – D (LHCII) = 19.2 nm – 10 nm = 9.2 nm



Explanation of used terms for inter-LHCII distance calculation

3.3. Ergänzende Resultate zur Copräzipitation

Ergänzend zu den in II.3.2 vorgestellten Ergebnissen erbrachten Copräzipitationsversuche weitere Informationen.

3.3.1. Salzeinflüsse auf Copräzipitation

In der Publikation (II.3.2) wurde eine Korrelation zwischen der Ladung der Puffermoleküle und den Silikatstrukturen aufgezeigt, die wiederum verantwortlich für die Menge an eingebauten Komplexen und deren Stabilität ist. Um die dort aufgestellte Hypothese des negativen Einflusses überwiegend zweifach negativ geladener Puffermoleküle zu verifizieren, wurde eine Copräzipitation unter Tris^{6,0}-Bedingungen durchgeführt und dieser 0,05 M Na₂SO₄ zugesetzt. Das SO₄²⁻ trägt unter den gewählten Bedingungen wie die bei pH 7,5 dominierenden HPO₄²⁻-Ionen zwei negative Ladungen und weist einen ähnlichen Ionenradius auf. Es sollte ermittelt werden, ob die SO₄²⁻-Ionen den Effekt des schwächeren Stabilisierungsvermögens von Phosphatpuffer simulieren können. Dabei wurden die Parameter Einbaurrate, Stabilisierungsvermögen nach 24 h thermischem Stress bei 50°C und der Fluoreszenzerhalt bestimmt (Tab. II.5):

Der Anteil in Silikat eingebauter Komplexe lag mit 64 ± 1 % unter den Werten von Tris^{6,0/7,5}- bzw. Phosphat^{6,0}-Bedingungen, die oberhalb von 73 % lagen, aber deutlich über dem Wert von Phosphat bei pH 7,5, der lediglich 29 % Komplexeinschluss erreichte. Auch hinsichtlich des Ausmaßes an Stabilisierung war mit einem EmChl *a*/EmChl *b* von 0,57 ein schwächerer Wert für diese Bedingungen festzustellen als für Tris^{6,0/7,5} und Phosphat^{6,0}, bei denen Werte von 0,74 und 0,83 erreicht wurden. Der Fluoreszenzerhalt betrug nach 24 h thermischen Stress noch $25,2 \pm 4,9$ %.

Tab. II.5: Sulfateinfluss auf Copräzipitation

Einer Copräzipitation (Pufferbedingung Tris^{6,0}) wurden 0,05 M Na₂SO₄ zugesetzt. Es wurde mittels HPLC-Quantifizierung die Einbaurrate bestimmt und vor und nach 24-h Stress bei 50°C Fluoreszenzspektren aufgenommen und hieraus das Stabilisierungsvermögen und der Fluoreszenzerhalt bestimmt ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 600-750$ nm).

Einbaurrate	normierte EmChl <i>a</i> /EmChl <i>b</i> nach Stress	Fluoreszenzerhalt nach Stress
64,9 ± 0,05 %	0,57 ± 0,12	25,2 ± 4,9

Unter noch nicht optimierten Copräzipitationsbedingungen wurde in einem vergleichbaren Ansatz die Sulfatkonzentration variiert und 0,001; 0,01 und 0,1 M Na₂SO₄ eingesetzt. Mit steigender Konzentration an SO₄²⁻-Ionen nahm die Chlorophyll *b*-Fluoreszenz dabei signifikant zu.

3.3.2. Einfluss von Saccharose und LM auf die Copräzipitation

In den in II.3.2 vorgestellten Copräzipitationsansätzen wurden stets 1 % [w/v] LM und 0,25 M Saccharose verwendet. Diese Konzentrationen wurden zu Beginn unter nicht optimierten Copräzipitationsbedingungen (hinsichtlich Puffer, pH-Wert und Inkubationszustand) ermittelt. Um einen möglichst großen, reproduzierbaren Versuchsquerschnitt zu erhalten, wurden diese Bedingungen bei allen

Versuchen beibehalten. Unter den optimierten Bedingungen wurde dennoch getestet, ob die anfangs ermittelten Konzentrationen tatsächlich die optimalen waren.

Es wurden Copräzipitationen in Tris^{6,0} durchgeführt und dabei die LM-Konzentration (0,1; 0,5; 1 und 2 % [w/v]) sowie die Saccharosekonzentration (0; 0,2; 0,4 und 0,6 M) variiert. Sowohl Einbaurate als auch Stabilisierungsvermögen wurden getestet. Es zeigte sich, dass weder die Einbaurate noch das Ausmaß der Stabilität sich in Abhängigkeit der Variation einer der beiden Komponenten veränderte und den in II.3.2 dargestellten Werten entsprachen.

3.3.3. Zugänglichkeit zu LHCII im Silikat

Aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen aus II.3.2 wird ersichtlich, dass sich die Silikatstrukturen hinsichtlich ihrer Partikelgröße signifikant unterscheiden. Während eine Copräzipitation mit Tris^{6,0} zu sehr kleinen (etwa 20 nm) monodispersen Partikeln führte, waren bei der Verwendung von Phosphat^{7,5} sehr große Strukturen mit etwa 200 nm Durchmesser zu sehen. Es sollte überprüft werden, ob diese unterschiedlichen Strukturen neben dem Stabilisierungsvermögen auch die Zugänglichkeit der eingeschlossenen Komplexe für denaturierende Substanzen beeinflussen.

3.3.3.1. Zugänglichkeit für kleine Moleküle

Es wurden Copräzipitationen unter Tris^{6,0} und Phosphat^{7,5} hergestellt und in WP resuspendiert. Zu diesen Lösungen wurden gleiche Volumina verschiedener Agenzien zugegeben, so dass sie in der in Klammern angegebenen Endkonzentration vorlagen: LDS (5 % w/v [A]), Butan-2-ol (50 % v/v [B]), Ethanol (30 % v/v [C], 50 % v/v [D]). Die Proben wurden vor Zugabe der Agenzien fluoreszenzspektroskopisch vermessen und zu definierten Zeitpunkten nach Zugabe. Die Vermessung erfolgte in 96-Well-Platten im Tecan infiniteM1000, wobei die Proben vor jeder Messung resuspendiert wurden. Die EmChl *a*/EmChl *b* wurde auf den Wert vor Agenzienzugabe normiert (Abb. II.5: Zugänglichkeit für kleine destruktive Agenzien zu Silikat-präzipitiertem LHCII).

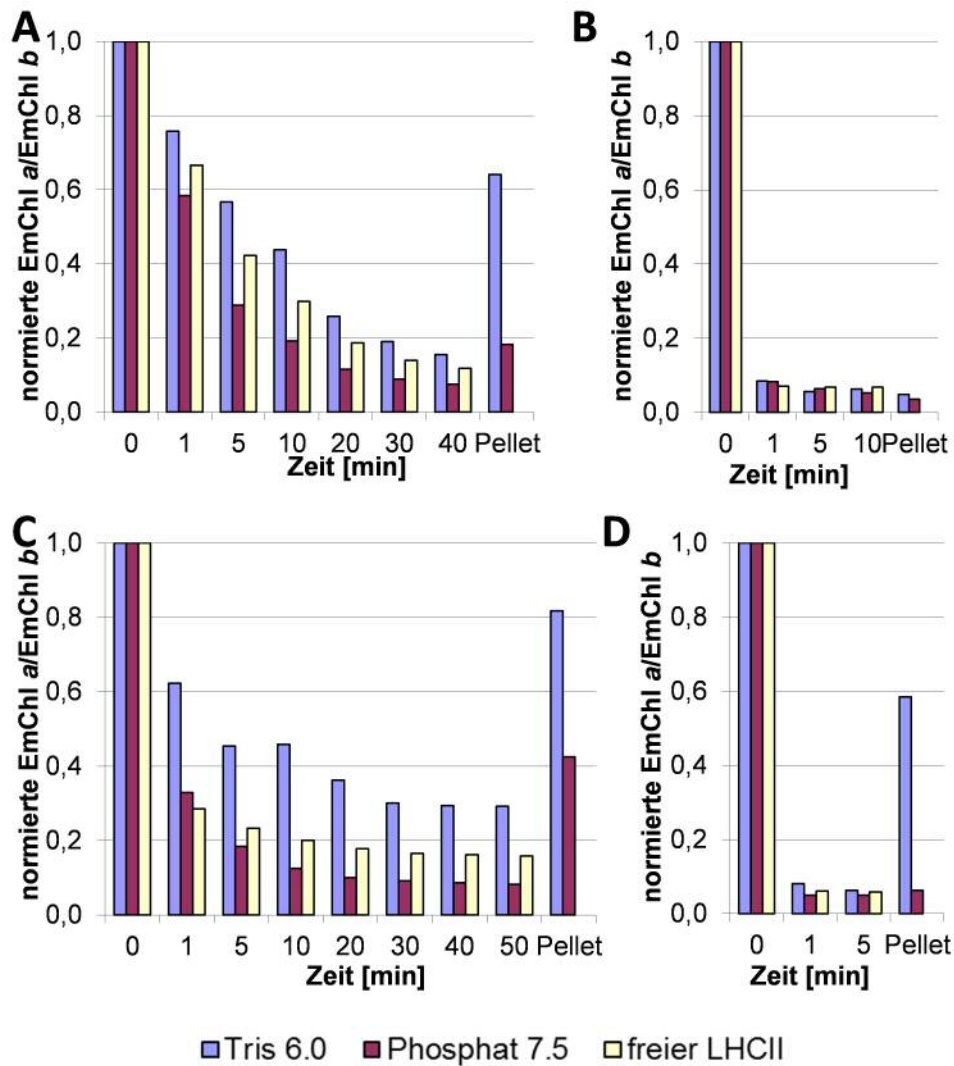


Abb. II.5: Zugänglichkeit für kleine destruktive Agenzien zu Silikat-präzipitiertem LHCII

LHCII wurde in Tris^{6.0} (blau) und Phosphat^{7.5} (rot) copräzipitiert oder als Kontrolle in Lösung gehalten (gelb). Die Pellets wurden in 100 μ l WP resuspendiert und 100 μ l folgender Agenzien wurden zugefügt: LDS ($c_{\text{end}} = 5\%$) [A], Butan-2-ol ($c_{\text{end}} = 50\%$) [B], Ethanol ($c_{\text{end}} = 30\%$) [C] und Ethanol ($c_{\text{end}} = 50\%$) [D]. Es wurden in den angegebenen Zeitabständen Fluoreszenzspektren (600 – 750 nm, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) aufgenommen (Tecan infinite M1000).

Bei der Verwendung von 50 % Ethanol bzw. Butan-2-ol weisen die Komplexlösungen schon nach 1 min ein EmChl *a*/EmChl *b* von unter 0,1 auf, was auf völlig zerstörte Komplexe schließen lässt. Bei Butan-2-ol löste sich zudem das Pellet vollständig innerhalb von 5 min auf. Bei Ethanol konnte das Pellet separiert werden und in frischem WP resuspendiert vermessen werden. Hierbei zeigte sich, dass das in Tris gefällte Präzipitat noch einen Quotienten von fast 0,6 aufwies, während das Phosphat-Pellet einen Wert vergleichbar mit freien Komplexen nach Agenszugabe ergab. Dieser Effekt ist in 30 %igem Ethanol noch deutlicher zu erkennen. Die Abnahme des EmChl *a*/EmChl *b*-Quotienten über 50 min geschah signifikant langsamer beim Tris-Pellet als bei dem Phosphat-Pellet, dessen Quotient sogar schneller sank als der von freien Komplexen. Nach 50 min wies das isolierte und frisch resuspendierte Tris-Pellet einen Wert von über 0,8 auf, während das vergleichbare Phosphat-Pellet bei etwa 0,4 lag. Auch bei der Verwendung von LDS trat eine verzögerte Abnahme des EmChl *a*/EmChl *b*-

Quotienten für das Tris-Pellet auf und die Abnahme bei Phosphat war wiederum stärker als bei freien Komplexen innerhalb von 40 min Inkubationszeit. Die frisch resuspendierten Pellets wiesen bei Tris-präzipitierten Pellets einen Wert von etwa 0,65 auf und bei Phosphat etwas unter 0,2.

3.3.3.2. Zugänglichkeit für eine lösliche Protease

Wie in II.3.3.3.1 beschrieben wurden Präzipitate mit Proteinase K inkubiert. Da die Inkubation bei deren Temperaturoptimum von 37°C stattfand, musste die thermisch bedingte Verringerung des EmChl *a*/EmChl *b*-Quotienten von der Proteinase-bedingten Abnahme unterschieden werden (Abb. II.6).

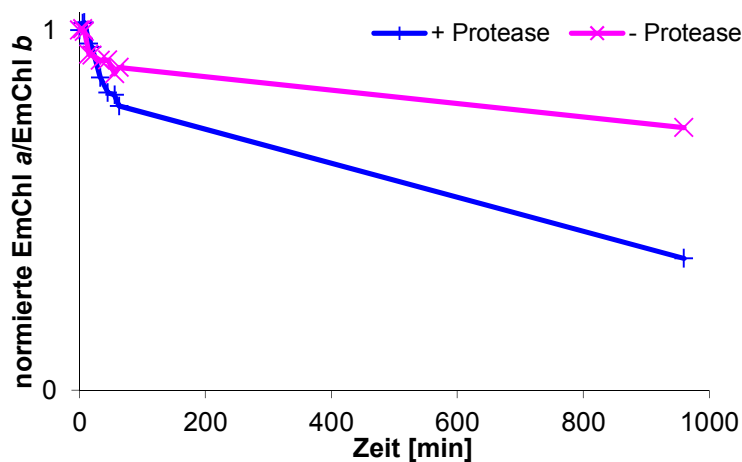


Abb. II.6: Proteinase K-Abbau von LHCII in Lösung

1 μM LHCII in Tris^{7,5} und 5 mM CaCl_2 wurden mit (+) 17,25 μM Protease (Proteinase K) bzw. ohne (-) diese über einen Zeitraum von 16 h bei 37°C inkubiert und vor und nach Proteasezugabe zu definierten Zeitpunkten Emissionsspektren aufgenommen (600 – 750 nm, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm). Die Messung erfolgte im Tecan infinite M1000.

Innerhalb von 16 h zeigte sich, dass der Quotient der Emission von Chlorophyll *b* im Verhältnis zur Chlorophyll *a*-Emission signifikant stärker zunahm wenn Proteinase vorhanden war. Damit eignete sich die Protease dafür, deren Zugänglichkeit zu LHCII in Silikatpellets, die unter verschiedenen Pufferbedingungen (Tris^{6,0} und Phosphat^{7,5}) präzipitiert wurden, zu untersuchen. Die Pellets wurden in WP resuspendiert und mit dem gleichen Volumen an Proteinase K versetzt ($c_{\text{end}} = 17,25 \mu\text{M}$) und bei 37°C über 18,5 h inkubiert. Vor jeder Messung eines Emissionsspektrums wurden die Pellets resuspendiert. Die Messung erfolgte im Tecan infinite M1000 (Abb. II.7).

Nach 18,5 h Inkubation konnte ähnlich wie bei den im vorigen Abschnitt dargestellten Ergebnissen festgestellt werden, dass die Abnahme der Emissionsquotienten bei den Tris^{6,0} copräzipitierten Komplexen am geringsten ausfiel und die Komplexe des aus den Phosphat^{7,5}-Pellets in der Größenordnung der freien Komplexe lag. Messungen über einen Zeitraum von etwa 4 h zeigten vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Die Intensität der Chlorophyll *b*-Schulter war zu jedem Zeitpunkt deutlich geringer bei den in Tris^{6,0} copräzipitierten Komplexen als bei denen aus Phosphat^{7,5} bzw. den freien Komplexen, deren Werte sich stets in etwa entsprachen.

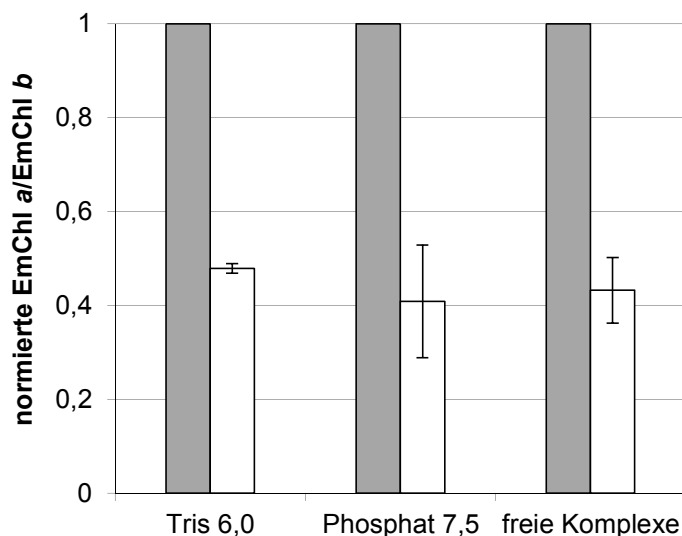


Abb. II.7: Zugänglichkeit Proteinase K zu Silikat-präzipitiertem LHCII

LHCII wurde in Tris^{6,0} und Phosphat^{7,5} copräzipitiert. Die Pellets wurden in 100 μ l WP resuspendiert und mit Proteinase K versetzt ($c_{\text{end}} = 17,25 \mu\text{M}$). Vor (grau) und nach (weiß) 18,5-stündiger Inkubation bei 37°C wurden Emissionsspektren gemessen und die Quotienten aus EmChl a/EmChl b bestimmt und auf den Wert vor Inkubationsbeginn normiert. Als Kontrolle dienen freie Komplexe ($c_{\text{end}} = 1 \mu\text{M}$). Die Messung fand im Tecan infinite M1000 statt. Pro Bedingung fanden zwei Messungen statt.

Damit zeigte sich sowohl bei der Zugänglichkeit kleiner Moleküle als auch bei der von einer löslichen Protease vergleichbare Tendenzen. Die unter Phosphat^{7,5}-Bedingungen präzipitierten Komplexe verhielten sich ganz ähnlich wie die freien Komplexe. Bei den in Tris^{6,0} in Silikat-eingeschlossenen Komplexen nahm die Chlorophyll *b*-Fluoreszenz deutlich verlangsamt zu (eine Ausnahme stellte Butanol dar, in dem die Komplexe in allen Fällen eine nahezu sofortige Störung der Energieweiterleitung aufwiesen).

3.3.4. Umgebungs- und Lagerungseinflüsse auf LHCII in Silikat

Es sollten zwei grundsätzliche Einflüsse auf das Stabilisierungsvermögen hinsichtlich der Umgebung bzw. Lagerung getestet werden: Zum einen, ob es möglich ist, während der Hitzeinkubation das Pellet auch nicht-wässrig unter N_2 zu lagern und zum anderen, ob ein Reifungsprozess der Präzipitate durch Lagerung vor dem thermischen Stress einen Einfluss auf das Stabilisierungsvermögen hat.

Das Pellet einer Copräzipitation unter Tris^{7,5}-Bedingungen wurde gewaschen und unter N_2 eingetrocknet. In diesem Zustand wurde es für 24 h bei 50°C inkubiert und anschließend resuspendiert und fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Das Pellet ließ sich dabei sehr schwer resuspendieren, d.h. die Menge an Probe war aufgrund der schnellen Absinkrate in der Küvette während der Messung recht gering. Aus den aufgenommenen Spektren ließ sich ein verbleibendes EmChl *a*/EmChl *b*-Verhältnis von 3,65 ermitteln, das in etwa dem Wert einer Probe entsprach, die in Phosphat bei pH 7,5 gefällt und im Wässrigen thermisch gestresst wurde. Die Lagerung unter N_2 hat also einen negativen Einfluss auf das Stabilisierungsvermögen der Komplexe im Silikat.

In einem weiteren Ansatz wurden Copräzipitationen in Tris bei pH 6,0 und in Phosphat bei pH 7,5 durchgeführt und in WP (gleiche Zusammensetzung für alle Pellets) bzw. unter N_2 eine Woche bei 4°C gelagert. Nach dieser Lagerung wurden die Pellets vor und nach 24 h Inkubation bei 50°C fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Es zeigte sich, dass nach der einwöchigen Lagerungsperiode unter N_2 bei den in Phosphat gefällten Proben schon eine sehr deutliche Chl *b*-Schulter auftrat, während

diese bei den anderen Ansätzen nur ganz schwach ausgeprägt, aber vorhanden, war (Abb. II.8 A).

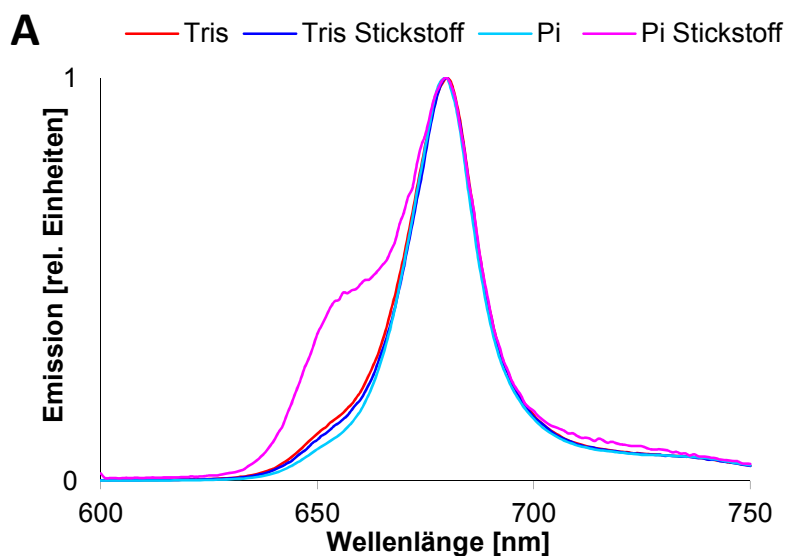


Abb. II.8: Lagerungseinflüsse auf Stabilisierungspotential der Copräzipitation

LHCII wurde unter zwei Pufferbedingungen copräzipitiert: Tris^{6,0} und Phosphat^{7,5}. Die Pellets wurden für eine Woche in zentrifugiertem Zustand gelagert: in WP bzw. unter Stickstoffatmosphäre (N₂). Vor und nach 24-stündigem Stress bei 50°C wurden Emissionsspektren aufgenommen (600 – 750 nm [$\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm]). In A sind die Spektren vor thermischem Stress gezeigt. Das Maß der Stabilisierung (B) wurde durch Normierung des Quotienten aus EmChl *a*/EmChl *b* auf den Wert vor Stress bestimmt. *Der Wert 0,08 ergibt sich unter Bezugnahme auf ein herkömmliches EmChl *a*/EmChl *b* vor Stress. Wie aus A) ersichtlich, ist dieses Verhältnis hier schon deutlich erhöht.

B

Probe	normierte EmChl <i>a</i> /EmChl <i>b</i> nach Stress
Tris	0,52
Tris N ₂	0,27
P _i	0,13
P _i N ₂	0,3/0,08*

Die Auswertung der Stabilisierungsexperimente (Abb. II.8 B) ergab, dass lediglich die im Wässrigen gelagerte Tris-Probe (0,52; damit höher als der Quotient bei Phosphat^{7,5}, vgl. II.3.2) einen Wert aufwies, der sich von freien Komplexen unterschied. Die unter N₂-gelagerten Tris-Proben (0,27) hoben sich dabei noch leicht von den Werten der Phosphat-Proben ab, die keinen Unterschied zu freien Komplexen hinsichtlich einer Stabilisierung zeigten.

3.3.5. Stabilisierung von R5C3.2h bei Spermin-Coprazipitationen in Phosphat pH 7,5

Wie in der Publikation dargestellt (vgl. II.3.2) zeigten die R5-modifizierte Komplexe eine erhöhte Einbaurrate sowohl unter Tris^{6,0} als auch unter Phosphat^{7,5}-Bedingungen. Die dort vorgestellte Stabilisierung des R5C3.2h bei einer Coprazipitation in Tris bei pH 6,0 entsprach derjenigen von C79Sh. Bei der Verwendung von Phosphatpuffer (pH 7,5) war jedoch ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Der Wert des normierten EmChl *a*/EmChl *b*-Quotienten nach Stress betrug $0,71 \pm 0,04$ und lag damit deutlich über jenem von C79Sh unter Phosphat^{7,5}-Bedingungen (0,47). Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. II.9) zeigten, dass die Silikatstruktur sehr homogen ist.

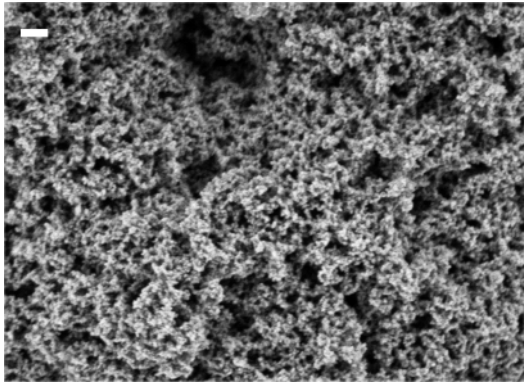


Abb. II.9: REM-Aufnahmen R5C3.2h Copräzipitation mit Spermin in Phosphat^{7,5}

1 μ M R5C3.2h wurde mit 1 mM Spermin in 0,05 M Phosphat^{7,5} und 0,02 M Kieselsäure copräzipitiert. Das Pellet wurde zweimal mit H_2O_{reinst} gewaschen und auf Siliciumwavern eingetrocknet. Die Probe wurde rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Größenskala = 200 nm.

Die Einzelpartikel lagen in Größenordnungen um 10-20 nm, wobei sie netzwerkartig miteinander verknüpft waren. Eine übergeordnete Struktur war nicht zu erkennen. Damit unterscheiden sich die Silikatstrukturen signifikant von denen einer Copräzipitation mit C79Sh und Spermin, deren Durchmesser in Größenordnungen um die 200 nm lagen (siehe hierzu II.3.2).

3.3.6. Verlust an Komplexen während Hitzeinkubation

In den vorangegangenen Passagen dieses Kapitels wurde bereits dargelegt, dass es während der Hitzeinkubation zu einem Verlust an Komplexen kam, was zu einem Verlust der Fluoreszenzintensität führte (vgl. II.3.1.2.2 und II.3.1.3). Bedingt war dies vor allem durch die Auflösung des Silikats und den Verlust an Probe in den Glasgeräten. Es sollte jedoch weiterhin überprüft werden, ob die Anwesenheit von kationischen Strukturen am LHCII durch Wechselwirkung mit der anionischen Silikatoberfläche einen Verlust reduzieren konnte.

Hierzu wurden die LHCII Varianten Δ N11h (verkürzt um die ersten 11 Aminosäuren, was einen Verlust von drei positiven Ladungen bedeutete) mit C79Sh und R5C3.2h auf Grund ihrer verbleibenden Fluoreszenz nach 24 h Inkubation bei 50°C verglichen. Die Komplexe wurden in Tris^{6,0} copräzipitiert und wie in II.3.2 beschrieben inkubiert. Der erhaltene Anteil an totaler Fluoreszenz vor und nach Hitzeinkubation wurde bestimmt (Abb. II.10), wobei ein intakter Energietransfer vorausgesetzt wurde.

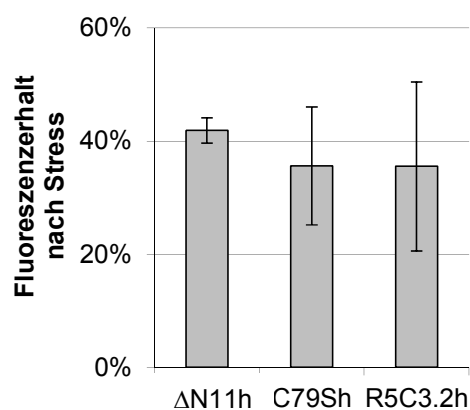


Abb. II.10: Komplexverlust während Hitzeinkubation anhand des Fluoreszenzintensitätserhalts

Der N-terminal um 11 Aminosäuren verkürzte Δ N11h, C79Sh und R5C3.2h wurden in einer Copräzipitation (Pufferbedingung Tris^{6,0}) eingesetzt. Vor und nach 24 h thermischem Stress bei 50°C wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen (600 – 750 nm [$\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm]). Der Anteil erhaltener Fluoreszenzintensität bei 680 nm als Maß für die Menge an verbliebenem Komplex im Präzipitat wurde ermittelt. Die Daten ermitteln sich aus $n = 4$ für C79Sh und R5C3.2h. Für Δ N11h sind bei $n = 2$ nur die beiden Maximalwerte als Fehlergrenzen dargestellt.

Unabhängig von der Ladung des N-Terminus blieben etwa 40 % der Fluoreszenz nach thermischem Stress erhalten ($\Delta N11h$: 42 ± 2 %; C79Sh: 36 ± 10 %; R5C3.2h: 36 ± 15 %).

4. Diskussion

Mittels Spermin-induzierter Copräzipitation wurden verschiedene Varianten des rekombinanten LHCII in Silikat eingeschlossen und hinsichtlich der Stabilisierung gegenüber thermischem Stress analysiert. Dabei zeigte sich, dass der entscheidende Faktor die Größe der Silikatpartikel ist. Kleine Partikel (~ 20 nm Durchmesser) haben ein sehr großes Potential LHCII vor thermisch bedingter Destruktion zu schützen. Es ist gleichwohl egal, ob die Partikelgröße durch den pH-Wert und die Art des Puffers bestimmt wird oder aber durch die Variation des N:Si (ergo Spermin zu Kieselsäure) – Verhältnisses. Die Resultate deuten auf eine Interaktion der Komplexe mit naszierendem Silikat hin, die zu einem Einschluss in innere Lücken des Silikatnetzwerks führen. Hierdurch werden Komplexe voneinander und auch von „leeren“ Detergenzmicellen räumlich separiert. Dieses führt zu einem Stabilisierungseffekt, da die hydrophoben Pigmente ihre Komplexumgebung mangels Aufenthaltsalternativen nicht verlassen. Die Komplexe sind sich dennoch optisch dabei so nahe, dass ein Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer beobachtet wird, was an der transparenten Eigenschaft des Silikats liegt. Allerdings wird eine Aggregation der Komplexe gleichzeitig effizient verhindert. Eine nähere Erläuterung zu diesen Resultaten findet sich in der Diskussion des Manuskripts. Im Folgenden soll der Fokus auf weitere Resultate hinsichtlich der Copräzipitationsreaktion gelegt werden. Neben Aspekten der Silikatquantifizierung sollen vor allem methodische Aspekte diskutiert werden.

4.1. Quantifizierung von Kieselsäure und Bestimmung der Fällungsausbeute

Mono- und Dikieselsäure reagieren mit Molybdat zu einem gelben Silicium-Molybdat-Komplex, der fotometrisch quantifiziert werden kann [98]. Die Nachweisgrenze wird durch die Reduktion dieses Komplexes in die blaue Komplexform (Molybdat-Blau) drastisch herabgesetzt [137]. Phosphat-Ionen können ebenfalls einen reduzierbaren Phospho-Molybdat-Komplex bilden, dessen Absorption sich stark mit der des entsprechenden Silikatkomplexes überschneidet [137]. Die Bildung des Phospho-Komplexes verläuft sehr viel schneller als die Bildung des Silikat-Komplexes, was bei Simultanbestimmungen zur Differenzierung ausgenutzt werden kann [138]. Für eine reine Kieselsäurequantifizierung reicht es allerdings aus, den entsprechenden Phospho-Komplex zu zerstören, so dass es bei der fotometrischen Bestimmung nicht mehr zu Interferenzen kommen kann. Hierfür werden komplexierende Agenzien wie Oxalat, Tatriat oder Citrat verwendet [139]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Oxalsäure verwendet, um eventuell vorhandenes Phosphat der Quantifizierung zu entziehen. Mittels Molybdat-Blau Test wurde aus dem Überstand der Copräzipitationsreaktionen die Menge an nicht-reagierter Kieselsäure bestimmt, um so aus der Differenz zur ursprünglich eingesetzten Kieselsäuremenge eine Fällungsrate zu bestimmen. Außerdem wurden während einer Hitzeinkubation zu definierten Zeitabständen Proben des Inkubationspuffers entnommen und die darin befindliche Menge an Kieselsäure quantifiziert, um das Ausmaß der Silikatauflösung bei unterschiedlichen pH-Werten festzustellen. Bei letzteren Versuchen wurde stets mit Tris gearbeitet, so dass mögliche Phosphatinterferenzen

zen nicht diskutiert werden müssen. Allerdings wurden Copräzipitationen sowohl in Tris als auch in Phosphat durchgeführt, so dass bei der Analyse der Überstände aus den Fällungen in Phosphat 0,05 M des interferierenden Moleküls vorhanden war. Für die Tris-gepufferten Ansätze ergeben sich Werte um 85 % Einbaurate, somit waren noch etwa 15 % der ursprünglichen 0,02 M Kieselsäure im Überstand enthalten (Abb. II.3). Die hieraus hergestellten Lösungen für den Molybdat-Blau-Test waren augenscheinlich schwach blau gefärbt. Wurden die Proben der Phosphat-haltigen Überstände vorbereitet, waren diese sehr intensiv blau gefärbt (Extinktion zwischen 2,6 und 3,7 mal höher als bei den Proben in Tris^{7,5}). Im Umkehrschluss würde dies auf eine sehr geringe Fällungsrate deuten, da die Konzentration an Kieselsäure im Überstand der Copräzipitation sehr hoch sein müsste. Dieser Befund widersprach aber der Tatsache, dass die Pellets in allen Fällungen etwa gleich groß waren. Aus diesem Grund wurden die Werte mit Phosphat-haltigen und gleichzeitig Kieselsäure-freien Referenzen korrigiert. Auch bei diesen Referenzen war eine intensive Blaufärbung zu erkennen, die auf Phospho-Molybdat-Komplexe zurückzuführen sind. Damit gelingt es scheinbar nicht, mittels Oxalsäure Phosphat derart zu maskieren, dass es zu keiner Bildung von blauen Phospho-Molybdat-Komplexen kommt. Wie kann diese Phosphat-bedingte Falsch-Quantifizierung begründet werden, wo in der Literatur eben dieser Effekt der Maskierung von Phosphat beschrieben wird? Die Versuchsdurchführung erfolgte nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll (nach Iler, 1979 [98]). Bei diesem befinden sich letztendlich 0,2 % [w/v] Oxalsäure im Bestimmungsansatz, die damit nur bei einem Drittel der Menge von Volk *et al.* liegt [140]. Dies ist allerdings immer noch ein 100-facher Überschuss über das in den Quantifizierungsansätzen noch vorhandene Phosphat (~235 μM). Bei Mullin *et al.* war die Konzentration an Phosphat deutlich geringer (aus der entsprechenden Veröffentlichung nicht exakt nachvollziehbar, maximal jedoch 16 μM), dennoch konnten sie zeigen, dass unterhalb einer Oxalsäurekonzentration von 0,25 % [w/v] eine signifikante Absorption bei 812 nm auftritt (0,798 nach 3 h), bei einer doppelten Menge Oxalsäure jedoch nur eine geringe (0,096) und bei der vierfachen Menge so gut wie keine (0,007) [137]. Demnach wurde in den Versuchen zu geringe Menge an Oxalsäure verwendet, um Phosphat zu maskieren. Die Resultate von Volk *et al.* deuten allerdings daraufhin, dass eine Erhöhung der Oxalsäuremenge nicht die Silikatquantifizierung neben Phosphat ermöglicht [140]. Die von ihnen verwendeten 0,6 % Oxalsäure liegen an und für sich bereits in dem von Mullin beschriebenen Bereich der effizienten Unterdrückung der Phospho-Molybdat-Komplex-Absorption. Bei konstanter Oxalsäurekonzentration konnten sie zeigen, dass ab einem bestimmten Anteil Phosphat (etwas über 10 ppm, was ~100 μM entspricht) der Kieselsäurenachweis gestört wird. Aus diesem Grund ist es fraglich, ob der Molybdat-Blau-Test generell eine geeignete Methode darstellt, um Kieselsäurequantifizierungen in Phosphat-haltigen Lösungen durchzuführen. Solche Interferenzen könnten dann beispielsweise die Aufnahme von Kinetiken der Silikatbildung massiv stören. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, eine Methode zur Bestimmung von Silikatbildungsraten mittels SPR-Spektroskopie zu etablieren (näheres hierzu: siehe Kapitel 5).

Die genannten Unwägbarkeiten machen eine abschließende Bewertung der Fällungsausbeuten schwierig. Die Werte für Phosphat-haltige Copräzipitationsansätze sind kritisch zu betrachten, was bei einer Fällungsausbeute von etwa 110 % nachvollziehbar ist. Die Werte für die Fällungen in Tris stellen realistische Werte dar, da eine negative Beeinflussung der Quantifizierung nicht zu erwarten war. Für die Phosphat-gepufferten Ansätze sind Werte in ähnlicher Größenordnung zu erwarten.

Wurden die Überstände unter nicht-hydrolytischen Bedingungen analysiert, wurde ein geringerer Wert an Molybdat-reaktiven Spezies detektiert als unter hydrolytischen Bedingungen. Dies bedeutet, dass im Fällungsüberstand bei Copräzipitationen oligomere Kieselsäurespezies vorliegen, die nicht mehr Molybdat-reaktiv sind (etwa 30 %). Hieraus lässt sich auf den Mechanismus der Spermin-induzierten Silikat-Bildung Rückschlüsse ziehen: Zuerst bilden sich oligomere Kieselsäurespezies, die dann zu immer größeren Zusammenlagerungen aggregieren, bis eine kritische Größe überschritten ist und präzipitierbare Strukturen auftreten. Dies geht mit der in der Literatur beschriebenen Mechanismushypothese einher (z.B. in Patwardhan *et al.*, 2005 [100]).

4.2. Auflösung von Silikat

Nach der 24-stündigen Inkubation der LHCII-haltigen Silikatpellets bei 50°C konnte beobachtet werden, dass die Pellets deutlich kleiner und schwächer grün gefärbt waren als vor der Hitzeinkubation. Mit dieser Beobachtung einher ging die Abnahme des absoluten Fluoreszenzmaximums bei 680 nm (ohne die entsprechende Zunahme der Emission bei 655 nm). Der Inkubationsüberstand war augenscheinlich grün gefärbt durch den Übergang von Komplexen in diesen während der Inkubation. Im Überstand konnten neben Komplexen bzw. entsprechenden Zerfallsprodukten auch Kieselsäure nachgewiesen werden. Wurden Silikatpräzipitate bei verschiedenen pH-Werten (4,0 bis 7,5; entsprechend Acetat-Puffer in den niedrigen pH-Bereichen, Tris in den höheren) bei 50°C inkubiert und zu definierten Zeitpunkten die Konzentration Molybdat-reaktiver Spezies im Überstand bestimmt, zeigte sich ein gesteigerter Übergang in Lösung mit steigendem pH-Wert (Abb. II.4). Grundsätzlich widerspricht diese Beobachtung der Tatsache, dass die Löslichkeit von Silikat bei pH 7,0 am geringsten ist (wobei die Differenzen im pH-Bereich von 4 bis 7 sehr gering sind) [141]. Allerdings wird bei der Betrachtung der Resultate von Baumann deutlich, dass die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Ergebnisse sehr wohl in Einklang mit dieser Tatsache stehen (vgl. Abb. II.11 [142]).

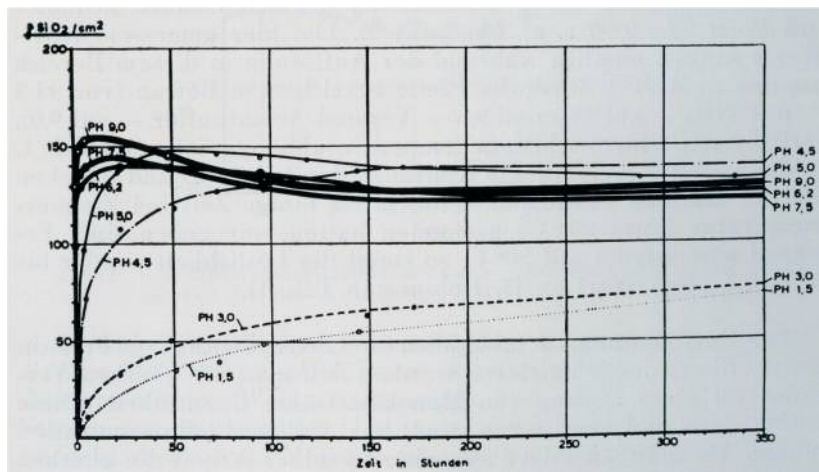


Abb. II.11: pH-Wert-abhängige Silikatauflösung
Graph entnommen aus
Baumann, 1955 [142].

Vergleicht man die Verläufe der Auflösung innerhalb von 24 h, so gilt auch bei Baumann: je höher der pH-Wert, desto größer die Menge an Kieselsäure im Überstand. Erst nach etwa 160 h ist eine Gleichgewichtseinstellung zu beobachten. In der Konsequenz bedeutet das, dass die Auflösungs geschwindigkeit mit steigendem pH-Wert zunimmt. Fällt die Menge an reaktiven Spezies im Überstand mit der Zeit wieder ab, so begründet Baumann dies damit, dass sich durch den sehr schnell ablaufenden Prozess mehr Kieselsäuremoleküle im Überstand befinden, als auf Grund der Löslichkeit möglich ist. Genau dieser Prozess setzt anschließend ein und senkt die Menge an Molybdat-reaktiven Spezies wieder ab. Die Löslichkeit von Silikat ist stark abhängig von der Temperatur; steigt diese, nimmt die Löslichkeit zu [143]. Als lösliches Silikat wird dabei die Molybdat-reaktive Kieselsäure bezeichnet [144]. Für 25°C wird eine Konzentration von 2 mM als Grenzkonzentration angegeben, ab der es zur Autopolykondensation kommt [98]. Bei höheren Temperaturen dürfte dieser Wert gemäß dem Trend der Löslichkeit höher liegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in den Überständen bei 50°C allerdings nur Werte bis maximal 1,3 mM gemessen, wobei galt: je höher der pH-Wert, desto höher die Konzentration. Letzteres lässt sich aus Abb. II.11 wie bereits erwähnt erklären. Warum liegen die Werte allerdings unter den erwarteten? Der diskutierte Wert von 2 mM bezieht sich auf die Löslichkeit in reinem Wasser. Diese Löslichkeit erniedrigt sich in Anwesenheit verschiedener Salze signifikant mit deren Konzentrationsanstieg [145; 146]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht in reinem Wasser gearbeitet. Neben 0,05 M Puffermolekülen, wobei es sich hier im Inkubationspuffer um das überwiegend positiv geladene Tris-Moleküle handelt, befand sich auch noch 0,1 % LM in der Lösung. Die Anwesenheit der beiden Solute könnte ein Grund für die niedrige Sättigungskonzentration beim Auflösen der Pellets sein.

Wurde bei der Inkubation der LHCII-haltigen Silikatpellets Kieselsäure-gesättigter Inkubationspuffer verwendet, konnte ein deutlich höherer Erhalt des Fluoreszenzmaximums ermittelt werden (vgl. Tab. II.3). Dennoch war immer noch eine Verkleinerung des Pellets und ein Herauslösen von Komplexen zu beobachten. Durch die Verwendung von Kieselsäure-gesättigtem Inkubationspuffer und

einer zusätzlichen Zentrifugation vor der Inkubation blieben ausreichende Mengen an Präzipitat und damit Komplex für Stabilitätsmessungen erhalten.

Zwischen der erhaltenen Menge an Pellet (30 % Auflösung ergeben 70 % erhaltenes Pellet) und 40 % erhaltenem Fluoreszenzmaximum besteht ein Missverhältnis. Bezüglich der Begrifflichkeit „Erhalt des Fluoreszenzmaximums“ sind ein paar grundsätzliche Anmerkungen zu machen: Hierbei handelt es sich um den Vergleich der absoluten Messwerte der Emission bei 680 nm nach der Hitzeinkubation zu dem Wert vor Hitzeinkubation. Diese Betrachtungsweise birgt automatisch Fehler in sich. Die im Pellet eingeschlossenen Komplexe, deren Energieweiterleitung gestört ist, emittieren nicht mehr bzw. nicht mehr quantitativ bei 680 nm. Damit sind diese Komplexe zwar noch im Pellet vorhanden, ihr Beitrag zum Maß des Fluoreszenzerhalts als Größe für die Menge an verbleibenden Komplexen ist aber verfälschend geringer. Des Weiteren setzt diese Messgröße voraus, dass sich vergleichbare Komplexmengen bei den Messungen im Detektions-relevanten Bereich befinden. Dies ist eine äußerst kritische Bedingung. Die Sedimentationsgeschwindigkeit der LHCII-haltigen Partikel hängt maßgeblich von deren Aggregationszustand ab. Je größer die Partikel, desto schneller sedimentieren sie und befinden sich nicht mehr im Detektions-relevanten Bereich. Dieser Sachverhalt erfordert es, dass die Proben vor und nach Hitzeinkubation in vergleichbarem Maße resuspendiert werden, um äquivalente Mengen an Komplexen im Messbereich zu haben. Eine dritte Komponente schwächt die Aussagekraft der Größe Fluoreszenzerhalt ab: Sämtliche Messungen wurden in Küvetten aus Glas durchgeführt. Ein Teil der Silikatpartikel blieb an der Gefäßwand hängen. Damit verringerte sich die totale Menge an Komplexen, wodurch eine Verminderung der totalen Fluoreszenzintensität auftritt (es werden schon weniger Komplexe in der Hitze inkubiert als zuvor fluoreszenzspektroskopisch vermessen wurden). Damit sind drei grundsätzliche Problemquellen aufgezeigt, die die Messgröße „Fluoreszenzerhalt“ zu einer eher schwachen machen. Für eine genauere Bestimmung des Komplexgehalts nach Hitzeinkubation müssen die Pigmente mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methode aus dem Pellet extrahiert und quantifiziert werden. Diese nutzt die Auflösung von Silikat bei höheren pH-Werten und das Extraktionsvermögen von Butanol für Komplex-gebundene Pigmente. Die Resultate zeigten, dass in etwa die Menge an Komplexen im Pellet enthalten waren, wie man auf Grund des Vergleichs der absoluten Fluoreszenz erwarten würde (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde der Fluoreszenzerhalt im Rahmen dieser Arbeit trotz der oben gemachten Einschränkungen dazu genutzt, Abschätzungen hinsichtlich der Menge an im Silikat-verbleibenden Komplexen zu machen. Die Methode der Pigmentextraktion ist natürlich genauer, bedarf aber eines sehr hohen Arbeitsaufwandes (4 h Extraktion und Probenaufarbeitung und anschließende HPLC-Quantifizierung), was bei einer großen Anzahl an Proben unpraktisch ist. Die Pigmentquantifizierung im Inkubationsüberstand nach Hitzestress brachte einen Anteil an herausgelösten Komplexen zwischen 25 und 45 % (Daten nicht gezeigt) hervor, der damit in der Größenordnung des Anteils an aufgelöstem Silikat lag. Insgesamt ergab sich bei

der Quantifizierung der eingebauten, der während der Hitzeinkubation herausgelöst und der im Pellet verbleibenden Komplexe, dass etwa 20 bis 25 % der Komplexe während der Analyse verloren gingen (vor allem durch die oben genannte Interaktion der Pellets mit Küvettenglas). Als Schlussfolgerung kann insgesamt hieraus gezogen werden, dass der Rückgang der totalen Fluoreszenz durch den Verlust an Probe und die Herauslösung von Komplexen erklärt werden kann. Damit scheidet eine Abschwächung des Fluoreszenzmaximums durch Aggregation aus. Außerdem rechtfertigt es den Vergleich des Rückgangs an Fluoreszenzmaximum als Größe zur ungefähren Abschätzung von Komplexverlust während der Inkubation.

Damit ist es legitim, drei verschiedene LHCII-Varianten, deren grundsätzliche Affinität zu Silikat unterschiedlich ist (siehe genaue Erläuterung der Publikationsdiskussion, II.3.2), hinsichtlich ihrer Tendenz zum Herauslösen aus dem Pellets während thermischem Stress mittels dieser Größe zu vergleichen (Abb. II.10). Wie in der Publikation erläutert, spielen die unterschiedlichen Ladungsverhältnisse am N-Terminus bei Δ NLHCII, LHCII und R5LHCII (Erläuterung der Nomenklatur: siehe II.2.1.2) keine Rolle, wenn diese während des Silikatbildungsvorgangs anwesend sind. Der Grund hierfür liegt in einem raschen Einschluss in die Lücken zwischen den kleinen (20 nm Durchmesser) Silikatpartikeln (siehe dazu Schema Publikation). Dieser Einschluss verhindert ein Abdiffundieren, das man beim Δ NLHCII am ehesten erwarten würde auf Grund des Defizits an 3 positiven Ladungen pro N-Terminus. Der Vergleich der drei Varianten mittels Fluoreszenzverlust (Abb. II.10) ergab ebenfalls keine signifikante Differenz zwischen den drei LHCII-Varianten. Dies steht mit der Hypothese zum Einbau der Komplexe in inter-partikuläre Räume vollends im Einklang. Ein Verlust der Komplexe aus dem intakten Teil des Silikatpellets ist nicht zu erwarten, da deren Diffusion durch den engen Einschluss zwischen den Partikeln limitiert wird. Eng mit dieser Hypothese zur Lokalisation der Komplexe verbunden ist auch die Zugänglichkeit von Komplex-schädigenden Substanzen.

4.3. Zugänglichkeit zu in Silikat-eingeschlossenen Komplexen

Die in Silikat eingeschlossenen Komplexe wurden mit verschiedenen Substanzen umgesetzt, von denen bekannt ist, dass sie die Integrität der Komplexe beeinflussen. Dabei wurde eine Spermin-Copräzipitation in Tris bei pH 6,0 und in Phosphat bei pH 7,5 durchgeführt, um die beiden Zustände - sehr homogenes Netzwerk aus kleinen Silikatpartikeln und Netzwerk aus großen Silikatpartikeln - miteinander zu vergleichen. Auffällig war, dass die Komplexe eingebettet in großen Partikeln im gleichen Maße zerstört wurden wie freie Komplexe, die zur Kontrolle eingesetzt wurden (Abb. II.5). Die Komplexe in kleinen Silikatnetzwerken wurden auch beeinträchtigt, allerdings nahm hier der Quotient aus normierter EmChl *a*/Em Chl *b* deutlich langsamer ab als in den beiden anderen Fällen. Welche Schlussfolgerung muss aus dieser Beobachtung gezogen werden? Das Netzwerk aus größeren Silikatpartikeln bildet derartig große inter-partikuläre Lücken aus, dass die destruirenden Substanzen nahe-

zu ungehindert diffundieren können. Bei den kleineren Silikatpartikeln ist diese Diffusion durch das engere Netzwerk deutlich stärker limitiert. Allerdings war auffällig, dass sich die Silikatstrukturen beim Inkubieren mit den destruirenden Substanzen relativ schnell auflösten (eine Diskussion dieser Beobachtung soll im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen). Eine effiziente Abtrennung von Überstand und Pellet war bei der Arbeit in Mikrotiterplatten erschwert. Dennoch wiesen die separierten Pellets nach der Inkubationsphase einen signifikant höheren normierten $\text{EmChl } a/\text{EmChl } b$ -Quotienten als die Mischung aus Pellet und Überstand auf. Außer in Butanol weisen die in Tris bei pH 6,0 gefällten Präzipitate nach Separierung vom Überstand Werte zwischen 0,6 und 0,8 auf (Ethanol bei verschiedenen Konzentrationen und LDS). Der normierte Quotient für die Pellets aus der Phosphat^{7,5}-Fällung liegt in allen Fällen nahe bei den Werten aus der Zeitreihenmessung. Die Zugänglichkeit der kleinen Moleküle Ethanol und Butanol bedürfen keiner Diskussion. Zu diskutieren bleibt die Rolle des LDS. Im Rahmen der Publikation wurde das ausgesprochen hohe Stabilisierungsvermögen in den Pellets aus Tris^{6,0} Fällungen mit der räumlichen Separierung des LHCII von LM-Micellen begründet. In den Zugänglichkeitsexperimenten scheint allerdings LDS mit den Komplexen in Kontakt zu kommen. Vergleicht man allerdings die Durchmesser der beiden Detergenzien, so treten deutliche Differenzen auf. Die ellipsoide Micelle des β -LM hat einen Durchmesser von 6,9/4,1 nm [147]. Deutlich kleiner ist eine SDS-Micelle 4,1/2,4 nm (für 1 % [w/v] nach [148]). Die Größenunterschiede liegen vermutlich in etwa in dem Größenbereich der Lücken, die die kleinen Silikatpartikel bilden. Diese regulieren über ihre Größe die Zugänglichkeit zu den inter-Partikellücken, in denen nach der Hypothese dieser Arbeit die Komplexe lokalisiert sind (siehe hierzu auch Schema in Publikation). Eingeschränkt wird diese Argumentationslinie dahingehend, dass hier von einer homogenen Größenverteilung der inter-Partikellücken ausgegangen wird. Diese ist nicht unbedingt zu erwarten. Zudem werden Dodecylsulfat und LM wie inerte Moleküle betrachtet. Allerdings weisen diese unterschiedliche Eigenschaften gegenüber ihrer Umgebung auf: Die Dodecylsulfat-Micelle ist nach außen hin negativ geladen, während die LM-Micelle hydrophil, aber neutral ist. Damit ist ein unterschiedliches Verhalten gegenüber anderen Molekülen wie dem negativen Silikat nicht unwahrscheinlich.

Beim Abbau durch Proteinase K konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben festgestellt werden, insbesondere wiederum nicht zwischen den Komplexen in Phosphat^{7,5} Pellets und freien Komplexen. Eine Signifikanz des höheren Wertes für die Probe in den Tris^{6,0} Pellets ist stark anzuzweifeln. Auf Grund der räumlichen Ausmaße der Proteinase K (3,8/4,3/3,8 nm in ellipsoider Ausdehnung [149]) sollte die Diffusion bei engmaschigen Netzwerken eingeschränkt, aber nicht verhindert werden (man würde vergleichbare Ergebnisse zu SDS erwarten). Allerdings wird durch die erhöhte Reaktionstemperatur (37°C) und die stark ausgedehnte Inkubationszeit (18,5 h) begünstigt, dass auch in den engmaschigen Netzwerken die Komplexe erreicht werden.

Die Resultate der Zugänglichkeitsexperimente stärken die in der Publikation erläuterte Hypothese zur Lokalisation des LHCII in inter-partikulären Lücken der Silikatstruktur, die mit Vermutungen in der Literatur übereinstimmt [136; 150]. Dadurch wird auch der Erklärungsansatz zur Stabilisierung der Komplexe unterstützt. Dieser basiert darauf, dass eine räumliche Separierung von anderen Komplexen und Micellen stattfindet, womit den hydrophoben Komponenten (Pigment) kein alternativer Aufenthaltsort angeboten und somit keine entropische Energie gewonnen wird. Ein Verlust dieser Komponenten ist in der Regel der initiale Schritt der Komplex Degradation (Daten hierzu wurden nicht gezeigt). Allerdings zeigen die Nachbindungsexperimente (siehe II.3.2), dass eine Wechselwirkung zwischen Komplex und Silikat alleine schon einen stabilisierenden Effekt hat, wenn auch nicht in dem Maße wie bei copräzipitierten und damit räumlich separierten Komplexen.

4.4. Alternative Silikatstruktur-Beeinflussung

Im Rahmen der Publikation wurde aufgezeigt, dass die Partikelgröße auf zwei unterschiedliche Arten gesteuert werden kann: Zum einen durch die Wahl des Puffers und einen entsprechenden pH-Wert und zum anderen durch die Variation des N:Si –Verhältnisses (ergo hier Spermin zu Kieselsäure). Brunner *et al.* zeigten, dass das bivalente Sulfat bei der Aggregation von Polyallylaminen eine vergleichbare Rolle wie Phosphat spielt und so eine Aggregation der Amine hervorrufen kann [151]. Wurde Sulfat einer Copräzipitation in Tris bei pH 6,0 zugesetzt, wo sich erwartungsgemäß kleine Silikatstrukturen mit einem hohen Maß an Stabilisierungspotential bilden, so sanken sowohl die Einbaurate um etwa 13 % also auch der normierte EmChl *a*/EmChl *b*-Quotient nach 24 h bei 50°C um 31 % (vgl. II.3.3.1). Auch ohne den entsprechenden rasterelektronenmikroskopischen Nachweis liegt es nahe, dass sich die Silikatstrukturen durch Sulfat hin zu weniger stabilisierenden – ergo größeren – verändert haben. Dabei dürfte die Rolle des bivalenten Sulfates die gleiche sein wie die in der Publikation angeführten Rolle des Phosphats bei pH 7,5: Die hohe negative Ladungsdichte der Anionen führt zu einer Aggregation des Spermins, das dadurch ein Template für größere Silikatstrukturen ist.

Die Rolle eines R5-modifizierten LHCII in einer Copräzipitation in Tris^{6,0} wurde im Rahmen der Publikation bereits erläutert. Ein vergleichbares Maß an Stabilisierung und eine leicht erhöhte Menge an eingebauten Komplexen lassen kleine Silikatpartikel vermuten. Wurde dieser R5-modifizierte Komplex in einer Copräzipitation in Phosphat^{7,5} eingesetzt, so verdoppelte sich die Menge an eingebauten Komplexen in etwa (siehe dazu II.3.2) und das Maß der Stabilisierung erhöhte sich um etwa 50 %. Die entsprechenden Silikatstrukturen zeigen dabei eine deutlich veränderte Struktur im Vergleich zur Copräzipitation nicht-modifizierter Komplexe (Abb. II.9 und Publikation II.3.2). Das Präzipitat besteht sehr homogen aus kleineren Partikelstrukturen (unterer zweistelliger nm-Bereich), was im Gegensatz zu den überwiegend sehr großen Partikeln (siehe Aufnahmen in II.3.2) mit etwa 200 nm Durchmesser steht. Zwei Schlussfolgerungen können hieraus gezogen werden: Die Hypothese der

Abhängigkeit des Stabilisierungsvermögens von kleinen Partikeln wird nochmals untermauert. Außerdem kann der N-terminalen R5-Modifikation am LHCII eine Struktur-beeinflussende Rolle zugeschrieben werden. Anders als in Kapitel III für Protamin-modifizierte Komplexe in Spermin-Copräzipitationen diskutiert, hat im Falle von R5C3.2h die polykationische Modifikation einen maßgeblichen Struktur-gebenden Einfluss. Die Partikelformation wird nicht durch Spermin dominiert. Worin dies mechanistisch begründet liegt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher analysiert. Das R5-Peptid beeinflusst vermutlich das Aggregationsverhalten von Spermin negativ, so dass die Bildung größerer Silikatstrukturen verhindert wird. Eine denkbare Möglichkeit besteht darin, dass die R5-Sequenz mit Phosphat wechselwirkt und dadurch Wechselwirkungen von Phosphat und Spermin abgeschwächt werden. Eine Aufklärung diesbezüglich könnten Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung erbringen. Können dabei Spermin-Aggregate in Phosphat bei pH 7,5 nachgewiesen werden, die bei Zugabe von R5-modifiziertem Komplex verschwinden, wäre das ein Hinweis auf den entsprechenden Wirkungsmechanismus.

Für zukünftige Experimente ist allerdings die Tatsache an sich, dass R5-modifizierter LHCII Silikatstrukturen hin zu kleineren Partikeln zu beeinflussen scheint, der entscheidende Sachverhalt. Auf Grund dessen, dass diese kleinen Strukturen eine vielversprechende Stabilisierung ergeben und zusätzlich der Anteil an eingebauten Komplexen im Vergleich zur Copräzipitation mit nicht-modifiziertem LHCII erhöht wird, sind R5-modifizierte Komplexe interessante Kandidaten für weiterführende Experimente.

III. Kapitel: Kovalente Modifikation des LHCII und daraus resultierende Kieselsäurefällungseigenschaften

1. Einleitung

Protamin ist ein polykationisches Protein, das in vielen Organismen eine Rolle in der Kondensation und Stabilisierung von DNA spielt. Eigentlich handelt es sich bei Protamin nicht um ein spezifisches Protein, sondern vielmehr um eine Gruppe Arginin-reicher und damit stark basischer Peptide. Der polykationische Charakter ist dafür verantwortlich, dass Protamin in der Lage ist, Kieselsäure zu kondensieren. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Protamin handelt es sich um Salmin, einer Mischung aus zwei Peptiden (21/22 Arginine, 4 Serine, 3 Proline, 2 Glycine und 2 Valine bzw. 1 Alanin und 1 Isoleucin) [152].

Protamin wurde bereits in Copräzipitationen mit β -Glucuronidase eingesetzt, wobei nahezu die gesamte Menge des Enzyms in Silikat eingeschlossen wurde. Das eingeschlossene Enzym zeigte vergleichbare Aktivität und eine verlängerte Stabilität bei Hitzeinkubationen und längeren Lagerungsdauern [77]. Zhang *et al.* modifizierten die Oberfläche von Enzym-haltigen Alginatkapseln mit Protamin, welches durch elektrostatische Wechselwirkungen auf die Kapseloberfläche gebunden wurde. Diese Kapseln wurden in Wasserglaslösung inkubiert und mit einer Silikatschicht überzogen, wodurch das Quellen der Alginatkapseln eingeschränkt und die Stabilität des Enzyms erhöht wurde [153]. Auch wurde es kovalent mit dem Enzym Glucoseoxidase über einen homobifunktionellen Crosslinker verknüpft [154]. Das modifizierte Enzym erhielt eine nahezu quantitative Bindungseigenschaft gegenüber Silikat- und Titandioxidpartikeln. Auf diesen immobilisiert können weitere Schichten des Oxids gebildet werden, wobei die katalytischen Enzymeigenschaften erhalten blieben.

Crosslinker sind Moleküle mit zwei funktionellen Gruppen, die über einen Spacer miteinander verbunden sind. Die funktionellen Gruppen besitzen eine spezifische Reaktivität zu bestimmten chemischen Gruppen. Unterscheiden sich diese in einem Crosslinkermolekül nicht voneinander, so bezeichnet man diesen als homobifunktionell. Heterobifunktionelle Moleküle dagegen zeigen Reaktivität gegenüber zwei unterschiedlichen Gruppen. Eine N-Hydroxysuccinimidgruppe (NHS-Gruppe) besitzt eine hohe Spezifität gegenüber deprotonierten Aminogruppen. Hierbei bildet sich eine Amidbindung aus [155; 156]. Allerdings sind NHS-Gruppen sehr Hydrolyse-empfindlich, vor allem bei pH-Werten, die oberhalb des Neutralpunktes liegen [157–159]. Eine spezifische Gruppe zur Bindung an freien Thiolgruppen stellt das Maleimid dar. Diese reagiert unter Ausbildung eines Thioethers mit dem Thiol und kann nicht unter reduktiven Bedingungen umgekehrt werden.

Mittels des heterobifunktionellen Crosslinkers Sulfosuccinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrat (sSMPB) sollte Protamin an trimeren LHCII gebunden werden. Die NHS-Gruppe sollte für die N-terminale Anbindung des sSMPB an Protamin genutzt werden, um das Produkt in einer zweiten Reaktion mittels der Maleimidfunktion an Cystein des LHCII zu binden. Es wurden verschiedenste Varianten des rekombinanten LHCII mit unterschiedlicher Zahl an Cysteinen in unterschiedlichen Positionen verwendet. Außerdem sollten mittels heterobifunktionellem Crosslinker Silanolgruppen in den LHCII eingeführt werden. Hierzu fand das Molekül MPS Anwendung, welches in einem zweiten Schritt an die Maleimidfunktion eines zunächst über die NHS-Gruppe an Lysinreste des Komplexes gekoppelten sSMPB gebunden werden sollte. Die kovalenten Modifikationen sollen im Falle von Protamin dem LHCII Silikat-fällende Eigenschaften verleihen, bzw. in Nähe des Komplexes für eine Silikatbildung sorgen. Im Falle des MPS soll die Ausbildung des Silikats unter unmittelbarer Beteiligung der Komplex-gebundenen Silanolgruppen stattfinden, so dass dieser effizient eingeschlossen und möglicherweise stabilisiert wird. Die derart eingeschlossenen Komplexe sollten hinsichtlich ihrer Einbauraten und ihres Stabilisierungsvermögens getestet werden.

2. Material und Methode

2.1. Material

2.1.1. Protamin

Das zur Modifikation von LHCII verwendete Protein Protamin wurde von der Firma Sigma-Aldrich, München, als Sulfat-Salz des Reinheitsgrades X bezogen [160]. Es handelt sich hierbei um ein Extrakt aus Lachs und wird deshalb auch als Salmin bezeichnet. Es ist eine Mischung aus überwiegend zwei Peptiden, die sich aus folgenden Aminosäuren zusammensetzen: 21/22 Arginine, 4 Serine, 3 Proline, 2 Glycine und 2 Valine bzw. 1 Alanin und 1 Isoleucin [152].

2.1.2. (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan (MPS)

MPS (Abb. III.1) wurde von der Firma Sigma-Aldrich, München bezogen und besaß eine Reinheit von > 95 %.

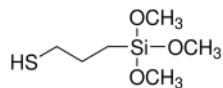


Abb. III.1: MPS

Strukturformel von MPS, Strukturformelrechte liegen bei: Sigma-Aldrich, München.

2.1.3. LHCII-Varianten

Folgende LHCII-Varianten wurden in den Versuchen dieses Kapitels verwendet: C79Sh, S3Ch, S106Ch, V151Ch, S160Ch, Be1, Be2, 3xCh, R5C3.2h, R5S106Ch, R5S160Ch, R5S106/160Ch, 2xC₁R5T. Für nähere Informationen zu den einzelnen Varianten siehe: Tab. 3. 1 und Tab. I.2.

2.2. Methoden

2.2.1. Modifikation von LHCII mit Protamin

Bei dem hier beschriebenen Procedere handelt es sich um die im Laufe dieser Arbeit optimierte Methode zur Modifizierung des LHCII mit Protamin mittels heterobifunktionellem Crosslinker sSMPB. Reaktionsstöchiometrien einzelner Ergebnisse weichen daher von den hier angegeben ab. Diese sind dann im entsprechenden Ergebnisteil erläutert.

Protamin	10 mg/ml (entspricht: 1950 µM)
TCaEP	0,2 mg/ml
sSMPB	3,9 mM

Bei der Verwendung des heterobifunktionellen Crosslinkers sSMPB ist darauf zu achten, dass eine der funktionellen Gruppen die Hydrolyse-empfindliche Succinimidylgruppe ist. Eine Hydrolyse dieser

führt zu einem Funktionalitätsverlust. Daher ist darauf zu achten, diese zuerst in die Reaktion einzubringen. Darüber hinaus ist es wichtig, das hier angegebene Protokoll exakt einzuhalten, da Abweichungen zu signifikant schlechteren Anbindungsausbeuten von Protamin an LHCII führen können.

Cysteinhaltige LHCII wurden präparativ hergestellt und die Trimer- bzw. Monomerbanden abgesaugt. Es folgte dreimaliges Aufkonzentrieren in 30 kDa Ultrazentrifugationseinheiten (Amicon Ultra MW 30) um den Faktor 15. Dabei wurde zweimal mit 0,05 M Phosphat^{7,5} verdünnt. Die Trimer-Endkonzentration sollte mindestens 11 μM betragen; im Falle der Verwendung von Monomeren sollte deren Konzentration mindestens 33 μM erreichen. Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte Standardansatz umfasste 20 μl (ohne Tris-Zugabe eliminieren der NHS-Funktion) und konnte je nach Anschlussverwendung beliebig vergrößert werden. Die Trimerkonzentration in diesen 20 μl betrug 3,55 μM . Die entsprechenden Konzentrationen des Crosslinkers und von Protamin wurden der Zahl der LHCII-Cysteine angepasst, um entsprechende Überschüsse zu generieren (vgl. Ergebnisteil).

Die Modifikation des LHCII lief in drei Stufen ab: A) Reduktion der Komplexe, B) Anbindung sSMPB an N-Terminus von Protamin (Produkt im Folgenden als CL-Protamin bezeichnet) und C) Verknüpfung des CL-Protamin mit Cysteinen des LHCII. Die drei Komponenten LHCII, Crosslinker und Protamin wurden so eingesetzt, dass sie in C) in folgenden Stöchiometrien vorlagen: sSMPB wurde in einem 10-fachen Überschuss zu einem LHCII-Cystein eingesetzt, während die Menge an Protamin 2,5-fach über der des Crosslinkers lag.

A) Reduktion der Komplexe

Die Komplexe wurden mit 50 μM TCaEP in 0,1 M Phosphat^{7,5} für mindestens 1 h bei 4°C reduziert ($V = 20 \mu\text{l} - V(\text{B})$).

B) Anbindung des Crosslinkers an Protamin

Während der Reduktionsphase (A) wurde die Anbindungsreaktion vorbereitet und durchgeführt. Es ist wichtig die hier beschriebene Reihenfolge genau einzuhalten. Zuerst wurde die Protamin-Stammlösung angesetzt und mit Phosphat^{7,5} ($c_{\text{end}} = 0,1 \text{ M}$) und evtl. H_2O vermischt. Nach dieser Vorbereitung konnte sSMPB abgewogen, in H_2O gelöst und direkt zu den vorbereiteten Ansätzen pipettiert werden ($V_{\text{max.}} = 12 \mu\text{l}$). Die Reaktion erfolgte bei 20°C auf dem Thermoschüttler (500 Upm). Nach 45 min Reaktionszeit wurden sie durch Zugabe von 0,5 x Vol. 0,5 M Tris^{8,5} (bezogen auf den Anbindungsreaktionsansatz) abgestoppt.

C) Verknüpfung von LHCII und CL-Protamin

Die beiden Ansätze A) und B) wurden zusammenpipettiert und für 1 h auf dem Thermoschüttler bei 20°C und 1000 Upm inkubiert. Im analytischen Maßstab wurde dem Ansatz 0,25 x Vol. 3-4x Sparmix zugegeben, für 2 min gekocht und eine SDS-PAA-Gelelektrophorese angeschlossen. Im präparativen Maßstab wurden 20 μl Probe entnommen und mit 6 μL 3-4x Sparmix versetzt, für 2 min

gekocht und ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Rest des präparativen Ansatzes wurde auf analytische Saccharosedichtegradienten (0,65 M Saccharose; 2 mM TCaEP; 0,1 % LM; 0,05 M Puffer: Tris^{7,5} oder Phosphat^{7,5}, die Wahl des Puffers richtete sich nach der geplanten folgenden Anwendung: siehe III.2.2.3) aufgetragen und für 19 h bei 52000 Upm (Rotor Beckman SW 60) zentrifugiert. Es bildeten sich drei Banden aus, wovon die untere die Protamin-modifizierte Trimere enthielt (zur entsprechenden Charakterisierung siehe Abb. III.4). Die spektroskopische Charakterisierung erfolgte nach LHCII-typischem Procedere (siehe 3.2.1.4).

2.2.2. Densitometrische Auswertung der SDS-PAA-Gele

Von den Coomassie-gefärbten Gelen aus 2.2.1.C wurden Aufnahmen gemacht (VersaDoc™ Imaging System 3000) und die Bilder mittels des Programms Quantity One 4.3.0 densitometrisch, das heißt durch Bestimmung der Farbdichte der Banden, ausgewertet. Hierzu wurde die Farbintensität entlang einer Gelbahn gemessen und eine Zuordnung von Farbintensität zu Laufweite vorgenommen. An den entsprechenden Banden entstanden so signifikante lokale Maxima. Die jeweiligen Maxima der Banden pro Gelbahn wurden summiert und als 100 % definiert. Nun wurde der Anteil jeder einzelnen Bande an diesem Wert bestimmt. Dieser Prozentwert entsprach dem Anteil des entsprechenden Proteinmodifikationsgrades, d.h. wie viel LHCP nicht-modifiziert bzw. mit einem oder mehreren Protaminen modifiziert vorlag. Pro Gelbahn wurden drei Bestimmungen durchgeführt und die Werte gemittelt. Bei der Festlegung der zu vermessenden Linie innerhalb einer Gelbahn musste beachtet werden, dass diese in gleichmäßig gefärbten Bereichen lag. Diese Bestimmungsmethode wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit (Isabell Büttel) etabliert und mit anderen Auswertungsmethoden verglichen und als zuverlässigste charakterisiert. Eine nähere Erläuterung hierzu soll im Rahmen dieser Arbeit nicht stattfinden.

2.2.3. Erhöhung der Konzentration von Protamin-modifiziertem LHCII

Wie in III.3.1.4 beschrieben, musste das Aufkonzentrieren von Protamin-modifizierten Komplexen etabliert werden. Bei Pufferwechseln ohne Saccharose trat der Effekt auf, dass die Komplexe sehr gut mit dem Membranmaterial wechselwirkten und so verloren gingen. Aus diesem Grund wurde auf das Wechseln der Pufferlösung verzichtet. Dies hatte zur Folge, dass die Komplexe in solchen Gradienten aufgetrennt wurden, die bereits den erwünschten Puffer und pH-Wert enthielten. Die abgezogenen Banden wurden mit 0,5 ml Membransystemen aus Polyethersulfon (PES) auf die gewünschte Konzentration gebracht (Zentrifugationsbedingungen richten sich nach Anleitung des jeweiligen Herstellers). Zu beachten galt, dass Phosphat-haltige Lösungen auch in Gegenwart von Saccharose ab einer Konzentration von etwa 5 μ M mit der Membran irreversibel interagierten. Höhere Konzentrationen sollten daher nicht angestrebt werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Standardprotokoll für LHCII.

2.2.4. Silikatfällungen mit Protamin

Auch Protamin-abhängige Kieselsäurefällungen mussten im Rahmen dieser Arbeit optimiert werden, da nur wenige Vorinformationen diesbezüglich bekannt waren.

2.2.4.1. LHCII-freie Protaminfällungen

Kieselsäurelösung	1 M	(aus mit 1 mM HCl hydrolysiertem TMOS)
Protamin	10 mg/ml	(entspricht 1950 μ M)

Um einen Überblick über das Fällungsverhalten von Protamin in verdünnten Kieselsäurelösungen in Abhängigkeit von Art des Puffers und pH-Wert zu bekommen, wurden verschiedene Fällungen durchgeführt. Die Reaktionsdauer der Fällungen betrug 30 min bei 20°C. Grundsätzlich wurden bei allen Ansätzen zwei verschiedene Kieselsäureendkonzentrationen getestet: 0,02 und 0,04 M. Protamin wurde in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 1, 5, 10, 50, 100, 500 μ M und jeweils mit Phosphat oder Tris ($c_{\text{end}} = 0,05$ M) gepuffert, wobei jeder dieser Puffer bei pH 6,0; 7,0 und 8,0 vorlag. Alle Komponenten wurden zusammenpipettiert und die Reaktion durch die Zugabe von Kieselsäure gestartet. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln bei 1400 Upm auf dem Thermoschüttler. Nachfolgend wurden die Proben zentrifugiert (2 min, 19000 x g) und die möglicherweise entstandenen Pellets in ihrer Größe verglichen.

2.2.4.2. Fällungen mit Protamin-modifiziertem LHCII

Kieselsäurelösung	1 M	(aus mit 1 mM HCl hydrolysiertem TMOS)
Protamin	10 mg/ml	(entspricht 1950 μ M)
Spermin	0,1 M	

Je nach Ansatzvolumen wurden die obenstehenden Stammlösungen in ihrem entsprechenden Lösungsmittel verdünnt, um pipettierbare Volumina zu den Reaktionen zugeben zu können. Es lässt sich an dieser Stelle kein definiertes Fällungsprotokoll verfassen, da im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Ansätze getestet wurden. In den entsprechenden Ergebnisteilen sind die entscheidenden Parameter der Reaktionen angegeben. Grundsätzlich wurden drei Typen an Fällungen mit verschiedenen Protamin-modifizierten LHCII-Varianten durchgeführt: Fällungen alleine mit Protamin-modifiziertem LHCII, zusätzliche Zugabe von Protamin und zusätzliche Sperminzugabe.

Die grundsätzlichen Gemeinsamkeiten der Reaktionen können wie folgt zusammengefasst werden: Die Reaktionszeit betrug 1 h bei 20°C (12 h bei 4°C) und wurde unter Schütteln (1400 Upm) am Thermoschüttler durchgeführt. Bei allen Reaktionen betrug die Konzentration an Kieselsäure 0,02 M. Es wurden grundsätzlich alle Komponenten in der folgenden Reihenfolge zusammengestellt: $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$, Puffer (abhängig von der Anwendung Tris oder Phosphat, Konzentrationen sind dem Ergebnisteil zu

entnehmen), evtl. Spermin/Protamin und Komplexe (Konzentrationen sind ebenfalls bei den entsprechenden Ergebnissen angegeben). Die Komponenten wurden kurz zentrifugiert und gevortext. Die Zugabe der Kieselsäure startete die Reaktion. Sie wurde vorsichtig an den Gefäßrand pipettiert und es folgte eine 1-sekündige Zentrifugation. Anschließend wurden die Proben in den Thermomixer überführt.

Nach erfolgter Reaktion wurden die Proben für 2 min zentrifugiert bei 19000 x g. Die etwaigen Pellets wurden fotografisch dokumentiert. Sämtliche sich anschließende Prozedere (Bestimmung Anteil an eingebautem LHCII, Waschen, Stabilitätstests und REM-Aufnahmen inkl. Probenpräparation) wurden wie im Allgemeinen Material und Methoden-Teil unter 3.2.1.5 beschrieben durchgeführt. Die Zeiten der Hitzeinkubation wurden den Proben wie in den entsprechenden Ergebnisteilen beschrieben angepasst.

2.2.5. Modifikation von LHCII mittels MPS

MPS sollte über den heterobifunktionellen Crosslinker sSMPB kovalent mit LHCII verknüpft werden. Hierzu sollte die Succinimidylgruppe des Crosslinkers an Lysinreste des LHCII gekoppelt und anschließend die Sulfhydrylgruppe des MPS mit der Maleimidgruppe des Crosslinkers umgesetzt werden. Die kovalente Einführung einer Trimethoxysilangruppe in den LHCII sollte bei einer Silikat-kondensationsreaktion eine Erhöhung der Einbaurate erbringen und der entsprechende Einfluss auf die Stabilität sollte untersucht werden. Auch bei diesen Reaktionen galten die Crosslinker-bedingten Limitierungen der Hydrolyseempfindlichkeit der Succinimidylgruppe. Das Reaktionsprotokoll wurde im Rahmen zweier betreuter Abschlussarbeiten (Examensarbeit Daniel Palm und Bachelorarbeit Christopher Dresler) etabliert. Im Folgenden dargestellt wird die etablierte Methode zur Darstellung MPS-modifizierter Komplexe im präparativen Maßstab. Abweichungen in der Reaktionsführung sind bei den jeweiligen Ergebnissen aufgeführt.

2.2.5.1. Verknüpfungsreaktion von MPS mit LHCII

sSMPB	13,4 mM	
MPS	8,4 mM	(1,6 µl MPS ad 1000 µl mit 1 mM HCl)

Die Verknüpfung von MPS mit LHCII gliederte sich in drei Schritte: A) Anbindung des Crosslinkers an LHCII, B) Pufferwechsel und C) Anbindung des MPS an die Maleimidgruppe des Crosslinkers.

A) Anbindung des Crosslinkers an LHCII

Die Anbindung des Crosslinkers an LHCII erfolgte über dessen Succinimidylgruppe an Aminogruppen des LHCII. Um ungewollte Nebenreaktionen zu vermeiden, konnten nur Cystein-freie LHCII-Varianten verwendet werden. Der pH-Wert dieser Reaktion sollte möglichst hoch liegen, da

nur in diesem Fall ausreichende Mengen deprotonierter Lysinseitenketten vorliegen. Zu hohe pH-Werte allerdings führen zu einer raschen Hydrolyse des Crosslinkers, so dass diese Moleküle nicht mehr reagieren können. Auch die Verwendung von Tris als Puffer ist ausgeschlossen, da dessen Aminogruppen ungewollte Reaktionen eingehen würden. Aus diesem Grund wurde dieser Reaktionsschritt in 0,05 M Phosphat^{8,5} durchgeführt. 4 μM C79Sh wurden mit Puffer und $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ zusammenpipettiert. Anschließend wurde der Crosslinker abgewogen und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ eine 13,4 mM Stammlösung hergestellt. Der Crosslinker wurde in 5-fachem stöchiometrischen Überschuss zu den Lysinen der trimeren Komplexe zugegeben (7 zugängliche Lysine pro Monomer \Rightarrow 21 Lysine pro Trimer $\Rightarrow c_{\text{end}}(\text{Lysin}) = 84 \mu\text{M} \Rightarrow c_{\text{end}}(\text{sSMPB}) = 420 \mu\text{M}$). Die Reaktion erfolgte für 30 min auf Eis. Anschließend mussten die überschüssigen Crosslinkermoleküle entfernt werden. Dazu wurde ein Pufferwechsel durchgeführt.

B) Pufferwechsel

Der Reaktionsansatz aus A) wurde mit dem 3-fachen Volumen Tris^{6,8} (0,05 M) verdünnt und mit Hilfe von 30 kDa Ultrazentrifugationseinheiten (je nach Ansatzvolumen wurden 0,5 ml Einheiten mit PES-Membran unterschiedlicher Hersteller oder 4,5 ml Einheiten aus regenerierter Cellulose der Fa. Merck Millipore verwendet) bei 4°C auf das Ausgangsvolumen der Probe eingengt. Dieser Vorgang wurde insgesamt 4-mal wiederholt.

C) MPS-Anbindung an LHCII-gebundenen Crosslinker

Die vom Crosslinkerüberschuss befreite Probe aus B) wurde nun mit MPS umgesetzt. Dieses wurde zuvor in 1 mM HCl auf eine Konzentration von 8,4 mM gebracht und für 25 min hydrolysiert (1,6 μl MPS ad 1000 μl mit 1 mM HCl). Das nicht-hydrolysierte MPS besaß eine geringe Wasserlöslichkeit, die durch die Hydrolyse drastisch erhöht wurde. Diese Lösung wurde im 10-fachen stöchiometrischen Überschuss zu den Lysinen dem Reaktionsansatz zugegeben. Die Reaktion wurde für 30 min bei 23°C am Thermoschüttler (1400 Upm) durchgeführt. Nach der Reaktion konnten die Proben verdünnt und hinsichtlich ihrer Integrität fluoreszenzspektroskopisch untersucht (siehe dazu Allgemeine Materialien und Methoden 3.2.1.4.A)) oder in Copräzipitationsansätzen mit Spermin eingesetzt werden.

2.2.5.2. Copräzipitation von MPS-modifiziertem LHCII mit Spermin

Spermin	0,01 M	
Kieselsäurelösung	0,1 M	(aus mit 1 mM HCl hydrolysiertem TMOS)

Die Modifikationsansätze aus 2.2.5.1.C) wurden direkt in Copräzipitationen eingesetzt. Das Procedure entsprach vollständig (einschließlich der Konzentrationen der beteiligten Komponenten) dem in Kapitel II beschriebenen. Die einzige Veränderung bestand darin, dass die LHCII-Endkonzentration bei 2,6 μM lag. Es fand darüber hinaus kein Wechsel des Puffers statt, so dass die Copräzipitation in

Tris^{6,8} durchgeführt wurde. Zu beachten sind die verringerten Konzentrationen der hier eingesetzten Stammlösungen (siehe Beginn dieses Unterkapitels).

Reaktionsbedingungen und alle nachfolgenden Arbeitsschritte (Bestimmung Einbaurrate, Waschen und Stabilitätstest) wurden ebenfalls wie im Allgemeinen Material und Methoden-Teil unter 3.2.1.5 beschrieben durchgeführt.

3. Ergebnisse

Beim R5C3.2h wurde eine polykationische Proteinsequenz auf genetischer Ebene mit dem LHCP-Gen verknüpft. Überexpression, Rekonstitution und Trimerisierung erfolgten mit eben dieser Veränderung in der Proteinstruktur. Eine alternative Möglichkeit zur kovalenten Veränderung der Komplexe bestand in der direkten Modifikation von Trimeren. Hierzu wurden I) das polykationische Protein Protamin bzw. II) Propylsilanolgruppen über heterobifunktionelle Crosslinker kovalent an LHCII gebunden. In beiden Fällen galt es, Reaktionsprotokolle zur Anbindung zu etablieren, das Verhalten in Silikatfällungsprozessen zu analysieren und das Vermögen, den Komplex vor thermischem Stress zu schützen, zu bestimmen.

3.1. Kovalente LHCII-Modifikation mit Protamin

Das 4,25 kDa schwere Arginin-reiche Protein Protamin sollte über den Crosslinker sSMPB an trimeren LHCII gebunden werden. Hierbei fand eine Bindung des Crosslinkers über die Succinimidylgruppe an den N-Terminus des Protamins und über die Maleimidgruppe an Cysteine des LHCII statt.

3.1.1. Fällungseigenschaften des Protamins

Über das Silikatfällungsverhalten des Protamins war anfänglich nur die Tatsache bekannt, dass es in der Lage ist, präzipitierbare Silikatstrukturen zu bilden. Wie die Ergebnisse in Kapitel II zeigten, beeinflussen Puffer, pH-Werte und auch das Verhältnis von fällendem Agens zu Kieselsäure die Silikatstruktur und das Fällungsverhalten im Allgemeinen. Aus diesem Grund sollte ermittelt werden, in welchen Protaminkonzentrationsbereichen es bei der Verwendung der beiden Puffer Tris und Phosphat zwischen pH 6,0 und 8,0 zur Bildung von Silikatpräzipitaten kam. Zudem wurde Kieselsäure in den Konzentrationen 0,02 und 0,04 M eingesetzt. Nach 30-minütiger Präzipitation wurde zentrifugiert und die Größen der Pellets verglichen (Tab. III.1). Es fand keine exakte Quantifizierung mittels Molybdat-Blau-Test statt.

Folgende grundsätzliche Beobachtungen ließen sich zusammenfassen: Bei der Verwendung von Tris traten bei einem pH-Wert von 6,0 unabhängig von der Protamin- und Kieselsäurekonzentration keine präzipitierbaren Silikatstrukturen auf. Ab einem pH-Wert von 7,0 kam es bei Tris zur Bildung von präzipitierbaren Strukturen wenn mindestens 50 μM Protamin verwendet wurden. Dabei unterschieden sich die die Pellets im Vergleich von pH 7,0 und 8,0 kaum (eine Ausnahme stellte 10 μM Protamin bei pH 7,0 und 0,02 M Kieselsäure dar, wo eine Fällung auftrat). In Relation zu Phosphat waren die Präzipitate unter vergleichbaren Bedingungen (Protamin- und Kieselsäurekonzentrationen) bei Tris kleiner. In Phosphat wurden auch bei einem pH-Wert von 6,0 präzipitierbare Silikatstrukturen gebildet. Die Fällungen traten dabei ab einer Protaminkonzentration von 10 μM auf (Ausnahme hier: in 0,02 M Kieselsäure Bildung eines Pellets bei pH 6,0 in 5 μM Protamin und keine Pelletbildung bei

pH 8,0 in 10 μM Protamin). Die Bildung präzipitierbarer Strukturen war nicht abhängig von der Kieselsäurekonzentration.

Tab. III.1: Silikatfällungseigenschaften von Protamin

Protamin wurde in den angegebenen Konzentrationen unter verschiedenen Puffer- (0,05 M) und pH-Wertbedingungen mit 0,02 bzw. 0,04 M Kieselsäure inkubiert. Die Reaktionsdauer betrug 30 min bei RT. Die Auswertung erfolgte nach 2-minütiger Zentrifugation semiquantitativ durch optischen Vergleich. Erfolgte keine Pelletbildung, ist dies durch „/“ gekennzeichnet. Die Größe der Pellets wird durch die Anzahl von „+“ wiedergespiegelt, graduelle Erhöhung erfolgte mit Hilfe von „-“.

Protamin [μM]		0,02 M Kieselsäure						0,04 M Kieselsäure					
		1	5	10	50	100	500	1	5	10	50	100	500
P _i	6,0	/	+	+	++	++	++++	/	/	+	++	+++	++++
	7,0	/	/	+	++	+++	++++	/	/	+	++	+++	++++
	8,0	/	/	/	++	+++	++++	/	/	+	++	+++	++++
Tris	6,0	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	7,0	/	/	+	+-	++	+++	/	/	/	+	++	+++
	8,0	/	/	/	+-	++	+++	/	/	/	+	+-	+++

Damit waren die Rahmenbedingungen für eine Protamin-induzierte Silikatfällung bekannt. Hieraus ergab sich, in welchen Konzentrationsbereichen (etwa 10 μM Protamin) und pH-Bereichen (7,0 – 8,0 unabhängig von der Art des Puffers) die modifizierten Komplexe in den Fällungen eingesetzt werden mussten.

Um eine möglichst hohe Konzentration in den Fällungsansätzen zu erreichen, mussten Reaktionsbedingungen gefunden werden, die eine möglichst effiziente Anbindung von Protamin an den LHCII ermöglichen.

3.1.2. Optimierung der Protaminanbindung an LHCII

Ziel der Optimierung der Reaktionsbedingungen war es, an möglichst viele Cysteine des LHCII Protamin über den Crosslinker anzuknüpfen (Markierungsgrad). Dabei konnten die stöchiometrischen Verhältnisse von Komplex zu Crosslinker und zu Protamin sowie das Verhältnis von Crosslinker zu Protamin variiert werden. Eine weitere Komponente waren die Reaktionszeiten der Einzelschritte. Die Modifikation durch Protamin verlief über drei Reaktionsschritte: der Reduktion des LHCII, der Anbindung des Crosslinkers an Protamin und die Verknüpfung des CL-Protamins an den LHCII.

Die LHCII-Variante 3xCh mit Cysteinen an den Positionen 3, 106 und 160 wurde für 60 min mit CL-Protamin umgesetzt, die für 30 min miteinander reagiert hatten. Die stöchiometrischen Verhältnis-

se der drei Komponenten wurden variiert. Die denaturierten Proben wurden auf PAA-Gelen aufgetrennt (Abb. III.1). Etwas unterhalb der 29 kDa Markerbande tritt in allen Reaktionsansätzen eine Bande auf, die auch in der Crosslinker-freien Kontrolle anzutreffen ist. Diese repräsentiert das nicht-modifizierte LHCP. Im Bereich zwischen der 29 und der 45 kDa Markerbande sind drei Banden zu sehen, die durch die Anbindung von einem, zwei bzw. drei Protaminen entstehen und sich in ihrer Intensität je nach Reaktionsansatz unterscheiden. Wurde der Crosslinker im Überschuss zum Protamin eingesetzt (1 und 2), so zeigt sich die intensivste nicht-modifizierte LHCP-Bande, im Sinne einer möglichst vollständigen Modifikation des LHCP ist ein solcher Überschuss also nicht zielführend.

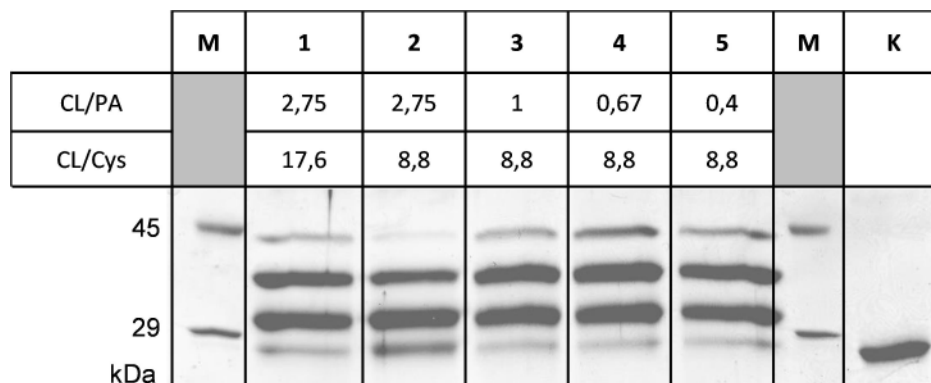


Abb. III.2: Protamin-Modifikation von LHCII: Variation Crosslinker zu Protamin Verhältnis

Gleiche Konzentrationen an LHCII Trimeren ($3xCh$, $c_{end}(\text{Trimer}) = 3,55 \mu\text{M}$; pro Trimer 9 Cysteine) wurde mit unterschiedlichen stöchiometrischen Überschüssen an Protamin (PA) und sSMPB (CL) umgesetzt. Bei einem konstanten Überschuss von CL zu PA von 2,75 wurden in 1 und 2 der Überschuss des Crosslinkers zu den Cysteinen des LHCII variiert (17,6 und 8,8-fach). Dieser wurde in 3 – 5 konstant bei 8,8 gehalten und PA in verschiedenen Verhältnissen zum CL verwendet ($CL/PA = 1; 0,67$ und $0,4$). Die Reaktionszeit für die Verknüpfung von PA und CL betrug 30 min, die zwischen LHCII und CL-Protamin 60 min. Die Cystein-haltige Mutante $3xCh$ wurde im Vorfeld mit $350 \mu\text{M}$ TCaEP für eine Stunde reduziert. Die Reaktionen wurden mit 0,25-fachem Vol. 3-4x Sparmix abgestoppt. Als Kontrolle (K) diente nicht-modifizierter LHCII.

Wurde der Crosslinker in gleicher Konzentration bzw. im Unterschuss zu Protamin eingesetzt (Bahn 3 – 5), so ist diese nicht-modifizierte LHCP-Bande deutlich schwächer. Die höchstmolekulare Bande (entspricht einer Anbindung von drei Protaminen pro LHCP) wird im Gegenzug in diesen Ansätzen deutlich intensiver. Dabei ist klar zu erkennen, dass sie bei einem CL-Unterschuss (4 und 5) stärker zu erkennen ist als im äquimolaren Ansatz (3). Eine weitere Erhöhung des Protaminüberschusses erbrachte keine Intensivierung der höhermolekularen Banden (Daten nicht gezeigt). Die beiden mittleren Banden (Bindung von einem bzw. zwei Protaminen pro LHCP) sind in allen Fällen sehr intensiv gefärbt, was eine Differenzierung der Intensitäten verhindert.

Die Anbindungsreaktion von Protamin an LHCII ließ sich also dadurch signifikant verbessern, indem Protamin in einem Überschuss zum Crosslinker eingesetzt wurde, welches deutlich effizienter war als ein erhöhter Überschuss des Crosslinkers über Cysteine bei einem Protamin-Unterschuss (im Vergleich zum Crosslinker).

Des Weiteren wurde getestet, wie sich die Variation der Reaktionszeit bei der Verknüpfung von Protamin und Crosslinker auf die Ausbeute an modifizierten Komplexen auswirkt. Unter konstanten

stöchiometrischen Bedingungen der drei Komponenten 3xCh, Crosslinker und Protamin wurden die Reaktionszeiten zwischen Protamin und Crosslinker von 30, 45 und 60 min getestet (Abb. III.3).

Die Verlängerung der Reaktionszeit von 30 min auf 45 min führt dazu, dass die Intensität der obersten Bande (drei Protamine pro LHCP) deutlich stärker wird und sich gleichzeitig die unterste Bande, die dem nicht-modifizierten LHCP entspricht, abschwächt. Bei einer weiteren Verlängerung der Reaktionszeit auf 60 min (3) wird die oberste Bande wieder etwas schwächer und die LHCP-Bande stärker. Ein Vergleich der beiden mittleren Banden ist schwieriger, da sie in allen Fällen sehr stark gefärbt sind und eine Unterscheidung augenscheinlich nicht möglich ist.

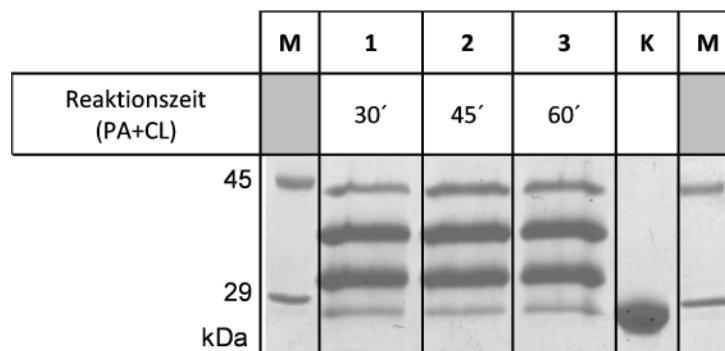


Abb. III.3: Protamin-Modifikation von LHCII: Variation Reaktionszeit Crosslinker mit Protamin

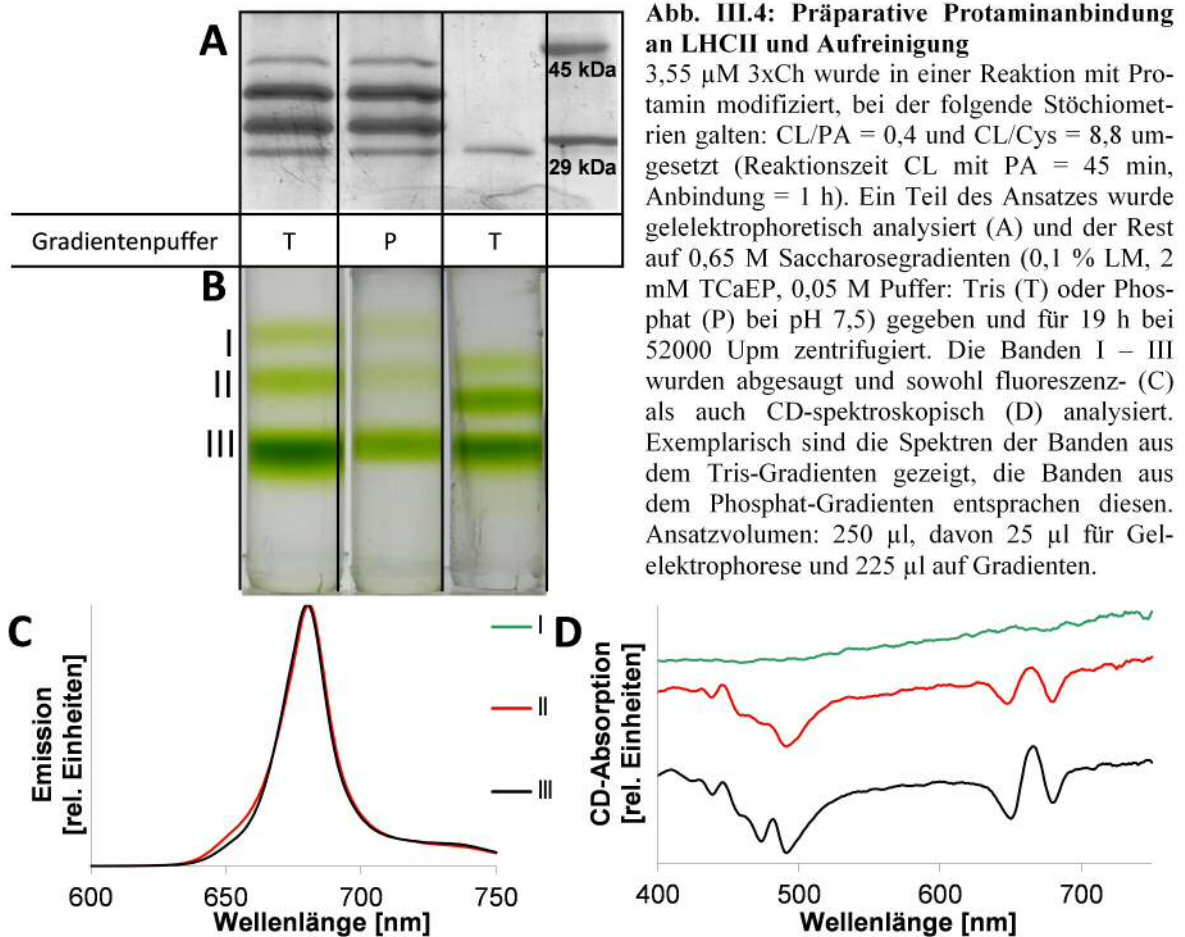
Protamin (PA) und Crosslinker (CL) wurde in drei Parallelen während der angegebenen Reaktionszeiten verbunden und dann mit LHCII Trimeren (Konzentration Cysteine = 31,95 μM) bei $\text{CL/PA} = 0,4$ und $\text{CL/Cys} = 8,8$ umgesetzt. Die Reaktion zwischen PA und CL wurde durch Zugabe von 0,4 x Vol. Tris^{8,5} beendet. LHCII reagierte mit dem CL-Protamin für konstante 60 min. Die Cystein-haltige Mutante 3xCh wurde im Vorfeld mit 350 μM TCaEP für eine Stunde reduziert. Die Reaktionen wurden mit 0,25-fachem Vol. 3-4x Sparmix abgestoppt. Als Kontrolle (K) dient nicht-modifizierter LHCII.

Ein optimiertes Protokoll umfasste also eine 45-minütige Reaktion zwischen Crosslinker und Protamin im stöchiometrischen Verhältnis von 0,4 und eine anschließende einstündige Anbindung an LHCII, wobei pro Cystein etwa 8,8 Crosslinkermoleküle eingesetzt werden. Die Optimierung führte dazu, dass der Anteil an nicht-modifiziertem LHCP minimiert und der von dreifach-modifiziertem maximiert werden konnte. Dieses im analytischen Maßstab eingesetzte Protokoll musste auf präparative Maßstäbe übertragen werden.

3.1.3. Präparative Modifikation von LHCII mit Protamin

Um eine ausreichende Menge an Protamin-markiertem LHCII für Silikatfällungsreaktionen bereitstellen zu können, musste das vorangegangene beschriebene Protokoll auf präparativen Maßstab übertragen werden. Gemäß der oben optimierten Stöchiometrien wurde Protamin mit dem Crosslinker verknüpft und anschließend an LHCII (3xCh) gebunden. Ein Teil des Reaktionsansatzes wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. III.4 A) und es zeigte sich ein gemäß des vorangegangenen Unterkapitels erwartetes Gelbild. Zwei dominierende Banden, die eine ein- und zweifach Anbindung von Protamin an LHCP widerspiegeln und zwei etwa vergleichbare Banden von nicht-modifiziertem LHCP (untere Bande) und dreifach-modifiziertem (obere Bande).

Wurden diese Ansätze in Saccharosedichtegradienten aufgetrennt, so bildeten sich in beiden Ansätzen gleiche Bandenmuster aus (Abb. III.4 B), die dem Kontrollgradienten ohne Protamin entsprachen. Es ist eine schwach gefärbte Bande im oberen Gradientenbereich zu erkennen. Darunter zwei weitere, wobei die untere hinsichtlich ihrer Intensität dominiert. Tris und Phosphat im Gradienten führten zu unterschiedlichen Bandenintensitäten. Die Gesamtmenge an Komplex in den Banden war geringer bei Phosphat, dafür bildete sich ein Präzipitat am Boden des Zentrifugenröhrchens (auf den Bildern nicht zu erkennen)



Die einzelnen Banden wurden abgesaugt und sowohl fluoreszenz- (Abb. III.4 C) als auch CD-spektroskopisch analysiert (Abb. III.4 D). Dabei zeigte Gradientenbande I kein komplextypisches CD-Signal, es handelte sich um freies Pigment. Bande II wies ein für Monomere typisches CD-Spektrum auf und eine leichte Schulter bei etwas über 650 nm ist zu erkennen im Fluoreszenzspektrum, welche bei Bande III nicht vorhanden ist. Diese ergibt bei der CD-spektroskopischen Analyse ein trimertypisches Spektrum. Die Analyse der Banden II und III auf dem SDS-PAA-Gel ergaben vergleichbare Bandenmuster aus LHCP-Bande und drei darüber liegenden Banden (Daten nicht gezeigt). Für sämtliche Silikatfällungsversuche wurden Proben entsprechend Bande III verwendet. Diese lagen jedoch in zu niedriger Konzentration vor und mussten deshalb aufkonzentriert werden.

Auch andere Cysteinmutanten des LHCII konnten mit Protamin modifiziert (siehe unten) und präparativ hergestellt werden. Das Bandenmuster der Saccharosedichtegradienten unterschied sich dabei nicht von dem bei 3xCh. Die Einzelcysteinmutante S160Ch und die Zweifachmutante Be1 (Cys an Position 3 und 160) wurden sowohl auf Tris- als auch Phosphat-haltige Gradienten bei pH 7,5 gegeben (Abb. III.5 A). Wie oben beschrieben treten 3 Banden auf. Deren CD-spektroskopische Analyse (Abb. III.5 B) ergab ein monomertypisches Spektrum für die mittlere Bande (I) und ein trimertypisches für die untere (II). Bei den Phosphat-haltigen Gradienten war, wie bereits für 3xCh beschrieben, die Intensität der Banden geringer als bei Tris-haltigen, obwohl gleiche Mengen an Komplex aufgetragen wurden. Zudem tritt unterhalb der untersten Bande eine dezente Grünfärbung auf. Saugte man diesen Bereich ab und konzentrierte ihn auf, ergab das Konzentrat ein CD-Spektrum, das dem der unteren Bande entspricht. Gezeigt sind nur die Spektren von S160Ch in Phosphat, die von Be1 entsprachen diesen und wurden daher weggelassen.

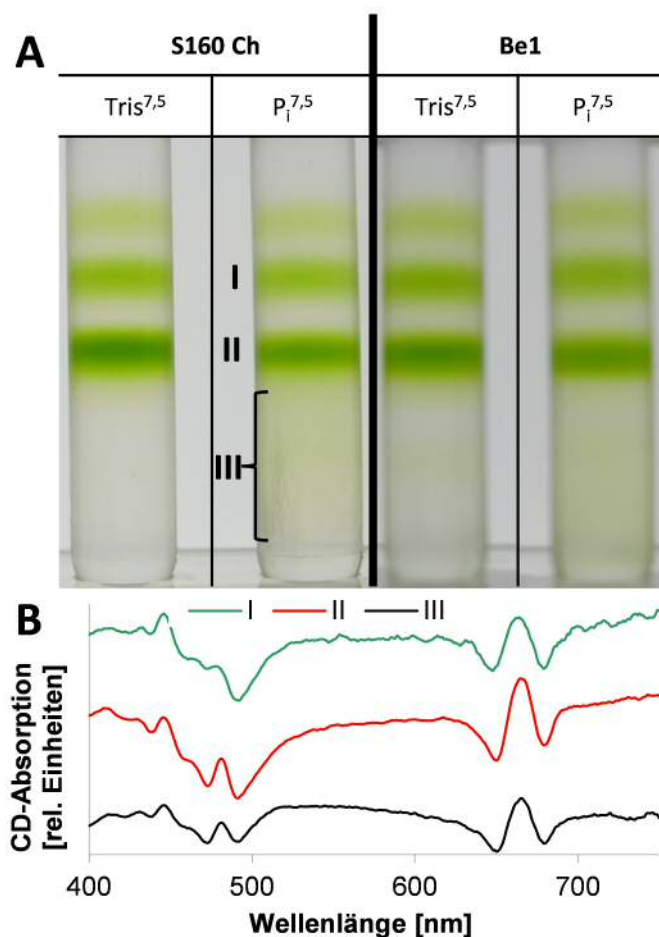


Abb. III.5: Präparative Herstellung diverser Protamin-modifizierter LHCII Cysteinvarianten: Gradientenpuffer-Abhängigkeit

Analog zu 3xCh wurden einfach- (S160Ch) und zweifach- (Be1, Be2 [nicht dargestellt]) Cysteinvarianten mit Protamin im präparativem Maßstab hergestellt, auf Saccharosedichtegradienten (0,65 M Saccharose; 2 mM TCaEP; 0,1 % LM; 0,05 M Puffer: Tris^{7.5} bzw. Phosphat^{7.5}) aufgetragen und für 19 h bei 52000 Upm zentrifugiert (A). Die Banden I – III wurden abgesaugt und mittels CD-Spektroskopie (B) charakterisiert (Parameter siehe M+M). Exemplarisch gezeigt sind die Spektren S160Ch in Phosphat^{7.5}, die den Banden der anderen Bedingung entsprachen.

Verschiedene Cystein-Varianten des LHCII ließen sich also im präparativen Maßstab mit Protamin modifizieren und durch Saccharosedichtegradienten aufreinigen. Wurde hierbei in der Gradientenlösung Phosphat anstelle von Tris verwendet, kam es zu einer Minderung der Ausbeute an modifizierten Trimeren. Es bildeten sich hier höher-molekulare Aggregate, die sich in einem diffus-grünen Bereich

in der unteren Gradientenhälfte (S160Ch und Be1) bzw. Präzipitaten am Boden (3xCh) widerspiegeln.

3.1.4. Aufkonzentrieren von Protamin-modifiziertem LHCII

Polykationische Moleküle bereiten beim Aufkonzentrieren dahingehend Probleme, dass sie mit dem Membranmaterial interagieren können. Es wurden diverse Versuche unternommen, die Konzentration an Protamin-modifizierten Komplexen zu erhöhen, die im Folgenden zusammengefasst werden sollen.

Von den 4 ml Membraneinheiten der Fa. Millipore (Amicon® Ultra Centrifugal Filters) wurden zwei verschiedene Membranmaterialien getestet: modifizierte Cellulose und PES. Schon beim Einengen der Saccharose-haltigen Lösung aus dem Gradienten verfärbte sich die modifizierte Cellulosemembran grün. Diese Verfärbung war irreversibel und ließ sich nicht durch erhöhte Ionenstärke entfernen. Bei PES trat dieser Effekt nicht auf. Wurden hier jedoch die Proben mit 0,05 M Phosphat^{7,5} verdünnt und wieder eingengt, so kam es zu einer ebenfalls irreversiblen Membranverfärbung. Eine Inkubation der PES-Membran mit einer reinen Protaminlösung beeinträchtigte nicht deren Wasserdurchlässigkeit, erbrachte aber auch keine Verhinderung der ungewollten Komplex-Membran-Interaktion. Mit 0,5 ml Einheiten aus PES ließen sich in 0,1 M Phosphat maximale Konzentrationen von knapp 4 µM Trimeren erreichen. Die Lösungen, die direkt aus den Gradienten abgesaugt wurden, konnten bei Tris in diesen Einheiten auf bis zu 10 µM, in Phosphat auf bis zu 5 µM aufkonzentriert werden, ohne eine Membraninteraktion hervorzurufen. Da die Gradientenlösung scheinbar die Interaktion mit der Membran einschränkte, wurde bei der Präparation von Komplexen für Fällungsexperimente auf einen Pufferwechsel verzichtet und stattdessen in den Gradienten der gewünschte Puffer verwendet. So wurde nur diese Lösung aufkonzentriert und zur Fällung eingesetzt.

Des Weiteren wurde versucht, die modifizierten Komplexe mittels Salz auszufällen, um sie dann in einem kleineren Volumen aufzunehmen. Doch weder die Verwendung von 0,05 M KCl mit 0,01 M MgCl₂ führte zu einer Ausfällung noch die sukzessive Erhöhung der MgCl₂-Konzentration auf 0,25 M.

Mittels Bindung an einer Kationenaustauschersäule (SP-Sepharose) und anschließender Elution in kleinem Volumen sollte die Konzentration an Protamin-modifiziertem Komplex erhöht werden. Die Komplexe (hier zum Testen Monomere) banden nahezu quantitativ an das Säulenmaterial und zwar direkt im oberen Säulenbereich. Es wurde mit einer aufsteigenden NaCl-Konzentration bis zu 2 M eluiert (alle Salzlösungen mit 0,1 % LM). Eine signifikante Ablösung der Komplexe konnte allerdings nicht beobachtet werden. Auch die Kombination aus erhöhtem pH-Wert (9,0) und 1 M NaCl bedingte keine Ablösung.

3.1.5. Positionsabhängige Protamin-Modifikation von LHCII

Wie in den vorangegangenen Unterkapiteln beschrieben, ließ sich 3xCh nicht quantitativ an allen Cysteinen mit Protamin modifizieren. Mit Hilfe von einfach- und zweifach Cystein-Varianten des

LHCII sollte analysiert werden, ob dies ein positionsabhängiger Effekt war, d.h. einzelne Cysteinpositionen besser bzw. schlechter mit Protamin modifiziert werden können. Ein möglicher anderer Grund könnte die erhöhte positive Ladungsdichte in Komplexnähe sein, die durch die Anbindung von Protamin entsteht und so durch elektrostatische Abstoßung eine quantitative Modifikation verhinderte. 3xCh hat Cysteine an den Aminosäurepositionen 3, 106 und 160. Mit diesem sollten die folgenden LHCII-Varianten verglichen werden: Be1 (3, 160), Be2 (106, 160), S3Ch, S106Ch und S160Ch. Die Reaktionen wurden so durchgeführt, dass die stöchiometrischen Überschüsse des CL-Protamins bezogen auf die Anzahl der Cysteine vergleichbar waren. Die SDS-PAA-Gele wurden densitometrisch ausgewertet und der prozentuale Anteil einer Bande an der Gesamtintensität pro Ansatz bestimmt. Die Banden entsprachen unterschiedlichen Mengen an LHCP-gebundenem Protamin. So konnte für jede Cystein-Variante errechnet werden, wie groß der Anteil an nicht-, einfach-, zweifach- bzw. dreifach-modifiziertem LHCP war (Abb. III.6). Es wurden dabei sowohl Monomere (A) als auch Trimere (B) verwendet.

Die geringste Ausbeute an Modifikation wurde bei S3Ch erreicht. Hier blieben etwa 70 % der Monomere ohne Anbindung von Protamin, wenn Monomere in der Reaktion eingesetzt wurden, jedoch nur gut 60 % bei Trimeren. Diese grundsätzliche Tendenz, dass der Anteil an nicht-modifiziertem LHCP beim Einsatz von Trimeren niedriger lag im Vergleich zu den Monomeren war bei allen Varianten zu beobachten. Die beiden Varianten S106Ch und S160Ch unterschieden sich im Ausmaß an Modifikation nicht signifikant voneinander (etwa 50 % bei den Monomeren und 45 % bei den Trimeren an nicht-modifiziertem LHCP).

Bei den zweifach-Cystein-Varianten Be1 und Be2 fiel auf, dass bei Be1, der Variante, bei der sich in Position 3 ein Cystein befindet, ein höherer Anteil an nicht-modifiziertem LHCP auftrat als bei Be2, dessen Cysteine in den Positionen 106 und 160 zu finden sind. Der Anteil an LHCP mit einem gebundenem Protamin ist bei beiden Varianten in etwa gleich. Folgerichtig war der Anteil an mit zwei Protaminen verknüpften LHCP bei Be2 höher als bei Be1.

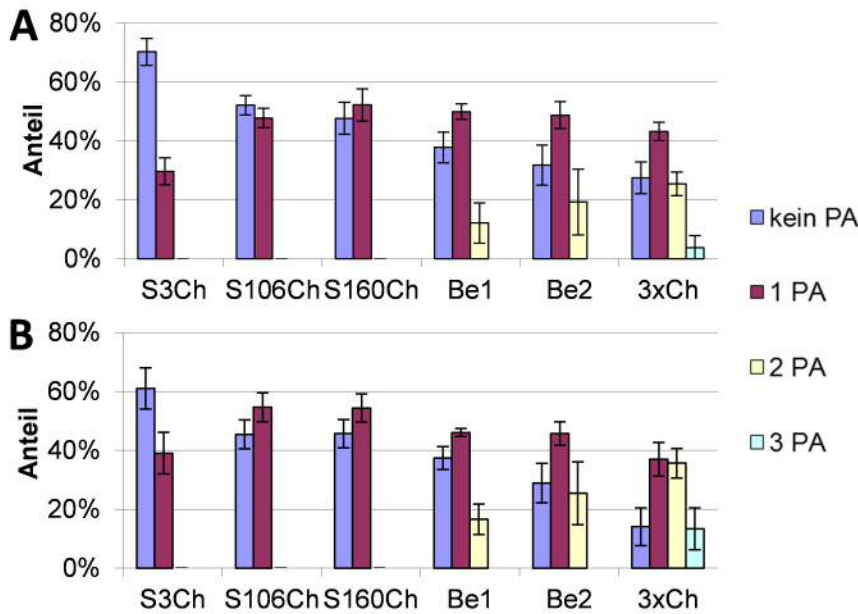


Abb. III.6: Positionsabhängige Anbindung von Protamin an monomere und trimere LHCII

Protamin und Crosslinker wurden im Verhältnis 2,5:1 umgesetzt und mit verschiedenen LHCII-Varianten für 1 h inkubiert. Dabei betrug der Überschuss von CL über jedes Cystein 10:1. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,25 x Vol. 3-4x Sparmix gestoppt. Es wurden sowohl Monomere ($c_{\text{end}} = 10,65 \mu\text{M}$ [A]) als auch Trimere ($c_{\text{end}} = 3,55 \mu\text{M}$ [B]) verwendet.

Auffällig beim 3xCh war der Unterschied zwischen Monomeren und Trimeren. Waren bei den Monomeren noch fast 30 % des LHCP nicht-modifiziert und der Anteil an dreifach verknüpften sehr niedrig, so sank der Anteil an nicht-modifiziertem LHCP bei den Trimeren auf gut 14 %, was in etwa dem Anteil an dreifach-modifiziertem LHCP entsprach.

Aus den Anteilen der unterschiedlich modifizierten Apoproteine ließ sich für jede LHCII-Variante eine durchschnittliche Anzahl an Protaminen pro Komplex errechnen (Tab. III.2).

Tab. III.2: Protamin-Modifikationsgrade verschiedener LHCII-Varianten

Mit den densitometrischen Daten aus Abb. III.6 wurde die durchschnittliche Zahl an Protaminen pro LHCP für Monomere und Trimere berechnet. Bei Letzteren konnte hieraus die durchschnittliche Anzahl Protamine pro Trimer bestimmt werden.

	PA pro...	S3Ch	S106Ch	S160Ch	Be1	Be2	3xCh
Monomer	...LHCP	0,3	0,5	0,5	0,7	0,9	1,1
Trimer	...LHCP	0,4	0,6	0,5	0,8	1,0	1,5
	...Trimer	1,2	1,7	1,6	2,4	2,9	4,5

Auffällig war, dass Monomere eher in schlechteren Ausbeuten modifiziert wurden als Trimere und dass Varianten mit einem Cystein in Position 3 weniger Protamin/e trugen als die mit Cystein/en in anderen Positionen.

3.1.6. Silikatfällungen mit Protamin-modifiziertem LHCII

Die bereits behandelten LHCII-Varianten wurden im präparativen Maßstab hergestellt und unter verschiedenen Bedingungen mit Kieselsäure umgesetzt. Es sollte getestet werden, ob die Protamin-modifizierten Komplexe in den Konzentrationsbereichen, die durch das Aufkonzentrieren (siehe hierzu III.3.1.4) erreicht werden konnten, grundsätzlich in der Lage sind, Kieselsäure zu kondensieren.

Nachdem dies erfolgreich gezeigt werden konnte, wurden die Einbauraten und das Potential zur Stabilisierung gegenüber thermischem Stress bestimmt und REM-Bilder aufgenommen, um diese mit den Resultaten des Stabilisierungsvermögens zu korrelieren.

3.1.6.1. Silikatfällungen mit Protamin-modifiziertem 3xCh

Protamin-modifizierter 3xCh wurde unter variierten Bedingungen mit 0,02 M Kieselsäure umgesetzt: Die Reaktion lief für 1 h bei 20°C ab (Abb. III.7 A) bzw. für 12 h bei 4 °C (Abb. III.7 B). Es wurden stets die pH-Werte 6,6 und 7,5 eingestellt. Der Grad an Protamin-Modifikation wurde mit 4,5 Protaminen pro Trimer bestimmt (siehe hierzu Tab. III.2). Es wurden 2,5 µM Protamin-modifizierte Komplexe eingesetzt (I), was einer Protaminkonzentration von 11,25 µM entsprach. In den Ansätzen II und III wurde dieser Wert durch die Kombination aus 1 µM LHCII (entspricht 4,5 µM Protamin) und 6,75 µM freiem Protamin erreicht, wobei in III die Zugabe des freien Protamins nach der Hälfte der Reaktionszeit stattfand. In IV wurden nicht-modifizierte Komplexe direkt mit 11,25 µM freiem Protamin umgesetzt (entspricht einer Copräzipitation).

Die Reaktion bei 20°C führte bei pH 6,6 in den Ansätzen ohne zusätzliches Protamin (I) bzw. ohne modifizierte Komplexe (IV) zu keiner Bildung von präzipitierbaren Strukturen. Dies war bei den gleichen Ansätzen mit längerer Reaktionsdauer bei 4°C nicht der Fall, ebenso bei erhöhtem pH-Wert. Unter allen anderen Bedingungen kam es zu einer Bildung von grünen Silikatpräzipitaten, aus denen sich beim Waschen keine Komplexe herauslösten. Insgesamt war festzustellen, dass bei verlängerter Reaktionsdauer mehr Komplexe in das Silikatpellet eingebaut wurden (kleine Abweichung bei II und III pH 7,5) und dass der pH-Wert von 7,5 dieses ebenfalls förderte. Die Einbaurate war in den Ansätzen am größten, in denen modifizierte Komplexe und freies Protamin gemeinsam in der Fällung eingesetzt wurden (zwischen 72 und 94 % bei einstündiger Reaktionsdauer und zwischen 91 und 93 % bei 12-stündiger).

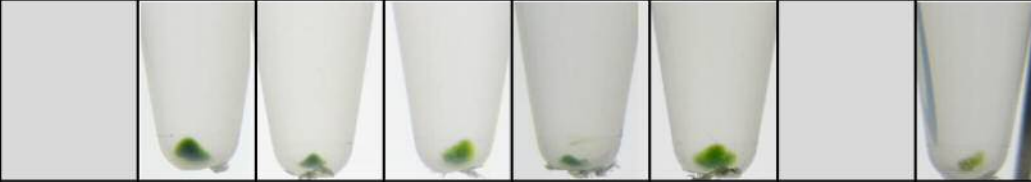
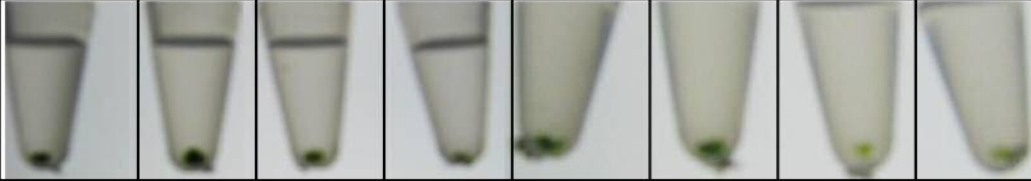
A) 20°C, 1 h	I		II		III		IV	
pH-Wert	6,6	7,5	6,6	7,5	6,6	7,5	6,6	7,5
c (LHCII)	2,5	2,5	1	1	1	1	1	1
c (PA _{LHCIIgeb})	11,25	11,25	4,5	4,5	4,5	4,5	0	0
c (PA _{frei})	0	0	6,75	6,75	6,75	6,75	11,25	11,25
t (Zugabe)	-	-	t = 0	t = 0	t = 30'	t = 30'	t = 0	t = 0
								
Einbaurrate (%)	-	79	84	92	72	94	-	17
B) 4°C, 12 h								
c (PA _{frei})	0	0	6,75	6,75	6,75	6,75	11,25	11,25
t (Zugabe)	-	-	t = 0	t = 0	t = 6 h	t = 6 h	t = 0	t = 0
								
Einbaurrate (%)	79	88	91	92	91	93	16	31

Abb. III.7: Protamin-induzierter Silikateinschluss von LHCII unter verschiedenen pH-Bedingungen

Für die Versuche wurde die dreifach Cystein-Variante 3xCh verwendet – sowohl Protamin-modifiziert (I-III) als auch nicht-modifiziert (IV). Bei den modifizierten Proben wurde von einem Modifizierungsgrad von 4,5 Protaminen pro Trimer ausgegangen. Die Konzentration des P_i-Puffers betrug 0,1 M, die der Kieselsäure 0,02 M. Reaktionsdauer war 1 h bei 20°C (A) bzw. 12 h bei 4°C (B) unter Schütteln. Den Proben II – IV wurde Protamin zugesetzt, so dass gemeinsam eine Gesamtprotaminkonzentration von 11,25 µM erreicht wurde. Die Zugabe erfolgte dabei zu Reaktionsbeginn (t = 0, II und IV) bzw. nach der Hälfte der Reaktionszeit (t = 30 min bzw. 6h, III). Die Pellets wurden zentrifugiert und mit WP gewaschen. Die Aufnahmen wurden nach dem Abzentrifugieren des WP gemacht. Die Einbaurrate errechnete sich aus der Differenz der verbleibenden Komplexe im Überstand nach der Fällung zur ursprünglich eingesetzten Menge.

Der Copräzipitationsansatz mit nicht-modifizierten Komplexen erreicht im Falle einer Bildung von präzipitierbaren Strukturen max. 31 % Einbaurrate, bei pH 6,6 selbst nach 12-stündiger Reaktion nur 16 %. Den auffälligsten Unterschied hinsichtlich des Fällungsverhaltens wiesen die reinen Proben modifizierter Komplexe in Abhängigkeit vom pH-Wert auf. Während innerhalb einer Stunde bei pH 6,6 keine Fällung auftrat, wurden bei pH 7,5 79 % der Komplexe ins Silikat eingebaut, bei einer verlängerten Reaktionszeit unterschieden sich die beiden Ansätze lediglich zwischen 79 % (pH 6,6) und 88 % (pH 7,5).

Unbekannt war an dieser Stelle, ob das kovalent an den Komplex gebundene Protamin einen Einfluss auf die Integrität der Komplexe hat. Daher wurden die in Abb. III.7 gezeigten Präzipitate resus-

pendiert und fluoreszenzspektroskopisch analysiert (Abb. III.8). Dabei zeigte sich, dass bei einer einstündigen Reaktion keine signifikante Fluoreszenz von Chlorophyll *b* auftrat, außer bei Ansatz IV bei pH 7,5, wo das Spektrum insgesamt etwa um 2 nm in den blauen Bereich verschoben war und eine leichte Schulter im Chlorophyll *b*-Bereich zum Vorschein trat. Die übrigen Spektren ähnelten stark, so dass sie sich in der Abbildung überlagern. Bei einer verlängerten Reaktionsdauer trat bei keiner Probe eine Verschiebung des Maximums auf. Bei IV pH 7,5 war die stärkste Chlorophyll *b*-Fluoreszenz zu erkennen. Diese trat in etwas schwächerer Form auch bei IV bei pH 6,6 auf sowie beim Ansatz III pH 7,5. Die übrigen Proben wiesen keine signifikante Chlorophyll *b*-Schulter auf und überlagern sich in der Abbildung.

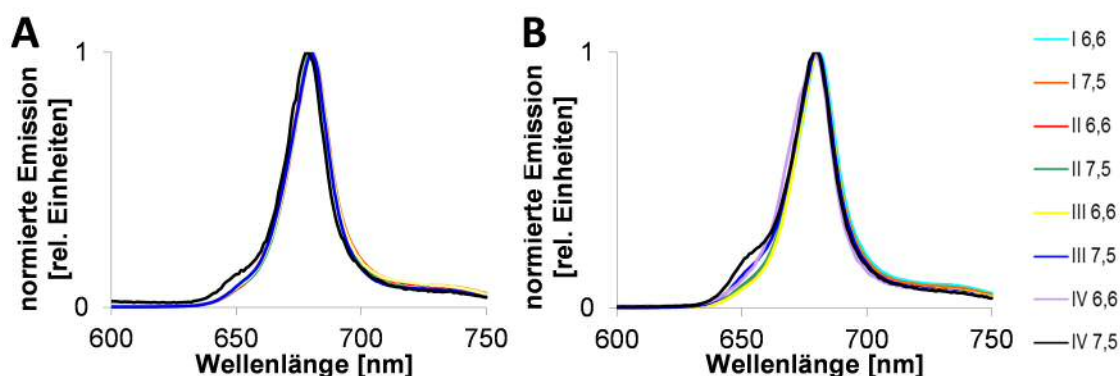


Abb. III.8: Einfluss der Silikatfällung auf Integrität der Protamin-modifizierten 3xCh Trimere

Die Pellets aus Abb. III.7 wurden resuspendiert und Fluoreszenzspektren von 600 – 750 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) aufgenommen. A: Spektren der Fällungen bei RT für 1 h, B: Spektren der Fällungen bei 4°C für 12 h.

Mit den hier beschriebenen Pellets sollten Hitzestressexperimente gemacht werden. Die Pellets lösten sich allerdings während der 24-stündigen Inkubation fast vollständig auf. Lediglich bei den beiden 4°C-Ansätzen der reinen Protamin-modifizierten Komplexe (I) wie auch dem entsprechenden pH 7,5 Ansatz aus der 20°C-Reaktion blieben noch Pellets erhalten. Diese zeigten aber bei der fluoreszenzspektroskopischen Messung eine dominierende Chlorophyll *b*-Fluoreszenz, die für eine vollständige Destruktion der Komplexe sprach (Daten nicht gezeigt).

3.1.6.2. Silikatfällungsverhalten Protamin-modifizierter LHCII-Varianten

Die LHCII-Varianten S160Ch, Be1, Be2 und 3xCh wurden präparativ mit Protamin modifiziert. Die Auftrennung erfolgte bei allen Varianten sowohl in Tris als auch Phosphat, so dass keine Pufferwechsel vor der Fällung vorgenommen wurden. Die eigentliche Fällung wurde mit 0,02 M Kieselsäure in einer 0,05 M gepufferten Lösung durchgeführt. Als Puffer wurde entweder Tris^{6,0} oder Phosphat^{7,5} verwendet. Während der einstündigen Inkubation war entweder 1 mM Spermin anwesend (+) oder nicht (-). Die Proben wurden danach für 2 min zentrifugiert und die Pellets fotografisch dokumentiert (Abb. III.9) und aus den Überständen die Einbaurate berechnet (Abb. III.10):

Ohne die Zugabe von Spermin fand in Tris^{6,0} bei S160Ch und Be1 keine Bildung von präzipitierbaren Silikatstrukturen statt, anders als bei Be2 und 3xCh, wobei hier die Pellets bei Be2 größer waren und auch eine höhere Einbaurate ermittelt wurde im Vergleich zu 3xCh (etwa 70 % gegenüber fast 40 %). In Phosphat bildete sich ohne Spermin bei allen LHCII-Varianten ein Pellet. S160Ch und Be1 wiesen allerdings signifikant kleinere Pellets auf und auch eine verringerte Einbaurate (um 40 %) im Vergleich zu Be2 und 3xCh, wo fast 90 respektive 75 % der eingesetzten Komplexe im Präzipitat wiederzufinden waren.

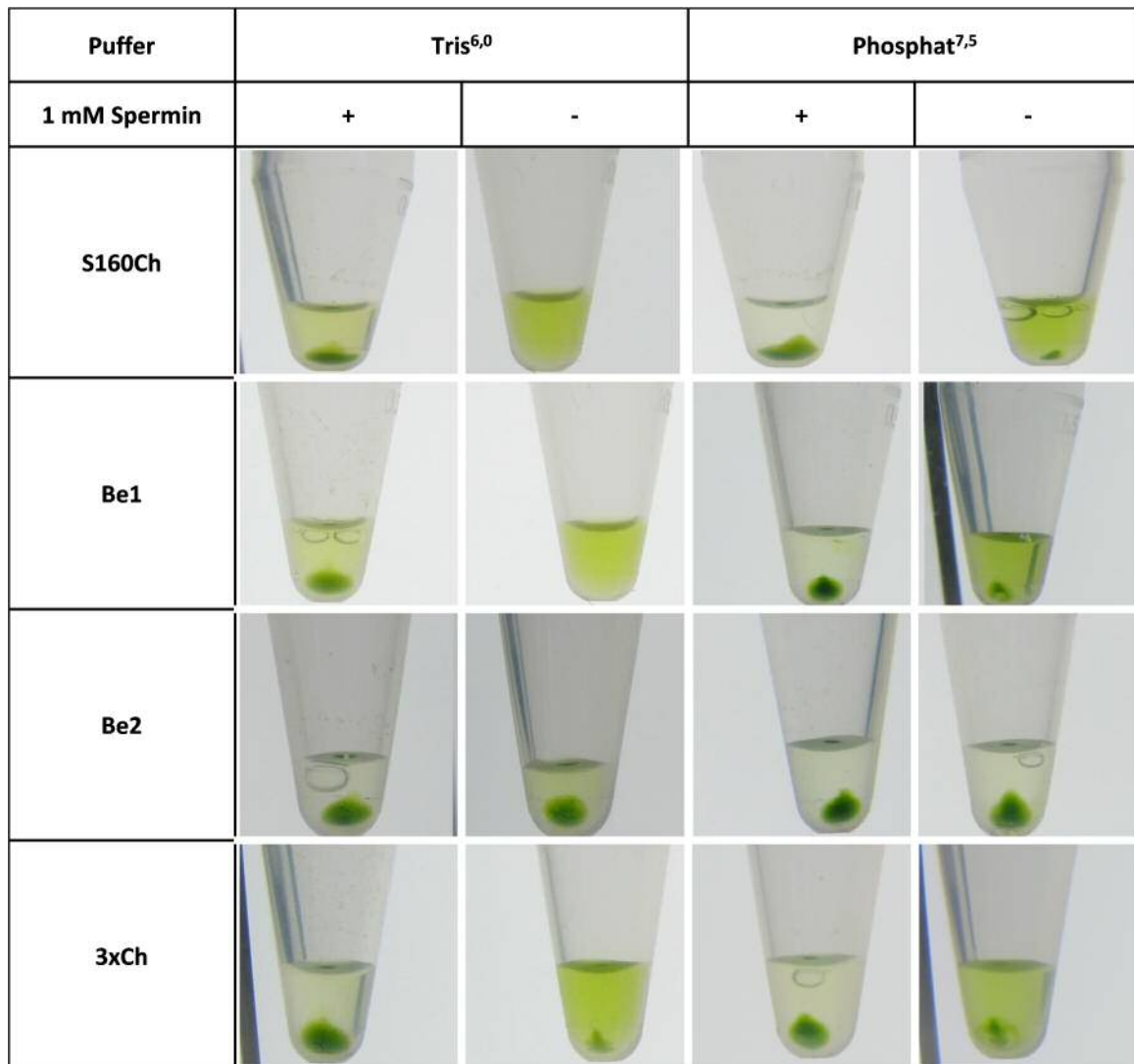


Abb. III.9: Silikatfällungsverhalten verschiedener Protamin-modifizierter LHCII-Varianten mit und ohne Spermin

Verschiedene Protamin-modifizierte Cysteinmutanten des LHCII wurden in Silikatfällungen eingesetzt. Die Fällungen wurden mit (+) und ohne (-) Zugabe von 1 mM Spermin entweder in 0,05 M Tris^{6,0} oder Phosphat^{7,5} durchgeführt. Komplexkonzentration war in allen Fällen 1 μ M, Kieselsäurekonzentration 0,02 M. Das Ansatzvolumen betrug 50 μ l für alle Ansätze außer Be2 in Tris^{6,0} (hier 25 μ l). Die Reaktionszeit war in allen Fällen 1 h bei 20°C.

Wurde den Ansätzen Spermin zugegeben, bildeten sich unabhängig vom Puffer (und damit vom pH-Wert) in allen Ansätzen Pellets, die sich hinsichtlich ihrer Größe nicht signifikant unterschieden. Bei Be2 und 3xCh wurden in beiden Puffern fast 90 % der Komplexe ins Pellet eingeschlossen, was auch bei Be1 in Phosphat erreicht wurde. In Tris wies dieser eine niedrigere Einbaurate auf, die vergleichbar mit den Ansätzen von S160Ch (etwa 60 %) war. An dieser Stelle bleibt anzumerken, dass etwaige Inkonsistenzen zwischen Farbintensitäten der Überstände und den ermittelten Einbauraten auf unterschiedliche Belichtungen bei der Aufnahme der Fotografien zurückzuführen sind.

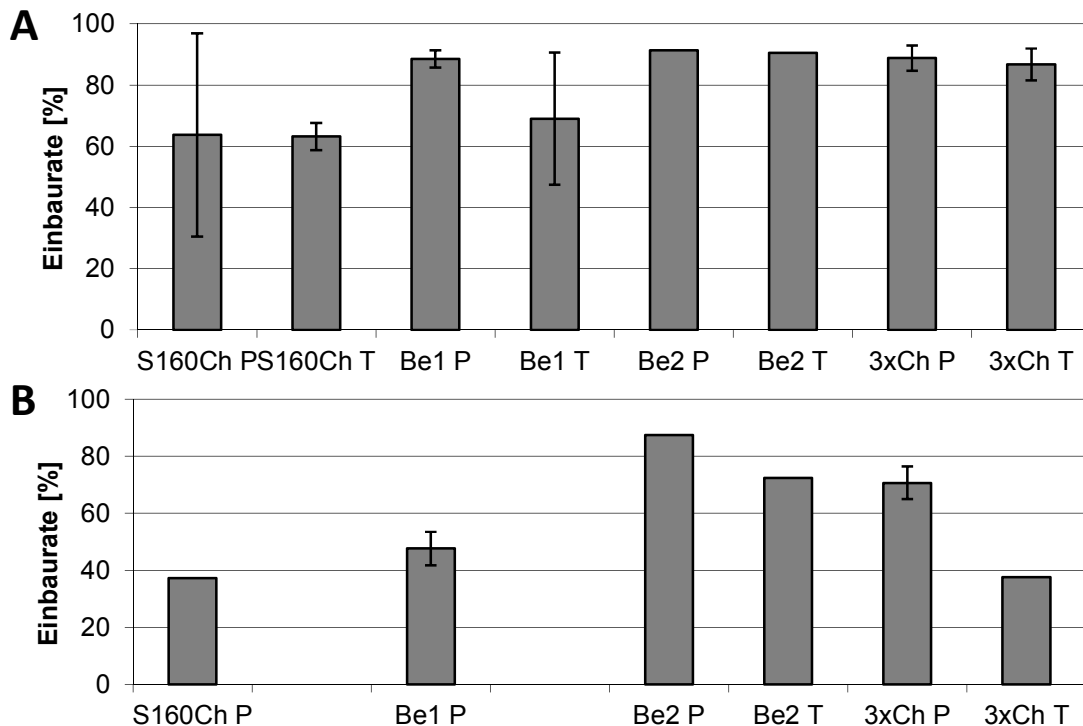


Abb. III.10: Einbaurate verschiedener Protamin-modifizierter LHCII-Varianten

Die Fällungen wurden mit (A) und ohne (B) Zugabe von 1 mM Spermin entweder in 0,05 M Tris^{6,0} (T) oder Phosphat^{7,5} (P) durchgeführt. Komplexkonzentration war in allen Fällen 1 μ M, Kieselsäurekonzentration 0,02 M. Das Ansatzvolumen betrug 50 μ l. Die Einbauraten wurden durch Konzentrationsbestimmungen von LHCII in den Fällungsüberständen berechnet. Quantifizierung erfolgte mittels HPLC nach Butanol-Pigmentextraktion. Fällungsdauer 1 h. Insofern möglich sind die Werte aus n = 2 berechnet.

In diesen Experimenten ließ sich also ein Unterschied hinsichtlich des Silikatfällungsverhaltens zwischen den LHCII-Varianten erkennen, die Protaminmodifikationen sowohl auf der stromalen als auch auf der lumenalen Seite des Komplexes trugen (Cysteinpositionen der Komplexe bei Be2: 106 und 160, 3xCh: 3, 106 und 160) und solchen, die diese nur auf einer Komplexseite besaßen (Cystein S160Ch: 160, Be1: 3 und 160).

3.1.6.3. Hitzeinkubation von Protamin-LHCII in Silikat

Wie schon für die 3xCh-Präzipitaten berichtet, zeigten auch die Pellets aus III.3.1.6.2 eine starke Auflösungstendenz während der Hitzeinkubation. Erschwerend kam hinzu, dass die Fällungsansätze aufgrund Materiallimitierung deutlich kleiner waren als standardisierte Spermin-Copräzipitationen.

Um ein ausreichendes Signal von in Silikat-eingeschlossenen Komplexen zu erhalten, wurde die Inkubationsdauer auf 5 h reduziert. Vor und nach Hitzestress wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen und der Quotient aus EmChl *a*/EmChl *b* bestimmt, die auf den Wert vor Hitzestress normiert wurden (Abb. III.11).

Die ohne Spermin präzipitierten Proben (B) wiesen nach thermischen Stress alle einen sehr geringen EmChl *a*/EmChl *b* auf. Bei S160Ch und Be1 gefällt in Phosphat lagen diese Werte mit 0,44 und 0,47 noch deutlich über den Werten von Be2 und 3xCh in Phosphat (0,1 bzw. 0,21). Die in Tris gefällten Proben von S160Ch und Be1 lösten sich vollständig auf. Für Be2 in Tris gefällt existieren keine Daten, 3xCh erreichte einen Wert von 0,07. Tendenziell schienen die Komplexe, die Protamin auf einer Komplexseite trugen, weniger stark beeinträchtigt zu werden während der Hitzeinkubation als solche, die sowohl auf der stromalen als auch auf der lumenalen Seite modifiziert waren.

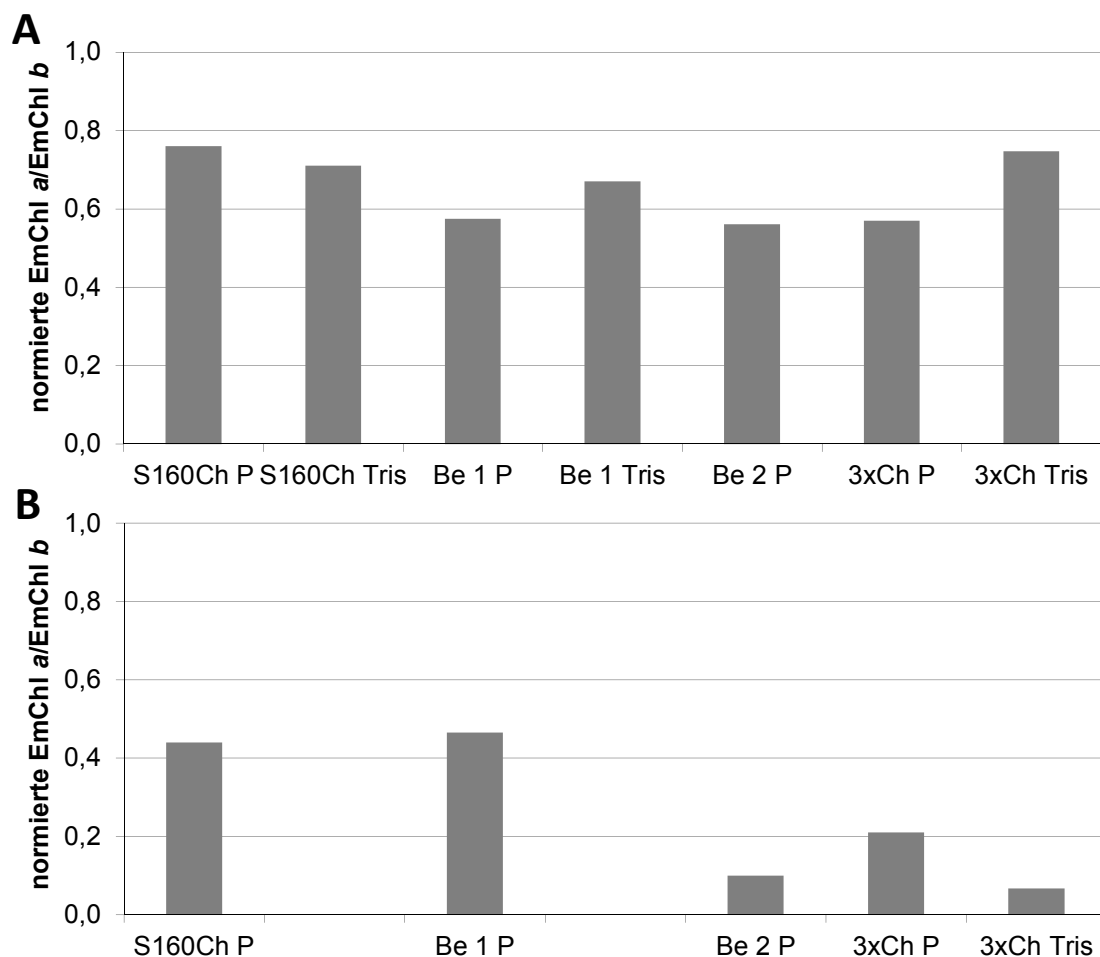


Abb. III.11: Hitzestabilität von Silikat-eingeschlossenem Protamin-modifizierten LHCII

Verschiedene Protamin-modifizierte Cysteinmutanten des LHCII wurden in Silikatfällungen eingesetzt. Den Proben in A wurde 1 mM Spermin zugefügt, denen in B nicht. Endkonzentration an LHCII war in allen Fällen 1 μ M, die der Kieselsäure 0,02 M. Die Fällungsansätze waren entweder in 0,05 M Tris^{6,0} (T) oder Phosphat^{7,5} (P) gepuffert. Die Fällungsdauer betrug 1 h bei RT. Emissionspektren von 600 – 750 nm ($\lambda_{ex} = 470$ nm) wurden vor und nach 5 h Inkubation bei 50°C vermessen und daraus die Quotienten aus EmChl *a*/EmChl *b* bestimmt, welche auf den Wert vor Inkubation normiert wurden.

Wurde den Fällungen 1 mM Spermin zugesetzt, so lagen die Werte der Quotienten signifikant höher. Bei S160Ch wurden 0,71 in Tris und 0,76 in Phosphat erreicht. Die Werte bei Be1 lagen unter den gleichen Bedingungen bei 0,67 und 0,58. Die in Phosphat gefällten Proben von Be2 und 3xCh kamen auf Werte von 0,56 und 0,57. 3xCh aus einer Tris-gepufferten Fällung ergab 0,75.

3.1.6.4. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Protamin-induzierten Silikatpräzipitaten

Wie in Kapitel II beschrieben besteht eine klare Korrelation zwischen dem Ausmaß an Stabilisierung und der Silikatstruktur. Je feiner und monodisperser diese ist, desto höher ist das Ausmaß der Stabilisierung des LHCII gegenüber erhöhter Temperatur. Um einen Eindruck davon zu gewinnen, welche Silikatstrukturen Protamin bildet, wurden entsprechende Silikatpräzipitate mittels REM analysiert (Abb. III.12).

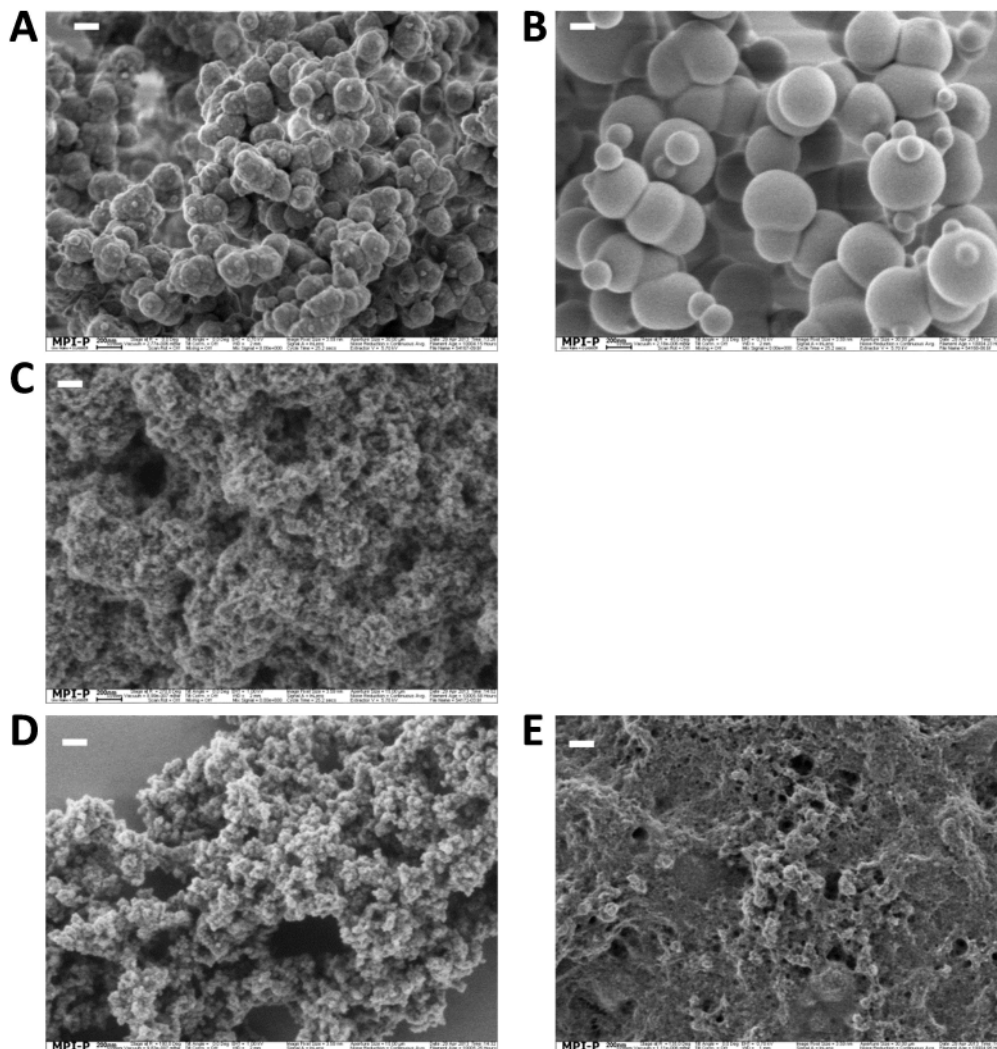


Abb. III.12: Protamin-induzierte Silikatstrukturen

0,02 M Kieselsäure wurde mit 50 μ M Protamin in 0,05 M Tris^{7,0} (A) bzw. Phosphat^{7,5} (B) für 30 min bei 20°C umgesetzt. Die Protamin-modifizierte LHCII Varianten 3xCh (C) und Be 1 (D + E) wurden mit (C und D) und ohne (E) 1 mM Spermin mit 0,02 M Kieselsäure für 1 h bei 20°C umgesetzt. Die Ansätze wurden in 0,05 M Tris^{6,0} (C) bzw. Phosphat^{7,5} (D + E) gepuffert. Die Proben wurden gewaschen und für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung auf Siliciuavern eingetrocknet. Größenmaßstab in allen Fällen 200 nm.

Protamin ohne jeden Zusatz von LHCII führte in Tris^{7,0} (A) zu globulären Strukturen mit ungefähr 200 nm Durchmesser. Die Oberflächentextur der Partikel schien eher rau zu sein und stand damit im Gegensatz zu den in Phosphat^{7,5} gefällten Partikeln (B), die äußerst glatt erschienen und einen Durchmesser von über 300 nm hatten. Hierzu traten ebenfalls sehr glatte, etwa 150 nm große Partikel auf. Wurden Protamin-modifizierte Komplexe mit Spermin gefällt, so bildeten sich bei 3xCh in Tris^{6,0} (C) sehr feine Silikatstrukturen, bei der die Größe der Einzelpartikel nicht genau festgestellt werden kann. Strukturell ähnelt das Präzipitat demjenigen aus einer Spermin-Copräzipitation mit nicht-modifiziertem LHCII. Bei Be1 in Phosphat^{7,5} mit Spermin (D) bildeten sich größere Silikatfeinstrukturen, die sich wiederum zu größeren Aggregaten zusammenlagerten. Die Proben wirkten grober strukturiert als in C beschrieben. Wurden jetzt Präzipitate ohne Spermin ausschließlich unter Beteiligung von modifiziertem Be1 in Phosphat^{7,5} (E) hergestellt, so trat im Großen und Ganzen keine partikuläre Struktur des Silikats auf. Dieses erschien eher massig-verschmolzen und nur vereinzelt waren Strukturen zu erkennen, die an die Partikel der vorangegangenen beschriebenen Proben erinnerten.

3.1.7. Protamin-Modifikation von R5LHCII und weiteren LHCII-Cysteinvarianten

Wie in Kapitel I.3.5 beschrieben, wurden verschiedene Cystein-haltige Varianten des R5C3.2h und eines Abkömmlings mit C-terminaler R5-Sequenz (2xC₁R5T) hergestellt. Diese und eine LHCII-Variante mit einem Cystein an Position 151 (V151Ch) wurden nach bereits erläuterten Prozedere mit Protamin kovalent modifiziert. V151Ch wurde ausgewählt, da hier das Cystein gut zugänglich im stromalen Bereich positioniert ist und zudem die Cystein-Cystein-Abstände im Trimer sehr groß sind. Es wurde die positionsabhängige Modifikationsausbeute bestimmt und sowohl Silikat- als auch Titan-dioxidfällungen (bezüglich Titan-dioxidfällungen siehe IV.) mit diesen modifizierten Komplexen durchgeführt.

3.1.7.1. Positionsabhängige Protamin-Modifikation von R5LHCII- und einer weiteren LHCII-Variante

R5S106Ch, R5S160Ch, R5S106/160Ch und 2xC₁R5T (Cys an Positionen 106 und 160 sowie einem C-terminalen R5-Anhang hinter dem His₆-Tag) sowie V151Ch wurden in analytischen Ansätzen mit CL-Protamin umgesetzt und auf SDS-PAA-Gelen aufgetragen, deren Banden densitometrisch analysiert wurden. So wurden die Anteile der einzelnen Banden innerhalb einer Gelbahn bestimmt (Abb. III.13) und hieraus die durchschnittliche Zahl an Protaminen pro Trimer berechnet (Tab. III.3).

V151Ch zeigte ein vergleichbares Verhalten wie die beiden Varianten S106Ch und S160Ch, wo ebenfalls etwas mehr als die Hälfte des Apoproteins mit Protamin modifiziert wurde und dementsprechend stimmt auch die Zahl der durchschnittlich pro Trimer gebundenen Protamine überein. Die R5-Variante des S106Ch, bei der die R5-Sequenz und das Cystein zur Bindung des Protamins stromal bzw. luminal liegen und damit auf entgegengesetzten Seiten des Komplexes, wiesen ebenfalls gleiche Modifikationsausbeuten bei der Reaktion mit Protamin auf wie die R5-freie Variante.

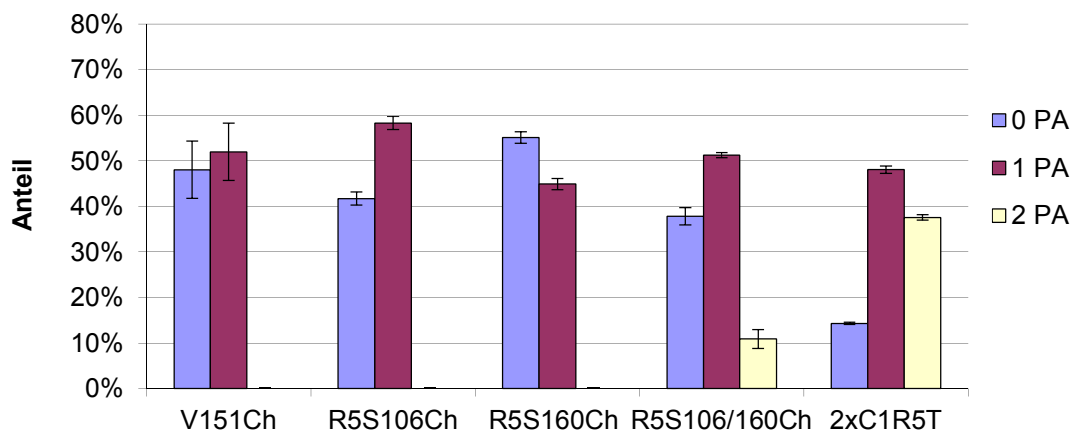


Abb. III.13: Protamin-Modifizierbarkeit von verschiedenen R5LHCII und V151Ch

Protamin und Crosslinker wurden im Verhältnis 2,5:1 umgesetzt und mit verschiedenen LHCII-Varianten für 1 h inkubiert. Dabei betrug der Überschuss von PA über jedes Cystein 25:1. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,25 x Vol. 3-4x Sparmix gestoppt. Es wurden Trimere ($c_{\text{end}} = 3,55 \mu\text{M}$) verwendet. Verändert nach DP.

Bei R5S160Ch, bei der die R5-Sequenz und das Cystein beide stromal liegen, waren signifikante Abweichungen zur R5-freien Variante zu beobachten. Deutlich weniger LHCP lag bei dieser Variante mit Protamin verknüpft vor (rund 55 %) und nur etwa 1,4 Protamine wurden so pro Trimer durchschnittlich gebunden. Die beiden Doppelcystein-Varianten R5S106/160Ch und 2xC₁R5T besitzen wie Be2 Cysteine an den Positionen 106 und 160. Bei R5S106/160Ch liegt die R5-Sequenz stromal am N-Terminus des Komplexes, bei 2xC₁R5T C-terminal hinter dem His₆-Tag. Zwischen diesen beiden Varianten bestand ein sehr auffälliger Unterschied hinsichtlich der Protamin-Modifikationsausbeute. Bei einer N-terminalen R5-Sequenz blieben fast 40 % des Apoproteins nicht-modifiziert und nur bei etwas mehr als 10 % wurden zwei Protamine gebunden. Dies lag deutlich unter den Werten von Be2, wo gut ein Viertel des LHCP zwei Protamine trug und so mit durchschnittlich 2,9 Protaminen pro Trimer etwa 0,7 Protamine mehr gebunden wurden als bei R5S106/160Ch. 2xC₁R5T überstieg diesen Wert von Be2 mit durchschnittlich 3,7 Protaminen pro Trimer nochmals sehr deutlich. Weniger als 15 % des Apoproteins blieb hier nicht-modifiziert. Damit bestanden äußerst auffällige Differenzen zwischen den beiden R5-modifizierten Doppelcystein-Varianten, abhängig von der Lage der R5-Sequenz.

Tab. III.3: Protamin-Modifikationsgrade verschiedener R5LHCII-Varianten und V151Ch

Mit den densitometrischen Daten aus Abb. III.10 wurde die durchschnittliche Zahl an Protaminen pro LHCP für Monomere und Trimere berechnet. Bei Letzteren konnte hieraus die durchschnittliche Anzahl Protamine pro Trimer bestimmt werden.

PA pro...	V151Ch	R5S106Ch	R5S160Ch	R5S106/160Ch	2xC1R5T
...LHCP	0,5	0,6	0,5	0,7	120
...Trimer	1,6	1,7	1,4	2,2	3,7

Die modifizierten R5-LHCII-Varianten konnten alle auch im präparativen Maßstab hergestellt werden und so für weitergehende Fällungsversuche verwendet werden.

3.1.7.2. Silikatfällung durch weitere Protamin-modifizierte LHCII-Varianten

Die Protamin-modifizierten Varianten V151Ch, R5S160Ch und R5S106/1060Ch sowie die nicht-modifizierte Kontrolle R5S106Ch (Komplekonzentration = 1 μM) wurden für 1 h in 0,05 M Tris^{7,0} mit 0,02 M Kieselsäure zur Reaktion gebracht ($T = 20^\circ\text{C}$). Die Proben wurden anschließend zentrifugiert und die Präzipitate fotografisch dokumentiert (Abb. III.14).

Bei der Protamin-freien Kontrolle R5S106Ch bildete sich während der einstündigen Inkubationsphase kein präzipitierbares Silikat. Die Modifikation der R5LHCII-Varianten mit Protamin führte zu einer Bildung von Pellets. Dieses war bei der einfach modifizierten Variante R5S160Ch deutlich schwächer ausgeprägt als bei R5S106/160Ch.



Abb. III.14: Silikatfällungsverhalten verschiedener R5LHCII-Cysteinvvarianten

Die Komplexe (1 μM) wurden in 0,05 M Tris^{7,0} mit 0,02 M Kieselsäure für 1 h bei 20°C zur Reaktion gebracht. Die Proben wurden anschließend für 2 min zentrifugiert und dokumentiert.

Die Protamin-modifizierte Variante V151Ch bildete unter den gewählten Bedingungen ebenfalls ein grünes Pellet. Dies steht im Gegensatz zum Fällungsverhalten von modifiziertem S160Ch (Abb. III.9), bei der es in Tris-Puffer innerhalb einer Stunde nicht zu einer Bildung von präzipitierbaren Strukturen kam. Allerdings wurde bei V151Ch ein um eine Einheit erhöhter pH-Wert verwendet.

3.2. Kovalente LHCII-Modifikation mit MPS

LHCII sollte kovalent mit MPS verknüpft werden. Wird bei diesem die Methoxysilangruppe sauer hydrolysiert, so könnten die entstandenen Silanolatgruppen in ein polymerisierendes Silikatnetzwerk eingebaut werden. Hierdurch wäre die Verbindung zwischen LHCII und SiO_2 kovalent und der Einbau könnte möglicherweise auch gesteigert werden gegenüber den reinen Copräzipitationsansätzen.

Die Verknüpfung sollte über den heterobifunktionellen Crosslinker sSMPB ermöglicht werden. An einen Cystein-freien LHCII sollte bei erhöhtem pH-Wert (8,5) die Anbindung des sSMPB über die Succinimidylgruppe an die Aminogruppen von Lysin als erste Reaktion erfolgen, dem die Verknüpfung des MPS mit der Maleimidgruppe folgte. Die so modifizierten Komplexe wurden in Spermin-Coprazipitationen eingesetzt und so das Potential für Komplexstabilisierung analysiert.

3.2.1. Etablierung der Anbindungsreaktion von MPS an LHCII

In der Dissertation von Gundlach wurde gezeigt, dass die Anbindung eines Succinimidylfarbstoffes an die Lysine nicht quantitativ verläuft [52]. Aus diesem Grund wurde der Crosslinker in stöchiometrischen Überschüssen von 5, 10, 20 und 40 bezogen auf ein Lysin im ersten Reaktionsschritt eingesetzt (Reaktion 30 min auf Eis). Der Crosslinkerüberschuss wurde mittels Filtrationseinheiten abge-

trennt und die Komplexe mit MPS umgesetzt (30 min, 23°C). Dieses besitzt eine schlechte Wasserlöslichkeit. Aus diesem Grund wurde eine 25-minütige Hydrolyse in 2 mM HCl vorgeschaltet, bei der die drei Trimethoxysilangruppen zu Methanol und Silanolatgruppen gespalten werden.

Als Maß der Modifikationseffizienz wurde die Einbaurate an Komplexen bei der anschließenden Copräzipitation angenommen (Abb. III.15). Hierbei zeigte sich, dass bei den modifizierten Komplexen unabhängig von der Höhe des Überschusses Einbauraten von über 90 % erreicht wurden. Den niedrigsten Wert erreichte die Probe mit 40-fachem MPS Überschuss mit knapp $91 \pm 7 \%$, während beim 20- und 5-fachem Überschuss $95 \pm 3 \%$ und bei 10-fach $94 \pm 4 \%$ der Komplexe ins Pellet eingebaut wurden. Damit lagen die Einbauraten signifikant höher als bei den beiden Kontrollen. In Kontrolle 1, welche $79 \pm 16 \%$ Einbaurate aufwies, wurde LHCII nur mit sSMPB umgesetzt, nicht jedoch mit MPS, bei Kontrolle 2 (Einbaurate $79 \pm 28 \%$) wurden Komplexe und MPS zusammengegeben, dafür aber keine Crosslinkeranbindung durchgeführt.

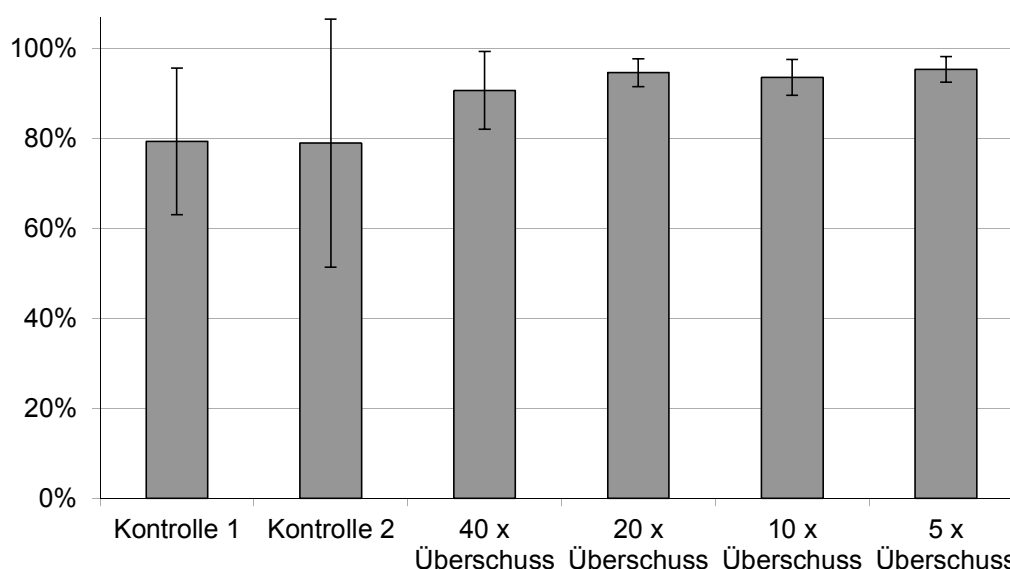


Abb. III.15: Crosslinkerüberschuss-abhängige Einbaurate bei LHCII-MPS Copräzipitationen

4 μM Cystein-freier LHCII (C79Sh) wurde mit unterschiedlichen Überschüssen an Crosslinker (bezogen auf ein Lysin) umgesetzt und anschließend, nach Entfernung nicht reagierter Crosslinker, mit 10-fachem Überschuss MPS (bezogen auf Lysin) inkubiert. Die so modifizierten Komplexe wurden in eine Spermin-Copräzipitation (Puffer: 0,05 M Tris^{6,8}, 0,02 M Kieselsäure, 1 mM Spermin, $c(\text{LHCII}) = 2,6 \mu\text{M}$) eingesetzt und die Überstände nach Butanolextraktion auf ihren LHCII-Gehalt hin quantifiziert. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne MPS (1) bzw. ohne sSMPB (2). Probenumfang $n = 4$ für Kontrollen, $n = 3$ für übrige Reaktionen.

Mit Hilfe von Fluoreszenz-Spektroskopie sollte die Integrität der Komplexe auf verschiedenen Stufen der Modifikation überprüft werden: direkt nach der Umsetzung mit sSMPB, nach dem Einschluss in Silikat und nach einer 2-stündigen Hitzeinkubation bei 60°C.

Die Überprüfung direkt nach Umsetzung mit sSMPB fand nach einer Reaktion von LHCII mit einem 50-fachen sSMPB-Überschuss bei RT und auf Eis für Zeiten zwischen 30 und 120 min statt (Daten nicht gezeigt). Es stellte sich heraus, dass sowohl höhere Temperaturen als auch verlängerte Reak-

tionszeiten zu einer deutlichen Zunahme an Chlorophyll *b*-Fluoreszenz führten. Aus diesem Grund wurde dieser Reaktionsschritt auf Eis für 30 min ausgeführt.

Die Analyse der in Silikat eingeschlossenen Komplexe erfolgte bei den in Abb. III.15 dargestellten Crosslinkerüberschuss-Reihen. Die Spektren vor Hitzestress (Abb. III.16 A) wiesen ab 10-fachen Überschüssen eine deutliche Chlorophyll *b*-Schulter auf, die in der Kontrolle und im 5-fach Überschussansatz nicht zu erkennen war. Nach der 2-stündigen Inkubation (Abb. III.16 B) zeigte der 40-fach-Ansatz eine nochmals gesteigerte Chlorophyll *b*-Emission. Die übrigen Proben wiesen eine schwache Emissionsschulter im Bereich von etwa 650 nm auf. Diese war im Gegensatz zu den Proben vor dem Stress bei 5- und 10-fachem Überschuss ausgeprägter als bei 20-fachem und der Kontrolle. Ein Grund hierfür könnte die nicht quantitative Entfernung des Inkubationsüberstandes sein, so dass nicht-Silikat-gebundene, vermutlich geschädigte Komplexe mit vermessen wurden.

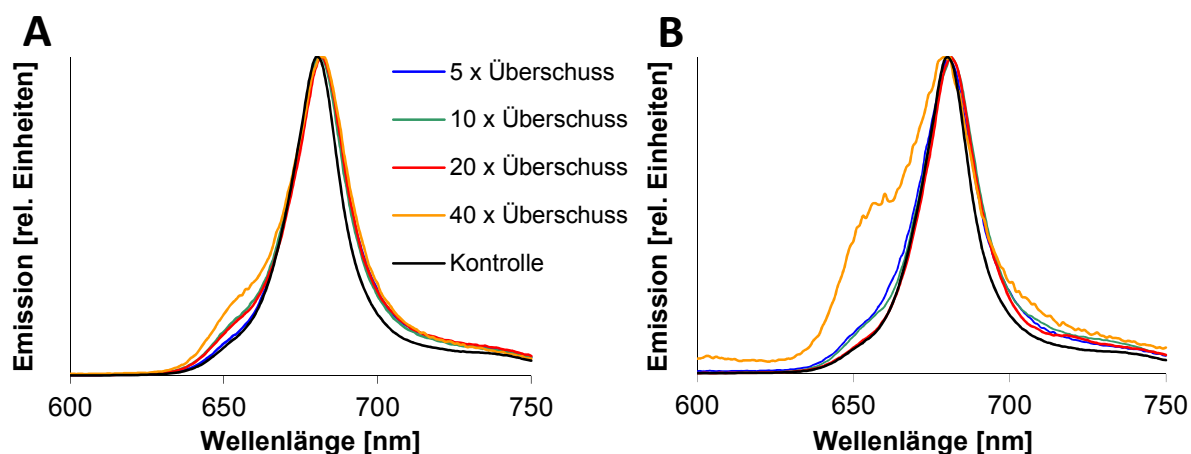


Abb. III.16: Crosslinkerüberschuss-abhängiger Einfluss auf Komplexintegrität bei Copräzipitationen
Die Komplexe aus einer sSMPB-Anbindung mit variablen sSMPB-Konzentrationen wurden in einer Spermin-Copräzipitation (Puffer: 0,05 M Tris^{6,8}, 0,02 M Kieselsäure, 1 mM Spermin, $c(\text{LHCII}) = 2,6 \mu\text{M}$) eingesetzt und vor (A) und nach (B) einer 2-stündigen Inkubation bei 60°C fluoreszenzspektroskopisch vermessen ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, Spektrum 600 – 750 nm). Als Kontrolle diente eine MPS-freie Probe. Daten nach DP.

3.2.2. Präparative Modifikation des LHCII mit MPS

Die im analytischen Maßstab ermittelte Methode der MPS-Modifikation von LHCII (5-facher Crosslinkerüberschuss, Anbindung des Crosslinkers an den LHCII auf Eis für 30 min) sollte auf präparative Maßstäbe übertragen werden, um ausreichende Mengen an Präzipitat generieren zu können. Diese größeren Mengen waren notwendig, da es auch in Silikat-gesättigten Inkubationspuffern zu Pelletaflösungen kam, so dass bei einer zu geringen Ausgangsmenge nach 24-stündiger Inkubation zu wenig Material für eine fluoreszenzspektroskopische Vermessung zur Verfügung stand.

Das so entstandene Präzipitat wurde vor und nach 24-stündiger Inkubation bei 50°C fluoreszenzspektroskopisch analysiert und der Quotient aus EmChl *a*/EmChl *b* wurde auf den Wert vor Inkubation normiert. Aus drei unabhängigen Reaktionsansätzen wurde ein durchschnittlicher Quotient von $0,51 \pm 0,04$ ermittelt.

4. Diskussion

4.1. Anbindung von Protamin an trimeren LHCII

Neben der bereits in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Modifikation des LHCII auf Genebene mit der R5-Sequenz, sollte der LHCII auf kovalentem Wege polykationisch verändert werden, um eine Komplex-nahe Silikatbildung zu ermöglichen.

Haase *et al.* zeigten, dass Glucoseoxidase über einen homobifunktionellen NHS-Crosslinker mit dem polykationischen Protein Protamin verknüpft werden kann. Dabei bleibt die Fähigkeit des Protamins, die Kondensation von Kieselsäure zu ermöglichen, erhalten [154]. Die Anbindungsreaktion verläuft dabei nicht gerichtet ab, da der homobifunktionelle Crosslinker in einem Reaktionsgemisch mit Protamin und Enzym umgesetzt wird und so drei Verknüpfungsmöglichkeiten bestehen: Protamin mit Protamin, Glucoseoxidase mit Glucoseoxidase und Protamin mit Glucoseoxidase. Die Anbindung von Protamin an LHCII sollte hingegen gerichtet verlaufen, um die Bildung von LHCII- LHCII-Verknüpfungen zu verhindern. Diese wären möglich über die N-Termini und evtl. über im LHCII vorhandene Lysine, die mit dem Crosslinker reagieren könnten (siehe dazu die Diskussion zur MPS-Modifikation von LHCII). Aus diesem Grund wurde die Modifikation mittels heterobifunktionellem Crosslinker sSMPB in zwei Schritten durchgeführt und verschiedene Cystein-Varianten des LHCII verwendet. Aus zwei Gründen wurde dabei der Crosslinker zuerst mit Protamin umgesetzt (NHS-Gruppe reagiert mit dem Protamin N-Terminus): Die NHS-Gruppe ist Hydrolyse-empfindlich und eine Inaktivierung bei RT bei einer Inkubation über einen längeren Zeitraum wahrscheinlich [157–159]. Außerdem würde LHCII über seinen N-Terminus und ggf. die Lysinseitenketten (abhängig vom pH-Wert) mit der NHS-Gruppe reagieren können und über Cysteine mit der Maleimidgruppe, so dass es doch zu einer LHCII- LHCII-Verknüpfung kommen könnte. Das Produkt aus der Anbindung des Crosslinkers an Protamin wurde anschließend mit Cystein-haltigem LHCII umgesetzt. Die Effizienz dieser Anbindungsreaktion kann über die Ausbeuten an modifiziertem Apoprotein durch SDS-PAA-Gelelektrophorese bestimmt werden. Je effizienter die Reaktion abläuft, desto weniger nicht-modifiziertes LHCP (bei einer Laufweite von etwa 25 kDa) liegt vor. Gemäß der Reaktionsvorschrift des sSMPB soll dieser in einem Überschuss zur NHS-reaktiven Gruppe des Proteins eingesetzt werden, um ausreichende Anbindungsausbeuten zu erhalten¹⁶⁰. Dies führte im vorliegenden Reaktionsansatz allerdings zu schlechteren Modifikationsausbeuten, als im Falle eines Protamin-Überschusses zum sSMPB (Abb. III.2). Dies kann damit begründet werden, dass durch die Zugabe eines Tris-Überschusses die nicht an Protamin-gebundenen NHS-Gruppen zwar abreagierten, im nachfolgenden Reaktionsschritt mit LHCII diese jedoch über die Maleimidgruppe an den Komplex gebunden werden können. Damit belegen Crosslinkermoleküle ohne Protamin Bindungsstellen für Protamin-gebundene Crosslinker. Eine Umsetzung des Crosslinkers im Unterschuss zu Protamin senkt den Anteil an Crosslinker ohne Protamin signifikant. In der Folgereaktion werden Cysteine häufiger mit Protamin modifi-

ziert. Mit dem optimierten Modifikationsprotokoll ließ sich die 3-fach Cystein-Variante 3xCh derart modifizieren, dass im SDS-PAA-Gel sowohl nicht-modifiziertes als auch Apoprotein mit einem, zwei oder drei Protaminen nachgewiesen werden konnten. Die Cysteine befinden sich in der Primärstruktur des 3xCh-LHCP an den Positionen 3, 106 und 160.

Warum lässt sich der Komplex jedoch nicht quantitativ an allen neun Cysteinen modifizieren und warum bestehen Unterschiede zwischen den Cysteinpositionen hinsichtlich einer Protaminbindung? Um dies aufzuklären, wurden positionsgetreue Einzelcystein-Varianten und zwei Doppel-Cystein-Varianten (Be1: 3 und 160; Be2: 106 und 160) unter den gleichen Bedingungen umgesetzt. Auffällig dabei war, dass sich Position 3 deutlich schlechter modifizieren ließ als die beiden anderen Positionen, zwischen denen keine signifikanten Unterschiede auftraten (Abb. III.6). Die direkt das jeweilige Cystein umgebenden Aminosäurereste sollten einen Einfluss auf die Anbindungsreaktion von Crosslinker-Protamin haben. Bei Position 3 ist das Cystein so in eine Sequenz eingebettet (RKCATTKK), dass es von drei (unter den vorliegenden Reaktionsbedingungen positiv geladenen) Lysinen und einem Arginin umgeben ist. Diese Ladungen können einen abstoßenden Effekt auf das polykationische Protamin ausüben und so eine Anbindung an dieser Position erschweren. Bei den beiden anderen Positionen befinden sich in direkter Nachbarschaft keine positiv geladenen Aminosäuren. Dennoch ist auch bei den Einzelcystein-Varianten S106Ch und S160Ch keine quantitative Modifikation zu beobachten. Die drei Cysteine im S106Ch Trimer liegen auf der lumenalen Komplexseite jeweils etwa 4,3 nm voneinander entfernt, so dass ein elektrostatischer Einfluss eines gebundenen Protamins auf die Anbindung weiterer Protamine durchaus gegeben ist (Abb. III.17 A).

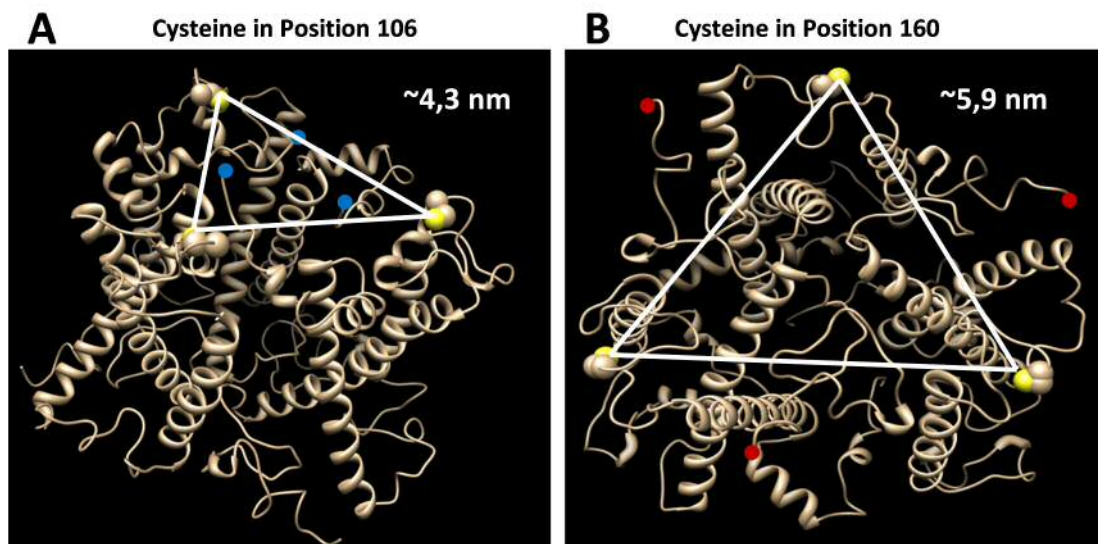


Abb. III.17: Trimere Cysteinabstände in S106Ch und S160Ch

Die Cysteinabstände im Trimer für die Positionen 106 (A) resp. 160 (B) zueinander wurden aus der Kristallstruktur nach Standfuss *et al.*, 2005 [24], bestimmt. In A gekennzeichnet in blau die Position der letzten C-terminalen Aminosäure vor dem nicht-dargestellten His₆-Tag. In B rot markiert die letzte N-terminale Aminosäure, die kristallographisch auflösbar ist. Die Abbildung wurde mit Chimera 1.6 erstellt.

Die Cysteine im trimeren S160Ch weisen einen fast 40 % größeren Abstand auf (5,9 nm; Abb. III.17 B), ein elektrostatischer Einfluss der Protamine aufeinander ist dennoch auch hier denkbar. Die unterschiedliche Distanz macht sich allerdings nicht in unterschiedlichen Modifikationsausbeuten bei S106Ch bzw. S160Ch bemerkbar. Für die Variante S3Ch sind solche Cystein-Abstände nicht aus der Kristallstruktur bestimmbar, da dieser Bereich nicht aufgelöst wurde [24]. Der N-terminale Bereich scheint eine starke strukturelle Flexibilität zu besitzen, da EPR-Messungen an S3Ch Trimeren eine sehr breite Abstandverteilung ergaben [40] mit einem Maximum bei etwa 3,4 nm. Diese Messungen weisen des Weiteren auf eine Orientierung des N-Terminus in Richtung Symmetriezentrums des Trimers hin. Damit lägen die Cysteine im S3Ch deutlich näher beieinander als bei den anderen beiden Varianten. In Monomeren der Einzelcystein-Varianten würde man solche Wechselwirkungen generell nicht erwarten. Pro Komplex kann bei den Einzelcystein-Varianten nur ein Protamin gebunden werden. Allerdings ist sehr auffällig, dass die Modifikationen bei Monomeren bei allen untersuchten Varianten schlechtere Ausbeuten liefern als bei Trimeren (bei Be1 und Be2 sind diese Effekte nur gering). Folglich ist eine Protamin-Protamin-Abstoßung als alleiniger Erklärungsansatz für geringe Modifikationsausbeuten nicht hervorzuheben. Auch die Zugänglichkeit des Cysteins für den mit Protamin verbundenen Crosslinker könnte eine Rolle in der Anbindungseffizienz spielen. Diese ist für die Position 160 im Vergleich zur Position 3 deutlich verringert [47]. Für die Position 106 existieren keine EPR-Daten bezüglich der Zugänglichkeit. Aus dem Vergleich der Positionen 90, 106 und 123 mit Hilfe der Kristallstruktur kann vermutet werden, dass die Zugänglichkeit des Cysteins 106 zwischen der der beiden anderen liegen sollte (Abb. III.18).

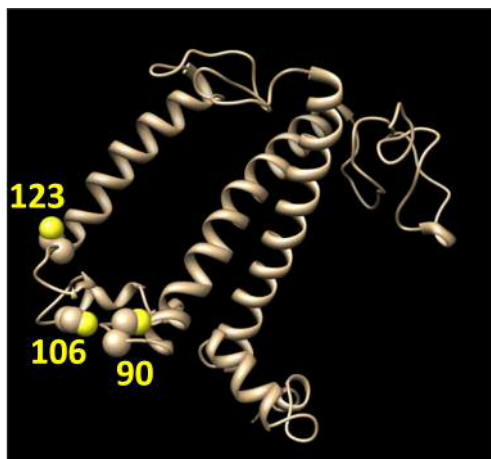


Abb. III.18: Zugänglichkeitsabschätzung Position 106

In der Kristallstruktur eines LHCII Monomers nach Standfuss *et al.*, 2005 [24], wurden die Positionen 90, 106 und 123 in Cysteine umgewandelt, um die Lage der Thiolgruppen vergleichen zu können. Die Erstellung der Grafik erfolgte mittels Chimera 1.6.

Aus der Positionierung erfolgte über die Zugänglichkeitsdaten aus EPR-Messungen für die Positionen 123 und 90 eine Abschätzung der Zugänglichkeit zur Position 106.

Damit läge sie deutlich unter der von Position 3 und etwa in der Größenordnung von Position 160. Hieraus kann man schlussfolgern, dass die Zugänglichkeit ebenfalls keine dominierende Rolle in der Erklärung von unterschiedlich starken Modifikationsraten einzelner Cysteinpositionen spielen dürfte. Vermutlich ergibt sich das Modifizierungsmuster aus einem Zusammenspiel der möglichen Einflüsse. So ist das Cystein an Position 3 sehr gut zugänglich, die Modifizierung wird aber auf Grund von Ladungsabstoßung durch die benachbarten Aminosäuren und inter-Protamin-Abstoßung bei der Reaktion mit den dicht zusammenliegenden Cysteinen deutlich negativ beeinträchtigt. Bei den beiden anderen

Varianten kommt auf Grund fehlender basischer Aminosäuren in direkter Umgebung und größerer Cystein-Abstände der elektrostatischen Repulsion ein geringeres Gewicht zu; die schlechtere Zugänglichkeit scheint hier ein stärkeres Ausmaß an Modifikation zu verhindern. Die Diskussion der schlechteren Modifizierungsausbeute bei Monomeren ist schwieriger. Im monomeren Zustand fallen mögliche negative elektrostatische Protamin-Protamin-Wechselwirkungen bei den Einzelcystein-Varianten weg. Da beispielsweise für die Position 3 gezeigt wurde, dass die Zugänglichkeit unabhängig vom Aggregationszustand ist [40], sollte durch den Wegfall der inter-Protamin-Abstoßung tendenziell eine bessere Modifikationsausbeute bei Monomeren zu erwarten sein. Auf einer tiefergehende Strukturanalyse hinsichtlich dieser Fragestellung wurde verzichtet, da für weitergehende Experimente wie Fällungen von Silikat oder Titandioxid sowieso nur die trimeren Varianten von Interesse sind. Das Resultat für die beiden Doppelcystein-Varianten Be1 und Be2, nämlich eine erhöhte Modifizierungseffizienz bei Be2, folgt den Beobachtungen der Einzelcystein-Varianten. Im Be1 liegen die Cysteine in Position 3 und 160 und damit beide auf der stromalen Seite des Komplexes. Abträgliche elektrostatische Einflüsse auf die Anbindungsreaktion sind an dieser Stelle durch eine erhöhte Dichte von Protamin auf der stromalen Komplexseite zu erwarten. Genaue Angaben von Cystein-Distanzen sind auf Grund der unbekanntenen Positionierung des N-Terminus nicht möglich. Darüber hinaus ist im Be1 Position 3 eine mögliche Bindestelle, die sich schon bei den Einzelcystein-Varianten als signifikant schlechter modifizierbar darstellte. Ein erwarteter Modifizierungsgrad (errechnet aus den Werten der Einzelcystein-Varianten) läge bei unabhängiger Betrachtung der Positionen bei 2,9 Protaminen pro Trimer und damit 0,5 Protamine über dem tatsächlich bestimmten Wert von Be1 (Tab. III.2). Eine Begründung hierfür dürfte in der oben erwähnten erhöhten Dichte und daraus resultierender Abstoßung auf der stromalen Komplexseite sein. Bei Be2 liegen die beiden Cysteine an gegenüberliegenden Seiten des Komplexes in Position 106 und 160. Dadurch sollte eine erhöhte negative Beeinflussung der Bindung durch Protamin-Protamin-Abstoßungen ausgeschlossen sein. Beide Positionen zeigten darüber hinaus im Vergleich zu Position 3 eine bessere Modifizierbarkeit. Dennoch liegt auch hier der Erwartungswert mit 3,3 über dem tatsächlich bestimmten Wert von 2,9. Bei der Dreifachcystein-Variante 3xCh stimmen hingegen Erwartungswert und der tatsächlich bestimmte Wert exakt überein, was das Argument des negativen kooperativen Einflusses bei Be1 wieder abschwächt.

Auch R5-modifizierte Komplexe wurden mit Protamin modifiziert. Lagen dabei das stromale R5-Motiv und das Cystein zur Modifizierung auf der gleichen Seite (R5S160Ch), so war die Modifizierungseffizienz herabgesetzt im Vergleich zur nicht R5-modifizierten Variante. Lagen sie – wie im R5S106Ch auf gegenüberliegenden Seiten, so wurden hingegen vergleichbare Werte erreicht. Die R5-Sequenz beinhaltet sechs basische Aminosäuren und hat damit eine hohe positive Ladungsdichte. Dies führt bei gleicher Seitenlage zum Cystein zu abstoßenden Effekten gegenüber Protamin, wodurch die Modifikationsausbeute vermutlich herabgesetzt wird, was bei einer entgegengesetzten (stromal-

lumenal) Lage nicht der Fall ist. In der Zweifachcystein-Variante R5S106/160Ch, die Be2 entspricht, ist die Modifizierungsausbeute folgerichtig ebenfalls herabgesetzt. Besonders die bereits angesprochene Vermutung der Zentrum-orientierten Lage des N-Terminus lässt eine hohe positive Ladungsdichte im zentralen stromalen Bereich vermuten. Liegt die R5-Sequenz C-terminal hinter dem His₆-Tag, ist die Modifizierung der beiden Cysteine sogar besser als im R5-freien Komplex. Durch fehlende exakte Lokalisierung der R5-modifizierten Termini kann über eine mögliche Begründung für diese Beobachtungen nur spekuliert werden. Aus der Struktur des C-terminalen Bereichs lässt sich eine Tendenz erahnen, dass dieser vom Komplex weg in Richtung wässriges Medium weist. Würde sich diese Tendenz über den His₆-Tag fortsetzen, läge die R5-Sequenz relativ weit vom Komplex entfernt. Möglicherweise würde dies eine Interaktion mit Protamin verhindern bzw. abschwächen, so dass die Position 106 gut modifiziert werden kann. Die Position 160 wäre durch ihre stromale Position sowieso unbeeinflusst. Für den N-Terminus gibt es neben der mehrfach erwähnten zentrierten Ausrichtung außerdem die Vermutung einer komplexoberflächennahen Lokalisation, was die Zugänglichkeit zu Position 160 im Falle der N-terminalen Lage der R5-Sequenz deutlich erschweren würde. Eine Erklärung für eine verbesserte Modifizierung bei C-terminaler R5-Positionierung ergibt sich aus dieser Hypothese allerdings nicht und es bedarf weiterer Untersuchungen, um dies aufzuklären.

Mit V151Ch sollte eine LHCII-Variante mit Protamin modifiziert werden, die das Cystein an einer anderen Position als die bisher besprochenen Komplexe trägt. Die Position 151 liegt exponiert in der stromalen Schleife und sollte daher im Vergleich zur Position 160 besser zugänglich sein (es existieren keine EPR-Daten hinsichtlich der Wasserzugänglichkeit für die Position 151). Die Modifizierungsausbeute liegt allerdings in der Größenordnung von der des S106Ch und des S160Ch (Tab. III.3). Die Abstände der Cysteine im Trimer betragen etwa 4,4 nm und liegen damit in der Größenordnung von S106Ch. Vermutlich ergibt sich die Effizienz auch hier aus einem Zusammenspiel mehrere Faktoren: Im Vergleich zum weniger gut zugänglichen Cystein in Position 160 liegen die Cysteine hier näher beieinander und erleichtern eine inter-Protamin-Abstoßung. Im Vergleich zur Position 106 ist die Position 151 vermutlich besser zugänglich bei vergleichbaren Cystein-Cystein-Abständen, was eine erhöhte Modifizierungseffizienz mit sich bringen sollte. Allerdings ist die Position des N-Terminus, der auch ohne R5-Sequenz eine erhöhte positive Ladungsdichte besitzt, unbekannt und kann möglicherweise einen Einfluss auf die Anbindung an Position 151 haben, die auf Grund der lumenalen Lage von Position 106 nicht gegeben wäre.

Die Modifizierungseffizienz lässt sich auf Grund der aktuellen Datenlage nicht stringent mit elektrostatischen Einflüssen erklären. Vermutlich treten also weitere Faktoren auf, die sich negativ auf die Modifikationseffizienz auswirken und dabei möglicherweise im Wechselspiel mit den bisher diskutierten Aspekten stehen. Wie bereits zu Beginn erläutert, ist die NHS-Gruppe des Crosslinkers Hydrolyse-

empfindlich und wird im Allgemeinen in einem deutlichen Überschuss zur Aminogruppe eingesetzt, mit der die Verknüpfung stattfinden soll. Letzteres wurde aus den beschriebenen Gründen nicht eingehalten. Es ist durchaus möglich, dass dieses Vorgehen in dem Rahmen der hier getesteten Bedingungen zwar das beste Resultat lieferte, die Verknüpfung zwischen Protamin und Crosslinker dennoch nicht optimal abläuft, so dass in diesem Schritt Crosslinker ohne Protamin übrig bleiben. Auch wenn durch das gewählte Reaktionsprotokoll eine NHS-Hydrolyse minimiert werden sollte, ist nicht auszuschließen, dass ein Teil dieser Gruppen im Reaktionsansatz hydrolysiert und so nicht für die Verknüpfung mit Protamin bereitstehen. Diese Moleküle könnten dann in der Folgereaktion, wie bereits erwähnt, Cysteine belegen und damit für eine Protaminanbindung blockieren. Ein Abtrennen der nicht-reagierten Crosslinker vor dem Umsetzen mit LHCII könnte dieses Problem umgehen. Dies impliziert jedoch zwei mögliche Probleme: In der Regel erhöht sich bei der Verwendung von Entsalzungseinheiten das Volumen, was für die Nachfolgereaktionen ungünstig ist. Außerdem ist ein Verlust an Protamin durch Wechselwirkungen mit Membransystemen (siehe hierzu die spätere Diskussion) nicht auszuschließen. Ein spezifisches Umsetzen mit NHS-reaktivem Säulenmaterial zur Entfernung von Crosslinkern, die nicht an Protamin gebunden sind, funktioniert nur, insofern die NHS-Gruppe nicht hydrolysiert ist. Aktuelle Resultate (Diplomarbeit Dennis Seiwert) deuten darauf hin, dass eine solche Abtrennung tatsächlich keine Verbesserung der Modifizierungseffizienz erbringt. Auch wenn vermutlich nicht alle Einflüsse auf die Modifizierungsreaktion von LHCII mit Protamin aufgeklärt werden konnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll optimiert, das es ermöglicht, LHCII derart mit Protamin zu modifizieren, dass die Komplexe ohne zusätzliche Fällungs-fördernde Agenzien in Silikat eingebaut werden.

4.2. Probleme bei der Aufarbeitung von Protamin-modifiziertem LHCII

Die mit Protamin modifizierten Komplexe wurden mittels Saccharosedichtegradienten aufgereinigt. Zum einen wurde dadurch überschüssiges CL-Protamin abgetrennt und zum anderen Monomere von Trimeren abgetrennt, die sich vermutlich während des Modifikationsprozesses gebildet hatten (Abb. III.4, Abb. III.5). Die Frage an dieser Stelle ist, ob die Monomerbildung durch den Modifikationsprozess als solchen (mehrfaches Aufkonzentrieren der Komplexe vor der Modifikation und Umsetzung mit CL-Protamin bei RT) oder durch den Zustand der Protaminbindung bedingt wird. Letzteres könnte auf einem Abstoßungseffekt der Protamine beruhen, der die nicht-kovalente Assemblierung der Monomere im Trimer auflöst. Allerdings müsste dann in Frage gestellt werden, warum es überhaupt zu einer solch dichten Modifizierung mit Protamin im Trimer kommt und nicht einfach die Anbindung des Protamins schon durch elektrostatische Repulsion verhindert wird. Bei Rückbindungsversuchen von Komplexen an Ni-Säulen (Abb. V.10) konnte auch beobachtet werden, dass sich Monomere aus Trimeren bilden, wenn diese mit EDTA umgesetzt, auf Ni-Säulen gebunden und erneut in Gradienten aufgetrennt wurden. Hier sind die Komplexe insgesamt weniger lange Situationen ausgesetzt, die eine

Monomerisierung begünstigen, was die schwächere Ausbildung der Monomerbande in den Rückbindungsversuchen erklären könnte.

Bei der Verwendung von Phosphat-Puffer in der Gradientenlösung war die Trimerbandenintensität schwächer als bei der Verwendung von Tris. Außerdem war unterhalb der eigentlichen Trimerbande eine diffuse schwache Grünfärbung zu erkennen (Abb. III.5). Wurde dieser Bereich abgesaugt und CD-spektroskopisch analysiert, ergab sich ein Trimer-typisches Signal. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass Phosphat die Bildung von höhermolekularen Aggregaten aus Protamin-modifizierten Komplexen ermöglicht. Diese pelletieren dabei, anders als R5-modifizierter LHCII, nicht auf dem Boden der Gradienten, scheinen also keine beliebig großen Aggregate zu bilden. Obwohl berichtet wurde, dass das divalente Anion Sulfat keine Protamin-Aggregation ermöglichen kann [153], scheint Phosphat diese Wirkung auszuüben. Bedingt durch die hohe Ladungsdichte ist es wahrscheinlich in der Lage, mehrere polykationische Protamine, die an LHCII gebunden sind, zu gruppieren und so kleine Aggregate zu formieren. Ein aggregierender Effekt von Phosphat auf polykationische Verbindungen wurde vielfach berichtet und z.T. als Grundvoraussetzung für eine folgende Silikatbildung angegeben [95; 108; 113]. In Tris trat dieser Effekt nicht auf, was durch den entsprechend kationischen Charakter der Tris-Moleküle erklärt werden kann (siehe hierzu auch die entsprechende Diskussion in Kapitel 2). Auch beim Aufkonzentrieren der Protamin-modifizierten Komplexe kam es zu Aggregationseffekten: In Phosphat-haltigen Lösungen kam es bei fast allen Membranmaterialien zu einer irreversiblen Interaktion der Komplexe mit der Membran. Dieser Effekt fiel bei modifizierter Cellulose stärker als bei PES aus. Dies kann damit zu tun haben, dass bei modifizierter Cellulose die Ausbildung von Wasserstoffbrücken sehr gut möglich ist, bei PES allerdings nicht. Eine Interaktion ist zwischen Cellulose und Protamin an sich sehr wahrscheinlich, wird aber vermutlich durch Phosphat deutlich verstärkt. Besonders stark ist der Effekt der Membran-assoziierten Aggregation, wenn durch Aufkonzentrieren und Verdünnen die Saccharose entfernt wird. Diese scheint einen präventiven Einfluss auf die Aggregation zu haben. Dies würde mit Beobachtungen in der Literatur einhergehen [130; 131]. In Tris war eine Aggregation der Protamin-modifizierten Komplexe ebenfalls bei der Entfernung von Saccharose unabhängig vom Membranmaterial zu beobachten, was einen Aggregations-verhindernden Effekt des Zuckers nahe legt. Jedoch ließen sich die Komplexe in Tris mit PES-Membranen zu deutlich höheren Konzentrationen aufkonzentrieren, insofern Saccharose vorhanden war. Aus diesem Grund wurden die Protamin-modifizierten Komplexe vor Silikatfällungen in Gradientenlösung aufkonzentriert, die Saccharose jedoch nicht durch Pufferwechsel entfernt.

4.3. Silikatfällungen von Protamin und Protamin-modifiziertem LHCII

Der Diskussion des Silikatfällungsverhaltens von Protamin bzw. Protamin-modifizierten Komplexen ist vorwegzunehmen, dass kein stringent logisches Fällungsverhalten beobachtet werden konnte. Dies führt dazu, dass mögliche Erklärungshypothesen ggf. direkt eingeschränkt werden müssen. Ob-

wohl Silikat-Protamin-Interaktionen durchaus schon länger bekannt sind (beispielsweise [161]), gibt es über Protamin-induzierten Silikatfällungen nur wenig Literaturdaten [77; 153; 154].

Eine mögliche Begründung für das nicht stringente Verhalten liegt vermutlich in der Natur des Protamins. Dieses ist ein intrinsisch ungeordnetes Protein (IDP) [162]. Die gemeinsame Eigenschaft von IDPs ist das Fehlen einer Information über eine definierte dreidimensionale Struktur in der entsprechenden Primärsequenz, so dass sie sich in Lösung nicht autonom falten [163; 164]. Für viele regulatorisch bedeutsame IDPs ist bekannt, dass sie von einem ungeordneten in einen definierten Zustand übergehen, wenn sie an ihre Zielstruktur binden [163; 164]. Die Daten von Zhang *et al.* deuten auf ein ähnliches Verhalten von Protamin bei Silikatbildungsprozessen hin: Protamin besitze in Tris-Puffer eine globuläre Struktur und führe daher in Kieselsäurekondensationsprozessen zu Partikelstrukturen, wohingegen Protamin gebunden an Alginat eine eher gestreckte Struktur aufweise [153]. Bei der Erläuterung der Protaminstruktur in Lösung wird allerdings auf eine Publikation verwiesen, in der ein abweichendes Protamin analysiert wurde [165]. Dennoch dürfte die Beobachtung auch für das in der Arbeit von Zhang und in dieser Arbeit verwendete Protamin gelten. Dieses Verhalten in Lösung kann Erklärungsansätze für die Ergebnisse dieser Arbeit liefern.

Es soll nun anfangs das Fällungsverhalten von reinem Protamin hinsichtlich seiner Abhängigkeit von der Art des Puffers und den entsprechenden pH-Werten diskutiert werden. In Tris bildete sich bei pH 6,0 kein Präzipitat, bei pH 7 und 8 allerdings schon. In Phosphat findet die Pelletbildung bei allen drei untersuchten pH-Werten statt; sie ist hier nur abhängig von der Protaminkonzentration (Tab. III.1). Die Partikelgrößen unterschieden sich dabei deutlich, wobei in Tris kleinere Strukturen mit unregelmäßiger Oberfläche und in Phosphat größere Strukturen mit glatter Oberfläche gebildet wurden (Abb. III.12). Dieser Unterschied liegt möglicherweise in der Voraggregation der globulären Protaminmoleküle. Diese sollte in Phosphat stattfinden, nicht jedoch in Tris. Es würden also Phosphat-induzierte Protaminaggregate gebildet, deren i) Durchmesser und ii) Oberfläche größer ist als im nicht-aggregierten Zustand in Tris. Mit abnehmendem pH-Wert nimmt die Nucleophilie von Silanolatgruppen ab. Dies könnte bedeuten, dass die Rolle des Kondensations-unterstützenden Moleküls mit abnehmendem pH-Wert wichtiger wird. Ein nicht aggregiertes Protamin weist auf seiner kleinen Oberfläche möglicherweise zu wenige katalytisch aktive Bereiche auf, um ausreichend die Verknüpfung von Silikat zu unterstützen. In einem aggregierten Zustand ist durch die Oberflächenvergrößerung möglicherweise eine effizientere Kondensationsunterstützung möglich. Eine Mindestkonzentration an Protamin für eine Bildung von präzipitierbarem Silikat innerhalb von 30 min liegt in der Größenordnung von 10 – 50 μM (eher weniger bei Phosphat, eher mehr bei Tris).

Dies steht im Widerspruch zu den Beobachtungen zum Silikatfällungsverhalten von LHCII-gebundenem Protamin. Hier wurde die Präzipitation bei einer LHCII-Konzentration von 1 μM beo-

bachtet (S160Ch in Phosphat; Abb. III.9), was einer totalen Protaminkonzentration von etwa $1,7 \mu\text{M}$ entspricht. Dies ist ein Konzentrationsbereich, in dem bei freiem Protamin unter keiner Puffer- und pH-Bedingung Präzipitate beobachtet wurden (Tab. III.1). Es muss klar zwischen den beiden Zuständen von freiem Protamin in Lösung und Komplex-gebundenem differenziert werden. Lokal ist die Protaminkonzentration im Falle einer Komplexbindung höher, so dass etwaige Wechselwirkungen möglich sind, die die Silikatbildung fördern. Hinzu kommt, dass sich, wie bereits erwähnt, die Protaminstruktur im Komplex-gebundenen Zustand vermutlich durch eine gestreckte Konformation auszeichnet. Ein Hinweis, dass das Protamin auch im Falle einer LHCII-Bindung eine eher gestreckte Konformation einnimmt, liefert der Vergleich der REM-Aufnahmen von Zhang [153] mit jenen aus der vorliegenden Arbeit (Abb. III.12 E). In beiden Fällen bilden sich keine Netzwerke aus Silikatpartikeln aus, sondern flächige, nicht-partikuläre Strukturen, die von Zhang mit eben jener gestreckten Protaminkonformation begründet werden. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass die Protaminbelegung der Alginatoberfläche deutlich höher war als die der Komplexe. Eine Konformationsänderung des Protamins im gebundenen Zustand ist aber nicht nur aus dieser Ableitung wahrscheinlich. Der Zustand eines IDPs ist nicht durch die Einnahme einer energieärmsten Struktur gekennzeichnet, so dass Strukturveränderungen abhängig von der Umgebung leicht möglich sein dürften. Bei einer Annäherung an den LHCII wirken elektrostatische Kräfte (abstoßende wie anziehende) auf das polykationische Protamin ein. So wie sich IDPs bei einer Zielstrukturbindung konformel verändern, ist dies auch für Protamin bei LHCII-Kontakt möglich. Besonders die bereits in Kapitel I diskutierten Cluster mit hoher positiver (N-Terminus) bzw. negativer Ladungsdichte (stromale Schleife) bieten sich für starke elektrostatische Einflüsse an.

Warum kann die Veränderung der Protaminstruktur zu einem unterschiedlich guten Silikatfällungsverhalten führen? Belton *et al.* geben an, dass der Abstand der Aminogruppen innerhalb eines Polyamines ein entscheidender Faktor für das katalytische Wirken bei der Silikatcondensation ist [105]. Ein Übergang zwischen zwei Protaminstrukturen verändert möglicherweise die Positionierung der Argininreste zueinander, die für die Silikatpolymerisation entscheidend sind. Im LHCII-gebundenen Zustand ist diese Positionierung evtl. vorteilhafter als im freien Zustand, so dass ersterer auch bei niedrigerer Konzentration einen Polymerisations-fördernden Effekt ausüben kann. Auch ein mögliches Wechselwirken im Komplex-gebundenen Zustand kann einen positiven Effekt ausüben, da die Abstände im Komplex ausreichend gering wären. Einen Hinweis darauf, dass Protamin-Protamin-Wechselwirkungen eine Rolle zu spielen scheinen, geben die Resultate der Präzipitationsreaktionen unterschiedlicher LHCII-Varianten in unterschiedlichen Puffern (Abb. III.9, Spermin-freie Proben). Vergleicht man hier die Resultate von S160Ch in Tris bzw. Phosphat, so wird in Tris kein Präzipitat gebildet, in Phosphat allerdings schon. Dies kann auf eine Phosphat-induzierte lokale Aggregation von Komplex-gebundenen Protaminen hindeuten, deren Wechselspiel eine verbesserte Polymerisationsunterstützung bietet. Aber auch der bereits diskutierte pH-Einfluss kann an dieser Stelle als mögliche

Begründung angeführt werden, da in Phosphat bei pH 7,5, in Tris bei pH 6,0 präzipitiert wurde. Vergleicht man das Verhalten von S160Ch mit dem von V151Ch, so deutet dies auf einen pH-Effekt bei der Verwendung von Tris hin. Der Modifizierungsgrad von V151Ch ist vergleichbar mit dem von S160Ch (1,6 resp. 1,7); V151Ch zeigte allerdings in Tris 7,0 eine Präzipitatsbildung, die bei S160Ch in Tris bei pH 6,0 nicht auftrat.

Auch bei der Variante Be1 beobachtete man die für S160Ch beschriebene Pufferabhängigkeit: Pelletbildung in Phosphat, Ausbleiben dieser in Tris. Be2 ist wie Be1 ebenfalls eine zweifach Cysteinvariante des LHCII. Hier bildeten sich allerdings sowohl in Tris als auch in Phosphat unter den gleichen Reaktionsbedingungen grüne Silikatpräzipitate. Ein offensichtlicher Unterschied zwischen den beiden Varianten liegt im Modifizierungsgrad, der bei Be2 mit 2,9 höher ist als bei Be1 mit 2,4. Dies ließe die Schlussfolgerung zu: Höherer Modifizierungsgrad führt zu wahrscheinlicherer und effizienterer Silikatbildung. Dieser einfache Zusammenhang wird allerdings bei einer Betrachtung von 3xCh in Frage gestellt. 3xCh weist mit 4,5 Protaminen pro Trimer einen deutlich höheren Modifizierungsgrad auf als Be2, dennoch werden kleinere Pellets gebildet und niedrigere Einbauraten (Abb. III.9; Abb. III.10) als bei Be2 erreicht. Die Silikatbildung wird folgerichtig von mehr als nur dem Modifizierungsgrad beeinflusst. 3xCh und Be2 haben als Gemeinsamkeit Cysteine an den Positionen 106 und 160, die Protamin binden können. Be1 hat im Vergleich zu Be2 jedoch ein Cystein an Position 3 anstatt an Position 106. Diese Position 3 ist auch bei 3xCh ein Cystein. 3xCh und Be1 unterscheiden sich also gemeinsam von Be2 in einer Protaminbindungsmöglichkeit an Position 3. In der Schlussfolgerung bedeutet dies, dass eine Protaminbindung an Position 3 das Vermögen der Komplexe reduziert, Silikat zu polymerisieren. Position 3 wies schon bei der Anbindungsreaktion, die zu Beginn diskutiert wurde, eine signifikant schlechtere Modifizierbarkeit im Vergleich zu den anderen Positionen auf. Der stromale Bereich des LHCII zeichnet sich dadurch aus, dass er in zwei gegensätzlich geladene Ladungscluster aufgeteilt ist (pro Monomer), den N-terminalen Bereich mit hoher positiver Ladungsdichte und der stromale Schleifenbereich mit hoher negativer Ladungsdichte. Diese Ladungscluster könnten eine Auswirkung auf die Struktur des intrinsisch ungeordneten Protamins haben, so dass die stromal gebundenen Protamine eine ungünstige Konformation bezüglich der Silikatpolymerisation einnehmen. Ein Beispiel für eine solche Interaktion wäre die Wechselwirkung des an Position 3 gebundenen Protamins mit dem stromalen Schleifenbereich. Dies könnte wiederum zu einem Einfluss auf das dort gebundene Protamin an Position 160 haben. Unabhängig voneinander würde man an Position 160 eher eine kompakte Komplex-orientierte Konformation erwarten, da der Bereich um Position 160 fünf saure Aminosäuren umfasst, die gut mit dem polykationischen Protamin wechselwirken können. Der N-Terminus hingegen zeichnet sich durch positiv geladene Aminosäuren an Position 1,2,7 und 8 aus. Diese verhindern vermutlich eine kompakte Komplex-nahe Orientierung des Protamins durch elektrostatische Abstoßung. Bei Be2 liegen die beiden Protaminbindungsstellen an gegenüberliegenden Komplexseiten. Das Ausmaß an gegenseitiger Beeinflussung sollte bei einer solchen Anordnung geringer sein. Auf Grund der

Modifizierungsausbeuten von S106Ch und S160Ch erwartet man eine ungefähr gleichmäßige Verteilung auf stromale und lumenale Seite. An dieser Stelle stellt sich die Frage, warum Be2 im Gegensatz zu S160Ch in Tris bei pH 6,0 in der Lage ist, Präzipitate zu bilden. Eine Schlussfolgerung hieraus wäre, dass sich das Zusammenspiel von Silikatpolymerisationen auf beiden Komplexseiten gleichzeitig positiv auf den Selbsteinschluss der Komplexe in Silikat auswirkt. Dieser positive Effekt wird bei 3xCh möglicherweise durch das Vorhandensein der Modifizierung an Position 3, die einen negativen Einfluss auszuüben scheint, abgeschwächt.

Für eine detailliertere Aufklärung der genauen Einflussmechanismen bedarf es weiterer Versuche, die die beiden anderen Einzelcystein Varianten S106Ch und S3Ch sowie eine Doppelcystein-Varianten mit Cysteinen an den Positionen 3 und 106 einschließt. Möglicherweise lässt sich mittels CD-Spektroskopie in Abhängigkeit von der Bindungsposition bestimmen, ob es eine strukturelle Veränderung zwischen den Bindungszuständen gibt. Hierzu könnte es notwendig sein, das LHCII-CD-Signal mittels Baseline aus dem Gesamtsignal herauszurechnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde darauf verzichtet, eine weitergehende Analyse des Einflusses der Protaminstrukturen vorzunehmen, da der thematische Fokus auf der Komplexstabilisierung lag und weniger auf einer mechanistischen Analyse der Protamin-Modifikation.

Eine Protamin-Modifizierung von R5LHCII verlieh diesem die Fähigkeit, innerhalb von 60 min bei RT Silikat zu präzipitieren (Abb. III.14). War das Protamin nur an Position 160 gebunden, wurden signifikant kleinere Pellets gebildet als bei einer Bindung an der Doppelcystein Variante R5S106/160Ch. Dies entsprach den Erwartungen, die man aufgrund der bereits diskutierten Ergebnisse für nicht-R5-haltige Komplexe haben konnte. Protamin ist im Falle dieser R5-Varianten die hauptverantwortliche Struktur zur Bildung des Silikats.

Ungeklärt blieb bislang, warum Protamin-modifizierter 3xCh in 0,1 M Phosphat bei pH 6,6 und einer Komplexkonzentration von 2,5 μM innerhalb einer Stunde zu keiner Präzipitatbildung führte (Abb. III.7 I). Dies widerspricht den bisher gemachten Aussagen, dass Protamin in Phosphat über einen breiteren pH-Bereich die Fähigkeit besitzt, Silikat zu präzipitieren. Zudem lag in diesem Reaktionsansatz die Protaminkonzentration höher als bei den bisher diskutierten Versuchen, da die zweieinhalbfache Menge an Komplexen eingesetzt wurde. Des Weiteren zeigte 3xCh selbst bei pH 6,0 in Tris eine Pelletbildung (Abb. III.9). Ein Erklärungsansatz besteht darin, dass die ebenfalls vorgenommene Verdopplung der Pufferkonzentration eine umfassendere Wechselwirkung des Phosphats (0,25 % des Phosphats liegen als HPO_4^{2-} vor, der Rest als H_2PO_4^-) mit Protamin hervorruft, die dessen fördernden Einfluss auf die Silikatpolymerisation einschränkt, wodurch eine Ausdehnung der Reaktionszeit für eine Silikatbildung von Nöten ist.

Durch die Modifikation mit Protamin generiert man einen LHCII, der in der Lage ist, autogen Silikat zu fällen und bei diesem Prozess im Silikat eingeschlossen zu werden. Dies geschieht abhängig von der Art des Puffers, dem entsprechenden pH-Wert und dem spezifischen Protaminbindungsmuster. Solche autogen eingeschlossenen LHCII wurden thermischem Stress ausgesetzt und auf ihr Stabilitätspotential hin getestet. Des Weiteren wurden Protamin-modifizierte Komplexe in Copräzipitationen eingesetzt. Vor der Diskussion des Stabilisierungspotentials soll das Verhalten der Komplexe in diesen Copräzipitationsreaktionen besprochen werden.

4.4. Copräzipitation von Protamin-modifizierten Komplexen

Die mit Protamin-modifizierten Komplexe wurden in Copräzipitationsansätzen nach dem in Kapitel II vorgestellten Protokoll (1 mM Spermin, Reaktionsdauer abweichend 1 h) verwendet. Be2 und 3xCh zeigten keine unterschiedlichen Werte hinsichtlich ihrer Einbauraten in Tris oder Phosphat. Be1 wich allerdings in Tris ab, der bei $n = 2$ einen deutlich niedrigeren Wert bei einer hohen Standardabweichung erreichte als in Phosphat. Eine ebenfalls hohe Standardabweichung wies S160Ch in Phosphat auf. Prinzipiell lassen sich an dieser Stelle zwei Interpretationen vornehmen. Der Wert für S160Ch in Phosphat liegt zu niedrig; damit wäre ein vergleichbares Bild bei Copräzipitationen wie bei autogenen Silikatfällungen der Komplexe (in Tris deutlich schlechter als in Phosphat) gegeben, wo bei S160Ch und Be1 in Tris keine Fällungen auftraten. Oder aber der Wert für Be1 in Tris ist zu niedrig und würde sich nicht von den Werten in Phosphat unterscheiden. Hieraus würde man den Schluss ziehen können, dass die Einbaurate Puffer- und pH-Wert-unabhängig ist und der Modifizierungsgrad über die Einbaurate bestimmt wird. Verglichen zur Copräzipitation mit nicht-modifizierten Komplexen (siehe dazu Kapitel II Publikation) wird die Einbaurate durch die Modifizierung signifikant erhöht, ein Effekt, der auch bei der polykationischen Modifikation mit R5 auftritt. Sowohl bei der Verwendung von nicht-modifizierten als auch R5-modifizierten Komplexen blieb allerdings ein deutlicher Unterschied zwischen Reaktionen in Tris bei pH 6,0 (hohe Einbaurate) und Phosphat bei pH 7,5 (niedrigere Einbaurate), der bei den Protamin-modifizierten Komplexen scheinbar nivelliert wird. Ein Grund für diese Angleichung kann in der verdoppelten Reaktionsdauer liegen, die gewählt wurde, um vergleichbare Bedingungen zu Spermin-freien Fällungen der Protamin-modifizierten Komplexe zu erreichen. Möglicherweise macht sich aber auch in diesen Spermin-abhängigen Copräzipitationen der bereits diskutierte positive Einfluss von Phosphat auf Protamin-modifizierte Komplexe in Silikatfällungen bemerkbar. Dies könnte mit einer dualen Silikatbildungsunterstützung sowohl von Spermin als auch von Protamin erklärt werden. Verglichen mit Spermin-freien Fällungen verändert sich die Silikatstruktur signifikant hin zu sphärischen Partikeln, die in Phosphat größere Strukturen als in Tris bilden (Abbildung III11 C und D, unter Annahme, dass die Varianten Be1 und 3xCh in gleichen Puffern vergleichbare Strukturen ausbilden würden). Dies weist daraufhin, dass Spermin das strukturgebende Element des Reaktionsansatzes ist, das ähnliche Strukturen bei Copräzipitationsversuchen

bildete (vgl. Kapitel II Publikation). Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Sperminkonzentration rund 200 – 600-fach höher lag als die Protaminkonzentration und Spermin-induzierte Copräzipitationen deutlich schneller ablaufen (nach 30 min zeigten die Protamin-modifizierte Komplexe autogen keine Pelletbildung [Daten nicht gezeigt]).

Wird anstelle von Spermin freies Protamin verwendet, muss man signifikant unterscheiden, ob die Komplexe des Systems Protamin-modifiziert waren oder nicht. Nicht-modifizierte Komplexe werden mit freiem Protamin schlecht eingeschlossen: Es bildete sich kein Pellet bei pH 6,6, ein sehr kleines bei pH 7,5 (1 h RT, Phosphat, Abb. III.7) und ein etwas größeres Pellet mit niedriger Einbaurrate bei einer 12-stündigen Reaktion im Kühlraum (Phosphat bei 6,6 resp. 7,5). Hierbei wurde verglichen mit Spermin nur ungefähr ein Hundertstel an fällendem Agens verwendet (11,25 μM), was einem Anteil an positiven Ladungen von etwa einem Zwanzigstel entspricht. Dass es bei pH 6,6 zu keiner Pelletierung kam, ist verwunderlich, da freies Protamin (10 μM) sogar bei pH 6,0 in Phosphat in 30 min zu einer Bildung eines Präzipitates führte. Wie schon in der Diskussion zuvor (autogene Fällung Protamin-modifizierte Komplexe) kann dieser Sachverhalt nicht ausreichend geklärt werden. Wurde Protamin-modifizierter 3xCh gemeinsam mit freiem Protamin umgesetzt (Abb. III.7 II und III), bildeten sich schon innerhalb einer Stunde sowohl bei pH 6,6 als auch 7,5 Pellets und sehr hohe Einbauraten wurden erreicht (zwischen 72 und 94 %, gilt für Systeme, bei denen freies Protamin sofort bei Reaktionsbeginn resp. nach der Hälfte der Reaktionszeit zugefügt wurde). Dabei lag im System die gleiche Protaminendkonzentration vor, wie bei der eben beschriebene reinen Copräzipitation (4,5 μM Komplex-gebundenes Protamin + 6,75 μM freies Protamin). Vor allem die Tatsache, dass auch bei niedrigerem pH-Wert eine Pelletbildung auftrat mit einer Einbaurrate von 84 % (Zugabe $t = 0$) resp. 72 % (Zugabe $t = 30$ min), unterscheidet diesen Ansatz signifikant von autogenen Fällungen von Protamin-modifizierten Komplexen oder der reinen Copräzipitation mit Protamin. Dies deutet auf ein hohes Maß an Kooperativität zwischen freiem Protamin und dem an Komplexe-gebundenem hin. Wie bereits mehrfach diskutiert, unterscheiden diese beiden Formen sich vermutlich hinsichtlich ihrer Raumordnung (globulär im freien Zustand, nicht-globulär im gebundenen Zustand). Ein Zusammenspiel der beiden Formen könnte ideale Anordnungen der Argininreste ergeben, die so eine effizientere Erleichterung der Kieselsäurekondensation ermöglichen. Weniger geometrisch, sondern eher mechanistisch wäre ein Erklärungsansatz, der von einer Vorkondensation zu kleinen Silikatpartikeln durch das freie Protamin ausgeht, dem eine rasche Verknüpfung zu größeren (präzipitierbaren) Silikatstrukturen durch die Komplex-gebundenen Protamine folgt. Auch an dieser Stelle erfolgte keine tieferegreifende Analyse des Sachverhaltes, da die Fokussierung auf dem Stabilisierungsvermögen lag.

4.5. Hitzestabilisierung durch Protamin-induzierten Komplexeinschluss in Silikat

Die Stabilität des LHCII in Silikat unter thermischem Stress wurde auch mit den Protamin-modifizierten Komplexen getestet. Allerdings wurde die Inkubationszeit auf fünf Stunden verkürzt.

Der Grund hierfür lag in den kleineren Fällungsansätzen, die entsprechend kleinere Pellets bedingten. Von diesen blieb bei einer 24-stündigen Inkubation derart wenig übrig, dass nicht ausreichend Material vorlag für zuverlässige Emissionsspektren. Proben, die durch autogene Silikatbildung eingeschlossen wurden, wiesen bereits nach dieser verkürzten Inkubationszeit eine signifikante Reduktion der Energieweiterleitung innerhalb des Komplexes auf, was auf einen Verlust der korrekten Pigmentanordnung zurückzuführen ist. Hierbei lagen die normierten *EmChl a/Em Chl b* für S160Ch und Be1 (beide nur in Phosphat präzipitiert, da in Tris keine Pellets gebildet wurden) deutlich über denen von Be2 und 3xCh und damit etwa in dem Bereich von nicht-modifiziertem LHCII bei einer Copräzipitation mit Spermin in Phosphat bei pH 7,5 (vgl. II.3.2). Be2 und 3xCh erreichten Werte, die mit denen von freien Komplexen vergleichbar sind, und denaturierten vermutlich vollständig während der Hitzinkubation. Welche Gründe gibt es für dieses geringe Ausmaß an Stabilisierung der Komplexe in den autogen gefällten Silikatpräzipitaten? Die REM-Aufnahme eines autogen gefällten Präzipitats zeigte die bereits früher angesprochene flächige Struktur mit nur vereinzelt Partikeln (Abb. III.12). Das Vorhandensein von einer homogenen, partikulären Silikatstruktur wurde im Rahmen dieser Arbeit aber als entscheidende Eigenschaft für eine effiziente Stabilisierung des LHCII in Silikat herausgestellt. Fehlen diese Strukturen, findet keine effiziente Stabilisierung mehr statt. Darüber hinaus deutet sich in den Resultaten an, dass Komplexe mit Protamin-Modifikationen sowohl auf der stromalen als auch der lumenalen Seite (Be2 und 3xCh) durch einen Silikateinschluss nicht gegenüber thermischem Stress stabilisiert werden. Da Protamin an der Silikatbildung beteiligt ist, kann man davon ausgehen, dass es im Silikatnetzwerk intensiv verwoben ist. Ist der Komplex sowohl stromal als auch lumenal mit Protamin verknüpft, bedeutet dies eine relativ starre Verankerung im Silikat. Strukturelle Veränderungen im Silikat, z.B. durch Alterungsprozesse, würden sich direkt auf den Komplex übertragen, der so auf Grund des mechanischen Stresses geschädigt würde (Abb. III.19). Bei einer einseitigen Bindung von Protamin würden solche Scherkräfte nicht gleichzeitig auf beiden Komplexseiten wirken. In der Proteinanalytik wirken in einer ähnlichen Art und Weise Kräfte auf ein Protein, wenn dieses auf einer räumlichen Seite immobilisiert vorliegt und die andere Seite an eine Cantilevernadel eines Rastertkraftmikroskops geknüpft ist.

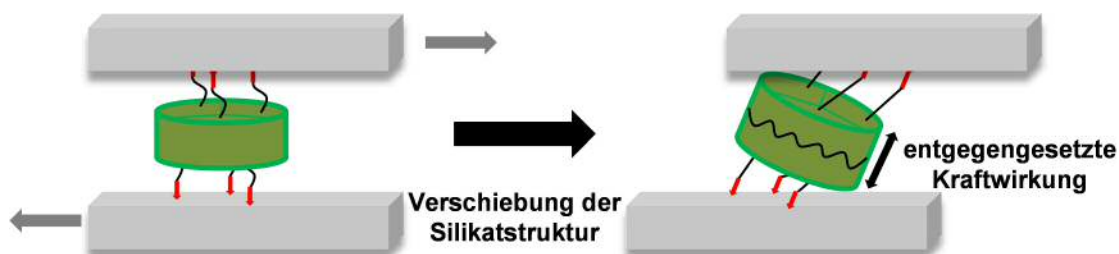


Abb. III.19: Auswirkung von Silikatveränderungen auf Protamin-modifizierte LHCII

Schematische Darstellung möglicher mechanischer Auswirkungen einer Verschiebung von Silikatstrukturen auf LHCII (grün), der kovalent mit Protamin (rot) verknüpft ist. Das Verschieben der Silikatebenen wird mechanisch über Protamin und sSMPB auf die Proteinstruktur weitergegeben.

Durch Zug an der Cantilevernadel wird mechanischer Stress auf das Protein ausgeübt und bei einer definierten Kraft können Entfaltungsvorgänge detektiert werden [166; 167]. Das Ausmaß der Stabilisierung bei einem Einsatz der Protamin-modifizierten Komplexe in einer Spermin-Copräzipitation liegt deutlich höher (abhängig von der LHCII Variante zwischen 0,56 und 0,76 für normierte $EmChl a/Em Chl b$). Eine grundsätzliche Tendenz einer Abhängigkeit von der LHCII-Variante kann dabei nicht festgestellt werden. Die Silikatstrukturen wiesen in diesem System wie bereits diskutiert vergleichbare Strukturen zu Copräzipitationen mit nicht-modifizierten Komplexen auf. Auffällig ist im Vergleich zu diesen, dass bei der Verwendung von Phosphat bei pH 7,5 deutlich kleinere Partikelstrukturen mit den Protamin-modifizierten Komplexen erreicht werden. Dies spiegelt sich in den entsprechenden Stabilitätswerten wider, die sich nicht signifikant unterscheiden für Tris bei pH 6,0 und Phosphat bei pH 7,5. Ähnlich wie bei R5C3.2h in Phosphat bei pH-Wert 7,5 geht auch bei den Protamin-modifizierten Komplexen die Tendenz hin zu kleineren Strukturen. Vermutlich haben also polykationische Modifizierungen einen lenkenden Einfluss auf den Aggregationsvorgang von Vorläufer-Silikatstrukturen. Dennoch ist das Ausmaß an Stabilisierung im Reaktionsansatz schon nach fünfstündiger Inkubation schlechter als bei einer 24-stündigen von nicht-modifizierten Komplexen. Der Grund hierfür könnte der Begründung der autogenen Fällungsansätze folgen. Eine partielle Teilnahme des Protamins an der Fällung ist auch bei der Copräzipitation mit Spermin zu erwarten, jedoch untergeordnet zur dominierenden Spermin-induzierten Polymerisation. Dennoch kann es zu intensiveren Wechselwirkungen der Komplexe mit dem Silikat kommen als ohne diese Modifikation.

Insgesamt scheint die Verwendung von Protamin-modifizierten Komplexen in einer Spermin-Copräzipitation zwar die Einbauraten zu erhöhen, das Ausmaß an Stabilisierung vor allem bei der Verwendung von Tris bei pH 6,0 vergleichsweise schlechter zu sein. Möglicherweise würde sich die Stabilisierung der Protamin-modifizierten Komplexe bei Phosphat (pH 7,5) der in Tris (pH 6,0) von nicht-modifiziertem LHCII in einer 24-stündigen Hitzeinkubation annähern. Dies würde den Resultaten für R5C3.2h unter diesen Bedingungen folgen (Kapitel I).

4.6. Modifizierung von LHCII mit MPS

Die Modifikation von trimerem LHCII mit MPS verlief nach einem ähnlichen Prinzip wie die Modifikation mit Protamin. Es wurde der gleiche heterobifunktionelle Crosslinker (sSMPB) verwendet, wobei hier die NHS-Gruppe an den LHCII gebunden wurde und die Maleimidgruppe an die Thiofunktion des MPS. Für die Anbindung stehen im Monomer sieben Lysine plus der N-Terminus zur Verfügung. Die Lysine liegen dabei sowohl auf der stromalen als auch auf der lumenalen Seite des Komplexes. Bei der Anbindung des MPS werden also auf beiden Komplexseiten Silanolgruppen eingefügt, die dann bei der Ausbildung des Silikatnetzwerkes in dieses eingebaut werden können. In diesem Fall findet also wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, eine sehr intensive Verbindung zwischen LHCII und Silikat statt, so dass sich Veränderungen des Silikats mechanisch wiederum di-

rekt auf die LHCII-Struktur auswirken könnten. Die MPS-modifizierten Komplexe wurden in einer Copräzipitation in Tris bei pH 6,0 eingesetzt. Der normierte $\text{EmChl } a/\text{Em Chl } b$ nach 24 Stunden thermischem Stress betrug nur noch 0,51 ($n = 3$) und lag damit signifikant unter dem Wert nicht-modifizierter Komplexe unter diesen Pufferbedingungen (0,83; Kapitel II, Publikation). Die Erklärungshypothese für Protamin-modifizierte Komplexe hinsichtlich mechanischen Stresses durch zweiseitige intensive Verknüpfung des Komplexes mit Silikat kann auch auf MPS-modifizierte Komplexe übertragen werden (vgl. Abb. III.19). Durch eine intensive Verwobenheit zwischen LHCII und Silikat können Veränderungen des Silikats auf den Komplex übertragen und dessen Integrität negativ beeinflusst werden.

Die Anbindung des MPS wurde im Rahmen dieser Arbeit modifiziert. Hierbei wurde im ersten Schritt die Verknüpfung des Crosslinkers durchgeführt. Bei neutralem pH-Wert sollte nur der N-Terminus reaktiv gegenüber NHS-Gruppen sein, weswegen die Reaktion bei einem pH-Wert von 8,5 ausgeführt wurde. Diese Bedingungen wurden schon von Gundlach, 2010, verwendet, um einen NHS-gekoppelten Farbstoff in trimerisierten LHCII einzuführen [52]. Bei diesem pH-Wert liegen nur knapp 2 % der Lysinreste deprotoniert und damit im reaktiven Zustand gegenüber NHS vor (bezogen auf den pK_s der ϵ -Aminogruppen eines isolierten Lysins). Eine Verknüpfung mit Arginin sollte bei den hier gewählten pH-Bedingungen genau wie bei der Anbindung des Crosslinkers an Protamin ausgeschlossen sein, da dessen pK_s -Wert bei über 12 liegt. Dennoch wurden vereinzelt Reaktionen dieser sowie von Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin mit NHS beobachtet [168; 169]. Somit können diese Nebenreaktionen grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden. Gundlach geht von einer Bindung von etwa 2,36 Farbstoffen pro Monomer aus. Um eine möglichst hohe Ausbeute der MPS-Modifizierung zu erhalten, wurde sSMPB in molaren Überschüssen zwischen 5- und 40-fach bezogen auf ein Lysin eines Monomers eingesetzt, was einem Crosslinker-Überschuss über ein Trimer zwischen 105- und 840-fach entspricht. Zwei Gründe können für die Verwendung solch hoher Überschüsse angeführt werden. Zum einen werden dadurch Auswirkungen der Hydrolyse von NHS-Gruppen, die beim vorliegenden pH-Wert zu erwarten sind, abgeschwächt (siehe hierzu den Beginn der Diskussion zur Protaminanbindungsoptimierung). Zum anderen wird durch einen massiven Überschuss die Anbindungsreaktion in Richtung der Produkte verschoben, was durch den geringen Deprotonierungsgrad der Lysinseitenketten notwendig ist. Dass auch die nachfolgende Anbindung von MPS erfolgreich verläuft, zeigen die Resultate in Abb. III.15, wo bei allen verwendeten Überschüssen mehr als 90 % der Komplexe ins Pellet eingebaut werden und sich damit signifikant von den Ansätzen ohne vollständige MPS-Anbindung (Kontrolle 1 ohne MPS, Kontrolle 2 ohne sSMPB) unterscheiden, die in der Größenordnung einer Copräzipitation wie Kapitel II beschrieben lagen. Das Ausmaß der Anbindung des Crosslinkers an LHCII und damit der Modifizierungsgrad konnte nicht mittels Nachbindung von NHS-reaktiven Farbstoffen ermittelt werden, da sich diese Reaktion selbst bei mehrfacher unabhängiger Durchführung aus ungeklärten Gründen nicht auswerten ließ. Im optimierten Reaktionspro-

tokoll wird nur ein 5-facher Crosslinker-Überschuss (bezogen auf ein Lysin eines Monomers) verwendet. Dieser Überschuss stellte sich wie eben beschrieben als ausreichend dar, weshalb alleine aus Kostengründen auf einen höheren Überschuss verzichtet werden sollte. Zum anderen hat die Verwendung eines höheren Überschusses sogar negativen Einfluss auf die Komplexintegrität, was sich besonders bei einem 40-fachen Überschuss in Form einer detektierbaren Chlorophyll *b*-Emission zeigt, die in leichter Ausprägung auch bei 20- und 10-fachem Überschuss auftritt und zwar vor der Hitzeinkubation. Hierfür könnte das Hydrolyseprodukt des Crosslinkers als Grund angeführt werden. Wie mehrfach erwähnt, ist bei einem leicht basischen pH-Wert eine starke Hydrolyse des sSMPB zu erwarten. Eines der Hydrolyseprodukte, Sulfohydroxysuccinimidin und p-Maleimidophenylbutyrat, könnte eine negative Interaktion mit LHCII eingehen. Besonders das zweite Produkt zeichnet sich durch einen amphoteren Charakter aus, dessen hydrophober Part den LHCII Detergenz-artig beeinflussen könnte.

Zukünftig steht eine Optimierung dieser Methode an, so dass nicht mit LHCII verknüpfte MPS-Moleküle, die in einem deutlichen Überschuss (10-fach über ein monomeres Lysin) eingesetzt werden, vor der Silikatcondensation abgetrennt werden. Freie MPS-Moleküle können wie gebundene im Silikatnetzwerk eingebaut werden. Durch den Propylrest stören sie allerdings die Regelmäßigkeit des Netzwerks, was einen negativen Einfluss auf das Stabilisierungspotential haben kann. Könnten durch die Abtrennung die Stabilisierungswerte verbessert werden, so stünde mit der MPS-Modifikation eine relativ einfache Methode zur Verfügung, die Einbaurate an LHCII in ein Silikatnetzwerk mittels Spermin-Copräzipitation deutlich zu steigern. Allerdings wäre an dieser Stelle die Problematik der mechanischen Beeinflussung durch kovalente Einbindung ins Silikat nicht gelöst. Der Einfluss scheint allerdings geringer zu sein als bei Protamin-Modifizierungen, da diese (S160Ch ausgenommen) schon bei einer 5-stündigen Hitzeinkubation fast ähnliche Werte (um 0,6) erreichen. Möglicherweise könnte die Problematik der kovalenten Einbindung ins Silikatnetzwerk mit daraus resultierendem mechanischem Stress dadurch gelöst werden, dass ein anderer heterobifunktioneller Crosslinker verwendet wird. 4-Succinimidylloxycarbonyl-alpha-methyl-alpha-(2-pyridyldithio)-toluene (SMPT) besitzt genau wie sSMPB eine Amino-reaktive NHS-Gruppe, die an Lysine gebunden werden kann. Die Thiopyridingruppe kann mit Sulfhydrylgruppen eine unter reduktiven Bedingungen spaltbare Disulfidbindung eingehen. Würde LHCII über diesen Crosslinker mit MPS modifiziert werden, so könnte die MPS-Verknüpfung dafür sorgen, dass der Komplex sehr eng von Silikatpartikeln umschlossen wird. Um mechanischen Stress zu vermeiden, könnte die kovalente Verknüpfung zwischen MPS und LHCII durch Inkubation des Silikatpellets zeitnah nach Präzipitation durch Reduktionsmittel gelöst werden. Dabei würde die enge räumliche Einbettung des Komplexes in das Silikatnetzwerk nicht beeinträchtigt werden. Eine Zugänglichkeit für Reduktionsmittel sollte gemäß den Resultaten aus Kapitel II (Abb. II.5, Abb. II.7) bestehen.

IV. Kapitel: Fällungen von Titandioxid

1. Einleitung

Der Tatsache zum Trotz, dass es sich bei Titan um ein Metall und bei Silicium um ein Halbmetall handelt, haben diese beiden Elemente ähnliche Eigenschaften, die auf vergleichbaren Elektronenkonfigurationen der Valenzschale beruhen. Aus diesem Grund ist eine Bildung von Titandioxid auf ähnlichem Wege zu erreichen wie die biogene Silikatbildung, die in den vorangegangenen Kapiteln besprochen wurde. Sowohl Spermin, als auch Protamin, R5-Peptid und weitere Silaffin-abgeleitete Peptide zeigen die Eigenschaft, Titandioxid unter milden Bedingungen zu bilden ([170–174]; für eine Übersicht zur nicht-biogenen Titandioxidbildung: Chen und Mao, 2007 [175]).

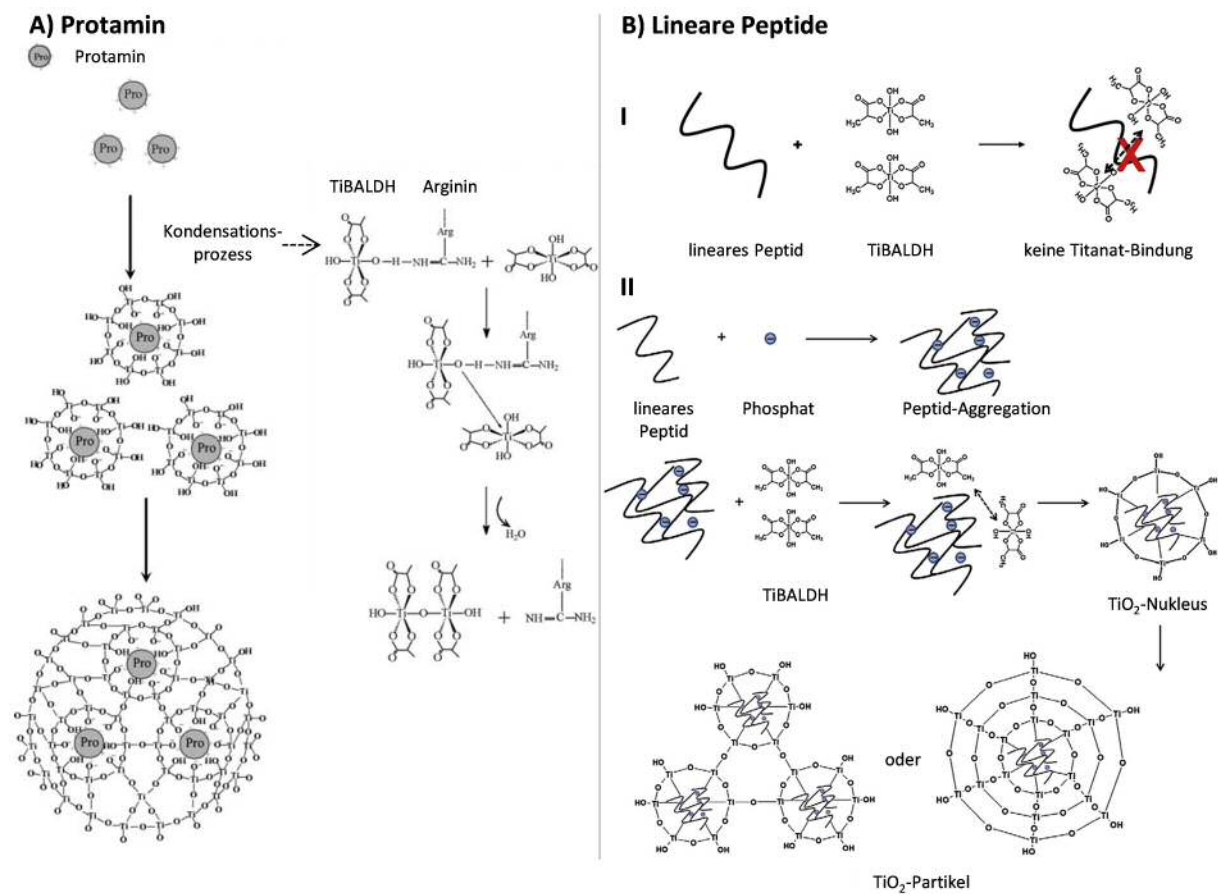


Abb. IV.1: Vermutete biogene Titandioxid-Bildungsmechanismen

A) Protamin-induzierte Bildung von TiO_2 mit Titanium(IV) bis(ammonium lactato)dihydroxid (TIBALDH) als Vorläufermolekül. Abbildung verändert nach Jiang *et al.*, 2008 [173].

B) Einfluss von linearen polykationischen Peptiden auf die Bildung (II) bzw. nicht-Bildung (I) von TiO_2 . Abbildung verändert nach Choi *et al.*, 2012 [174].

C) Rolle des Spermins bei der Ausbildung von Titanatbindungen. Abbildung verändert nach Cole *et al.*, 2007 [177].

Bezüglich der Mechanismen, wie polykationische Moleküle die Bildung von Titandioxid ermöglichen, gibt es verschieden Hypothesen (Abb. IV.1). Für Protamin postulieren Jiang *et al.*, dass die glo-

buläre Struktur in Lösung und die überaus hohe Anzahl an positiven Ladungen, bedingt durch die Arginine, im Molekül ausreichend sind für eine Kondensation zu Titandioxid (A). Dabei dient ein Protamin als Nukleationskern für einen Titandioxidpartikel. Durch eine Säure-Base-artige Wechselwirkung zwischen einer Hydroxylgruppe des Titanium(IV)-bis-(ammoniumlactato)-dihydroxids (TiBALDH) und der Guanidinogruppe des Arginins wird das Hydroxyl-Sauerstoffatom stark negativiert. Dieses kann so das Titan(IV)-Ion eines benachbarten TiBALDHs nucleophil angreifen. An diesem wird eine Hydroxylgruppe oder eine Bindung des Liganden Lactat substituiert und eine Titanatbindung ausgebildet. Dieser Prozess wiederholt sich bis zur Ausbildung eines komplexen Netzwerks aus Titandioxid um das Protamin. Dieser Mechanismus erklärt auch, warum Protamin während des Prozesses in das Präzipitat eingebaut wird und nicht im Überstand verbleibt. Choi *et al.* beschreiben auf ganz ähnliche Art und Weise den Mechanismus für die Kondensation mit TiO_2 -bindenden Peptiden, die eine globuläre Struktur einnehmen (nicht gezeigt in Abb. IV.1 B). Bei diesen wie auch bei Protamin besteht keine Abhängigkeit von Phosphat, da sie einen rigiden Nucleationskern vorgeben. Bei linearen Peptiden ist dies nicht gegeben, so dass kein ausreichend starker Vorläufer-TiBALDH-Komplex gebildet werden kann, der für die Ausbildung einer Titanatbindung notwendig ist. Wird durch Phosphat allerdings eine Aggregation der linearen Peptide ermöglicht, so kann dieses Aggregat als rigider Nucleationsursprung dienen und eine Partikelbildung um diesen herum erfolgen. Auch hier erklärt sich durch diese Hypothese der Einbau des Peptids in das Titandioxid. Auch für R5-Peptid gilt dieser Erklärungsansatz grundsätzlich: Das schon für die Silikatbildung als essentiell erklärte RRIL-Motiv führt zu einer Assemblierung von R5, die so einen Nucleationsursprung bilden [112; 171] (Eine kritische Auseinandersetzung mit der „RRIL-Hypothese“ erfolgte bereits in Kapitel I). Für Spermin wurde von Cole *et al.* ein von den vorangegangenen Mechanismen abweichender vorgeschlagen (C). Das Spermin fungiert dabei als zweizähliger Ligand für Titan(IV)-Ionen. So können gleichzeitig an zwei TiBALDH-Molekülen jeweils ein Lactat durch dasselbe Spermin verdrängt werden. Hierbei entsteht eine derart große räumliche Nähe zwischen den beiden TiBALDH-Molekülen, dass ein nucleophiler Angriff eines Hydroxyls auf das benachbarte Titan(IV)-Ion stattfinden kann und eine Titanatbindung ausgebildet wird. Dieser Vorgang wiederholt sich immer wieder bis ein Titandioxidnetzwerk entsteht. Das Spermin verbleibt dabei nicht in diesem, sondern wird freigesetzt. Die gemeinsame Eigenschaft des biogenen Titandioxids ist der amorphe Charakter, der durch Erhitzen zugunsten von kristallinen Strukturen (zuerst Anatas, bei weiterer Temperaturerhöhung Rutil) verloren geht [170; 171; 173; 174]. Lediglich Köger beschreibt die Bildung von Rutilstrukturen bei der Verwendung eines speziellen Silaffins [172].

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die in den vorangegangenen Kapiteln benutzten kationischen Moleküle Spermin und Protamin zum Einschluss von LHCII und verschiedenen modifizierten Varianten in Titandioxidstrukturen genutzt werden. Hierbei galt es, Reaktionsbedingungen zu etablieren, die einen effizienten Komplexeinschluss ermöglichen, der die Integrität der Komplexe garantierte.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. LHCII-Varianten

Alle im Rahmen dieses Kapitels verwendeten LHCII-Varianten und deren Protamin-modifizierte Versionen wurden im vorangegangenen Kapitel IV näher beschrieben. Exakte Informationen sind den Tab. 3. 1 und Tab. I.2 zu entnehmen.

2.1.2. Chemikalien

TiBALDH (Abb. IV.2) wurde von der Firma Sigma-Aldrich bezogen (50 % [w/v] in H₂O).

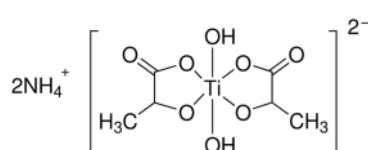


Abb. IV.2: TiBALDH

Strukturformel von TiBALDH, Strukturformelrechte liegen bei: Sigma-Aldrich, München.

2.2. Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Versuche zur Einbettung von LHCII in Titandioxid unternommen. Hierbei sollten Rahmenbedingungen abgesteckt werden, innerhalb derer Titandioxid durch verschiedene Kondensation-initiiierende Moleküle präzipitiert wird. Aus diesem Grund kann an dieser Stelle kein definiertes Protokoll angegeben werden, sondern eher eine allgemeine Beschreibung der Rahmenbedingungen. Konkrete Stöchiometrien sind dem jeweiligen Ergebnisteil zu entnehmen.

2.2.1. Fällungen von Titandioxid

TiBALDH	1,7 M
Spermin	0,1 M
Protamin	10 mg/ml (entspricht 1950 µM)

TiBALDH wurde in der gewünschten Menge vorgelegt und mit einem Puffer der Wahl versetzt. Zu dieser Lösung wurde das Kondensation-initiiierende Molekül – entweder Spermin oder Protamin – zugegeben. Wurde in den Fällungen LHCII (1 µM, die Komplexlösung bringt ausreichend LM mit, so dass kein zusätzliches hinzugefügt werden muss) eingesetzt, egal ob modifiziert oder nicht, so wurde dieser vor Spermin/Protamin zugefügt. Komplex-freie Ansätze wurden 5 min bei 23°C und leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion war nach dieser Dauer bereits abgeschlossen. Komplex-haltige Lösungen wurden für 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch etwa 2-minütiges Zentrifugieren in der Tischzentrifuge (~ 14000 x g) abgestoppt und der Überstand entfernt. Die Pellets wurden fotografisch dokumentiert. Abweichungen und Konkretisierungen sind den entsprechenden Abbildungsbe-

schriftungen im folgenden Ergebnisteil zu entnehmen. Die Präparation von REM-Proben verlief analog zu der bei Silikatproben (3.2.1.5 E)).

2.2.2. Fluoreszenzspektroskopische Analyse von Titandioxid-eingeschlossenem LHCII

Im Gegensatz zu Silikatpellets sind die Titandioxidpellets i) intensiv weiß gefärbt und ii) lassen sich deutlich schwerer resuspendieren. Diese Eigenschaften machen eine fluoreszenzspektroskopische Analyse schwieriger, da die Partikel größer sind und auf Grund des höheren Gewichts sehr viel schneller in Küvetten absinken. Aus diesem Grund wurden die Messungen mittels Tecan infinite M1000 Plattenreader durchgeführt. Die Proben wurden in die Mikrotiterplatten gegeben und auf das Absetzen der Partikel am Plattenboden gewartet. Durch automatische Festlegung der z-Achsenhöhe wurde die Lokalisation der Messung an das niedergeschlagene Pellet angepasst. Die Komplexe wurden bei 470 nm angeregt und ein Emissionsspektrum von 600 – 750 nm aufgenommen, um die Integrität des Titandioxid-gebundenen LHCII zu überprüfen. Die Einstellung der weiteren Messparameter erfolgte angepasst an die jeweilige Probe.

3. Ergebnisse

Bevor LHCII in Präzipitationsreaktionen mit Titandioxid eingesetzt wurde, wurden Komplex-freie Ansätze sowohl mit Protamin als auch mit Spermin durchgeführt, von denen bekannt ist, dass sie in der Lage dazu sind, aus einem Vorläufermolekül Titandioxid zu bilden. Mit den so abgesteckten Rahmenbedingungen wurden anschließend Präzipitationen mit LHCII durchgeführt.

3.1. Protamin-induzierte Titandioxidbildung

Protamin wurde mit dem Vorläufermolekül TiBALDH in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen umgesetzt, wobei zum einen die Konzentration von Protamin und zum anderen die des TiBALDHs konstant gehalten wurde. Die exakten Reaktionsbedingungen sind den jeweiligen Abbildungsunterschriften zu entnehmen.

Wurde die Protaminkonzentration konstant bei 500 μM gehalten und die des TiBALDHs zwischen 5 und 50 mM variiert (entspricht Überschüssen über Protamin zwischen 10- und 100-fach), so zeigte sich in allen Ansätzen eine Bildung von weißen Präzipitaten (Abb. IV.3). Ab einer Konzentration von 20 mM TiBALDH (entspricht einem 40-fachen Überschuss über Protamin), wurden vergleichbar große Pellets gebildet. Bei geringeren Konzentrationen vergrößerte sich dieses mit steigender TiBALDH-Menge. Die Überstände der Reaktionsansätze waren in allen Fällen klar.


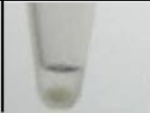
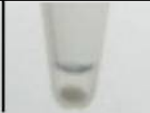


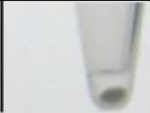
TiBALDH/PA	10	20	40	60	80	100
c(TiBALDH) [mM]	5	10	20	30	40	50
						

Abb. IV.3: TiBALDH-Konzentrationsabhängigkeit bei Protamin-induzierten Titandioxidfällungen

Eine konstante Menge Protamin (500 μM in 0,5 M Tris^{7,2}) wurde mit variablen Mengen an TiBALDH für 5 min bei 23°C unter Schütteln umgesetzt und anschließend für 4 min bei 14000 x g zentrifugiert. Eine Pufferung fand nur über die in Puffer gelöste Komponente Protamin statt. Das Ansatzvolumen betrug 25 μl . Daten verändert nach DP.

Wurde die Konzentration des TiBALDHs bei einer konstanten Konzentration von 0,125 M gehalten und die Protaminkonzentrationen zwischen 10 und 200 μM variiert, so kam es ebenfalls in allen Ansätzen zu einer Bildung von Präzipitaten (Abb. IV.4). Bei der geringsten Protaminkonzentration von 5 mM ist nur ein sehr schwaches Pellet zu erkennen. Mit zunehmender Konzentration an Protamin vergrößerten sich die Präzipitate sukzessive. Auch in diesem Fall waren alle Überstände völlig klar.







TiBALDH/PA	12500	5000	2500	1667	1250	625
c(PA) [μ M]	10	25	50	75	100	200
						

Abb. IV.4: Protaminkonzentrationsabhängige Titandioxidfällung

Eine konstante Menge TiBALDH (0,125 M) wurde mit variablen Mengen Protamin für 5 min bei 23°C unter Schütteln inkubiert und anschließend zentrifugiert (3 min, 14000 x g). Eine Pufferung fand nur durch die Protaminzugabe statt, das in 0,05 M Tris^{7,2} gelöst vorlag. Das Ansatzvolumen betrug 25 μ l. Daten verändert nach DP.

Neben Protamin ist auch Spermin in der Lage, Titandioxid aus dem Vorläufermolekül TiBALDH zu bilden und damit zu präzipitieren. Zu einer konstanten Menge TiBALDH (0,01 M) wurden zwischen 1 und 50 mM Spermin gegeben (Abb. IV.5). In allen Ansätzen bildeten sich weiße Pellets, die vergleichbare Größen besaßen. Die Überstände blieben klar. Im Ansatz mit 50 mM Spermin wurde ein pH-Wert von 10,5 nach Zentrifugation gemessen.






TiBALDH/Spermin	10	2	1	0,5	0,2
c(Spermin) [mM]	1	5	10	20	50
					

Abb. IV.5: Sperminkonzentrationsabhängige Titandioxidfällung

Eine konstante Menge TiBALDH (0,01 M) wurde mit variablen Mengen Spermin für 5 min bei 23°C unter Schütteln inkubiert und anschließend zentrifugiert (4 min, 14000 x g). Die Endkonzentration an Tris^{6,8} betrug 0,03 M. Das Ansatzvolumen betrug 25 μ l. Daten verändert nach DP.

3.2. Titandioxidfällungen durch Protamin-modifizierten LHCII

Die Protamin-modifizierten LHCII-Varianten 3xCh und Be1 (jeweils 1 μ M, Protaminmodifizierungsgrade sind für alle in diesem Kapitel beschriebene Varianten III.3.1.5 zu entnehmen) wurden mit 0,175 M TiBALDH für 5 Minuten inkubiert und anschließend zentrifugiert (Abb. IV.6 linke Bilder). Dabei bildeten sich in beiden Ansätzen grüne Pellets. In beiden Fällen blieben die Überstände grün gefärbt mit vergleichbarer Farbintensität. Dieser Überstand wurde isoliert und im Falle von Be1-PA mit weiterem TiBALDH versetzt ($c_{\text{total}} = 0,172$ M); im Falle von 3xCh-PA mit freiem Protamin ($c_{\text{total}} = 38$ μ M). Nach der 5-minütigen Inkubation wurde erneut zentrifugiert. Nur im Ansatz von 3xCh bildete sich ein grünes Pellet, das signifikant größer war als nach der ersten Inkubation (mittlere Bilder). Beim Ansatz des Be1-PA bildete sich durch die TiBALDH-Zugabe kein Pellet.

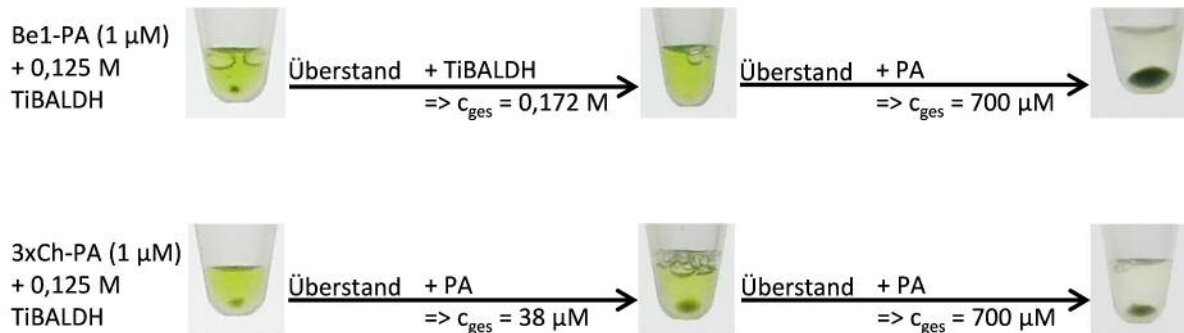


Abb. IV.6: Titandioxidfällungen durch Protamin-modifizierten LHCII

1 μM der Protamin-modifizierten LHCII-Varianten Be1 und 3xCh wurden in 0,06 M Tris^{7,2} mit 0,125 M TiBALDH für 5 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Zum Überstand wurde bei Be1-PA TiBALDH (theoretische $c_{\text{total}} = 0,172 \text{ M}$), zu 3xCh-PA Protamin ($c_{\text{total}} = 38 \mu\text{M}$) gegeben. Nach weiteren 5 min Inkubation und einer Zentrifugation wurde beiden isolierten Überständen Protamin zu einer Endkonzentration von 700 μM zugefügt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, nachdem bei 23°C (wie bei allen Inkubationen) für 5 min inkubiert wurde. Daten verändert nach DP.

Die Überstände wurden wiederum isoliert und beiden wurde erneut freies Protamin zugegeben. Nach Inkubation und Zentrifugation (gleiche Bedingungen wie zuvor) bildeten sich in beiden Fällen intensiv grün gefärbte Pellets, wobei das im Be1-PA Ansatz größer war als im Falle von 3xCh-PA (rechte Bilder). Die Überstände waren nahezu farblos.

Die beiden mit Protamin-modifizierten LHCII Varianten R5S106/160Ch und Be2 sowie deren nicht-modifizierten Versionen wurden für 15 min in 0,125 M TiBALDH bei 23°C inkubiert, anschließend zentrifugiert und fotografisch dokumentiert (Abb. IV.7 oberste Bilderreihe). Die Pellets wurden resuspendiert, freies Protamin zugefügt und wiederum 15 min inkubiert. Dieser Schritt wurde mehrfach wiederholt, so dass die Pellets bei einer Protaminkonzentration von 33,3; 50; 60 und 377 μM fotografisch dokumentiert und anschließend wieder resuspendiert wurden.

Während der ersten Inkubationsphase ohne freies Protamin bildete sich nur bei den Protamin-modifizierten Komplexen ein leichtes Pellet aus, welches bei Be2-PA deutlicher zu erkennen war als bei R5S106/160Ch-PA. Bei den folgenden Protaminzugaben bis zu einer Endkonzentration von 60 μM war in allen Ansätzen ein Pellet zu erkennen. Dieses war bei den Protamin-modifizierten Komplexen deutlich grün gefärbt, entsprechend entfärbte sich der Überstand sukzessive von Zyklus zu Zyklus, welches bei Be2 wiederum etwas stärker geschah. Der Überstand entfärbte sich bei den nicht-modifizierten Komplexen erheblich schwächer, was sich in einem nur schwach grünlich gefärbten Präzipitat widerspiegelte. Hier erschien jeweils das Pellet bei Be2 weniger stark gefärbt als bei R5S106/160Ch. Wird die Protaminkonzentration bei allen Ansätzen drastisch erhöht, bildeten sich in allen Ansätzen etwa gleich intensiv grün-gefärbte Präzipitate und die Überstände wurden nahezu farblos.

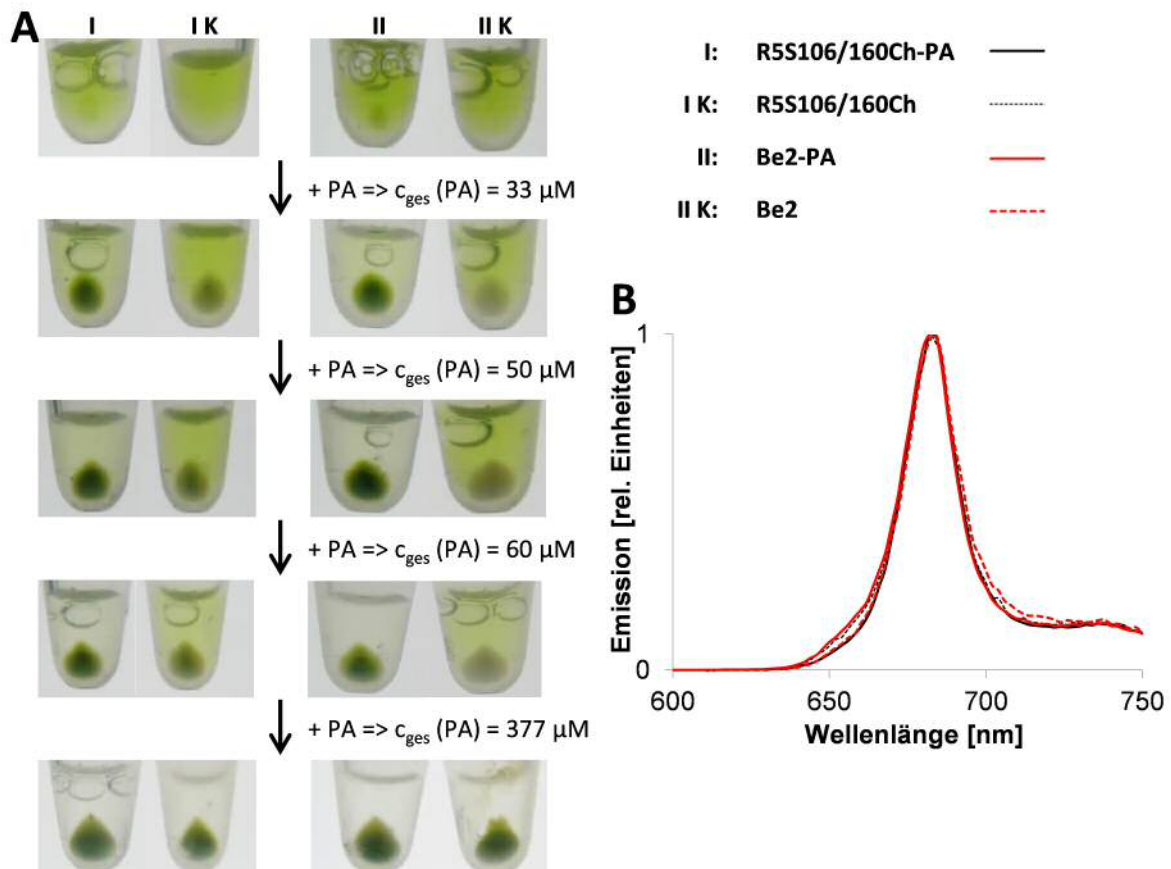


Abb. IV.7: Protamin-modifizierte LHCII-Varianten in einer Titandioxid-Copräzipitation mit Protamin 1 μM der Protamin-modifizierten und nicht-modifizierten (K) Varianten von R5S106/160Ch und Be2 wurden mit 0,125 M TiBALDH für 15 min umgesetzt und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert und dann sukzessive mit Protamin versetzt, um die entsprechenden Protaminkonzentrationen zu erreichen. Die zwischenzeitlichen Inkubationsdauern betragen jeweils 15 min. Es wurde stets für 2 min bei 12000 x g zentrifugiert (A). Die Pellets nach letzter Protaminzugabe wurden in frischem Puffer aufgenommen und fluoreszenzspektroskopisch analysiert (B, $\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$, Spektrum von 600 bis 750 nm). Puffer war in allen Fällen 0,05 M Tris^{7,2}. Daten verändert nach DP.

Die Pellets nach der letzten Protaminzugabe wurden in frischem Puffer resuspendiert und fluoreszenzspektroskopisch untersucht (Abb. IV.7 B). In keinem Ansatz zeigte sich eine gestörte Energieweiterleitung in Form einer Chlorophyll *b*-Schulter. Die Komplexintegrität wird durch den Einbau in Titandioxid nicht beeinträchtigt.

Sowohl die Protamin-modifizierten als auch die nicht-modifizierten Varianten von R5S106Ch, Be2 und V151Ch (jeweils 1 μM) wurden mit 0,01 M TiBALDH bei 23°C für 15 min umgesetzt. Durch Zentrifugation ließen sich eventuelle Pellets nachweisen und dokumentieren (Abb. IV.8 obere Reihe). Diese wurden wieder resuspendiert, 1,7 mM Spermin hinzugefügt und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Erneut wurde nach Zentrifugation dokumentiert und die Pellets in frischem Puffer fluoreszenzspektroskopisch analysiert.

Nach der initialen Spermin-freien Inkubation bildeten sich nur bei R5S106Ch-PA und bei Be2-PA schwache grün-gefärbte Präzipitate. Nach der Zugabe von Spermin waren in allen Ansätzen Präzipita-

te entstanden, die intensiv grün gefärbt waren. Die Überstände entfärbten sich entsprechend. Das Ausmaß der Entfärbung war allerdings nicht bei allen Ansätzen gleich stark. Bei Be2-PA und V151-PA war der Überstand annähernd farblos, bei R5S106Ch-PA stärker gefärbt, etwa vergleichbar zur R5S106Ch-Kontrolle ohne gebundenes Protamin. Die beiden anderen Protamin-freien Kontrollen waren nochmals intensiver, die Pellets entsprechend am schwächsten grün gefärbt.

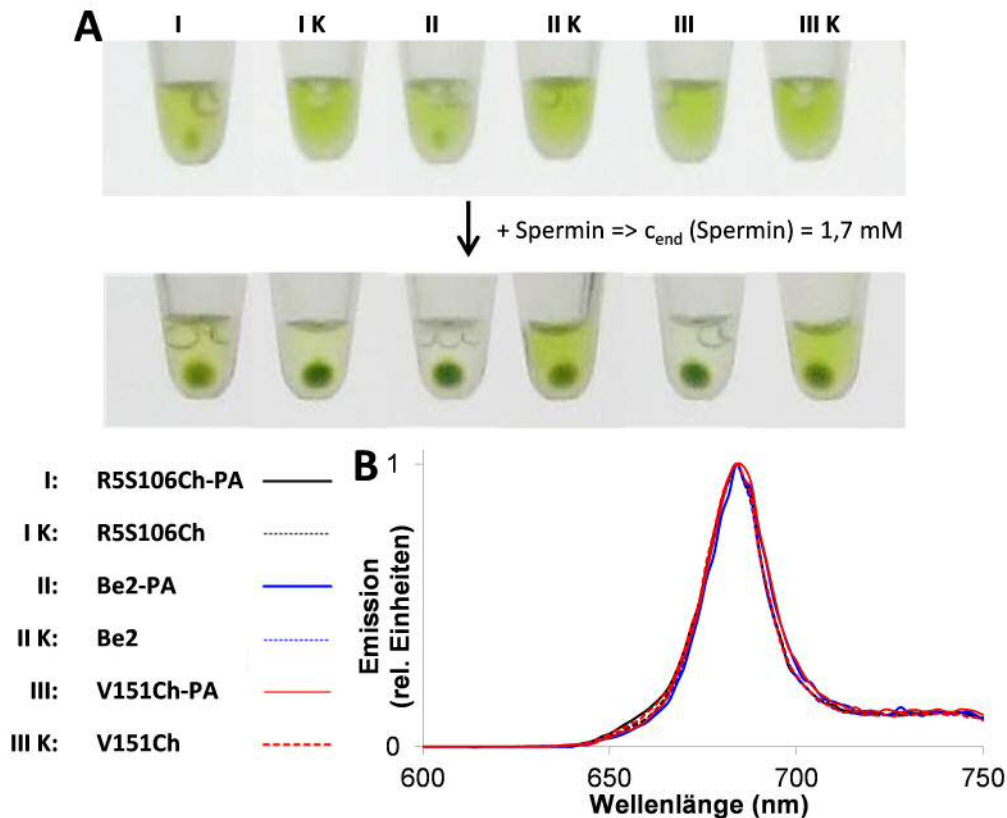


Abb. IV.8: Protamin-modifizierte LHCII-Varianten in einer Titandioxid-Copräzipitation mit Spermin
 1 μM der Protamin-modifizierten und nicht-modifizierten (K) Varianten von R5S106Ch, Be2 und V151Ch wurden mit 0,01 M TiBALDH für 15 min umgesetzt und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert und dann mit Spermin ($c_{\text{end}} = 1,7 \text{ mM}$) versetzt (A). Die Inkubationsdauer betrug wiederum 15 min. Es wurde stets für 2 min bei 12000 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden in frischem Puffer aufgenommen und fluoreszenzspektroskopisch analysiert (B, $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$, Spektrum von 600 bis 750 nm). Puffer war in allen Fällen 0,05 M Phosphat^{7,0}. Daten verändert nach DP.

Die fluoreszenzspektroskopische Analyse (Abb. IV.8 B) der in frischem Puffer resuspendierten Pellets ergab für keinen Ansatz eine Schulter im Emissionsbereich von Chlorophyll *b*, so dass man schlussfolgern kann, dass auch der Spermin-induzierte Einbau von verschiedenen LHCII-Varianten nicht die Komplexintegrität beeinflusst.

3.3. REM-Aufnahmen von Titandioxid-Präzipitaten

Die LHCII Varianten V151Ch mit und ohne gebundenem Protamin, R5C3.2h und R5S106Ch mit gebundenem Protamin (alle 1 μM) wurden mit 62,5 mM TiBALDH und 980 μM Protamin für 15 min bei 23°C inkubiert. Außerdem wurde Be1 mit gebundenem Protamin ohne zusätzlich freies Protamin

mit 0,125 M TiBALDH umgesetzt. Die Präzipitate wurden für REM-Aufnahmen präpariert (Abb. IV.9).

In den Präzipitaten der Protamin-freien Komplexe, R5C3.2h (A) und V151Ch (C) lassen sich sehr ähnliche Strukturen erkennen. Es treten feine Titandioxidpartikel auf mit Durchmessern kleiner als 50 nm, die zu einem komplexen Netzwerk verschmelzen. Dieses Netzwerk wird von größeren Lücken von etwa 200 nm durchzogen.

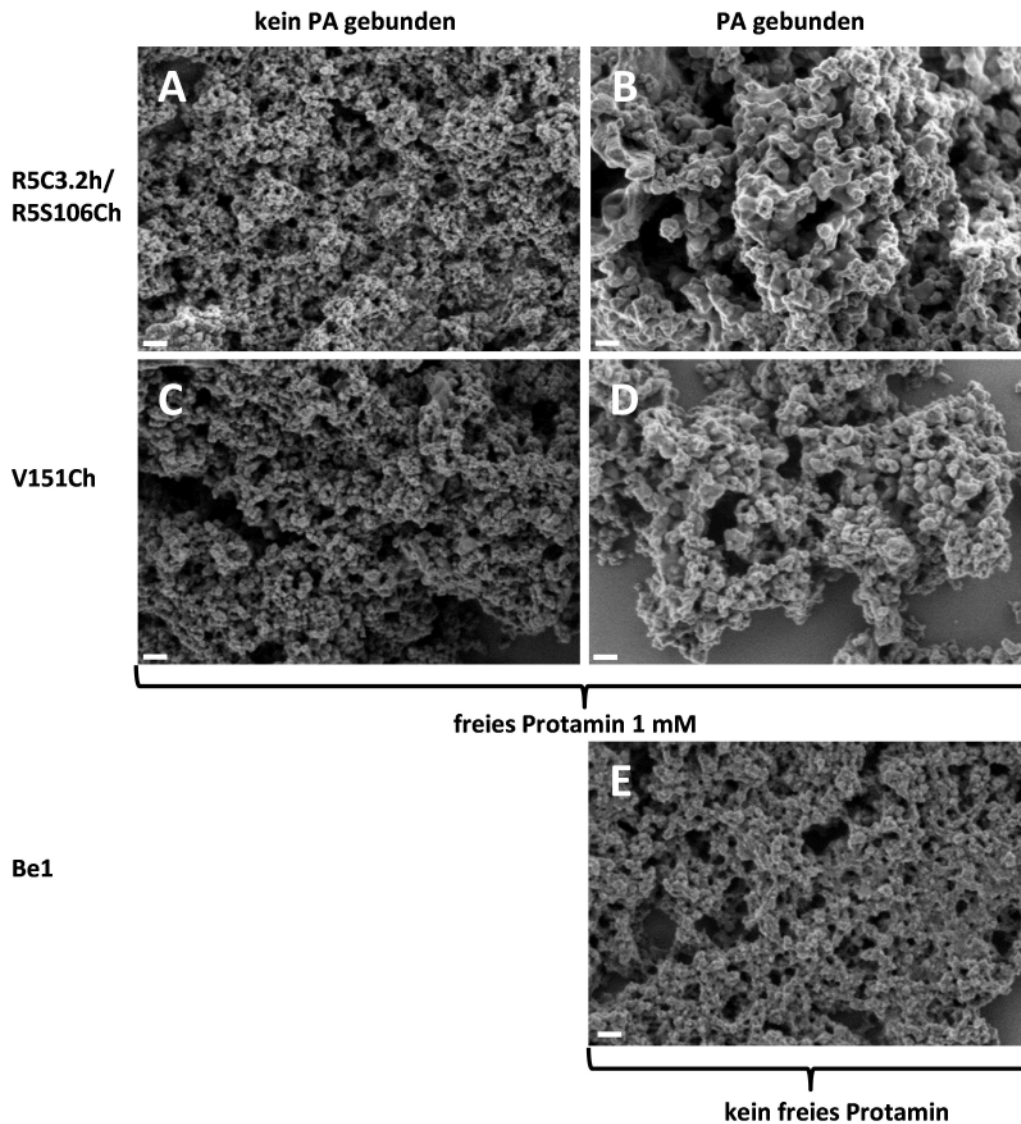


Abb. IV.9: REM-Aufnahmen verschiedener Titandioxid-Präzipitate

1 μM der Protamin-modifizierten Komplexe R5S106Ch (B) und V151Ch (D) und die entsprechenden nicht-modifizierten Komplexe (A bzw. D) wurden in 0,05 m Tris^{7,2} mit 0,0625 M TiBALDH und 980 μM freiem Protamin für 15 min umgesetzt und anschließend zentrifugiert (2 min, 12000 x g). Protamin-modifizierter Be1 wurde ohne freies Protamin mit 0,125 M TiBALDH unter den gleichen Bedingungen inkubiert und das Pellet isoliert. Die Proben wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gewaschen und für REM-Aufnahmen auf Siliciumwavern eingetrocknet. Größenskala in allen Fällen 200 nm. Daten verändert nach DP.

Auch die Präzipitate der Protamin-modifizierten Komplexe (B und D) ähneln sich untereinander wiederum. Die Durchmesser der Einzelpartikel sind mit ca. 100 – 200 nm überwiegend deutlich größer als in den beiden zuvor beschriebenen Ansätzen. Insgesamt scheinen die Partikel eine deutlich

stärkere Tendenz hin zum Verschmelzen aufzuweisen. Die Lücken innerhalb des Netzwerkes sind deutlich größer und unregelmäßiger. Wurde den Proben kein freies Protamin hinzugefügt (E), so ist die Tendenz hin zur Partikelverschmelzung aus tendenziell kleineren Partikeln nochmals ausgeprägter. Es entsteht ein Netzwerk mit einer recht hohen Anzahl an Lücken, deren Größen zwischen 100 und 500 nm liegen.

4. Diskussion

4.1. Fällungen von Titandioxid

TiBALDH ist ein gut geeignetes Ausgangsmolekül zur Bildung von Titandioxid. Im Gegensatz zu Titan(IV)-Halogeniden ist es unter neutralen pH-Bedingungen und Temperaturen unter 100°C Hydrolyse-stabil und kann im Gegensatz zu Titan(IV)-citrat in höheren Konzentrationen gelöst werden [171]. Mittels thermischer Hydrolyse bildet es Titandioxid in Anatas Kristallstruktur, das eine ungewöhnlich geringe Größenverteilung der Partikel aufweist [176]. Die Oxidationsstufe +IV von Titan hat sehr ähnliche Eigenschaften wie Silicium in der gleichen Oxidationsstufe. Hierin begründet sich die strukturelle Verwandtschaft von Titandioxid und Siliciumdioxid. Nicht verwunderlich ist deshalb, dass Titandioxid auf ähnliche Art und Weise wie für Silikat in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben durch polykationische Moleküle polymerisiert werden kann. Sowohl Spermin [177] als auch das R5-Peptid [170] und Protamin [173] sind in der Lage mit TiBALDH als Vorläufermolekül Titandioxid zu bilden. Die Gemeinsamkeit der Titandioxidstruktur ist bei Verwendung der verschiedenen polykationischen Verbindungen der amorphe Charakter, wobei hieraus im Temperaturbereich zwischen 600°C und 1000°C die kristallinen Formen Anatas und Rutil gebildet werden können. Die Temperaturen hierfür sind abhängig vom jeweiligen Molekül, das zur Kondensations-Unterstützung verwendet wurde [170; 171; 173; 174].

Spermin ist in den Konzentrationsbereichen, in denen es in Silikatfällungen eingesetzt wurde, ebenfalls in der Lage, Titandioxid zu bilden und das schon bei relativ niedrigen TiBALDH-Konzentrationen. Das Verbleiben von Spermin im Reaktionsüberstand konnte durch dessen basischen pH-Wert gemäß den Erwartungen bestätigt werden [177]. Wird Protamin in einer sehr hohen Konzentration eingesetzt (500 µM), kann TiBALDH auch in sehr geringen Konzentrationen (5 mM) eingesetzt werden (verglichen mit den Mengen aus der Literatur: 0,125 M [173]; 0,05 M [178]). Bei einer konstant hohen Konzentration des TiBALDHs (0,125 M) zeigte sich, dass für die Protaminkonzentration ein vergleichbarer Mindestwert von etwa 10 µM besteht für eine Bildung von Präzipitaten wie bei der Silikatbildung (Abb. IV.4 resp. Tab. III.1). Allerdings ist eine pH-Abhängigkeit wie bei der Silikatbildung auf Grund der Daten von Jiang *et al.*, die in Tris ab einem pH-Wert von 6,0 eine nahezu konstante Bildungsrate beobachteten, nicht zu erwarten [173].

Bei Protamin-modifizierten Komplexen trat ebenfalls ein vergleichbarer Effekt zur Silikatbildung auf: Auch bei einer Komplexkonzentration von 1 µM, die bei Be1 einer totalen Protaminkonzentration von 2,4 µM entspricht (bei 3xCh 4,5 µM), kam es zur Bildung eines grünen Präzipitats (vgl. Abb. IV.6). Dies wäre aufgrund der Beobachtungen bei LHCII-freien Ansätzen von Protamin nicht zu erwarten. Mögliche Gründe hierfür können der entsprechenden Diskussion in Kapitel 3 entnommen werden (Stichwort: erhöhte lokale Protaminkonzentrationen). Allerdings wurden sowohl bei Be1 als auch 3xCh nur kleine Pellets gebildet. Der limitierende Faktor scheint in diesem Fall die Konzentration

on an Protamin zu sein. Wurde nämlich weiteres TiBALDH zum Überstand gegeben, so kam es zu keiner Bildung eines weiteren Präzipitats (Be1-PA). Wurden allerdings geringe Mengen an freiem Protamin zugefügt (3xCh), so bildete sich ein Pellet. Mit einem hohen Überschuss an Protamin wurde ein nahezu quantitativer Einbau ins Pellet erreicht. Auch Jiang beschreiben Protamin als limitierenden Faktor, da dieses im Präzipitat eingebaut wird und so seine Konzentration durch den Prozess der Titandioxidbildung kontinuierlich verringert wird [173]. Vermutlich sind drei kooperative Gründe zu nennen, warum mit der Zugabe von freiem Protamin große Präzipitate gebildet werden, bei denen nahezu alle Komplexe eingeschlossen werden. Zum einen wird die Grenzkonzentration für Protamin überschritten und zum anderen können freies und Komplex-gebundenes Protamin miteinander wechselwirken. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass bei einer sehr hohen Konzentration an Protamin (letzter Reaktionsschritt) viele Nukleationsursprünge entstehen, was die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit zwischen LHCII und Titandioxid erhöht und so den nahezu quantitativen Einbau ermöglicht.

Bei der Zugabe von freiem Protamin ist die Zuordnung eines speziellen Mechanismus nicht direkt möglich. Neben der Teilnahme der Komplex-gebundenen Protamine am Kondensationsprozess, sind auch Wechselwirkungen der Komplexe mit dem naszierenden Titandioxid und ein damit verbundener Einschluss in das Präzipitat möglich. Die Wechselwirkungsmöglichkeiten von Komplexen mit Silikat wurden bereits in Kapitel II diskutiert und können auf Titandioxid übertragen werden. Bei Ansätzen ohne freiem Protamin liegt ein entsprechender Einbaumechanismus nahe: Teilnahme der Komplex-gebundenen Protamine an der Kondensation von Titandioxid und dabei Einschluss der Komplexe in das Oxid.

Nicht mit Protamin-modifizierter LHCII zeigte in gleicher TiBALDH-Konzentration (0,125 M) keine Bildung eines Präzipitats. Auch eine N-terminale Modifikation mit R5 führte nicht zu einer Bildung von Titandioxid (Abb. IV.7 I K und II K und 6 I K, II K, III und III K). Von den R5-modifizierten Komplexen wäre eigentlich eine Bildung präzipitierbarer Titandioxid-Strukturen zu erwarten. Die Fähigkeit des R5-Peptides, Titandioxid zu bilden, wurde bereits mehrfach gezeigt [170; 171]. Sewell und Wright postulieren dabei vergleichbare Mechanismen bei der Titandioxidbildung wie bei Silikat. Das Peptid ist wie Protamin auch vollständig im Präzipitat zu finden und die Reaktion zeigt nur eine schwache Phosphat-Abhängigkeit [170]. In der vorliegenden Arbeit sind entsprechende Rahmenbedingungen eingehalten worden, allerdings wurde bei deutlich geringeren Konzentrationen gearbeitet, (siehe auch Kapitel I und Publikation Kapitel II). Auch bei der Titandioxidbildung wird die Notwendigkeit des RRIL-Motivs am R5-Peptid zur Assemblierung als Grundvoraussetzung für eine Kondensationsreaktion beschrieben. Eine solche Assemblierung würde quasi-globuläre, rigide Strukturen bedingen, die wiederum wie von Choi *et al.* beschrieben als Voraussetzung für eine Peptid-induzierte Titandioxidbildung dienen [174]. Für ein N-terminal gebundenes R5-Peptid ist eine solche Assemblierung nicht zwangsläufig zu erwarten, da dieses Motiv im Übergangsbereich zum LHCII N-Terminus liegt, was ein Wechselwirken mit anderen R5-Peptidabschnitten erschweren dürfte. Auch

ein ausreichend rigides Verhalten des N-terminalen R5-Peptides an sich, das von Choi *et al.* gefordert wurde, ist nicht zu erwarten. Diese nannten weiterhin für lineare Peptide die Möglichkeit einer Phosphat-induzierten Assemblierung, die allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht auftrat.

Wird den beiden nicht mit Protamin modifizierten Varianten R5S106/160Ch und Be2 sukzessive freies Protamin zugeführt, so kommt es schon bei geringen Protaminkonzentrationen zu einer Pelletbildung. Diese Pellets sind allerdings nur schwach grün gefärbt (mehr bei R5-Variante, kaum bei Be2). Erst bei einer starken Erhöhung der Protaminkonzentration (letzter Reaktionsschritt Abb. IV.7) kommt es in beiden Fällen zu einer intensiven Pelletfärbung, die auch mit einer fast vollständigen Entfärbung des Überstandes einhergeht. Worin liegt dieses Verhalten des extensiven Einbaus bei hohen Konzentrationen an freiem Protamin begründet? Vermutlich sind die geringen Mengen in den ersten Reaktionsschritten relativ schnell verbraucht (es handelt sich in Abb. IV.7 um theoretische Gesamtkonzentrationen, die die im Pellet eingeschlossene Protaminmenge beinhaltet). Es bilden sich nur wenige Nukleationsursprünge, so dass nur wenige Komplexe in das sich bildende Netzwerk eingebaut werden. Bei erhöhter Protaminkonzentration wird eine viel größere Anzahl dieser Ursprünge gebildet, so dass eine Komplex-Titandioxid-Wechselwirkung wahrscheinlicher wird und daher mehr Komplexe eingebaut werden. Inwiefern hier Partikelgrößen eine Rolle spielen, wie es vom Silikat bekannt ist (vgl. Publikation Kapitel II), kann nicht belegt werden, da keine REM-Bilder zu Fällungen bei unterschiedlichen TiBALDH-Konzentrationen existieren.

Wurden verschiedene Protamin-modifizierte und nicht-modifizierte Komplexe mit einer deutlich geringeren TiBALDH-Konzentration inkubiert (8 % im Vergleich zu den vorangegangenen diskutierten Ansätzen), bildeten die Protamin-modifizierten Komplexe R5S106Ch und Be2 ein Pellet; der ebenfalls modifizierte Komplex V151Ch und alle nicht-modifizierten Komplexe aber nicht (Abb. IV.8). R5S106Ch und V151Ch sind in vergleichbarem Ausmaß modifiziert mit Protamin, jedoch bildet nur die R5-veränderte Variante ein Präzipitat. Dies lässt den Schluss zu, dass am Komplex eine ausreichende Menge positiver Ladungen vorhanden sein muss, um präzipitierbare Strukturen zu bilden. Wird diesen Ansätzen das Oligoamin Spermin zugesetzt, bilden sich in allen Reaktionsansätzen grüne Pellets. Anhand der Färbung des Überstandes lässt sich das Ausmaß des jeweiligen Komplexeinbaus vergleichen. Die nicht-modifizierten Varianten von Be2 und V151Ch wurden mit dem geringsten Ausmaß ins Pellet eingebaut, ihre modifizierten Versionen am besten. Hervorzuheben ist die Tatsache, dass die nicht modifizierte Version des R5S106Ch sehr viel besser in das Pellet eingebaut wurde als die beiden anderen nicht-modifizierten Varianten und sogar besser als die eigene modifizierte Variante. Die Kombination aus R5-Sequenz und Protaminmodifikation scheint sich also negativ auf einen Einbau in das Präzipitat bei Spermin-induzierter Copräzipitation auszuwirken. Dies konnte auch beim Vergleich von modifiziertem R5S106/160Ch mit Be2 beobachtet werden (Abb. IV.7 I bzw. II). Hierbei nivellierte sich der Effekt jedoch im Laufe der sukzessiven Zugabe von freiem Protamin. Ein Überschuss an freiem Protamin überlagert also den negativ kooperativen Effekt von R5 und Protamin,

was bei Spermin allerdings nicht gelingt. Dies kann man vermutlich mit den unterschiedlichen Mechanismen der Wirkungsweisen von polykationischen Peptiden und Oligoaminen erläutern (vgl. dazu Einleitung dieses Kapitels). Während Protamin und R5-Peptid als Nukleationsursprünge gelten, um die herum sich Titandioxid ausbildet und die so in das Netzwerk eingebaut werden, ist die Rolle des Spermins eine sozusagen assistierende bei der Verknüpfung von Titanatbindungen, ohne dabei mit im Netzwerk eingeschlossen zu werden. Eine direkte Interaktion ist hierfür nicht notwendig. Diese ist allerdings bei der Verwendung von freiem Protamin mit gebundenem Protamin sehr wahrscheinlich, so dass hier Komplex-nah die nachteiligen Effekte von R5 und Protamin überlagert werden können als bei Spermin, das keinen gezielten Effekt auszuüben scheint.

Unabhängig vom verwendeten Einschlussverfahren wird die Komplexintegrität bei Einschluss in Titandioxid gewahrt. In keinem der Ansätze zeigte sich eine gesteigerte Chlorophyll *b*-Fluoreszenz, die auf eine Störung der Energieweiterleitung im Komplex hindeuten würde.

4.2. Aussichten und Entwicklungspotential

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Komplexeinschlusses auf die Stabilität bei thermischem Stress nicht untersucht. Auf Grund der großen Ähnlichkeit von Titandioxid und Silikat sollte es möglich sein, Erwartungen hinsichtlich des Stabilisierungspotentials zu formulieren. Bei Silikat konnte ein stringenter Zusammenhang zwischen Partikelgröße und dem Ausmaß der Stabilisierung gezeigt werden (siehe dazu Kapitel I R5c3.2h in Phosphat und Kapitel II). Je kleiner und uniformer die Partikel waren und eine Tendenz zur Ausbildung von flächigen Strukturen nicht gegeben war, desto stabiler zeigten sich die Komplexe gegenüber thermischem Stress. Von den Proben, die rasterelektronenmikroskopisch analysiert wurden, zeigten die Copräzipitationsansätze von R5C3.2h und V151Ch mit Protamin grundsätzlich eine solche Strukturierung, die erwarten ließe, dass eingeschlossene Komplexe in aussichtsreichem Maße stabilisiert werden. Hatten diese Komplexe Protamin kovalent gebunden und wurden mit freiem Protamin vermischt, so war eine klare Tendenz hin zum Verlust partikulärer Strukturen zu erkennen. Gleiches gilt für einen Ansatz ohne freies Protamin mit einem Protamin-modifiziertem Be1. Hinsichtlich des Ausmaßes an Komplexeinbau zeigten nicht-modifizierte R5LHCII sowohl mit freiem Protamin als auch mit Spermin eine stärkere Tendenz im Pellet eingeschlossen zu werden als R5-freie Varianten (bislang keine REM-Daten bezüglich Spermin-induzierter Partikel). Aus diesem Grund sollte ein Augenmerk auf die Optimierung eines Reaktionsprotokolls von R5LHCII mit TiBALDH und einer freien polykationischen Verbindung gelegt werden (Variation Pufferart und pH-Wert), die hinsichtlich ihres Potentials zur Komplexstabilisierung überprüft und durch REM charakterisiert werden sollte.

Welches weitere Potential besitzt ein in Titandioxid-eingeschlossener LHCII? Titandioxid ist ein Halbleiter und energiereiches UV-Licht kann die Bildung eines Elektronen-Loch-Paares induzieren, was z.B. zur fotokatalytischen Wasserspaltung genutzt werden kann [179]. Die Halbleiter-Eigenschaft ermöglicht den Einsatz in Farbstoffsolarzellen, den sog. Graetzel-Zellen [7]. Das biogen hergestellte Titandioxid zeigte in Röntgenbeugungsexperimenten amorphe Eigenschaften und ist damit für einen Einsatz als Halbleiter nicht geeignet, da die vielen Defektstellen im amorphen Titandioxid die Wahrscheinlichkeit für Rekombinationsereignisse drastisch steigen lässt [180]. Erhöhte Temperaturen ermöglichen die Umwandlung der amorphen Struktur in die kristallinen Formen Anatas bzw. Rutil [170; 171; 173; 174; 177]. Kröger *et al.* gelang es mit einem spezifischen Silaffin-Peptid, rSilC, Titandioxidstrukturen herzustellen, die Rutilanteile enthielten [172]. Um LHCII in fotovoltaischen Anwendungen basierend auf Titandioxid zu verwenden, muss eine thermische Umwandlung in kristalline Formen vermieden werden, da dieser dabei pyrolytisch zersetzt würde. Allerdings wäre es vorstellbar, dünne Schichten kristallinen Titandioxids (bevorzugt Anatas) herzustellen und dieses mit Protamin-modifiziertem R5LHCII zu inkubieren. Eine Wechselwirkung des Komplexes mit dem Titandioxid ist zu erwarten. Um den Komplex in ein kleinporiges Netzwerk anorganischer Partikel einzuschließen (dieser Einschluss wäre bei einer einfachen Inkubation auf Grund von Diffusionslimitierung nicht zu erwarten; vgl. Publikation Kapitel II), würde anschließend mit TiBALDH- oder Kieselsäurelösung inkubiert werden. Dabei sollten die auf dem Anatas gebundenen Komplexe in der Lage sein, die Bildung weiterer Oxidpartikel zu ermöglichen, die ihn eng einfassen und somit stabilisieren. Besonders die Bildung des transparenten Silikats ist für eine technische Anwendung dabei interessant. Es wurde bereits gezeigt, dass LHCII, gebunden an Quantum Dots, diese durch Übertragung der Anregungsenergie für eine Ladungstrennung sensibilisieren kann [53]. Würde es gelingen in dem oben beschriebenen Aufbau LHCII-Quantum Dot-Hybride einzusetzen, könnten diese als Elektronendonoren für Anatas dienen und so thermisch stabilisiert in einer fotovoltaischen Applikation nutzbar gemacht werden.

V. Kapitel: Weitere Versuche

1. Einleitung

SPR-Spektroskopie

SPR-Spektroskopie ist eine Messmethode, bei der die Veränderung des Brechungsindex oberhalb einer Goldoberfläche detektiert wird [181]. Die Einstrahlung von Licht in einem spezifischen Winkel auf die Goldoberfläche kann eine Oberflächenplasmonwelle auslösen. Eine Oberflächenplasmonwelle ist eine oszillierende Elektronendichte an der Metalloberfläche, mit der ein evaneszentes elektromagnetisches Feld (ein Oberflächenplasmon) einhergeht. Dessen Ausbreitung parallel zur Oberfläche ist abhängig vom Abstand zur Oberfläche und wird durch den Brechungsindex oberhalb der Oberfläche beeinflusst. Es existiert ein kritischer Winkel des von unten auf die Goldoberfläche eingestrahlt Lichts, bei dem die Anregung eines Oberflächenplasmons maximal und die Reflexion des Lichtes an der Oberfläche minimal ist. Verändert sich der Brechungsindex über der Oberfläche, z.B. durch Bindung eines Liganden an der Oberfläche, muss das Licht in einem veränderten Winkel eingestrahlt werden, um die minimale Reflexion des Lichtes zu erhalten. Das eigentliche Messsignal der Veränderung oberhalb der Goldoberfläche ist also die Winkelveränderung für eine minimale Reflexion. Die SPR-Spektroskopie wird häufig dazu verwendet, um Bindungen zwischen Molekülen, z.B. Rezeptor-Ligand-Bindungen, zu analysieren und Bindungskonstanten zu bestimmen.

Mit der Kondensation von Kieselsäure in Silikat geht ebenfalls eine Veränderung des Brechungsindex einher. Die Bindung eines polykationischen Proteins – hier das Silaffin-ähnliche rekombinante Protein Sx3 - auf die Sensorchipoberfläche mit anschließender Applikation von Kieselsäure sollte zu einer Silikatbildung auf dem Chip führen, die eine Veränderung des Brechungsindex hervorruft. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Reaktionsaufbau optimiert werden, der es erlaubt die Kondensation von Silikat durch polykationische Proteine aufzulösen. Hiermit soll eine alternative Methode zur Quantifizierung von Silikat-fällenden Eigenschaften von Proteinen etabliert werden.

Einschluss von LHCII in Polyacrylamid

Ruban *et al.* zeigten, dass LHCII eingeschlossen in ein Netzwerk aus PAA spektroskopisch analysiert werden kann [182]. Die Poren in diesem PAA-Netzwerk besitzen eine Größe, die in etwa in dem Bereich der Poren von Silikat liegt, in das LHCII mittels Copräzipitation in Tris bei pH 6,0 eingeschlossen wurde (siehe dazu Kapitel II) [181]. Eine entscheidende Eigenschaft von PAA für die Proteinanalytik besteht in seinem inerten Verhalten gegenüber Proteinen. Anders als für die negativ geladene Silikatoberfläche ist ein Wechselwirken mit LHCII nicht zu erwarten. Eine im Rahmen dieser Arbeit zu klärende Frage war es, ob ein organisches Polymernetzwerk wie PAA zu einer Stabilisie-

rung des LHCII gegenüber thermischem Stress in der Lage ist. Für den Einschluss mussten geeignete Reaktionsbedingungen etabliert werden, die die Integrität der Komplexe nicht schädigen. Außerdem sollte Silikat-eingeschlossener LHCII durch Einpoly-merisieren zugänglich für CD-spektroskopische Anwendungen gemacht werden.

2. Material und Methode

2.1. Material

Im Rahmen der SPR-Experimente wurden Sensorchips der Firma Xantec, Düsseldorf verwendet. Hierbei kam ein 2-dimensional Nitrilotriessigsäure- (NTA-) derivatisierter Chip (NIP) zum Einsatz, der mit NiCl_2 -Lösung gebrauchsfertig gemacht wird.

2.2. Methoden

2.2.1. Darstellung des polykationischen silaffinähnlichen Proteins Sx3

Die rekombinante Herstellung von Sx3 verläuft nach erfolgreicher Überexpression und Zellaufschluss über zwei Reinigungsschritte, welche durch einen Proteaseverdau zur Entfernung der pelB-Leadersequenz voneinander getrennt werden.

2.2.1.1. Herstellung einer Überexpressionskultur

LB-Medium

Bacto-Tryptone	1,0 % (w/v)	
Yeast-Extract	0,5 % (w/v)	
NaCl	1,0 % (w/v)	
mit NaOH	5 M	auf pH 7,5 einstellen

die LB-Lösung wird autoklaviert; für das Ausstreichen der LB-Platten:

Agar	1,5 %
------	-------

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml
Chloramphenicol (Cam)	34 mg/ml
IPTG	1 M

Der Bakterienklon wurde auf LB-Agarplatten ($c_{\text{end}}(\text{Amp}) = 100 \mu\text{g/ml}$; $c_{\text{end}}(\text{Cam}) = 34 \mu\text{g/ml}$) ausgestrichen und üN im Brutschrank wachsen gelassen. Von dieser Platte wurde eine Einzelkolonie in 25 ml LB-Amp/Cam-Medium überführt und üN auf dem Schüttler bei 180 Upm und 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Kultur bei $12000 \times g$ für 2 min abzentrifugiert, das Pellet in 25 ml frischem LB-Amp/Cam-Medium aufgenommen, in 800 ml LB-Amp/Cam-Medium überführt und bei 37°C auf dem Schüttler (198 Upm) platziert. Um den Wachstumszustand zu kontrollieren, wurde alle 30 min die $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ der Kultur bestimmt (Messung gegen steriles LB-Medium). Bei Erreichen einer $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ zwischen 0,6 und 1 wurde $1/1000 \times \text{Vol.}$ IPTG zugegeben. Die Expressionsphase betrug 4,5 h. Die Bakterienkultur wurde bei 4°C für 10 min mit $12000 \times g$ abzentrifugiert und die Pellets eingefroren.

2.2.1.2. Isolierung des überexprimierten Sx3

MgCl ₂	1 M
DTT	1 M
Benzonase	25 U/μl
Tris ^{7,5}	1 M
<u>Harnstoff-Lysispuffer</u>	
Harnstoff	8 M
Tris ^{7,5}	0,1 M

Das Pellet aus 800 ml (alle folgenden Angabe beziehen sich auf dieses Kulturvolumen)) Überexpressionsmedium wurde in 25 ml H₂O_{dest} resuspendiert. Hierzu wurden 1/1000 x Vol. MgCl₂ (c_{end} = 1 mM), 1/50 Vol. x DTT (c_{end} = 0,02 M) und Benzonase (210 U) gegeben. Der Zellaufschluss erfolgte in drei Durchgängen in der French Press. Das Zelllysate wurde für 7 min bei 15000 x g abzentrifugiert und der Überstand aufbewahrt.

Das Pellet wurde in fünf Schritten gewaschen, um das Protein in Lösung zu bringen, wobei jeweils bei 12000 x g und 20°C für 7 min zentrifugiert und anschließend nach einem festen Muster resuspendiert wurde. Die beiden ersten Waschschrte wurden mit 16 ml 0,02 M Tris^{7,5} durchgeführt. Für die übrigen Waschschrte wurden 12 ml Harnstoff-Lysis-Puffer benutzt.

Waschschritt 1	5 min Ultraschall (40°C)
	1 min klopfen und vortexen
	2 min Ultraschall
	1 min vortexen
	90 s Ultraschall
	30 s vortexen und schütteln
Waschschritt 2	3 min Ultraschall
	1 min klopfen und vortexen
	90 s Ultraschall
	1 min vortexen und schütteln
Waschschritt 3 – 5	2 min Ultraschall
	30 s klopfen und vortexen
	1 min Ultraschall
	30 s vortexen und schütteln

Um den Sx3-Gehalt in den Waschfraktionen zu bestimmen, wurde eine Gelelektrophorese auf einem Tris-Tricingel (Durchführung nach [110]) durchgeführt. Für die weitere Prozessierung wurden die Fraktionen ausgewählt, in denen Sx3 in einer hohen Konzentration vorlag. Jedoch konnte nicht der

erste Überstand verwendet werden, da in diesem die DTT-Konzentration noch so hoch war, dass das Ni^{2+} der Chelating-Sepharosesäulen reduziert wurde. Vor Auftrag auf die Ni^{2+} -Chelating-Sepharosesäulen wurden die ausgewählten Waschfraktionen durch BioRad-Kartuschen filtriert, um störende Feststoffe aus den Lösungen zu entfernen.

2.2.1.3. Aufreinigung der Fusionsproteine mittels Ni^{2+} -Chelating-Sepharosesäulen

NiCl_2	0,3 M
Tris ^{7,5}	0,02 M
<u>Ni-Säulen-Waschpuffer</u>	
Harnstoff	8 M
Tris ^{7,5}	0,1 M
NaCl	0,2 M
Imidazol	0,02 M
<u>Ni-Säulen-Elutionspuffer</u>	
NaCl	2,5 M
Imidazol	0,5 M
Tris ^{7,5}	0,02 M

Um Fremdproteine aus der Lösung zu entfernen, wird bei dem Verfahren das Vorhandensein eines His₆-Tags am C-Terminus des Sx3 ausgenutzt. Dieser bildet mit den an die Sepharose gebundenen Ni^{2+} -Ionen Chelatkomplexe. Die übrigen Proteine in der Lösung binden nicht bzw. nur schwach an diese und können so durch Waschschrte entfernt werden. Die Elution von Sx3 erfolgt durch Imidazol-haltige Pufferlösung.

Anhand des Gelbildes aus IV.2.2.1.2 wurde die Menge an Sx3 abgeschätzt, welche auf die Ni^{2+} -Sepharosesäule aufgetragen werden soll. Pro mg Protein wurden 1 ml Ni^{2+} -Chelating-Sepharosesäule (Ni-Säule) vorbereitet. Die Sepharose wurde in 1 ml Aliquots in Biorad-Kartuschen gefüllt. Es folgte das Vorspülen des Säulenmaterials mit drei Säulenvolumina (SV) $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$. Danach wurden drei SV NiCl_2 -Lösung aufgetragen und mit fünf SV Tris^{7,5} nachgespült (ab dem Auftragen des NiCl_2 wurden alle Säulendurchläufe getrennt von den vorherigen aufgefangen und im Schwermetallabfall entsorgt). Nach Auftragen von fünf SV Ni-Säulen-Waschpuffer war das Säulenmaterial gebrauchsfertig und wurde aus den Kartuschen in ein verschraubbares 400 ml Kunststoffgefäß überführt. Hierzu wurden die filtrierten Waschfraktionen gegeben. Der verschlossene Becher wurde für mindestens 45 min in einer großen Schale auf dem Inkubator bewegt. Das Säulenmaterial wurde durch eine Nylongaze filtriert vom Überstand abgetrennt und anschließend in ein 40 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das Säulenmaterial wurde zweimal mit zwei SV Ni-Säulen-Waschpuffer gewaschen, wobei gründlich gevortext wurde. Die Waschlösung wurde von dem beladenen Säulenmaterial durch eine 20-sekündige Zentrifugation bei maximaler Umdrehungszahl abgetrennt und durch Dekantieren entfernt.

Anschließend wurde das Protein in acht Schritten mit je einfachem SV Ni-Säulen-Elutionspuffer eluiert. Der Elutionspuffer wurde zum Säulenmaterial gegeben und kräftig gevortext. Nach 20-sekündiger Zentrifugation wurden die jeweiligen Eluate dekantiert und über Bioradkartuschen filtriert. Die erhaltenen Elutionsfraktionen wurden auf Tris-Tricingelen auf ihren Gehalt an Sx3 hin überprüft. Hierbei zeigte sich, dass stets die Fraktionen 1-3 mehr als 90 % des Gesamtproteins enthielten, weshalb mit diesen Fraktionen weitergearbeitet werden konnte, ohne das Ergebnis der Kontrollgele abzuwarten.

2.2.1.4. Prozessierung von Sx3

Um die PelB-Signalsequenz vom Protein zu entfernen, wurden die vereinigten Ni-Säulen-Eluate einem Verdau durch die FXa-Endoprotease unterzogen. Die Eluate wurden 1:5 mit H₂O_{dest} verdünnt, da die Protease nicht ausreichend im Elutionspuffer aktiv ist. In dieser Lösung wurde der Verdauungspuffer zusammengestellt, so dass folgende Endkonzentrationen erhalten wurden:

NaCl	0,1 M (bereits ausreichend vorhanden => keine Zugabe)
Tris ^{8,0}	0,02 M
CaCl ₂	5 mM

Aus dem Gelbild aus IV.2.2.1.3 wurde die Sx3-Totalkonzentration abgeschätzt. Hiernach richtete sich die Menge an einzusetzender Fxa-Endoproteasenmenge. Pro mg Protein wurden 7,5 U Protease benötigt, wobei die Endoprotease eine spezifische Aktivität von 2 U/μl Protein besitzt. Der Verdau sollte für mindestens vier Stunden bei 37 °C ablaufen. Die Verdauungsreaktion wurde durch die Zugabe von Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Endkonzentration = 0,01 M) im Verdauungsansatz bewirkt.

2.2.1.5. Proteinaufreinigung mittels SP-Sepharose-Kationenaustauschersäule

Vorbereitung der SP-Sepharose-Kationenaustauschersäule:

<u>SP-Waschpuffer</u>	
Tris	0,025 M
NaCl	0,025 M
eingestellt auf pH 8,2 mit HCl	
angesetzt in H ₂ O _{reinst}	
<u>1. Elutionspuffer (10 ml):</u>	
NaOH	0,05 M
<u>2. Elutionspuffer (26 ml):</u>	
NaOH	0,05 M
NaCl	0,25 M

HCl	2 M
Phosphat ^{7,0}	0,5 M

Obwohl theoretisch 70 µg Protein pro µl Säule gebunden werden können, wurde das Säulenmaterial hier in einem Verhältnis von 3 µg Protein pro µl Säulenmaterial eingesetzt. Die entsprechende Menge an Material wurde in eine Glaschromatographiesäule mit Hahn gefüllt. An dieser Stelle ist besonders auf die Porosität der Fritte zu achten, da diese bei zu großer Porosität (Por. 0) Säulenmaterial nicht zurückhält bzw. bei zu geringer (3) verstopft. Die Wahl richtet sich auch nach dem verwendeten Säulenmaterial und dessen Sepharosekugeldurchmesser. Um die Säule einsatzfertig zu machen, wurde mit drei SV H₂O_{dest} gewaschen und anschließend mit fünf SV SP-Waschpuffer äquilibriert.

Proteinbindung und -elution an SP-Sepharose-Kationenaustauschersäule:

Um den Salzgehalt der Probe zu verringern, wurde die Proteinlösung nach dem Verdau nochmals 1:10 mit H₂O_{dest} verdünnt. Die Beladung der Säule erfolgte mit einer Tropfgeschwindigkeit von 10 ml/min. Bei der Elution wurden jeweils 3 ml-Fractionen aufgefangen. Zu Beginn wurden 10 ml des 1. Elutionspuffers verwendet, danach wurde mit dem 2. Elutionspuffer weiter eluiert. Dies hatte den Vorteil, dass unverdautes Sx3 in den ersten Fractionen abgelöst wurde und erst mit der Erhöhung der NaCl-Konzentration die Elution des verdauten Sx3 einsetzte. Die Eluate mussten sofort neutralisiert und in Puffer gelagert werden. Es wurde deshalb das 0,0258-fache Volumen der Elutionsfractionen an HCl und das 0,01-fache Volumen an Phosphat-Puffer vorgelegt. Jede Einzelfraktion wurde hinsichtlich ihres pH-Wertes mittels Indikatorpapier überprüft und ggf. nachtitriert.

Die Elutionsfractionen wurden mittels einer Tris-Tricin-Gelelektrophorese auf ihren Sx3-Gehalt hin überprüft, woraufhin man die Fractionen auswählte, die weiterverwendet wurden. Ein Aufkonzentrieren der Proben war bei der Verwendung von 5 kDa-PES-Membranfiltersystemen der Fa. Sartorius möglich (die Verwendung anderer Membraneinheiten führte zu einem Totalverlust an Sx3).

2.2.1.6. Regeneration der SP-Sepharosesäule

NaCl	1 M
SDS	1 % (w/v)
Ethanol	20 % (v/v)

Das Säulenmaterial wurde mit zehnfachem SV H₂O_{dest} gespült. Danach folgten Waschungen mit zehnfachem SV NaCl- und SDS-Lösung, wobei zwischendurch zehnfachem H₂O_{dest} aufgetragen wurden. Bevor das Säulenmaterial in 20 %-igem Ethanol gelagert werden konnte, wurde nochmals mit

H₂O_{dest} gespült. War das Säulenmaterial nicht trocken gelaufen, so musste keine Entgasung im Rotationsverdampfer stattfinden. Die Säule konnte im Kühlraum bis zur nächsten Verwendung gelagert werden.

2.2.1.7. Konzentrationsbestimmung des Sx3

Zur Konzentrationsbestimmung von Sx3 wurde ein Spektrum von 200 – 400 nm aufgenommen und die Höhe des Extinktionspeaks bei etwa 278 nm bestimmt. Hieraus ließ sich die Konzentration nach

$$c = E / \varepsilon * d$$

mit c der Konzentration in M,

E der Extinktion bei 278 nm,

ε dem molaren Extinktionskoeffizient in M⁻¹ * cm⁻¹ (4200 M⁻¹ * cm⁻¹) und

d der Küvettendicke in cm

bestimmen.

2.2.2. Optimierung der Zweitbindung von His₆-Tagproteinen an Ni²⁺-Chelating-Anker

Sämtliche Puffer und verwendete Materialien entsprachen denen einer einfachen Rekonstitution und Trimerisierung (vgl. 3.2.1.3). Gradienten und Laufparameter der Ultrazentrifugation wurden ebenfalls gemäß einer herkömmlichen Trimerisierung durchgeführt. Die konkrete Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist im entsprechenden Ergebnisteil IV.0 beschrieben. Das EDTA wurde nach der Inkubationsphase mit Hilfe von Ultrazentrifugationseinheiten entfernt. Die Lösungen wurden dabei dreimal auf 1/50 des Ausgangsvolumens aufkonzentriert und mit Pufferlösung wieder auf dieses aufgefüllt. Danach konnten die Proben auf die Ni-Säulen aufgetragen werden.

2.2.3. SPR-Spektroskopie

SPR-Spektroskopie basiert darauf, dass der refraktäre Index eines Mediums oberhalb einer Goldoberfläche das evaneszente Feld der Oberflächenplasmonen beeinflusst und sich so der kritische Winkel der Totalreflexion eines von unten auf die Goldschicht eingestrahlt Lichtstrahls verändert. Diese Winkelveränderung stellt das Messsignal der Methode dar. Auf einem Sensorchip sollte das polykationische Protein Sx3 immobilisiert werden und durch dieses auf der Chipoberfläche eine Silikat Kondensation induziert werden, die mittels SPR verfolgt werden sollte.

Die Immobilisierung des polykationischen Proteins Sx3 sollte über eine Chelatbindung des His₆-Tags an Ni²⁺-NTA erfolgen. Die Sensorchips wurden für eine Proteinbindung aktiviert, welches die Bindung der Ni²⁺-Ionen beinhaltet. Nach diesem Schritt konnten Proteine immobilisiert werden und weitere Untersuchungen vorgenommen werden. Für sämtliche Messungen wurde die 4-Port-Fließzelle der Fa. Reichert verwendet. Als Laufmittel diente in allen Fällen H₂O_{reinst}, das sterilfiltriert und entgast wurde.

2.2.3.1. Aktivierung des NIP-Sensorchips

EDTA 0,5 M (pH 8,5)

NiCl₂ 0,3 M

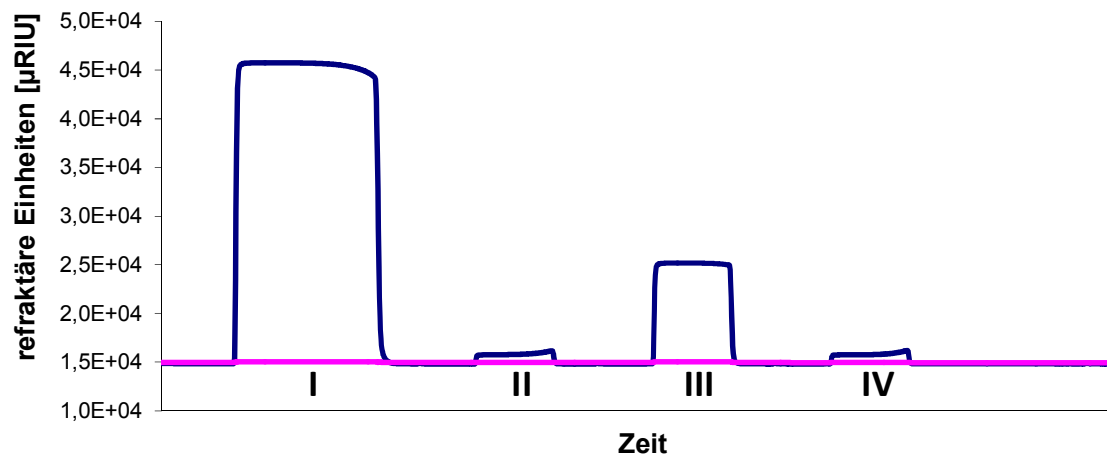
Immobilisierungspuffer

Hepes-Puffer pH 7,4 0,01 M

NaCl 0,15 M

Tween 20 0,005 % (w/v)

Sämtliche verwendeten Lösungen wurden vor ihrer Verwendung mit Sterilfiltereinheiten sterilisiert und anschließend entgast. Lösungen sollten alle zwei Tage frisch angesetzt bzw. frisch entgast werden, da Luftblasensignale die Messungen signifikant beeinträchtigen können. Die Aktivierung der NIP-Sensorchips erfolgte über den Autosampller. Abb. V.1 zeigt ein typisches Spektrogramm einer Aktivierung des NIP-Chips. Die entsprechenden Injektionsparameter der Einzelkomponenten sind der Abbildung ebenfalls zu entnehmen. Zwischen den Injektionen wurden 3-minütige Basislinien gemessen.



Fließgeschwindigkeit		50 µl/min	
Peak	Injektionslösung	Injektionsvolumen [µl]	Injektionszeit [s]
I	EDTA	250	270
II	Immobilisierungspuffer	150	150
III	NiCl ₂ -Lösung	150	150
IV	Immobilisierungspuffer	150	150

Abb. V.1: Aktivierung NIP-Chipoberfläche

Gemäß des Durchführungsprotokolls (Xantec-Anleitung für NIP-Chip) wurde der Chip aktiviert. Die Proben wurden über den Autosampller injiziert. Verwendung fand dabei die 4-Port-Fließzelle, wobei nur der Messkanal (blau) überströmt wurde. Die Bereiche zwischen den Signalen sind Basislinien-Messbereiche.

2.2.3.2. Immobilisierung von Sx3

Sx3 wurde ausschließlich auf dem Messkanal des Sensorchips immobilisiert. Die Fließzelle wurde dabei so konfiguriert, dass lediglich dieser überströmt wurde (vgl. Abb. V.2). Das Protein wurde über

den Autosampler appliziert. Die entsprechenden Fließparameter sind dem entsprechenden Ergebnisteil dieses Kapitels zu entnehmen (Abb. V.6 und Abb. V.8). Mit Hilfe des Immobilisierungspuffers wurde die gewünschte Konzentration an Sx3 eingestellt.

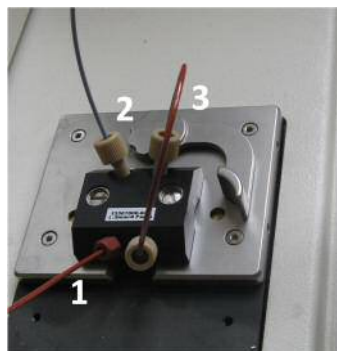


Abb. V.2: Selektive Messkanalanströmung 4-Port-Fließzelle

Der Messkanal liegt zwischen den Ports 1 und 2. Über den Zugang 1 wird der Messkanal angeströmt und die Probe appliziert. Ausgangsport 2 führt die Lösung direkt ins Abfallgefäß. Mit Schlauch 3 werden die beiden Ports des Referenzkanals abgeschlossen. Im abgebildeten Zustand erfolgt kein Überströmen des Referenzkanals.

2.2.3.3. Applikation von Kieselsäure über halbautomatisches Injektionsventil

Zur Applikation von Kieselsäure im SPR-Gerät sind einige Vorbemerkungen zu machen: Grundsätzlich besteht die Gefahr, dass bei der verwendeten Kieselsäurekonzentration von 0,02 M Autopolykondensationsprozesse auftreten. Dies könnte innerhalb des Gerätes, vor allem innerhalb des Autosamplers zu schwerwiegenden Komplikationen führen. Um dem entgegenzuwirken, erfolgt die Injektion der Kieselsäure über das sog. halbautomatische Injektionsventil (Abb. V.3 A). Im Falle einer ungewollten Kieselsäurekondensation können hier einfache Maßnahmen zur Beseitigung der Störung ergriffen werden. Zudem ist zu beachten, dass Mess- und Referenzkanal parallel von der gleichen Menge an Kieselsäurelösung angeströmt werden. Würde zuerst einer der beiden Kanäle und danach der andere überströmt werden, führte dies dazu, dass möglicherweise schon oligomere Silikatspezies den zweiten Kanal erreichen und hier leichter präzipitieren als es Kieselsäure tun würde. Aus diesem Grund wird das Leitungssystem in zwei Teilleitungssysteme aufgezweigt (Abb. V.3 B). Dabei ist es ganz entscheidend, dass beide zur Fließzelle hinführenden Leitungsschenkel die gleiche Länge besitzen, um den gleichen Strömungswiderstand zu ermöglichen. Nur so kann garantiert werden, dass die Kieselsäuremengen in Mess- und Referenzkanal gleich groß sind. Die Entfernung der Kieselsäure erfolgte mit NaOH, das zu einer Auflösung von Silikat führt. Die Optimierung der NaOH-Konzentrationen sind dem entsprechenden Ergebnisteil zu entnehmen.

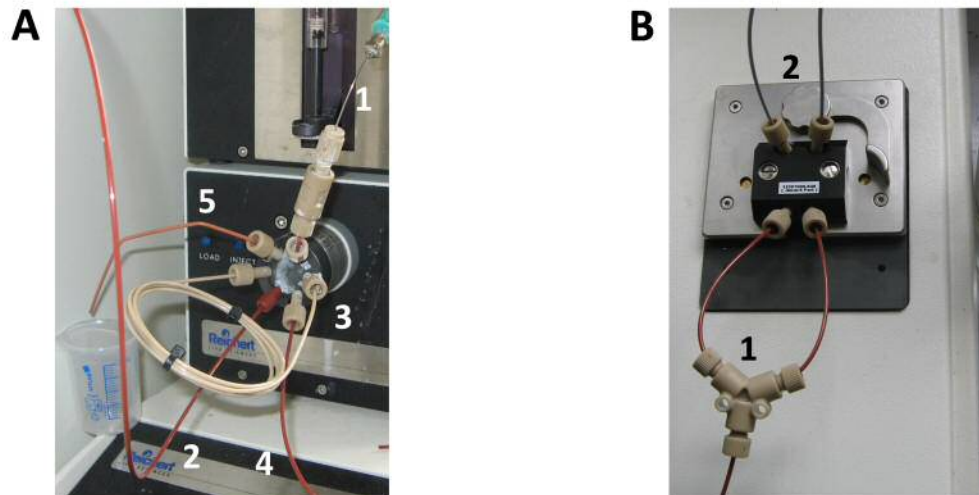


Abb. V.3: Konfiguration halbautomatisches Injektionsventil und Parallelanströmung 4-Port-Fließzelle
 Das halbautomatische Injektionsventil (A) wird über eine Spritze (1) mit der zu injizierenden Lösung befüllt, die über die Probenschleife (3) in den Gerätestrom eingeschaltet werden kann. Laufpuffer gelangt über Zuleitung 2) direkt von der Gerätepumpe in das Ventil und strömt über 4) in Richtung Messzelle. Überschüssige Injektionslösung wird über (5) in das Abfallgefäß geleitet.
 Die 4-Port-Fließzelle (B) wurde auf Mess- und Referenzkanal parallel angeströmt. Das Laufmittel wurde dabei an einem T-Port (1) in zwei gleiche Parallelströme aufgetrennt. Die Ableitung ins Abfallgefäß erfolgte aus beiden Kanälen parallel (2).

Kieselsäurelösung wurde durch Hydrolyse von TMOS für 30 min bei RT hergestellt und entgast. Auch NaOH wurde über die entsprechende Apparatur appliziert. Genau wie die Kieselsäurelösung wurde diese in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ hergestellt und ebenfalls entgast. Die entsprechend optimierten Einstellungen der Injektionen sind den Abbildungen im Ergebnisteil zu entnehmen (Abb. V.7 und Abb. V.8).

2.2.3.4. Regeneration der NIP-Chipoberfläche

SDS/Imidazol-Puffer

SDS	0,5 % (w/v)
Imidazol	0,5 M

EDTA 0,5 M (pH 8,5)

Glycin 0,05 M pH 9,5

Routinemäßig wurde nach der Applikation von Kieselsäure folgender Regenerationszyklus verwendet: Zweimalige Injektion von 0,01 M NaOH über das halbautomatische Injektionsventil, gefolgt von einer einmaligen Injektion von $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ über selbiges (Injektionsvolumen 250 μl , Fließgeschwindigkeit (FG) 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, Injektionszeit 2 min). Anschließend erfolgte ein Umbau der Anströmvorrichtung, im Zuge dessen der Autosampler wieder in der Flusschleife eingegliedert wurde. Über diesen wurden nacheinander folgende drei Reinigungslösungen über beide Kanäle gespült: SDS/Imidazol-Puffer – EDTA – Glycin (jeweils Injektionsvolumen 150 μl , FG 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, Injektionszeit 2,5 min). Es folgte die Aktivierung des Chips nach IV.2.2.3.1 und eine erneute Proteinimmobilisierung konnte

vorgenommen werden. Die hierfür verwendete Fließzellkonfiguration ist in Abb. V.4 zu sehen. So werden nacheinander Mess- und Referenzkanal angeströmt.

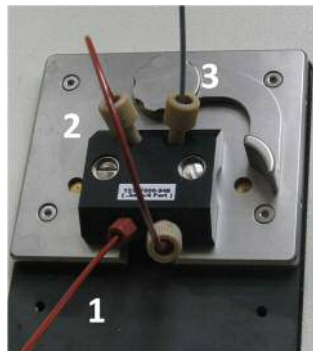


Abb. V.4: Serienanströmung von Mess- und Referenzkanal in 4-Port-Fließzelle

Das Laufmittel strömt den Messkanal über Port 1 an und wird über eine Schleife (2) direkt zum Eingangsport des Referenzkanals geführt. Aus diesem wird es über einen abführenden Schlauch (3) zum Abfallgefäß geführt.

2.2.4. Einschluss von nativem LHCII in Polyacrylamid

In einem Netzwerk aus PAA sind möglicherweise Bewegungsvorgänge, die durch thermische Energie bedingt werden, deutlich eingeschränkt. Eine offene Frage dabei ist, ob diese Einschränkung ausreicht, damit ein stabilisierender Effekt gegenüber LHCII auftritt, insofern sich dieser im PAA-Netzwerk befindet. Aus diesem Grund wurde nativer LHCII in PAA-Gele unterschiedlichen Polymerisierungsgrades eingeschlossen und hinsichtlich seiner Stabilität bei hohen Temperaturen spektroskopisch untersucht.

2.2.4.1. Solubilisieren von nativem LHCII

Im Rahmen dieser Arbeit wurde kein nativer LHCII präpariert. Die Darstellung der hier verwendeten Komplexe erfolgte nach Krupa [183]. Die gelagerten Komplexe wurden zentrifugiert und die überstehende Lösung entfernt. Das Pellet (0,8 mg Chl) wurde in 1 ml 0,5 %-iger LM-Lösung (gepuffert mit 0,05 M Tris^{7,0}) aufgenommen und auf Eis stehen gelassen. In regelmäßigen Abständen wurde gevortext bis das Pellet vollständig gelöst war. Anschließend wurde die Lösung mit 0,05 M Tris^{7,0} auf einen LM-Endgehalt von 0,1 % verdünnt. Die Konzentration an LHCII wurde fotometrisch bestimmt (vgl. 3.2.1.3.E)).

2.2.4.2. Einpolymerisieren von LHCII in Polyacrylamidgele

Acrylamidlösung	30 % (w/v) [29,1:0,9 AA:BAA]
TEMED	10 % (v/v)
APS	10 % (w/v)
Glycerin	80 % (w/v)
<u>Polymerisationspuffer (PP)</u>	
Tris ^{7,0}	0,05 M
LM	0,1 % (w/v)

Agarosegellösung

1 x TAE-Puffer (vgl. I.2.2.1.4)

Agarose 2 % (w/v)

Die Polymerisierung der LHCII-haltigen Gelproben wurde direkt in den Küvetten (sowohl Polystyrol (PS) als auch Acryl) durchgeführt. In diese wurde zuvor ein Agarosekissen gegossen (Agaroselösung in der Mikrowelle erhitzt und 1 ml in die Küvette pipettiert). Die Aushärtung lief 30 min im Kühlschrank ab. Das an der Küvette niedergeschlagene Kondenswasser wurde mit einem fusselfreien Tuch abgewischt. Für die folgende Polymerisation des PAA war es ganz entscheidend, dass kein Kondenswasser mehr vorhanden war und der Agaroseblock vollständig abgekühlt war, da sich ansonsten im PAA Schlieren bildeten.

Die Polymerisationsansätze wurden wie folgt zusammengestellt: Die Endkonzentration an LHCII betrug 0,8 μM , die des TEMED 0,5 % und die des Glycerins 6 %. Die Konzentrationen an APS und PAA wurden wie im Ergebnisteil angegeben variiert. Mit PP wurde auf ein Endvolumen von 1,5 ml aufgefüllt. Im optimierten Protokoll wurden alle Komponenten im Wasserbad auf eine Temperatur von 25°C vortemperiert. Dabei konnten schon alle Bestandteile außer APS zusammengegeben werden. Die Polymerisation wurde mit APS-Zugabe gestartet, dabei wurde das Eppendorfgefäß intensiv gevortext und direkt in die Küvette pipettiert. Auf die Lösung wurden vorsichtig 200 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ pipettiert. Die Küvette wurde umgehend an einem Schaumstoffschwimmer befestigt und im Wasserbad bei 25°C inkubiert. Nach etwa 5 min war die Reaktion abgeschlossen. Das überstehende Wasser wurde entfernt und eine weitere 1 ml umfassende Agaroseschicht wurde auf den PAA-Gelblock aufgegossen.

Alternativ konnten anstelle von gelösten Komplexen auch in Silikat-eingeschlossene verwendet werden. Diese wurden dann sehr gründlich in der APS-freien Lösung resuspendiert und anschließend wurde die Polymerisation durch APS gestartet.

2.2.4.3. Spektroskopische Untersuchung der in PAA-einpolymerisierten Komplexe

Die einpolymerisierten Komplexe wurden sowohl CD- als auch fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Dabei wurden die im Allgemeinen Material und Methoden Teil beschriebenen Einstellungen eingehalten (vgl. 3.2.1.4) und LHCII-typische CD- und Fluoreszenzspektren aufgenommen. Die Schmelzkurve bei 473 nm wurde mit untenstehender Temperatur-Korrektur im CD-Spektrometer, wie in I.2.2.2.4 beschrieben, aufgenommen. Fluoreszenzspektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm vermessen und ein Emissionsspektrum von 600 – 750 nm aufgenommen. Die Inkubation bei 50°C fand im Wasserbad statt. Die Küvette wurde kurzzeitig entnommen, abgetrocknet und in der Front-Face-Apparatur des Fluoreszenzspektrometers vermessen.

Folgende Aspekte wurden bei der CD-Spektroskopie darüber hinaus beachtet: Als Basislinie wurde ein LHCII-freies Gel im entsprechenden Polymerisierungsgrad in der Küvette aus dem jeweiligen Material vermessen. Um Streuungen an den Brechungskanten der Agarose- und PAA-Gele zu vermei-

den, wurden die Ränder mit undurchsichtigem Klebeband abgeklebt, so dass nur das PAA-Gel freilag. Da sich ein Gelblock in einer 1x 1 cm Küvette deutlich langsamer aufheizt als eine wässrige Lösung, wurde mittels Faden-thermometer direkt die PAA-Geltemperatur gemessen. Zu definierten Zeitpunkten wurde diese mit der Temperaturanzeige im Programm Spectra-Manager vergleichend aufgezeichnet und nachträglich so das Messsignal mit der tatsächlichen Gelinnentemperatur korrigiert.

2.2.4.4. Lagerungsversuche von PAA-einpolymerisiertem LHCII

LHCII wurde wie vorangegangen beschrieben in PAA einpolymerisiert. Die Küvetten wurden in Alufolie eingewickelt und im Kühlschrank bzw. einem temperierbaren Wärmeschrank gelagert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Küvette am oberen Rand sorgfältig mit Fett abgedichtet und mit Parafilm verschlossen wurde, um das Verdunsten von Wasser zu verhindern.

3. Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieses Kapitels teilt sich inhaltlich in zwei Bereiche: Im ersten Teil werden Ergebnisse zur SPR-gestützten Auflösung von Silikatkondensationsprozessen vorgestellt und im zweiten Teil folgen Resultate zum Einschluss von LHCII in polymerisierendes AA.

3.1. Analyse der Silikatkondensation mittels SPR

3.1.1. Darstellung des polykationischen Proteins Sx3

Das silaffinähnliche Protein Sx3 wurde gemäß des etablierten Protokolls (I.2.2.1) dargestellt und das Eluat der SP-Sepharosesäule (Fraktion 6-10) mit Hilfe von 5 kDa Membranfiltereinheiten aus PES der Firma Sartorius aufkonzentriert. Sowohl Durchlauf als auch Filtrationsüberstand wurden auf Tris-Tricin-Gele aufgetragen (Abb. V.5).

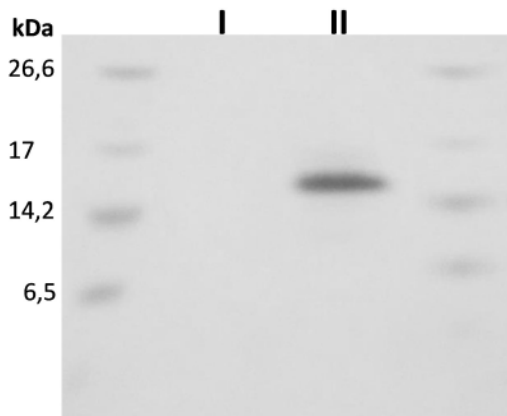


Abb. V.5: Aufgereinigter und aufkonzentrierter Sx3

Sx3 wurde gemäß dem in I.2.2.1 angegebenen Protokoll aufgereinigt und mit Hilfe einer Ultrazentrifugationseinheit um den Faktor 20 aufkonzentriert. Aufgetragen sind der Filtrationsdurchlauf (I) und der Filtrationsüberstand (II) auf einem Tris-Tricin-Gel. Auf den beiden Außenbahnen befindet sich der Ultra low-Marker.

Es zeigte sich im Überstand eine deutliche Proteinbande bei etwa 15 kDa, die man Sx3 zuordnen kann. Die Proben wiesen keine weiteren Proteinverunreinigungen auf und konnten so für die Anbindungsversuche in SPR-Experimenten verwendet werden.

3.1.2. SPR-spektroskopische Analyse von Silikatkondensationsprozessen

Die SPR-Spektroskopie basiert auf dem Prinzip der Detektion von Brechungsindexveränderungen oberhalb einer Goldoberfläche. Die Kondensation von Kieselsäure und die damit verbundene Veränderung des Brechungsindex auf dem Sensorchip soll ermöglichen, dass das Biomineralisationsereignis spektroskopisch verfolgt werden kann.

3.1.2.1. Verfolgung des Silikatkondensationsprozesses

Das His₆-Tag tragende Protein Sx3 wurde auf einem Goldchip mit 2-dimensionaler Nitrilotriessigsäure-Funktionalität nach Aktivierung durch Ni²⁺-Ionen immobilisiert (Abb. V.2).

Die Immobilisierung erfolgte lediglich auf dem Messkanal (blaue Linie) wie in Abb. V.6 gezeigt. Das Messsignal stieg bei Kontakt der Oberfläche mit der Proteinlösung durch die Veränderung des Brechungsindex an. Nach beendeter Injektion floss wieder das ursprüngliche Laufmittel über den Messkanal.

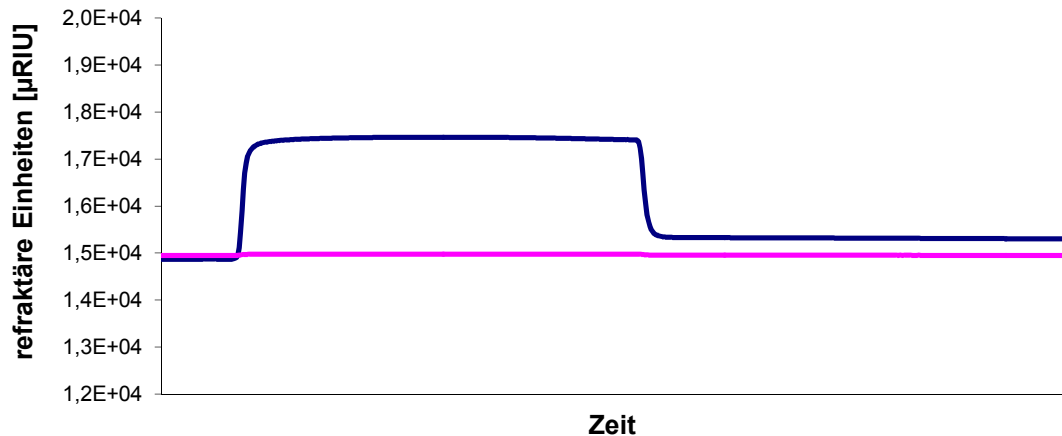
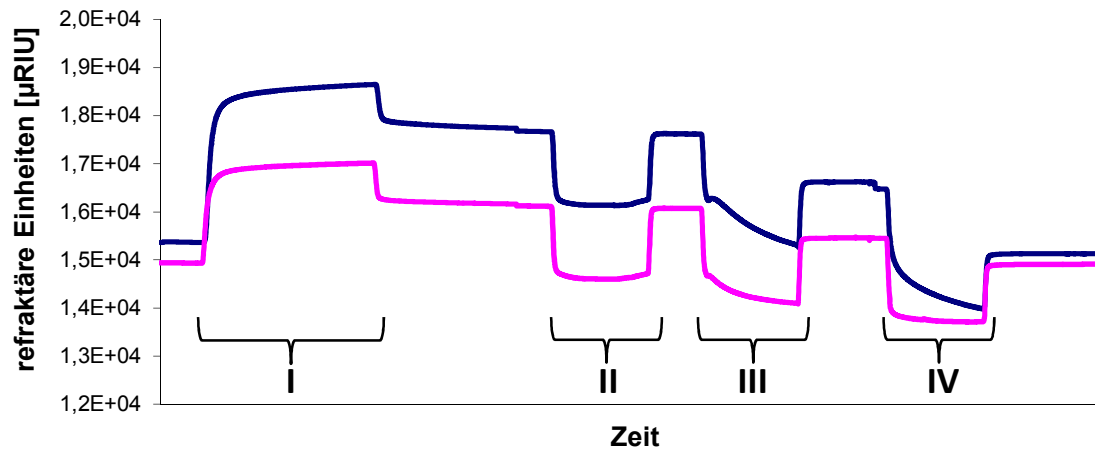


Abb. V.6: Sx3 Immobilisierung auf Ni²⁺-Chelating funktionalisierter Chipoberfläche

Sx3 wurde in Immobilisierungspuffer auf eine Endkonzentration von 21 µM gebracht und entgast. Über den Autosampler wurden 100 µl Probe über 390 s bei einer FG von 10 µl/min appliziert. Es wurde die 4-Port-Fließzelle verwendet, wobei nur der Messkanal (blau) überströmt wurde. Vor und nach Injektion wurde eine Basislinie gemessen.

Das Signal kehrte allerdings nicht auf das Ausgangsniveau zurück. Der Versatz im Vergleich zum Ausgangsniveau stellte die Bindung von Sx3 dar. Damit konnte das polykationische Protein erfolgreich immobilisiert werden. Ein langsamer Verlust des Proteins von der Chipoberfläche konnte nicht festgestellt werden (keine Abnahme des Messsignals während einer mehrstündigen Basislinienaufnahme (in allen Messungen in H₂O_{reinst}; Daten nicht gezeigt).

Der Prozess der Sx3-induzierten Silikatkondensation sollte daraufhin mittels SPR verfolgt werden. Die Apparatur wurde wie Abb. V.3 gezeigt umgebaut, so dass sowohl Mess- als auch Referenzkanal gleichermaßen von Kieselsäurelösung überspült wurden. Die Injektion wurde über das halbautomatische Injektionsventil vorgenommen. Abb. V.7 zeigt, dass das Signal auf beiden Kanälen mit der Injektion (I) der 0,02 M Kieselsäurelösung anstieg, bedingt durch die Veränderung des Brechungsindex im Vergleich zum eigentlich verwendeten Laufmittel (sämtliche Laufparameter sind der Abbildung zu entnehmen).



	Injektionslösung	FG [$\mu\text{l}/\text{min}$]	Injektionsvolumen [μl]	Injektionszeit [min]
I	H_4SiO_4 (0,02 M)	10	250	15
II	NaOH (100 μM)	25	250	8,5
III	NaOH (0,001 M)	25	250	8,5
IV	NaOH (0,01 M)	25	250	8,5

Abb. V.7: Kieselsäurefällung durch immobilisiertes Sx3 und anschließende Regeneration mit NaOH

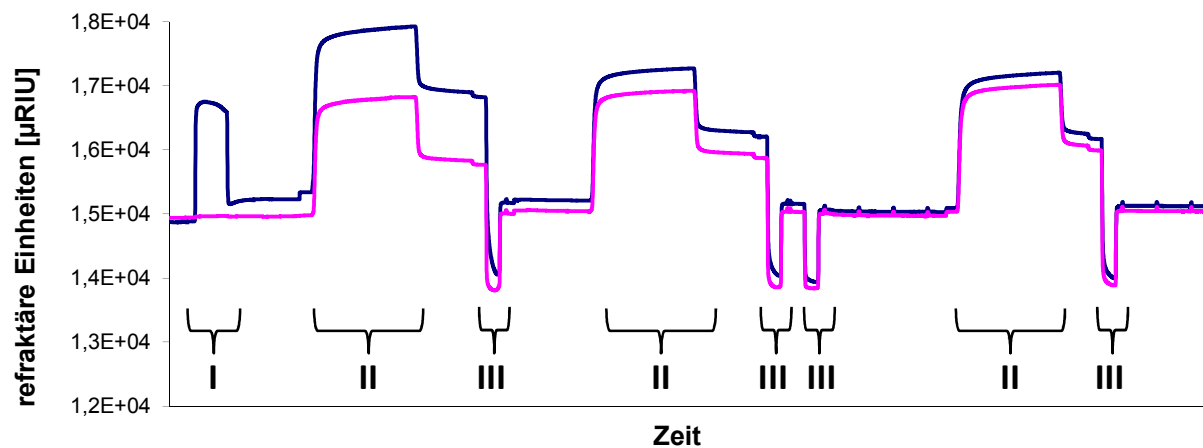
Sx3 wurde wie in Abb. V.6 auf der Chipoberfläche immobilisiert. Die Applikation der Lösungen erfolgte über das halbautomatische Injektionsventil mit einer Spritze und sowohl Mess- (blau) als auch Referenzkanal (rosa) der 4-Port-Fließzelle wurden überströmt. Zwischen den Messsignalen wurden entsprechende Basislinien gemessen.

Nach dem Ende der Injektion wiesen sowohl Mess- als auch auf Referenzkanal einen Anstieg des Signals auf im Vergleich zum Ausgangsniveau. Die Differenz der beiden Kanäle erhöhte sich allerdings signifikant, so dass von einer Sx3-abhängigen Silikatcondensation auf dem Messkanal ausgegangen werden konnte. Anschließend wurden unterschiedliche Molaritäten NaOH über die Kanäle gespült, um die Kieselsäure wieder von der Chipoberfläche zu entfernen. 100 μM NaOH-Lösung (II) führte zu keiner Veränderung des Messsignals im Vergleich zum Signal vor der Injektion. Bei Verwendung von 0,001 M NaOH (III) war schon während der Injektionsphase zu erkennen, dass das Signal abnahm. Nach Injektionsende wurde allerdings auf beiden Kanälen noch nicht das Ausgangsniveau vor Silikatcondensation erreicht. 0,01 M NaOH (IV) führte zu einer Rückkehr des Ausgangssignals auf annähernd das Niveau vor Kieselsäureapplikation. Jedoch war die Differenz zwischen Mess- und Referenzkanal deutlich geringer als zu Beginn der Messung. Dies führte zu der Fragestellung, in wie weit die NaOH-basierte Chip-Regeneration auch dazu führt, dass Sx3 von der Chipoberfläche entfernt wurde. Aus diesem Grund sollte die Reproduzierbarkeit der Silikatcondensation mit zwischenzeitlicher NaOH-Regeneration überprüft werden.

3.1.2.2. Reproduzierbarkeit der Silikatcondensation nach NaOH-Regeneration

Sx3 wurde auf einem Sensorchip immobilisiert (Abb. V.8 I) und anschließend Kieselsäure appliziert (II). Die Chipoberfläche wurde anschließend mit 0,01 M NaOH (III) regeneriert und erneut Kie-

selsäure appliziert. Der Vorgang wurde dreimal ohne erneute Bindung von Sx3 wiederholt. Im zweiten Zyklus wurde zweimal hintereinander mit NaOH über die Chipoberfläche gespült.



	Injektionslösung	FG [$\mu\text{l}/\text{min}$]	Injektionsvolumen [μl]	Injektionszeit [min]
I	Sx3 (15 μM)	10	100	4,75
II	H_4SiO_4 (0,02 M)	10	250	15
III	NaOH (0,01 M)	100	250	2

Abb. V.8: Reproduzierbarkeit der Kieselsäurefällung nach NaOH-Waschungen

Nach Sx3 Bindung (I) auf dem Messkanal (blau) wurden dreimal hintereinander Kieselsäure (II) und NaOH (III) appliziert. In den Zwischenphasen wurden Basislinien vermessen. Es wurde eine 4-Port-Fließzelle verwendet, die nach Sx3-Bindung über beide Kanäle angeströmt wurde.

Die Immobilisierung von Sx3 führte zu einem Anstieg des Signals auf dem Messkanal. Die erste Applikation von Kieselsäure bedingte eine stärkere Veränderung des Signals auf dem Mess- als auf dem Referenzkanal. Die erste Regeneration mit NaOH bewirkte eine Rückkehr auf annähernd das Ausgangsniveau vor Kieselsäureapplikation. Jedoch war die Differenz etwas geringer als direkt nach der Sx3-Bindung. Die erneute Injektion von Kieselsäure machte sich wieder durch einen Anstieg des Signals bemerkbar. Auf dem Referenzkanal fiel dieser genauso wie bei der ersten Injektion aus, auf dem Messkanal allerdings signifikant geringer. Auch die Differenz zwischen Mess- und Referenzkanal war nach Ende der Injektion kleiner als nach der ersten Injektion. Das zweimalige Spülen mit NaOH führte zu einer weiteren Abnahme der Signaldifferenz. Das Messsignal hatte nur noch einen geringfügig stärkeren Messwert als die Referenz. Die letzte Injektion Kieselsäure bedingte eine nochmals verringerte Differenz zwischen Mess- und Referenzkanal. Als Schlussfolgerung dieser Versuche musste gezogen werden, dass die Chipoberflächenregeneration mit 0,01 M NaOH dazu führte, dass sich auch die Sx3-Menge auf der Oberfläche verringerte und daher für eine weitere Silikat Kondensation eine geringere Menge Protein zur Verfügung stand, was sich in den kleiner werdenden Differenzen von Mess- und Referenzkanal bei erneuter Kieselsäureapplikation widerspiegelt. Daher war es notwendig, die Chipoberfläche zwischen jedem Messvorgang vollständig zu regenerieren und eine neue Immobilisierung von Sx3 vorzunehmen. Diese konnte nicht durch eine reine NaOH basierte Regeneration

vollzogen werden, sondern bedurfte einer SDS- und EDTA-basierten Regeneration. Dies hatte zur Folge, dass die Chipoberfläche nach jedem Reinigungsprozess vollständig neu aktiviert werden musste.

Wurde die Oberfläche so wieder für eine neue Sx3-Bindung mit anschließender Kieselsäureapplikation präpariert, konnten stabile Messergebnisse erhalten werden mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis. Es wurden aufeinanderfolgend drei Zyklen aus Protein-Immobilisierung, Silikatkondensation und Regeneration durchgeführt. Als Maß für die Vergleichbarkeit wurden die Messsignale referenzkorrigiert und die proteinbedingte Zunahme des Brechungsindex auf dem Messkanal ins Verhältnis zur silikatbedingten Veränderung gesetzt. Abb. V.9 zeigt, dass in drei aufeinanderfolgenden Messungen dieses Verhältnis nahezu konstant blieb (1,11; 1,01; 1,16).

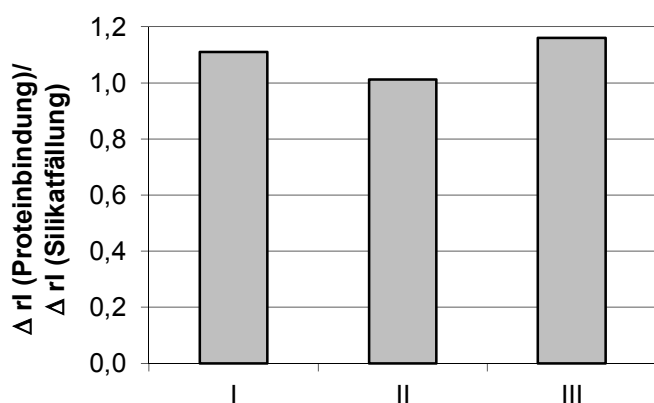


Abb. V.9: Reproduzierbarkeit des SPR-basierten Monitoring von proteininduzierten Kieselsäurefällungen

Sx3 ($c = 15 \mu\text{M}$) wurde auf dem Messkanal des Sensorchips immobilisiert, anschließend wurde über das halbautomatische Injektionsventil H_4SiO_4 ($c = 0,02 \text{ M}$) injiziert. Nach der Silikantfernung mit $0,01 \text{ M NaOH}$ folgte eine Chipreinigung mit anschließender -aktivierung. Die Zyklen wurden 3-fach wiederholt (I-III) und die Veränderung des refraktären Index (r_i) vor und nach Proteinbindung mit dem vor und nach H_4SiO_4 -Applikation ins Verhältnis ge-

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unterlag folgender Einschränkung: Wurden die Versuche mit einem gewissen zeitlichen Abstand (ein Tag) durchgeführt, so kam es zu Abweichungen von diesem durchschnittlichen Wert des Quotienten. Während dieser passiven Phasen wurden allerdings nicht die verwendeten Lösungen erneuert oder frisch entgast. Das heißt sämtliche Lösungen unterlagen einem Alterungsprozess bis zur erneuten Verwendung.

3.1.3. Optimierung der Zweitbindung eines His₆-Tags an Ni²⁺-Chelating-Sepharose

Dockter, 2009, konnte zeigen, dass LHCII mit C-terminalem His₆-Tag schlecht an die Ni-Säule gebunden werden kann, wenn diese Komplexe bereits einmal mit diesem Säulenmaterial und damit Ni²⁺-Ionen in Berührung kamen [209]. Vermutlich wird das Ni²⁺-Ion durch Imidazol nicht aus dem Komplex mit dem His₆-Tag vertrieben, der für eine weitere Bindung sozusagen blockiert ist. Diese Bindung des His₆-Tags an immobilisierte Ni²⁺-Ionen ist aber Grundvoraussetzung für eine Immobilisierung der Komplexe auf Ni²⁺-aktivierten SPR-Sensorchips. Aus diesem Grund sollte versucht werden, das an den His₆-Tag gebundene Ni²⁺ aus diesem Komplex durch die Zugabe eines Überschusses an EDTA zu vertreiben.

Ein Einfluss des EDTA in verschiedenen stöchiometrischen Überschüssen auf die Integrität der Komplexe konnte mittels Fluoreszenzspektroskopie nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob die Bindefähigkeit des His₆-Tags bei einer zweiten Bindung an Ni-Säulen durch

EDTA erhöht werden kann, wurden Trimere und Monomere aus Saccharosedichtegradienten (also den aufgetrennten Eluaten von einer Ni-Säule) mit einem 100-fachen Überschuss an EDTA (in beiden Fällen bezogen auf Monomerkonzentration) für 30 min bei RT inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Aufkonzentrieren und Verdünnen in Ultrafiltrationseinheiten zur Entfernung des EDTA. Die Proben (+) wurden erneut auf Ni-Säulen aufgetragen. Zur Kontrolle wurde die exakt gleiche Menge an Komplexen ohne EDTA-Behandlung (-) auf Säulen aufgebracht. Es erfolgten die standardisierten Schritte einer Trimerisierung, gefolgt von einer Aufreinigung der Eluate mittels Saccharosedichtegradienten (Abb. V.10 A).

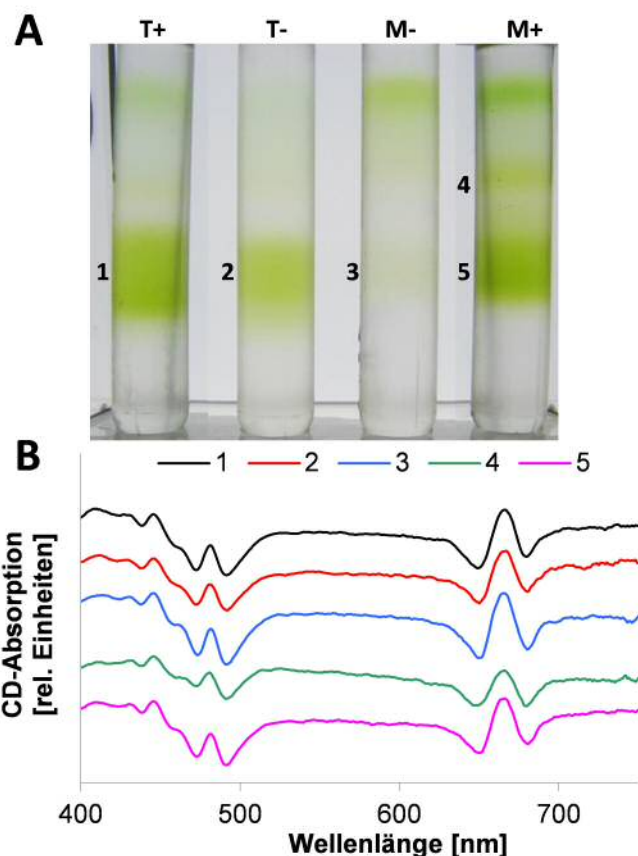


Abb. V.10: Einfluss von EDTA auf die Rückbindefähigkeit von His₆-Tags an Ni²⁺-Chelatingmaterial

Trimere (T) und Monomere (M) aus einer Saccharosedichtegradientenaufreinigung wurden mit (+) bzw. ohne (-) EDTA bei RT für 30 min inkubiert und anschließend zweimal in Centricons um den Faktor zwei eingengt und rückverdünnt. Die Proben wurden auf Ni-Säulen nach Standardprotokoll trimerisiert. Die Elutionsfraktionen wurden auf SW41-Saccharosegradienten aufgetragen und ultrazentrifugiert. Aus den Gradienten (A) wurden die Banden 1 – 5 abgesaugt und mittels CD-Spektroskopie charakterisiert (B).

Vergleicht man die Trimerproben miteinander, so ist zu erkennen, dass signifikant mehr Trimere (entsprechende Charakterisierung durch trimertypisches CD-Spektrum in Abb. V.10 B 1 und 2) im Gradienten zu finden waren bei einer Vorbehandlung mit EDTA als ohne. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass ohne diese Vorbehandlung ein großer Anteil an Trimeren nicht an das Säulenmaterial gebunden hat und bei den Waschschrinen entfernt wurde.

Bei den Monomeren war der Unterschied zwischen den Proben noch deutlicher zu erkennen. Waren kaum Komplexe in den Gradienten zu finden, wenn die Monomere nicht mit EDTA behandelt wurden, so traten nach Behandlung der Monomere mit EDTA zwei klare Banden im Gradienten auf (4 und 5). Dabei konnte Bande 4 ein monomertypisches CD-Spektrum zugewiesen werden, Bande 5 ein trimertypisches. Dies bedeutet, dass EDTA-behandelte Monomere nicht nur erfolgreich an das Säulenmaterial gebunden wurden, sondern diese Komplexe auch trimerisierten.

Für die Bindung des in IV.3.1.1 dargestellten Sx3 ergab sich die Bindungsproblematik nicht, da dieser im Zuge seiner Aufreinigung intensiv mit EDTA inkubiert wurde, so dass von einer erfolgreichen Entfernung von möglicherweise bindungsstörendem Ni²⁺ ausgegangen werden kann.

3.2. Einschluss von nativem LHCII in Polyacrylamid

PAA besteht abhängig von den Anteilen an AA und BAA aus einem unterschiedlich dichten polymeren Netzwerk. Ein solches Netzwerk kann möglicherweise die Eigenschaften besitzen, thermisch bedingte Bewegungen in molekularen Größenordnungen einzuschränken. Dies beinhaltet auch die Bewegung von Proteinstrukturen bei thermisch bedingten Entfaltungsvorgängen. Aus diesem Grund sollte LHCII in PAA-Netzwerke eingeschlossen werden und so sein thermisch bedingter Verlust der nativen Struktur verhindert werden. Außerdem sollten Polymerisationsbedingungen etabliert werden, die es ermöglichen, in Silikat-eingeschlossenen LHCII CD-spektroskopisch zu analysieren. Insofern nicht abweichend angegeben, wurde in diesem Kapitel nativer LHCII verwendet.

3.2.1. Küvetten- und PAA-Einfluss auf spektroskopische Eigenschaften des LHCII

LHCII wurde bei RT in 10- und 20 %-iges AA gemischt und sowohl in 1 x 1 cm Küvetten aus PS als auch Acryl gegossen und ausgehärtet. Die Proben wurden CD- und fluoreszenzspektroskopisch analysiert. Für die CD-Messungen wurden jeweils LHCII-freie PAA-Gele in den entsprechenden Küvetten als Basislinie verwendet (Abb. V.11). Bei den CD-Spektren (A) war festzustellen, dass sich bei der Verwendung von Acryl-Küvetten die Spektren von freien und in PAA eingeschlossenen Komplexen kaum unterschieden.

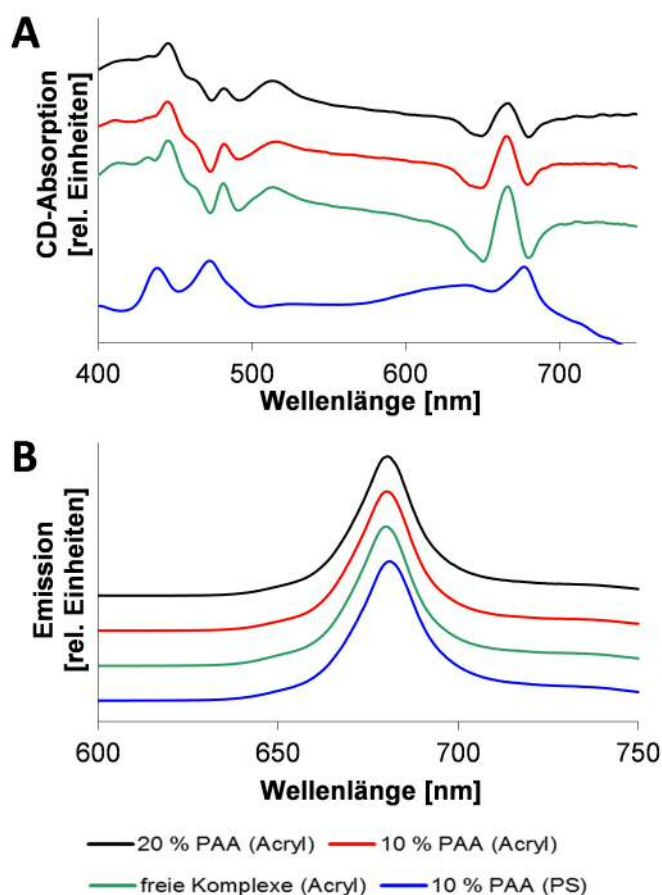


Abb. V.11: Einfluss von Küvetten und PAA auf spektroskopische Eigenschaften

Vergleichend wurden die CD- (A) und Fluoreszenz- (B) Spektren von $0,8 \mu\text{M}$ nativem LHCII, einpolymerisiert in PAA-Gele unterschiedlichen Polymerisierungsgrades (20 % [schwarz], 10 % [rot]) gemessen. Zusätzlich wurden freie Komplexe (grün) in Detergenzhaltiger Pufferlösung analysiert. Diese Proben befanden sich in Acrylküvetten. Im Vergleich dazu eine in 10 %-igem PAA eingeschlossene Komplexprobe in einer Polystyrol (PS)-Küvette (blau).

Sie zeigten die trimertypische Schulter in der Flanke des negativen Signals bei 650 nm und ein lokales Minimum bei 473 nm. Zwischen einpolymerisiertem und freiem Komplex existierte kein CD-Signalunterschied, es bestand also kein Einfluss des PAA auf das CD-Signal. Das Signal bei der Verwendung von PS-Küvetten ließ sich nicht in Einklang bringen mit einem LHCII-typischen Spektrum, welches am Material PS lag. In allen beschriebenen Folgeversuchen wurden daher Acrylküvetten verwendet. Bei Fluoreszenzspektren war kein materialabhängiger Effekt feststellbar (B). Unabhängig vom Material (PS oder Acrylküvetten) oder der An- bzw. Abwesenheit von PAA war ein deutlicher Peak bei 680 nm zu erkennen. Die Ausbildung einer Schulter bei 650 nm bedingt durch Chlorophyll *b* – Fluoreszenz war in keiner Probe feststellbar.

3.2.2. Ammoniumpersulfat - Einfluss auf die Integrität des LHCII

Für den Start der Polymerisationsreaktion von AA zu PAA verwendet man APS. Der radikalische Zustand nach Zerfall könnte auch den LHCII schädigen. Deshalb sollte eine APS-Konzentration ermittelt werden, die nicht den Komplex schädigt, dennoch aber für eine ausreichend schnelle und homogene Polymerisation sorgt. Aus diesem Grund wurden 0,1 und 0,7 % APS zur Polymerisation von 10 und 20 %-igen PAA-Gelen in Küvetten verwendet. Die Polymerisation wurde in allen Fällen sowohl bei RT als auch auf Eis ausgeführt. Über einen Zeitraum von 32 Tagen wurden die Gel-Küvetten fotografisch dokumentiert und Emissionsspektren aufgenommen (Abb. V.12).

Die Polymerisationsgeschwindigkeit unterschied sich nicht bei der Variation der APS-Konzentration, bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen allerdings ein wenig. Bei RT war die Reaktion bereits nach weniger als 3 min abgeschlossen, bei einer Lagerung auf Eis nach 5 min (Daten nicht gezeigt).

Bei der Verwendung von 0,7 % APS (I und III) ließ sich einheitlich die Beobachtung machen, dass die Komplexe sowohl im 20- als auch im 10 %-igen Gel sehr schnell ausbleichen. Dies geschah bei einer Polymerisation bei RT schneller (III) als auf Eis. Schon nach drei Tagen war bei den 10 %-igen Gelen bei RT so gut wie keine grüne Färbung mehr zu erkennen. Generell galt, dass die Entfärbung bei 10 %-igen Gelen intensiver ablief. Bei den 20 %-Gelen zeigte sich ein Art Grünfärbungsgradient, der von oben nach unten zunahm. Die Emissionsspektren wiesen bei einer Polymerisation bei RT schon direkt nach dem Komplexeinschluss (Tag 0) eine gestörte Energieweiterleitung in Form einer Chlorophyll *b*-Schulter auf. Mit zunehmendem Ausbleichen verstärkte sich der Effekt der gestörten Energieweiterleitung.

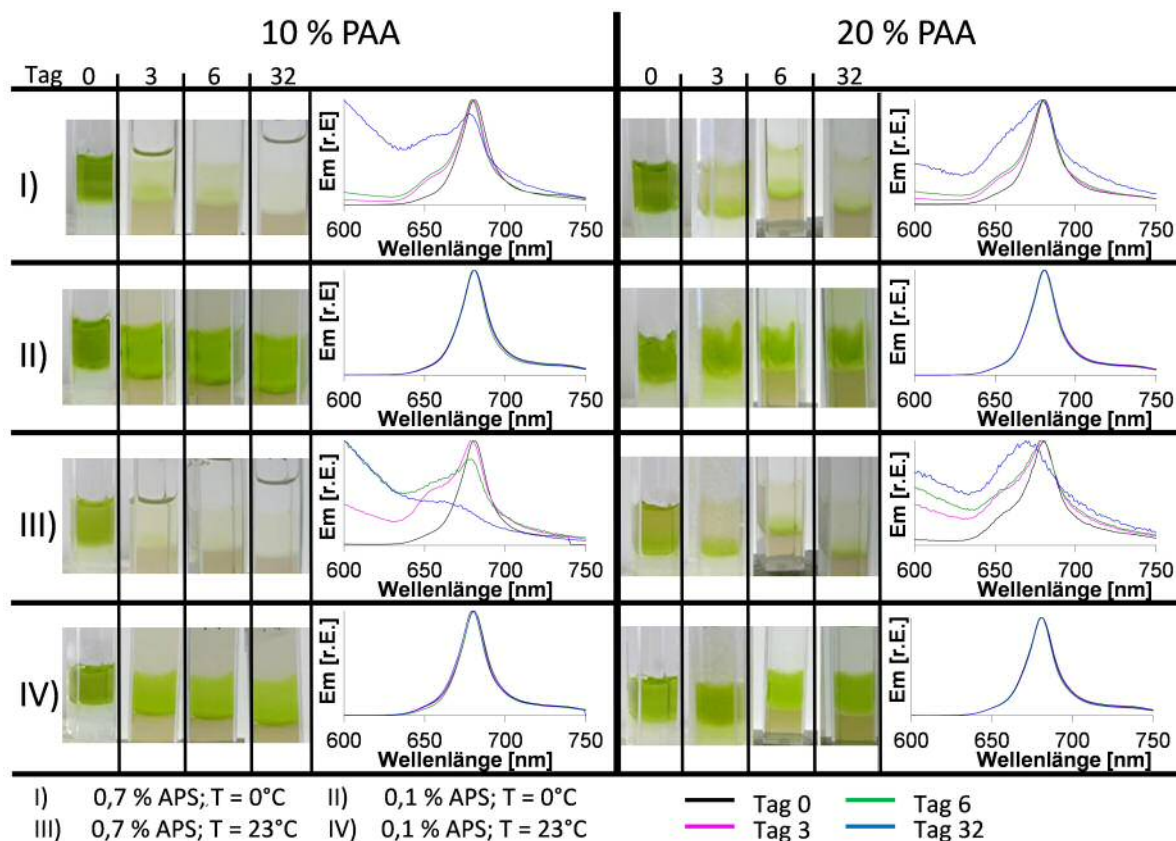


Abb. V.12: Ammoniumpersulfat-Einfluss auf LHCII über längere Lagerungszeiträume

Native LHCII-Trimere wurden in 10 und 20 %-ige PAA-Gele eingegossen. Dabei wurde die APS-Konzentration zwischen 0,7 % (I und III) und 0,1 % (II und IV) variiert und auch die Temperatur der Acrylamidpolymerisation zwischen Eislagerung (I und II) und 23°C (III und IV). Die Komponenten Acrylamidlösung, Puffer (0,5 M Tris^{7.0} und 0,1 % LM), TEMED (0,05 %) und LHCII (1 μ M) wurden nach APS Zugabe direkt in eine 1 x 1 cm Acrylküvette gegossen und dort polymerisiert. Die Färbung der Komplexe wurde fotografisch an den Tagen 0, 3, 6 und 32 dokumentiert und ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen ($\lambda_{ex} = 470$ nm, Spektrum von 600 – 750 nm).

Bei der Verwendung von 0,1 % APS zeigte sich ein vollständig anderes Bild. Ein Ausbleichen der Komplexe im Lagerungsverlauf konnte nicht augenscheinlich festgestellt werden, unabhängig von der Polymerisationstemperatur oder dem Polymerisierungsgrad des PAA. Unterstützt wird dieses Resultat von den Emissionsspektren, die in keinem Fall Chlorophyll *b*-Fluoreszenz aufwiesen.

3.2.3. Stabilisierender Einfluss von PAA auf LHCII während Lagerungen

LHCII wurde sowohl in 10- als auch in 20 %-ige PAA-Gele eingeschlossen. Oberhalb und unterhalb des PAA-Gels befanden sich Agarosegelkissen, die an der Küvettenöffnung mit Fett und Parafilm abgedichtet wurden. Freie Komplexe wurden in Pufferlösung zwischen die Agarosekissen eingebettet und ebenfalls verschlossen. Die Küvetten wurden im Dunklen bei 4°C und Wärme (22°C in der ersten Woche, 30°C in Woche 2 und 3 und danach 35°C) gelagert und zu definierten Zeitpunkten Fluoreszenzspektren aufgenommen. Die EmChl *a*/EmChl *b* wurde pro Probe auf den Wert von Tag 0 normiert und gegen die Zeit aufgetragen (Abb. V.13).

Bei einer Lagerung bei 4°C (durchgezogene Linien) war weder bei den freien noch bei den in PAA einpolymerisierten Komplexen eine Zunahme an Chlorophyll *b*-Fluoreszenz festzustellen, die sich in einer Abnahme des Quotienten aus EmChl *a*/EmChl *b* zeigen würde. Bei einer Lagerung unter Wärme (gestrichelte Linien) differenziert sich dieses Bild ein wenig. Die Komplexe in 20 %-igem PAA (rot) verzeichneten die geringste Abnahme des Quotienten (nach 42 Tagen noch 0,6).

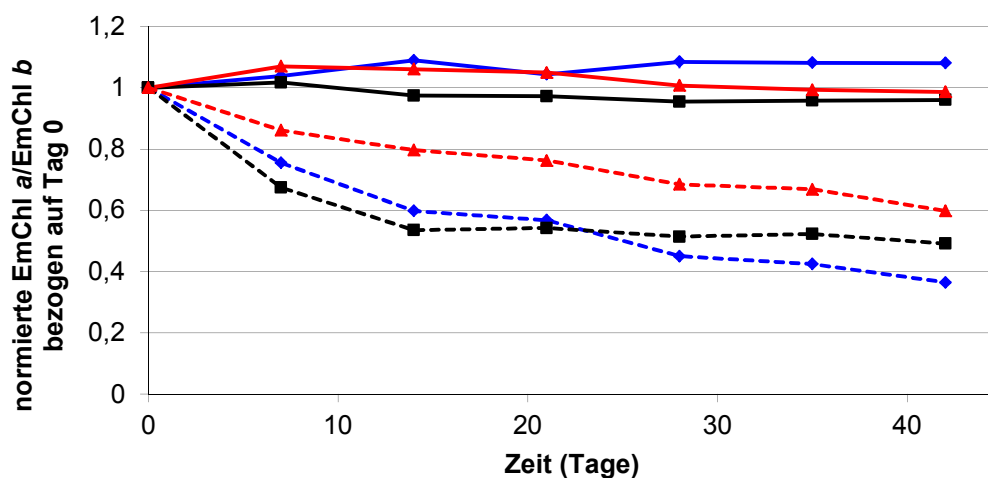


Abb. V.13: Lagerungsexperimente von nativem LHCII in PAA

Nativer LHCII wurde in 10-(schwarz) bzw. 20 %-iges (rot) PAA einpolymerisiert und bei 4°C (durchgezogene Linien) und in Wärme (gestrichelte Linien) gelagert [Woche 1 22°C, Woche 2 und 3 30°C und übrige Zeit 35 °C]. Zur Kontrolle wurden freie Komplexe (blau) analysiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) aufgenommen und EmChl *a*/EmChl *b* bestimmt. Die Werte wurden auf den Quotienten zum Zeitpunkt 0 normiert. Alle Proben befanden sich zwischen Agarosekissen, waren durch Fett abgedichtet und wurden dunkel gelagert.

Die in 10 %-igem PAA eingeschlossenen Komplexe (schwarz) zeigten vor allem zu Beginn eine deutlich stärkere Abnahme, die etwa nach 14 Tagen schwächer wurde. Nach 42 Tagen erreichten die Proben einen Wert des Quotienten von 0,49. Die in Detergenz-haltigem Puffer aufbewahrten LHCII

(blau) wiesen nach 42 Tagen mit 0,36 den geringsten Emissionsquotienten auf, also die stärkste Störung der Energieweiterleitung.

3.2.4. Wärmeinduzierte Zerfallskinetik von PAA-eingeschlossenem LHCII

Um zu überprüfen, ob PAA den thermisch bedingten Zerfall des LHCII verhindert, wurden Komplexe wie oben beschrieben in PAA eingegossen. Es erfolgte eine Inkubation bei 50°C, wobei zu definierten Zeitpunkten Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) aufgenommen wurden und EmChl *a*/EmChl *b* bestimmt wurden. Diese wurden auf den Quotienten zum Zeitpunkt vor Temperaturerhöhung normiert und gegen die Zeit der Wärmeinkubation aufgetragen (Abb. V.14).

Der Quotient aus EmChl *a*/EmChl *b* nahm bei allen Proben während der 90-minütigen Inkubation ab. Bei den in 20 %-igem PAA eingeschlossenen Komplexen (rot) verlief diese Abnahme am langsamsten, erreichte nach 90 min jedoch einen vergleichbaren Wert (0,37) zu den freien Komplexen (0,34, blau). Die in 10 %-igem PAA eingeschlossenen Komplexe (schwarz) unterschritten nach etwa 15 min den Wert der freien Komplexe und blieben während der gesamten Messung unterhalb dieser. Nach 90 min hatten diese einen Wert von 0,24.

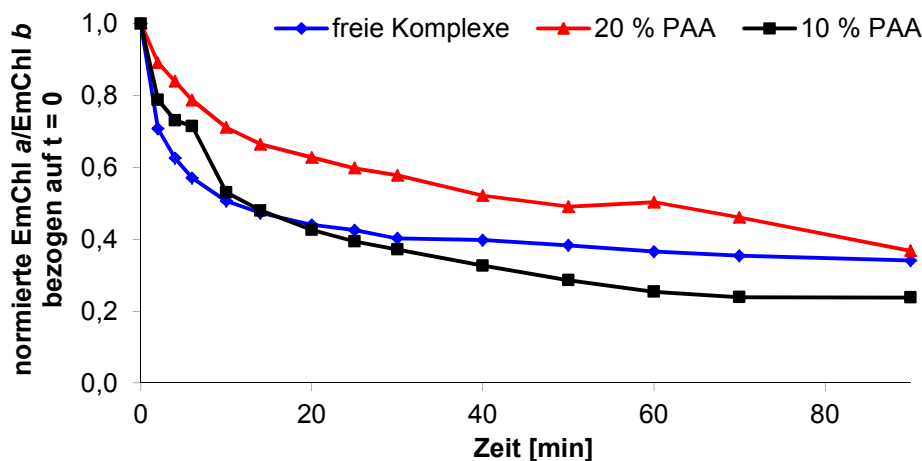


Abb. V.14: Zerfallskinetik von einpolymerisiertem LHCII

Vergleich von gelösten Komplexen (blau) mit in 10- (schwarz) bzw. 20 %-igem (rot) PAA eingeschlossenen. Die Proben wurden bei 50°C inkubiert und zu definierten Zeitpunkten wurden Emissionsspektren von 600-750 nm aufgenommen ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$). Das Verhältnis EmChl *a*/EmChl *b* wurde auf den Quotienten bei $t = 0$ normiert und gegen die Zeit aufgetragen.

3.2.5. Bestimmung der Schmelztemperatur einpolymerisierter Komplexe

Mittels CD-Spektroskopie in einem Temperaturgradienten lässt sich die Abnahme LHCII-spezifischer Signale verfolgen und hieraus ein Rückschluss auf den Temperaturbereich ziehen, bei dem dieser thermisch bedingt seine Konformation verliert (Schmelztemperatur). Freie und in 10- und 20 %-iges PAA einpolymerisierte Komplexe wurden CD-spektroskopisch bei 473 nm in einem Temperaturgradienten vermessen. Da die Wärmeleitfähigkeit von PAA-Gelen signifikant unterschiedlich zu wässriger Lösung ist, wurde die Temperatur in allen Fällen direkt in den Proben mit einem externen

Thermometer gemessen und anschließend eine Temperaturkorrektur der Messwerte durchgeführt. Die Signalkurven wurden mittels Table Curve sigmoidal angepasst, wobei der Wendepunkt den Schmelzpunkt der Komplexe darstellte (Abb. V.15).

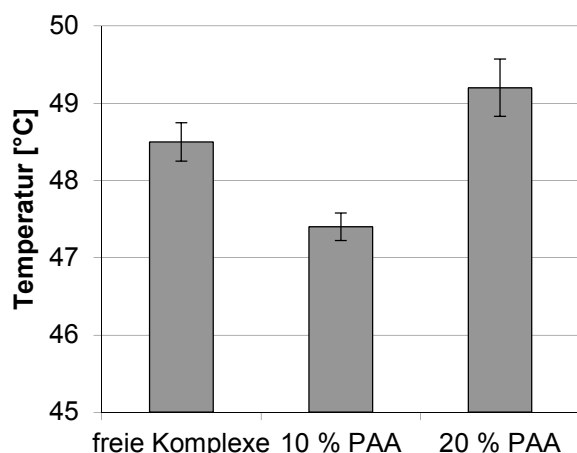


Abb. V.15: Schmelztemperaturen von einpolymerisiertem LHCII

Nativer LHCII wurde direkt in eine 1 x 1 cm Acrylküvette einpolymerisiert (10 und 20 % PAA). Der PAA-Block wurde zwischen zwei Agarosegelen fixiert. Die freie Komplexprobe beinhaltete Pufferlösung anstelle des AA und wurde ebenfalls zwischen Agarose fixiert. Die Temperatur wurde sowohl im Pelletierblock als auch mit einem zusätzlichen Thermometer direkt im Gelblock gemessen. Die Temperaturerhöhung betrug 1°C/min. Es wurde das CD-Signal bei 473 nm detektiert. Messdaten wurden vor der sigmoidalen Anpassung mit TableCurve auf die Temperatur im Gelblock angeglichen.

Die Schmelztemperaturen der drei Proben unterschieden sich insgesamt nur um etwa 1,5°C. Dabei ist bei den in 10 %-igem PAA einpolymerisierten Komplexen die Schmelztemperatur mit 47,4°C geringer als bei den freien Komplexen mit 48,5°C. Die in 20 %-igem PAA befindlichen Komplexe wiesen einen Wert von 49,2°C auf.

3.2.6. Komplexreorganisation in PAA nach thermischer Destruktion

Es sollte untersucht werden, ob Komplexe sich wieder reorganisieren können, insofern sie direkt nach einer thermisch bedingten Komplexdestruktion abgekühlt werden und ob dies durch ein PAA-Netzwerk gefördert werden könnte. LHCII wurde auf 60°C erhitzt und direkt auf Eis auf unter 5°C abgekühlt. Die Struktur des Komplexes wurde CD-spektroskopisch vor und nach der Hitzeinkubation sowie nach dem Abkühlen vermessen.

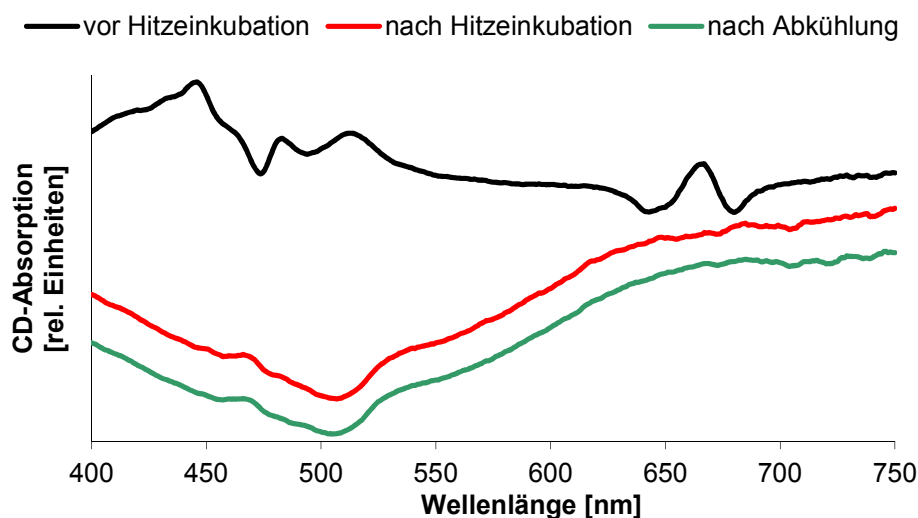


Abb. V.16: Einfluss starker Temperatursprünge auf LHCII-Struktur

Nativer LHCII wurde in ein 20 %-iges PAA-Gel einpolymerisiert. Es wurden CD-Spektren vor (schwarz) und nach (rot) einer Temperaturerhöhung auf 60°C (Temperaturmessung im PAA-Gel) sowie einer sofortigen Abkühlung auf Eis (grün) im Anschluss an das Erreichen der Höchsttemperatur aufgenommen.

Vor der Hitzeinkubation zeigte die Probe ein trimertypisches CD-Spektrum. Nach dem Erhitzen auf 60°C trat kein solches typisches Spektrum mehr auf. Das Signal hatte ein unspezifisches Minimum bei etwa 505 nm. Nahezu deckungsgleich dazu verhielt sich das Signal nach dem sofortigen Abkühlen. Eine Komplexreorganisation konnte ausgeschlossen werden.

4. Diskussion

4.1. SPR-Experimente

4.1.1. SPR-Spektroskopie zur Analyse von Protein-induzierter Silikatbildung

Kieselsäurekondensationsprozesse können durch verschiedenste Methoden wie Quarzkristallmikrowaagen, Röntgenbeugung, zeitaufgelöste NMR oder Neutronenkleinwinkelstreuung *in situ* verfolgt werden [184–186]. Nasschemisch wird sehr häufig der von Iler etablierte Molybdat-Blau Test angewendet, um den durch polykationische Moleküle induzierten Prozess zu verfolgen [105; 132; 187–189]. Bei diesem bilden monomere und dimere Kieselsäuremoleküle einen farbigen Komplex mit Molybdat, der reduziert bei 810 nm fotometrisch quantifiziert werden kann [98]. Zur kinetischen Charakterisierung des Kondensationsprozesses wird einem Reaktionsansatz zu definierten Zeitpunkten eine Probe entnommen und der Gehalt an monomeren und dimeren Kieselsäurespezies bestimmt. Die Kondensationskinetik ergibt sich also indirekt aus der Messung der Abnahme der monomeren und dimeren Edukte. Als Erweiterung besteht die Möglichkeit, die Proben kombiniert mittels Molybdat-Blau-Test und dynamischer Lichtstreuung zu analysieren, wobei bei letzterer das Partikelwachstum verfolgt wird [104; 187; 188]. Besonders der Molybdat-Blau-Test birgt gewisse Schwächen in sich: Die Analyse führt nur zu einer indirekten Kinetik auf der frühesten Stufe der Silikatkondensation. Zudem ist das Messverfahren diskontinuierlich und damit abhängig von der zeitlichen Dichte der Probenentnahme. Besonders bei der Verwendung von Phosphat-haltigen Puffern treten beim Molybdat-Blau-Test weitere Probleme auf, wie in Kapitel II dargelegt wurde.

Die SPR-Spektroskopie bietet hingegen die Möglichkeit, den Kondensationsprozess *in situ* zu detektieren. Das Messsignal bei der SPR-Spektroskopie ergibt sich aus einer Veränderung des Brechungsindex oberhalb eines Sensorchips. Diese Veränderung des refraktären Index als Funktion der Zeit ermöglicht es also, Reaktionsprozesse auf bzw. direkt oberhalb der Chipoberfläche kontinuierlich zu verfolgen. Der Vorteil ist, dass schon die Bindung des für den Kondensationsprozess verantwortlichen Materials (z.B. polykationisches Protein) auf der Chipoberfläche verfolgt und quantifiziert werden kann. Die Bildung von Silikat auf der Chipoberfläche führt zu einer erneuten Veränderung des refraktären Index und die gemittelte Dicke der entstehenden Silikatschicht kann berechnet werden [190]. Die Menge an gefällttem Silikat kann also auch wie bei einer Reaktion in Lösung in Relation zur Menge an Protein gesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Silikatkondensation, die durch das rekombinante silaffinähnliche Protein Sx3 induziert wurde, analysiert werden. Es existieren verschiedene Möglichkeiten, basische Peptide auf SPR-Sensoroberflächen zu immobilisieren: Lysozym wurde unspezifisch auf einer planaren Goldoberfläche adsorbiert und behielt die Fähigkeit, Silikatkondensationsprozesse auszulösen [190]. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, eine mit negativen Ladungen funktionalisierte

Chipoberfläche zu nutzen, um positiv geladene Proteine auf die Sensoroberfläche zu bringen [191]. Eine spezifische, reversible Bindung von Proteinen kann über einen His₆-Tag erreicht werden [192–195]. Ein Silikat-kondensierendes Silicatein konnte bereits über einen His₆-Tag auf einer NTA-funktionalisierten Goldoberfläche gebunden und der Erhalt der Fähigkeit, Silikat Kondensation auszulösen, nachgewiesen werden [196]. Allerdings wurde hier nur die Immobilisierung mittels SPR detektiert, der Silikatbildungsprozess nicht. Dieser wurde im Nachhinein mittels REM, EDX und Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen. Der Vorteil einer Bindung über den His₆-Tag besteht darin, dass diese gerichtet über den Proteinterminus verläuft und daher die Proteinstruktur unbeeinflusst sein sollte. Würden bestimmte Proteindomänen, die beispielsweise für die Silikatbildung verantwortlich sind, stattdessen an der Immobilisierung auf der Chipoberfläche teilnehmen, wäre ihr Wirken in der Kieselsäurekondensation möglicherweise beeinträchtigt.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Sx3 verfügt über einen C-terminalen His₆-Tag und konnte so erfolgreich auf einem Ni²⁺-funktionalisierten Sensorchip immobilisiert (Abb. V.6) werden. Der Umbau der Apparatur gemäß Abb. V.3 ermöglichte die gleichmäßige Anströmung von Kieselsäure sowohl auf dem Messkanal mit Sx3 als auch auf dem Referenzkanal. Auf beiden Kanälen kam es zu einer Zunahme der refraktären Einheiten. Das bedeutet, dass auf beiden Kanälen eine Silikatschicht gebildet wurde. Die signifikant stärkere Zunahme auf dem Messkanal mit immobilisiertem Sx3 lässt den Schluss zu, dass das polykationische Protein eine spezifische Kondensation von Kieselsäure auf der Chipoberfläche induziert, während es sich auf dem Referenzkanal um eine Oberflächen-bedingte unspezifische Bildung handelt. Wurde die Signalzunahme auf dem Messkanal um die Werte des Referenzkanals korrigiert, konnte die Zunahme der refraktären Einheiten durch die Silikatbildung in Relation zur Zunahme durch die Proteinbindung gesetzt werden. In drei unabhängigen Messungen hintereinander konnten dabei vergleichbare Werte für diesen Quotienten ermittelt werden (Abb. V.9), so dass man die Nachverfolgung der Sx3-induzierten Silikatbildung mittels SPR als reproduzierbar bezeichnen kann. Eine mögliche Erklärung für die unspezifische Kondensation am Referenzkanal kann in der Arbeit von Wallace *et al.* gefunden werden [197]: Oberflächen mit Carboxy-terminierten Monolayern zeigten hier eine Präzipitation von Kieselsäure. Im Rahmen dieser Dissertation wurden Chips verwendet, deren Goldoberfläche mit Carboxymethyldextran bedeckt ist, an dem die NTA-Funktionalisierung stattfindet. Damit weist die Chipoberfläche eine hohe Dichte an Carboxylgruppen auf, die möglicherweise unspezifisch die Kondensation von Kieselsäure ermöglichen.

Eine Regeneration der Chipoberfläche ist schon alleine auf Grund der Kosten der Sensorchips unattraktiv. Hierzu muss das polymerisierte Silikat von der Chipoberfläche entfernt werden. Im optimalen Fall bleibt das Protein dabei auf der Silikatoberfläche gebunden und die nächste Applikation von Kieselsäure kann erfolgen. Silikat löst sich bei basischen pH-Werten auf [98]. Um das Silikat vollständig von der Chipoberfläche zu entfernen, wurde NaOH mit einer Konzentration von mindestens 10 mM benötigt. Auffällig an dieser Stelle war, dass die Differenz zwischen Mess- und Referenzkanal

nach Basen-Applikation kleiner war, als nach der anfänglichen Sx3-Bindung, was auf einen Verlust an Protein von der Chipoberfläche hindeutete. Die Kieselsäure-fällenden Eigenschaften blieben erhalten, verringerten sich allerdings mit jeder erneuten NaOH-Applikation (Abb. V.8), was sich mit einer Basen-bedingten Ablösung von Sx3 erklären lässt. Eine Auflösung des His₆-Ni²⁺-Komplexes bei 10 mM NaOH (pH-Wert = 12) ist nicht unbedingt zu erwarten, da eine Deprotonierung des Histidins eher zu einer verstärkten Donortendenz der freien Elektronenpaare der Histidin-Stickstoffe hin zum Ni²⁺-Ion führen sollte. Eine mögliche Basen-labile Stelle besteht allerdings bei der Bindung der NTA-Funktionalisierung an Carboxymethyldextran, die über die Ausbildung einer Amidbindung entsteht. Wird diese basisch gespalten, so kommt es zu einem Verlust an Protein, wie er im Versuch detektiert wurde. Darüber hinaus verlöre der Chip hierbei seine Funktionalisierung, so dass das Proteinbindungspotential auf Dauer verringert würde. Beobachtungen, dass mit häufigerem Gebrauch des Chips der Quotient aus Signalzunahme durch Silikatbildung zu Signalzunahme durch Proteinbindung (Daten nicht gezeigt) größer wird, deuten auf eben diese Verkleinerung des Bindungspotentials des Chips mit zunehmender Nutzung hin.

Durch eine vollständige Regeneration der Chipoberfläche mit EDTA und SDS wurde gewährleistet, dass innerhalb eines Tages drei reproduzierbare Ergebnisse mit ausreichend hoher Signalstärke erhalten wurden, was allerdings den Zeitaufwand pro Einzelmessung (im etablierten System etwa 2 h pro Messung) stark erhöht. Bei einer mehrtägigen Anwendung setzte die oben beschriebene Veränderung des Quotienten (Silikatbildung zu Proteinbindung) ein, die möglicherweise zusätzlich zur Verkleinerung des Bindungspotentials durch die Alterung der verwendeten Lösungen unterstützt wird.

4.1.2. Anwendungspotential und Ausblick

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte System kann in gewissem Umfang dazu genutzt werden, Kinetiken der Protein-unterstützten Kieselsäurekondensation zu messen. Beispielsweise könnte ein bestimmtes Protein bei unterschiedlichen Kieselsäurekonzentrationen analysiert werden. Bei einem Umfang von etwa fünf Messreihen pro Tag sollten reproduzierbare Bedingungen für die Chipoberfläche gelten. Würde anschließend der Chip erneuert werden, könnte mit anderen polykationischen Proteinen die gleiche Messreihe durchgeführt werden. So ließe sich die Kieselsäurekonzentrations-Abhängigkeit der Kondensation, ausgelöst durch verschiedene Proteine, miteinander vergleichen. Nachteilig an diesem Procedere wären allerdings die durch den Chipaustausch entstehenden hohen Kosten (mehr als 60 € pro Chip). Aus diesem Grund sollte über einen veränderten Immobilisierungsaufbau nachgedacht werden. Bei diesem sollte ausgehend von einer planaren Goldoberfläche eine stufenweise Funktionalisierung erfolgen, wobei jeder Einzelschritt Stabilität gegenüber 10 mM NaOH-Lösung zeigen sollte. Ein Streptavidin-Biotin-System sollte diesen pH-Bedingungen standhalten [198; 199]. Thiolisiertes Streptavidin müsste hierzu (mit einem hydrophoben Spacer versehen) auf einer Goldoberfläche gebunden werden. Eine Ablösung dieser Funktionalisierung unter den basischen

Regenerationsbedingungen wäre nicht zu erwarten. Das in den Kondensationsprozessen zu analysierende Protein müsste biotinyliert werden, am besten über eine Cystein-reaktive Maleimidgruppe. Dies würde die Anwendung auf Cystein-haltige Proteine beschränken. Eine Biotinylierung über NHS-Gruppen, die zur Ausbildung einer Amidbindung führt, ist aus den bereits diskutierten Gründen ungünstig. Mit einem solchen Aufbau sollte das Silikat mit 10 mM NaOH von der Chipoberfläche entfernt werden können, ohne dass sich die Proteinbelegung der Chipoberfläche verändert. Der Vorteil eines solchen Systems bestünde darin, dass mit NaOH nur das Silikat entfernt würde und eine vollständige Regeneration des Chips inkl. einer Neuansbindung des Proteins nicht nötig wäre. Dies würde sowohl den Proteinverbrauch verringern als auch eine deutliche Zeitersparnis darstellen.

Welche weiteren Applikationen lassen sich aus der Tatsache, dass auf der Sensorchipoberfläche eine Silikatbildung reversibel vorgenommen werden kann, herleiten? Luckarift *et al.* zeigten, dass auf einer planaren Goldoberfläche Lysozym unspezifisch adsorbiert werden kann und dieses in der Lage ist, einen Monolayer Silikat auf der Chipoberfläche zu präzipitieren [190]. Mittels einer solchen Silikatoberfläche könnte das Adsorptionsverhalten verschiedener LHCII-Varianten an Silikat, wie es in Kapitel II.3.2 diskutiert wurde, genauer analysiert und möglicherweise quantifiziert werden. Des Weiteren könnten verschiedene LHCII-Varianten auf einer Sensorchipoberfläche immobilisiert werden, die durch Modifikationen wie der Einführung einer R5-Sequenz oder der kovalenten Bindung von Protamin die Fähigkeit besitzen, Kieselsäure zu kondensieren (siehe hierzu Kapitel III.3.1). Sollte die Applikation von Kieselsäure zu unterschiedlichen Ausmaßen an Silikatbildung führen, so könnte mittels dieser Technik ein Silikatfällungspotential für die unterschiedlichen Komplexe ermittelt werden. Der Vorteil dieser Methodik besteht darin, dass deutlich weniger Material gebraucht würde als für eine Quantifizierung über die Bestimmung von Einbauraten. Außerdem könnte die Immobilisierung der Komplexe direkt aus verdünnten Lösungen heraus stattfinden, was das Aufkonzentrieren der Komplexe, das für Fällungsreaktionen notwendig ist (3.1.4), überflüssig machen würde. Die Bindung von LHCII über verschiedene Kopplungssysteme wurde darüber hinaus hinreichend analysiert [200], so dass bereits bekannte LHCII-Immobilisierungsmethoden den Reaktionsbedingungen angepasst werden können. Ein nochmals optimierter Aufbau ermöglicht durch geschickte Wahl der Oberflächenbelegungsdichte mit Protein, Kondensationskeimbildung und Kondensationswachstum kinetisch zu unterscheiden, was bei der Molybdat-Blau-Methode schwer möglich ist. Der immobilisierte Zustand des Proteins könnte außerdem den normalerweise negativen Einfluss dieses auf das Partikelwachstum deutlich verringern, da eine gleichmäßige Belegung der Partikeloberfläche durch Protein stark limitiert sein sollte.

4.2. Einschluss von nativem LHCII in Polyacrylamid

Welche Motivation steckte hinter dem Plan, LHCII in PAA einzupolymerisieren? Einen Einschluss von Komplexen in PAA zu etablieren, geschah grundsätzlich aus zwei völlig unterschiedlichen Be-

weggründen. Zum einen sollte so ermöglicht werden, Silikat-eingeschlossene Komplexe in einem resuspendierten Zustand zu immobilisieren, um ausreichend Komplexe im Lichtstrahl für eine CD-Messung zu halten, was in Lösung unmöglich war. Dass spektroskopische Analysen von LHCII in PAA grundsätzlich möglich sind, wurde schon von Ruban *et al.* gezeigt [182]. Zum anderen sollte überprüft werden, ob ein Einschließen von LHCII in ein PAA-Netzwerk dazu führen kann, thermisch bedingte Molekülbewegungen so einzuschränken, dass ein Strukturverlust des LHCII bei erhöhten Temperaturen verhindert wird.

Folgenden Bedingungen für die Etablierung der Polymerisationsreaktion sollte Rechnung getragen werden: Ein möglichst schnelles auspolymerisieren, um das Absinken der Silikat-eingeschlossenen Komplexe zu verhindern, bei gleichzeitiger ausreichend langer Polymerisationszeit, um die Bildung von Schlieren zu verhindern. Die Geschwindigkeit der Polymerisation lässt sich bei gleicher Acrylamidkonzentration vor allem durch die beiden Faktoren Temperatur und APS-Konzentration regulieren. Eine Erhöhung führt in beiden Fällen zu einer Beschleunigung [201; 202]. Die APS-Konzentration beeinflusst nicht signifikant die Polymerisationsgeschwindigkeit, wohl allerdings die Komplexintegrität. Unabhängig der PAA-Konzentration führten 0,7 % APS zu einer starken Ausbleichung der Proben, die schneller bei den RT- als bei den Eis-Proben ablief (Abb. V.12). Der negative Einfluss auf die Komplexe durch APS beruht sehr wahrscheinlich auf dessen starker oxidativer Wirkung. Es ist bekannt, dass APS zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen kann [203]. Wasserstoffperoxid beispielsweise wird eine wichtige Rolle im Chlorophyllabbau zugeschrieben und zwar direkt beim Entfärbungsprozess durch die Öffnung des Tetrapyrrol-Ringsystems [204–207]. Bei der Verwendung von 0,7 % APS scheinen nach der Polymerisation noch ausreichend nicht-reagierte Moleküle vorzuliegen, die im Laufe der Lagerungszeit zerfallen – also Radikale bilden – und gemeinsam mit Sauerstoff für die Bleichung der Komplexe verantwortlich sind. Das vermutete Zusammenspiel mit Sauerstoff wird dadurch gestützt, dass die Bleichung der Pigmente im Gel Gradienten-artig von der Seite des Gels beginnt, die zur Küvettenöffnung weist. Bei der 20 %-igen PAA Probe, polymerisiert bei RT, ist schon direkt eine leichte Entfärbung zu erkennen und außerdem ist die Ausbildung einer Chlorophyll *b*-Schulter im Emissionsspektrum, was auf einen gestörten Energietransfer hinweist, zu beobachten. Die Erhöhung der Temperatur ist neben der TEMED-katalysierten Reaktion eine weitere Möglichkeit, APS homolytisch aufzuspalten. Dies stellt einen weiteren Hinweis auf die hervorgehobene Rolle des APS in der Pigmentbleichung dar, da dieser Effekt unter gleichen Bedingungen bei einer 0,1 %-igen APS-Konzentration bzw. bei gleicher APS-Konzentration auf Eis nicht auftritt. Die Verringerung der APS-Konzentration auf ein Siebtel scheint also einen nahezu vollständigen APS-Verbrauch zu bedingen, so dass kein APS-Überschuss vorlag, der Komplex-schädigend wirken könnte. Da kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Polymerisationszeit in Abhängigkeit von der APS-Konzentration beobachtet werden konnte, wurden sämtliche weiteren Reaktionen stets bei 0,1 % APS und RT durchgeführt. Eine Abhängigkeit der Komplexintegrität vom Polymerisations-

grad des PAA ließ sich nicht feststellen. Es erwies sich als vorteilhaft, sämtliche Lösungen für die Polymerisation auf die spätere Reaktionstemperatur vorzutemperieren. Dies verhinderte eine Schlierenbildung durch temperaturbedingte Entmischungsvorgänge in der Lösung während des Polymerisierens. Mit dem so optimierten Herstellungsprotokoll ließen sich in Silikat-eingeschlossene Komplexe CD-spektroskopisch vermessen (II.3.2).

Das Potential, LHCII durch Einschluss in PAA gegenüber thermischem Stress zu stabilisieren, ist in 10 %-igem PAA nicht gegeben, während die Destruktion in 20 %-igem PAA verlangsamt abläuft. Wie können diese Beobachtungen erklärt werden? Die thermische Destruktion des LHCII beginnt vermutlich mit einem Verlust einzelner Chlorophylle, bevor die Trimere in Monomere zerfallen und anschließend die Tertiärstruktur dieser verloren geht (Daten nicht gezeigt). In Kapitel II.3.2 wurde die drastisch erhöhte thermische Stabilität der Komplexe mit einer räumlichen Separierung dieser voneinander und vor allem von leeren Detergenzmicellen begründet. Hierdurch bleiben die hydrophoben Pigmente Komplex-gebunden und die Quartärstruktur intakt. Grundsätzlich wäre zusätzlich auch die Einschränkung von molekularen Proteinbewegungen durch den engen räumlichen Einschluss in ein polymeres Netzwerk als Stabilisierungsmechanismus denkbar. Das PAA-Netzwerk eines 20 %-igen Gels hat einen ungefähren Porendurchmesser von 3,3 nm, bei einem 10 %-igen Gel liegt dieser etwa bei 4,6 nm (abgeschätzt nach [181]). Damit sind die Poren in diesen Netzwerken enger als die Größe eines Detergenz-gelösten trimeren LHCII. Beim Polymerisierungsprozess sollten die Komplexe daher recht eng von diesem Netzwerk eingeschlossen werden. Dennoch scheint hier ein signifikant stabilisierender Effekt nicht aufzutreten, wie er beim Einschluss in Silikat zu beobachten war. Worin liegt also der signifikante Unterschied zwischen einem Silikat- und einem PAA-Netzwerk, wo beide doch in etwa vergleichbar große Aufenthaltsräume für den LHCII bilden? Das amorphe Silikatnetzwerk bildet sich aus der unregelmäßigen dreidimensionalen Verknüpfung von Silikatpartikeln. Außerdem ist die Oberfläche der Partikel negativ geladen, so dass es zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen basischen Bereichen des LHCII und den Partikeln kommt (siehe II.3.2). Im PAA-Netzwerk sind solche ionischen Wechselwirkungen nicht möglich; ganz im Gegenteil ist eine für die Anwendung in der Proteinanalytik entscheidende Eigenschaft eben das inerte Verhalten gegenüber Proteinen. Die Beweglichkeit der Komplexe ist damit per se deutlich größer. Außerdem besteht ein PAA-Netzwerk aus linearen Polymerketten, die untereinander quervernetzt sind. Ohne Quervernetzungen sind diese linearen Ketten stark gegeneinander verschiebbar. Diese Bewegungsmöglichkeit wird zwar durch Quervernetzungen eingeschränkt, dennoch besitzt auch das quervernetzte Polymer elastomere Eigenschaften (BAA-Anteil 3 % [w/w] bezogen auf Gesamtacrylamid). Hinzu kommt, dass eine Temperaturerhöhung das Verschieben der Polymerketten gegeneinander begünstigt. Diese erhöhte Strukturflexibilität des einschließenden Polymers und fehlende ionische Interaktionen können vermutlich die Diffusion von Micellen/Komplexmicellen nicht ausreichend einschränken und auch einer Proteinfaltung nicht ausreichend entgegenwirken. Dennoch erkennt man auch bei PAA, dass sich ein enger

werdendes Netzwerk negativ auf eine thermische Destruktion auswirkt (wenn auch um ein Vielfaches geringer als beim anorganischen Silikat). Die PAA-Flexibilität ließe sich durch eine Erhöhung des BAA-Anteils bei der Polymerisation erhöhen. Dieser lag bei den hier durchgeführten Experimenten bei 3 % [w/w] bezogen auf den Gesamtacrylamidgehalt. Es ist allerdings bekannt, dass ein gesteigerter Anteil an BAA (> 5 %) neben der Veränderung der Geleigenschaften (spröde und hydrophob) auch die Porenweite vergrößert [181]. Eine minimale Porenweite wird bei 5 % erreicht, so dass der Rahmen für weitere Modifikationen diesbezüglich relativ klein ist. Eine Erhöhung der Gesamtacrylamidkonzentration (bis zu 30 % [w/w]) kann vermutlich den leichten Effekt der verminderten Destruktion bei 20 %-igen Gelen weiterführen, jedoch ist nicht zu erwarten, dass ein vergleichbares Ausmaß erreicht wird, wie bei einem Einschluss in Silikat.

Die mittels CD-Spektroskopie gemessenen Schmelzpunkte weichen deutlich von denen ab (etwas mehr als 10°C niedriger), die üblicherweise für nativen und rekombinanten LHCII bestimmt wurden [50; 208]. Begründet liegt dies an der Schwierigkeit der Temperaturbestimmung während der Schmelzkurven-Messung im CD-Gerät. Es wurden 1 x 1 cm Kunststoffküvetten verwendet, die sich per se langsamer erwärmen. Zudem ist die Wärmeleitfähigkeit des PAA-Block schlechter als die von Wasser, so dass es zu einer langsameren und inhomogeneren Erwärmung der Probe kam. Während der Messung wurden daher zwei Temperaturen parallel bestimmt: Mit einem Bimetall-Fadenthermometer wurde die Temperatur direkt im Gel und mit dem Geräte-internen Thermometer die Messtemperatur im Probenblock des CD-Gerätes gemessen. Letztere wurde durch die Software mit dem aktuellen CD-Signal korreliert. Nachträglich wurden die Werte der Messtemperatur des Gerätes mit den Messwerten in der Probe verrechnet und so eine Temperaturkorrektur vorgenommen. Schwächen dieser Methode sind sicherlich das händische Aufzeichnen und Korrigieren der Temperaturen. Dennoch konnte auch in Blindmessungen mit einer 0,2 mm Glasküvette bei beschriebener vergleichender Temperaturmessung eine Differenz zwischen Gerätemesswert und Probenmesswert bestimmt werden, so dass hier zukünftig weitere Analysen der Temperaturgenauigkeit nötig sein werden.

Der Einschluss in ein dichtes organisches Polymernetzwerk beeinflusst also bei Verwendung von 0,1 % APS als Radikalstarter nicht die Komplexintegrität und die optische Transparenz des Gels ermöglicht spektroskopische Analyse im sichtbaren Spektralbereich. Auch ergibt sich bei einer Polymerisation bei RT die Möglichkeit, Silikat-eingeschlossenen LHCII so zu präparieren, dass er CD-spektroskopisch vermessbar wird. Allerdings erhöht sich bei nicht in Silikat-eingeschlossenen Komplexen durch den Einschluss in PAA die thermische Stabilität nicht signifikant.

5. Zusammenfassung

Der Haupt-Lichtsammelkomplex des Fotosystems II (LHCII) setzt sich aus einem Proteinanteil und nicht-kovalent gebundenen Pigmenten – 8 Chlorophyll *a*, 6 Chlorophyll *b* und 4 Carotinoide - zusammen. Er assembliert *in vivo* zu einem Trimer, in dem die Monomereinheiten ebenfalls nicht-kovalent miteinander wechselwirken. Die ausgesprochen hohe Farbstoffdichte und die Tatsache, dass der Komplex rekombinant hergestellt werden kann, machen den LHCII zu einem interessanten Kandidaten für technische Anwendungen wie einer Farbstoffsolarzelle. Allerdings muss hierzu seine thermische Stabilität drastisch erhöht werden.

Der Einschluss von Proteinen/Enzymen in Silikat erhöht deren Stabilität gegenüber Hitze signifikant. LHCII sollte als erster rekombinanter Membranproteinkomplex mittels kovalent verbundener, polykationischen Sequenzen in Silikat eingeschlossen werden. Hierzu wurde der Komplex auf zwei Weisen polykationisch modifiziert: Auf Genebene wurde die Sequenz des R5-Peptids in den N-terminalen Bereich des LHCP-Gens eingeführt und ein Protokoll zur Überexpression, Rekonstitution und Trimerisierung etabliert. Außerdem wurde eine kovalente Modifikation des trimeren LHCII mit dem Arginin-reichen Protamin über heterobifunktionelle Crosslinker entwickelt. Beide resultierenden LHCII-Derivate waren in der Lage, Silikat autogen zu fällen. Die Stabilisierung der so in Silikat präzipitierten Komplexe war jedoch deutlich geringer als bei nicht-modifizierten Komplexen, die durch eine Spermin-induzierte Copräzipitation eingeschlossen wurden. Dabei zeigte sich, dass für den Anteil der eingebauten Komplexe und das Ausmaß an Stabilisierung die Größe und klare partikuläre Struktur des Silikats entscheidend ist. Kleine Partikel mit einem Durchmesser von etwa 20 nm führten zu einem Einbau von rund 75 % der Komplexe, und mehr als 80 % des Energietransfers innerhalb des Komplexes blieben erhalten, wenn für 24 Stunden bei 50°C inkubiert wurde. Nicht in Silikat eingeschlossene Komplexe verloren bei 50°C ihren Komplex-internen Energietransfer binnen weniger Minuten. Es war dabei unerheblich, ob die Partikelgröße durch die Wahl des Puffers und des entsprechenden pH-Wertes, oder aber durch Variation des Spermin-zu-Kieselsäure-Verhältnisses erreicht wurde. Wurden die polykationisch veränderten Komplexe in solchen Copräzipitationen verwendet, so erhöhte sich der Anteil an eingebauten Komplexen auf über 90 %, jedoch wurde nur bei der R5-modifizierten Variante vergleichbare Ausmaße an Stabilisierung erreicht. Ein noch höherer Anteil an Komplexen wurde in das Silikatpellet eingebaut, wenn LHCII kovalent mit Silanolgruppen modifiziert wurde (95 %); jedoch war das Ausmaß der Stabilisierung wiederum geringer als bei einer Copräzipitation. Die analysierten Fällungssysteme waren außerdem in der Lage, Titandioxid zu fällen, wobei der Komplex in dieses eingebaut wurde. Allerdings muss das Stabilisierungspotential hier noch untersucht werden. Innerhalb eines Silikatpräzipitats aggregierten die Komplexe nicht, zeigten aber einen inter-trimeren Energietransfer, der sehr wahrscheinlich auf einem Förster Resonanz Mechanismus basiert.

Dies und das hohe Maß an Stabilisierung eröffnen neue Möglichkeiten, rekombinanten LHCII in technischen Applikationen als Lichtsammelkomponente zu verwenden.

6. Summary

The major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHCII) of the photosynthetic apparatus in green plants consists of a membrane protein and numerous non-covalently bound pigments – 8 chlorophyll *a*, 6 chlorophyll *b* and 4 carotenoids. LHCII assembles *in vivo* to form a trimer with non-covalently linked monomer units. Due to its high pigment density and the self-organization of the recombinant complex, LHCII is potentially interesting as a light-harvesting component in synthetic constructs. However, for such applications its stability needs to be significantly improved.

In this work, LHCII was dramatically stabilized by encapsulating it in polymerizing colloidal silica. Polymerizing was induced by the naturally occurring tetraamine spermine, which was mixed with LHCII (coprecipitation). The encapsulated LHCII stayed functional at 50 °C for up to 24 h instead of a few minutes in detergent solution. Both the extent of stabilization and the yield of encapsulation strongly increased with decreasing diameters of the silica particles. This effect was completely independent of the synthetic route: Small particles (20 nm) could be gained by varying buffer and pH-value as well as the N:Si ratio (spermine to silicic acid ratio) with the same high extent of stabilization (more than 80 % remaining energy transfer) and encapsulation (75 %).

Furthermore LHCII was modified with polycationic protein-sequences. The diatom-derived R5-peptide was added to the N-terminus of LHCP by fusing the gene sequences. Protocols for overexpression, reconstitution and trimerization of the resulting chimeric protein could be established. In an alternative approach, trimeric LHCII was covalently modified with the protein protamine via a heterobifunctional crosslinker. The silica encapsulation efficiency was enhanced by polycationic peptides attached to LHCII in both cases if modified LHCII was used in a spermine mediated coprecipitation (>90 %). But stabilization differed significantly. While R5-modified LHCII were stabilized comparable to non-modified ones, protamine-modification unexpectedly decreased the extent of stabilization. Both polycationic modified LHCII variants were able to polymerize silicic acid without spermine and thus to promote a self-encapsulation into silica. The extent of stabilization was much lower in comparison to encapsulation via coprecipitation. In neither case, formation of clearly defined particles was observed which seems to be the key-factor for a high extent of stabilization. Encapsulation was nearly quantitative (95 %) when mercaptopropylsilane was introduced to trimeric LHCII via a heterobifunctional crosslinker but the extent of stabilization after spermine-induced coprecipitation was lower in comparison to non-modified LHCII again. Furthermore it was possible to precipitate titanium dioxide with all kinds of polycationic molecules used in this work. Complex stability was not negatively influenced by this encapsulation. Effects on stabilizing against thermal stress have to be tested soon.

Within silica encapsulated LHCII shows an efficient inter-complex energy transfer. Because of this and the high extent of stabilization, silica encapsulated LHCII opens new possibilities towards its use in technical applications like dye-sensitized solar cells.

7. Literatur

- [1] Chapin, D. M., Fuller, C. S., Pearson, G. L. (1954) A New Silicon p-n Junction Photocell for Converting Solar Radiation into Electrical Power. *J. Appl. Phys.*, 25, 676.
- [2] Arbeitsgruppe Energiebilanzen (AGEB). Bruttostromerzeugung in Deutschland für 2010 bis 2012, 2013. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/Wirtschaftsbereiche/Energie/Erzeugung/Tabellen/Bruttostromerzeugung.html>.
- [3] Barber, J. (2007) Biological solar energy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 365, 1007–1023.
- [4] BP p.l.c. BP Statistical Review of World Energy June 2013, 2013. http://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/statistical-review/statistical_review_of_world_energy_2013.pdf.
- [5] Renewable Energy Policy Network. Renewables 2013 Global Status Report, 2012. http://www.ren21.net/Portals/0/documents/Resources/GSR/2013/GSR2013_lowres.pdf.
- [6] O'Regan, B., Grätzel, M. (1991) A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films. *Nature*, 353, 737–740.
- [7] Grätzel, M. (2001) Photoelectrochemical cells. *Nature*, 414, 338–344.
- [8] Zhang, S., Yang, X., Numata, Y., Han, L. (2013) Highly efficient dye-sensitized solar cells: progress and future challenges. *Energy Environ. Sci.*, 6, 1443.
- [9] Green, M. A., Emery, K., Hishikawa, Y., Warta, W., Dunlop, E. D. (2013) Solar cell efficiency tables (version 41). *Prog. Photovolt: Res. Appl.*, 21, 1–11.
- [10] Gratzel, M. (2007) Photovoltaic and photoelectrochemical conversion of solar energy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 365, 993–1005.
- [11] Gonçalves, L. M., Zea Bermudez, V. de, Ribeiro, H. A., Mendes, A. M. (2008) Dye-sensitized solar cells: A safe bet for the future. *Energy Environ. Sci.*, 1, 655.
- [12] Kim, B.-G., Chung, K., Kim, J. (2013) Molecular Design Principle of All-organic Dyes for Dye-Sensitized Solar Cells. *Chem. Eur. J.*, 19, 5220–5230.
- [13] Hagfeldt, A., Boschloo, G., Sun, L., Kloo, L., Pettersson, H. (2010) Dye-Sensitized Solar Cells. *Chem. Rev.*, 110, 6595–6663.
- [14] Heldt, H. W. (2003) Pflanzenbiochemie. 3rd ed., Heidelberg, *Spektrum Akademischer Verlag*.
- [15] Armond, P. A., Schreiber, U., Bjorkman, O. (1978) Photosynthetic Acclimation to Temperature in the Desert Shrub, *Larrea divaricata*: II. Light-harvesting Efficiency and Electron Transport. *PLANT PHYSIOLOGY*, 61, 411–415.
- [16] Berry, J., Bjorkman, O. (1980) Photosynthetic Response and Adaptation to Temperature in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 31, 491–543.
- [17] Thomas, P. G., Dominy, P. J., Vigh, L., Mansourian, A. R., Quinn, P. J., Williams, W. P. (1986) Increased thermal stability of pigment-protein complexes of pea thylakoids following catalytic hydrogenation of membrane lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 849, 131–140.
- [18] Mershin, A., Matsumoto, K., Kaiser, L., Yu, D., Vaughn, M., Nazeeruddin, M. K., Bruce, B. D., Graetzel, M., Zhang, S. (2012) Self-assembled photosystem-I biophotovoltaics on nanostructured TiO₂ and ZnO. *Sci. Rep.*, 2, 234
- [19] LeBlanc, G., Chen, G., Gizzie, E. A., Jennings, G. K., Cliffler, D. E. (2012) Enhanced Photocurrents of Photosystem I Films on p-Doped Silicon. *Adv. Mater.*, 24, 5959–5962.

- [20] Gunther, D., LeBlanc, G., Prasai, D., Zhang, J. R., Cliffel, D. E., Bolotin, K. I., Jennings, G. K. (2013) Photosystem I on Graphene as a Highly Transparent, Photoactive Electrode. *Langmuir*, 29, 4177–4180.
- [21] Pu, Y., Zhu, G.-L., Ge, B.-S., Yu, D.-Y., Wang, Y.-P., Qin, S. (2013) Photocurrent generation by recombinant allophycocyanin trimer multilayer on TiO₂ electrode. *Chinese Chemical Letters*, 24, 163–166.
- [22] Nagata, M., Amano, M., Joke, T., Fujii, K., Okuda, A., Kondo, M., Ishigure, S., Dewa, T., Iida, K., Secundo, F., Amao, Y., Hashimoto, H., Nango, M. (2012) Immobilization and Photocurrent Activity of a Light-Harvesting Antenna Complex II, LHCII, Isolated from a Plant on Electrodes. *ACS Macro Lett.*, 1, 296–299.
- [23] Yu, D., Zhu, G., Liu, S., Ge, B., Huang, F. (2013) Photocurrent activity of light-harvesting complex II isolated from spinach and its pigments in dye-sensitized TiO₂ solar cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, in press, doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.02.114
- [24] Standfuss, J., van Terwisscha Scheltinga, A. C., 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.
- [25] Ballottari, M., Girardon, J., Dall'Osto, L., Bassi, R. (2012) Evolution and functional properties of Photosystem II light harvesting complexes in eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817, 143–157.
- [26] Bassi, R., Sandona, D., Croce, R. (1997) Novel aspects of chlorophyll a/b-binding proteins. *Physiol Plant*, 100, 769–779.
- [27] Allen, J. F., Forsberg, J. (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends in Plant Science*, 6, 317–326.
- [28] Frank, H. A., Cogdell, R. J. (1996) Carotenoids in Photosynthesis. *Photochem Photobiol*, 63, 257–264.
- [29] Muller, P. (2001) Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *PLANT PHYSIOLOGY*, 125, 1558–1566.
- [30] Allen, J. F. (2003) State Transitions - a Question of Balance. *Science*, 299, 1530–1532.
- [31] Baroli, I., Niyogi, K. K. (2000) Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355, 1385–1394.
- [32] Andersson, J., Wentworth, M., Walters, R. G., Howard, C. A., Ruban, A. V., Horton, P., Jansson, S. (2003) Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II – effects on photosynthesis, grana stacking and fitness. *The Plant Journal*, 35, 350–361.
- [33] Teardo, E., Patrizia Polverino de Laureto, Bergantino, E., Vecchia, F. D., Rigoni, F., Szabò, I., Giacometti, G. M. (2007) Evidences for interaction of PsbS with photosynthetic complexes in maize thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767, 703–711.
- [34] Barros, T., Kühlbrandt, W. (2009) Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting Complex SII6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1787, 753–772.
- [35] Standfuss, J. (2004) The Three Isoforms of the Light-harvesting Complex II: SPECTROSCOPIC FEATURES, TRIMER FORMATION, AND FUNCTIONAL ROLES. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 36884–36891.
- [36] Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., Chang, W. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, 428, 287–292.
- [37] Nußberger, S., Dörr, K., Wang, D. N., Kühlbrandt, W. (1993) Lipid-protein Interactions in Crystals of Plant Light-harvesting Complex. *Journal of Molecular Biology*, 234, 347–356.

- [38] Hobe, S., Foerster, R., Klingler, J., Paulsen, H. (1995) N-Proximal Sequence Motif in Light-Harvesting Chlorophyll a/b-Binding Protein Is Essential for the Trimerization of Light-Harvesting Chlorophyll a/b Complex. *Biochemistry*, *34*, 10224–10228.
- [39] Kühlbrandt, W. (1994) Structure and function of the plant light-harvesting complex, LHC-II. *Current Opinion in Structural Biology*, *4*, 519–528.
- [40] Dockter, C., Muller, A. H., Dietz, C., Volkov, A., Polyhach, Y., Jeschke, G., Paulsen, H. (2012) Rigid Core and Flexible Terminus: STRUCTURE OF SOLUBILIZED LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL a/b COMPLEX (LHCII) MEASURED BY EPR. *Journal of Biological Chemistry*, *287*, 2915–2925.
- [41] Cashmore, A. R. (1984) Structure and Expression of a Pea Nuclear Gene Encoding a Chlorophyll a/b-Binding Polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*, 2960–2964.
- [42] 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.
- [43] Paulsen, H., Hobe, S. (1992) Pigment-binding properties of mutant light-harvesting chlorophyll-a/b-binding protein. *Eur J Biochem*, *205*, 71–76.
- [44] Hobe, S., Prytulla, S., Kuehlbrandt, W., Paulsen, H. (1994) Trimerization and crystallization of reconstituted Light-harvesting chlorophyll a/b complex. *EMBO JOURNAL*, *13*, 3423–3429.
- [45] Rogl, H., Kosemund, K., Kühlbrandt, W., Collinson, I. (1998) Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Letters*, *432*, 21–26.
- [46] 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). *Journal of Molecular Biology*, *366*, 1045–1054.
- [47] Volkov, A., Dockter, C., Bund, T., Paulsen, H., Jeschke, G. (2009) Pulsed EPR Determination of Water Accessibility to Spin-Labeled Amino Acid Residues in LHCIIb. *Biophysical Journal*, *96*, 1124–1141.
- [48] Erker, W., Boggasch, S., Xie, R., Grundmann, G., Paulsen, H., Basché, T. (2010) Assemblies of semiconductor quantum dots and light-harvesting-complex II. *Journal of Luminescence*, *130*, 1624–1627.
- [49] Werwie, M. (2013) Biologischer Lichtsammler (LHCII) für Halbleiternanokristalle (Quantum Dots). *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- [50] Gundlach, K., Werwie, M., Wiegand, S., Paulsen, H. (2009) Filling the "green gap" of the major light-harvesting chlorophyll a/b complex by covalent attachment of Rhodamine Red. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1787*, 1499–1504.
- [51] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*, 18485–18490.
- [52] 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.
- [53] Werwie, M., Xu, X., Haase, M., Basché, T., Paulsen, H. (2012) Bio Serves Nano: Biological Light-Harvesting Complex as Energy Donor for Semiconductor Quantum Dots. *Langmuir*, *28*, 5810–5818.
- [54] Mozhaev, V. V., Berezin, I. V., Martinek, K., Nosoh, Y. (1988) Structure-Stability Relationship in Proteins: Fundamental Tasks and Strategy for the Development of Stabilized Enzyme Catalysts for Biotechnolog. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *23*, 235–281.

- [55] Vagenende, V., Yap, M. G. S., Trout, B. L. (2009) Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. *Biochemistry*, *48*, 11084–11096.
- [56] Cleland, J. L., Builder, S. E., Swartz, J. R., Winkler, M., Chang, J. Y., Wang, D. I. C. (1992) Polyethylene Glycol Enhanced Protein Refolding. *Nat Biotechnol*, *10*, 1013–1019.
- [57] Golovanov, A. P., Hautbergue, G. M., Wilson, S. A., Lian, L.-Y. (2004) A Simple Method for Improving Protein Solubility and Long-Term Stability. *J. Am. Chem. Soc.*, *126*, 8933–8939.
- [58] Collins, K. D. (2004) Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods*, *34*, 300–311.
- [59] Scott, D. J., Kummer, L., Tremmel, D., Plückthun, A. (2013) Stabilizing membrane proteins through protein engineering. *Current Opinion in Chemical Biology*, *17*, 427–435.
- [60] Yu, S. M., McQuade, D. T., Quinn, M. A., Hackenberger, C. P., Gellman, S. H., Krebs, M. P., Polans, A. S. (2000) An improved tripod amphiphile for membrane protein solubilization. *Protein Sci.*, *9*, 2518–2527.
- [61] Tribet, C. (1996) Amphipols: Polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*, 15047–15050.
- [62] Zhao, X., Nagai, Y., Reeves, P. J., Kiley, P., Khorana, H. G., Zhang, S. (2006) Designer short peptide surfactants stabilize G protein-coupled receptor bovine rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*, 17707–17712.
- [63] Liu, S., Qiu, Y., Yu, D.-Y. (2010) The effect of amphiphilic peptide surfactants on the light-harvesting complex II. *Photosynthetica*, *48*, 610–616.
- [64] Argos, P., Rossmann, M. G., Grau, U. M., Zuber, H., Frank, G., Tratschin, J. D. (1979) Thermal stability and protein structure. *Biochemistry*, *18*, 5698–5703.
- [65] Fontana, A. (1991) Analysis and modulation of protein stability. *Current Opinion in Biotechnology*, *2*, 551–560.
- [66] Bowie, J. U. (2001) Stabilizing membrane proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, *11*, 397–402.
- [67] Cao, L. (2005) Immobilised enzymes: science or art? *Current Opinion in Chemical Biology*, *9*, 217–226.
- [68] Kim, J., Grate, J. W., Wang, P. (2006) Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, *61*, 1017–1026.
- [69] Brady, D., Jordaán, J. (2009) Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol Lett*, *31*, 1639–1650.
- [70] Hwang, E. T., Gu, M. B. (2013) Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Eng. Life Sci.*, *13*, 49–61.
- [71] Roach, P., Farrar, D., Perry, C. C. (2006) Surface Tailoring for Controlled Protein Adsorption: Effect of Topography at the Nanometer Scale and Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.*, *128*, 3939–3945.
- [72] Léonard, A., Dandoy, P., Danloy, E., Leroux, G., Meunier, C. F., Rooke, J. C., Su, B.-L. (2011) Whole-cell based hybrid materials for green energy production, environmental remediation and smart cell-therapy. *Chem. Soc. Rev.*, *40*, 860.
- [73] Badjić, J. D., Kostić, N. M. (1999) Effects of Encapsulation in Sol–Gel Silica Glass on Esterase Activity, Conformational Stability, and Unfolding of Bovine Carbonic Anhydrase II. *Chemistry of Materials*, *11*, 3671–3679.
- [74] Takahashi, H., Li, B., Sasaki, T., Miyazaki, C., Kajino, T., Inagaki, S. (2000) Catalytic Activity in Organic Solvents and Stability of Immobilized Enzymes Depend on the Pore Size and Surface Characteristics of Mesoporous Silica. *Chem. Mater.*, *12*, 3301–3305.

- [75] Nguyen, D. T., Smit, M., Dunn, B., Zink, J. I. (2002) Stabilization of Creatine Kinase Encapsulated in Silicate Sol–Gel Materials and Unusual Temperature Effects on Its Activity. *Chem. Mater.*, *14*, 4300–4306.
- [76] Luckarift, H. R., Spain, J. C., Naik, R. R., Stone, M. O. (2004) Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nat Biotech*, *22*, 211–213.
- [77] Li, L., Jiang, Z., Wu, H., Feng, Y., Li, J. (2009) Protamine-induced biosilica as efficient enzyme immobilization carrier with high loading and improved stability. *Materials Science and Engineering: C*, *29*, 2029–2035.
- [78] Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D., Ottolenghi, M. (1990) Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes. *Materials Letters*, *10*, 1–5.
- [79] Avnir, D., Braun, S., Lev, O., Ottolenghi, M. (1994) Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials. *Chem. Mater.*, *6*, 1605–1614.
- [80] Coiffier, A., Coradin, T., Roux, C., Bouvet, O. M. M., Livage, J. (2001) Sol–gel encapsulation of bacteria: a comparison between alkoxide and aqueous routes. *J. Mater. Chem.*, *11*, 2039–2044.
- [81] Meunier, C. F., van Cutsem, P., Kwon, Y.-U., Su, B.-L. (2009) Thylakoids entrapped within porous silica gel: towards living matter able to convert energy. *J. Mater. Chem.*, *19*, 1535.
- [82] Meunier, C. F., Rooke, J. C., Léonard, A., van Cutsem, P., Su, B.-L. (2010) Design of photochemical materials for carbohydrate production via the immobilisation of whole plant cells into a porous silica matrix. *J. Mater. Chem.*, *20*, 929.
- [83] Leonard, A., Rooke, J. C., Meunier, C. F., Sarmiento, H., Descy, J.-P., Su, B.-L. (2010) Cyanobacteria immobilised in porous silica gels: exploring biocompatible synthesis routes for the development of photobioreactors. *Energy Environ. Sci.*, *3*, 370–377.
- [84] Rooke, J. C., Léonard, A., Sarmiento, H., Meunier, C. F., Descy, J.-P., Su, B.-L. (2011) Novel photosynthetic CO₂ bioconverter based on green algae entrapped in low-sodium silica gels. *J. Mater. Chem.*, *21*, 951.
- [85] Costa, S. C., Gester, R. M., Guimarães, J. R., Amazonas, J. G., Nero, J. D., Silva, S. B., Galembeck, A. (2008) The entrapment of organic dyes into sol–gel matrix: Experimental results and modeling for photonic applications. *Optical Materials*, *30*, 1432–1439.
- [86] Wu, S., Ellerby, L. M., Cohan, J. S., Dunn, B., El-Sayed, M. A., Valentine, J. S., Zink, J. I. (1993) Bacteriorhodopsin encapsulated in transparent sol-gel glass: a new biomaterial. *Chem. Mater.*, *5*, 115–120.
- [87] O'Dell, W. B., Beatty, K. J., Kuo-Hsiang Tang, J., Blankenship, R. E., Urban, V. S., O'Neill, H. (2012) Sol–gel entrapped light harvesting antennas: immobilization and stabilization of chlorosomes for energy harvesting. *J. Mater. Chem.*, *22*, 22582.
- [88] O'Neill, H., Greenbaum, E. (2005) Spectroscopy and Photochemistry of Spinach Photosystem I Entrapped and Stabilized in a Hybrid Organosilicate Glass. *Chem. Mater.*, *17*, 2654–2661.
- [89] Kopnov, F., Cohen-Ofri, I., Noy, D. (2011) Electron Transport between Photosystem II and Photosystem I Encapsulated in Sol-Gel Glasses. *Angew. Chem. Int. Ed.*, *50*, 12347–12350.
- [90] Field, C. B. (1998) Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science*, *281*, 237–240.
- [91] Kröger, N., Poulsen, N. (2008) Diatoms—From Cell Wall Biogenesis to Nanotechnology. *Annu. Rev. Genet.*, *42*, 83–107.
- [92] Smetacek, V. (1999) Diatoms and the Ocean Carbon Cycle. *Protist*, *150*, 25–32.
- [93] Kröger, N., Deutzmann, R., Sumper, M. (1999) Polycationic Peptides from Diatom Biosilica That Direct Silica Nanosphere Formation. *Science*, *286*, 1129–1132.

- [94] Poulsen, N. (2003) Biosilica formation in diatoms: Characterization of native silaffin-2 and its role in silica morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*, 12075–12080.
- [95] Kröger, N. (2002) Self-Assembly of Highly Phosphorylated Silaffins and Their Function in Biosilica Morphogenesis. *Science*, *298*, 584–586.
- [96] Kröger, N., Deutzmann, R., Bergsdorf, C., Sumper, M. (2000) Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*, 14133–14138.
- [97] Mizutani, T., Nagase, H., Fujiwara, N., Ogoshi, H. (1998) Silicic Acid Polymerization Catalyzed by Amines and Polyamines. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, *71*, 2017–2022.
- [98] Iler, R. K. (1979) The Chemistry of Silica. 1st ed., Hoboken, *John Wiley & Sons*.
- [99] Coradin, T., Lopez, P. J. (2003) Biogenic Silica Patterning: Simple Chemistry or Subtle Biology? *ChemBioChem*, *4*, 251–259.
- [100] Patwardhan, S. V., Clarkson, S. J., Perry, C. C. (2005) On the role(s) of additives in bioinspired silicification. *Chem. Commun*, 1113.
- [101] Bogush, G. H., Tracy, M. A., Zukoski, C. F., IV (1988) Preparation of monodisperse silica particles: Control of size and mass fraction. *Journal of Non-Crystalline Solids*, *104*, 95–106.
- [102] Marner, W. D., Shaikh, A. S., Muller, S. J., Keasling, J. D. (2008) Morphology of Artificial Silica Matrices Formed via Autosilicification of a Silaffin/Protein Polymer Chimera. *Biomacromolecules*, *9*, 1–5.
- [103] Belton, D., Patwardhan, S. V., Perry, C. C. (2005) Putrescine homologues control silica morphogenesis by electrostatic interactions and the hydrophobic effect. *Chem. Commun.*, 3475.
- [104] Belton, D. J., Patwardhan, S. V., Perry, C. C. (2005) Spermine, spermidine and their analogues generate tailored silicas. *J. Mater. Chem*, *15*, 4629.
- [105] Belton, D. J., Patwardhan, S. V., Annenkov, V. V., Danilovtseva, E. N., Perry, C. C. (2008) From biosilicification to tailored materials: Optimizing hydrophobic domains and resistance to protonation of polyamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*, 5963–5968.
- [106] Sumper, M., Kröger, N. (2004) Silica formation in diatoms: the function of long-chain polyamines and silaffins. *J. Mater. Chem.*, *14*, 2059.
- [107] Knecht, M. R., Sewell, S. L., Wright, D. W. (2005) Size Control of Dendrimer-Templated Silica. *Langmuir*, *21*, 2058–2061.
- [108] Lutz, K., Gröger, C., Sumper, M., Brunner, E. (2005) Biomimetic silica formation: Analysis of the phosphate-induced self-assembly of polyamines. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *7*, 2812.
- [109] Gröger, C., Lutz, K., Brunner, E. (2008) Biomolecular Self-assembly and its Relevance in Silica Biomineralization. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *50*, 23–39.
- [110] Schägger, H., Jagow, G. von (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, *166*, 368–379.
- [111] Butler, P. J. G. a. K. W. (1988) Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex from chloroplast membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*, 3797–3801.
- [112] Knecht, M. R., Wright, D. W. (2003) Functional analysis of the biomimetic silica precipitating activity of the R5 peptide from *Cylindrotheca* *Chem. Commun*, 3038.
- [113] Rodríguez, F., Glawe, D. D., Naik, R. R., Hallinan, K. P., Stone, M. O. (2004) Study of the Chemical and Physical Influences upon in Vitro Peptide-Mediated Silica Formation. *Biomacromolecules*, *5*, 261–265.
- [114] Marner, W. D., Shaikh, A. S., Muller, S. J., Keasling, J. D. (2009) Enzyme immobilization via silaffin-mediated autoencapsulation in a biosilica support. *Biotechnology Progress*, *25*, 417–423.

- [115] Nam, D. H., Won, K., Kim, Y. H., Sang, B. in (2009) A novel route for immobilization of proteins to silica particles incorporating silaffin domains. *Biotechnology Progress*, 25, 1643-1649.
- [116] Chien, L.-J., Lee, C.-K. (2008) Biosilicification of dual-fusion enzyme immobilized on magnetic nanoparticle. *Biotechnol. Bioeng*, 100, 223–230.
- [117] Müller, K. (2011) Phosphorylierung von rekombinantem LHCII (light harvesting complex II). *Diplomarbeit*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- [118] Gilbert, P., Moore, L. (2005) Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol*, 99, 703–715.
- [119] Ganz, T., Selsted, M. E., Lehrer, R. I. (1990) Defensins. *European Journal of Haematology*, 44, 1–8.
- [120] Lehrer, R. I., Barton, A., Daher, K. A., Harwig, S. S., Ganz, T., Selsted, M. E. (1989) Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J. Clin. Invest.*, 84, 553–561.
- [121] Mazin, A., Kuzminov, A., Dianov, G., Salganik, R. (1991) Mechanisms of deletion formation in *Escherichia coli* plasmids. *Molec. Gen. Genet.*, 228.
- [122] Chédin, F., Dervyn, E., Dervyn, R., Ehrlich, S. D., Noirot, P. (1994) Frequency of deletion formation decreases exponentially with distance between short direct repeats. *Mol Microbiol*, 12, 561–569.
- [123] Cline, K. (1986) Import of proteins into chloroplasts. Membrane integration of a thylakoid precursor protein reconstituted in chloroplast lysates. *J. Biol. Chem*, 261, 14804–14810.
- [124] Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T. W., Carpenter, J. F. (2003) Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation. *Pharmaceutical Research*, 20, 1325–1336.
- [125] Striolo, A., Bratko, D., Wu, J. Z., Elvassore, N., Blanch, H. W., Prausnitz, J. M. (2002) Forces between aqueous nonuniformly charged colloids from molecular simulation. *J. Chem. Phys.*, 116, 7733.
- [126] Chi, E. Y., Krishnan, S., Kendrick, B. S., Chang, B. S., Carpenter, J. F., Randolph, T. W. (2003) Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Protein Sci.*, 12, 903–913.
- [127] Collins, K. D. (2004) Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods*, 34, 300–311.
- [128] Zhang, J. (2012) Protein-Protein Interactions in Salt Solutions, Protein-Protein Interactions - Computational and Experimental Tools, Dr. Weibo Cai (Ed.), ISBN: 978-953-51-0397-4, InTech, DOI: 10.5772/38056. Available from: <http://www.intechopen.com/books/protein-protein-interactions-computational-and-experimental-tools/protein-protein-interactions-in-salt-solutions>
- [129] Dumetz, A. C., Snellinger-O'Brien, A. M., Kaler, E. W., Lenhoff, A. M. (2007) Patterns of protein-protein interactions in salt solutions and implications for protein crystallization. *Protein Sci.*, 16, 1867–1877.
- [130] Kendrick, B. S., Cleland, J. L., Lam, X., Nguyen, T., Randolph, T. W., Manning, M. C., Carpenter, J. F. (1998) Aggregation of recombinant human interferon gamma: Kinetics and structural transitions. *J. Pharm. Sci.*, 87, 1069–1076.
- [131] Krishnan, S., Chi, E. Y., Webb, J. N., Chang, B. S., Shan, D., Goldenberg, M., Manning, M. C., Randolph, T. W., Carpenter, J. F. (2002) Aggregation of Granulocyte Colony Stimulating Factor under Physiological Conditions: Characterization and Thermodynamic Inhibition †. *Biochemistry*, 41, 6422–6431.
- [132] Coradin, T., Durupthy, O., Livage, J. (2002) Interactions of Amino-Containing Peptides with Sodium Silicate and Colloidal Silica: A Biomimetic Approach of Silicification. *Langmuir*, 18, 2331–2336.

- [133] Wong Po Foo, C. (2006) Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*, 9428–9433.
- [134] Bassindale, A. R., Taylor, P. G., Abbate, V., Brandstadt, K. F. (2009) Simple and mild preparation of silica-enzyme composites from silicic acid solution. *J. Mater. Chem.*, *19*, 7606.
- [135] Forsyth, C., Patwardhan, S. V. (2013) Controlling performance of lipase immobilised on bioinspired silica. *J. Mater. Chem. B*, *1*, 1164.
- [136] Forsyth, C., Yip, T. W. S., Patwardhan, S. V. (2013) CO₂ sequestration by enzyme immobilized onto bioinspired silica. *Chem. Commun.*, *49*, 3191.
- [137] Mullin, J. B., Riley, J. P. (1955) The colorimetric determination of silicate with special reference to sea and natural waters. *Analytica Chimica Acta*, *12*, 162–176.
- [138] Ingle, J. D., Crouch, S. R. (1971) Simultaneous determination of silicate and phosphate by an automated differential kinetic procedure. *Anal. Chem.*, *43*, 7–10.
- [139] Chalmers, R. A., Sinclair, A. G. (1966) Analytical applications of β -heteropoly acids: This influence of complexing agents on selective formation. *Analytica Chimica Acta*, *34*, 412–418.
- [140] Volk, R. D., Weintraub, R. L. (1958) Microdetermination of Silicon in Plants. *Analytical Chemistry*, *30*, 1011–1014.
- [141] Alexander, G. B., Heston, W. M., Iler, R. K. (1954). *J. Phys. Chem.*, *58*, 453–455.
- [142] Baumann, H. (1955) Über die Auflösung von SiO₂ in Wasser. *Beiträge zur Silikose-Forschung*, *45*, 45–71.
- [143] Alexander, G. B. (1953) The Reaction of Low Molecular Weight Silicic Acids with Molybdic Acid. *Journal of the American Chemical Society*, *75*, 5655–5657.
- [144] Tarutani, T. (1989) Polymerization of silicic acid. A review. *Anal. Sci.*, *5*, 245–252.
- [145] Marshall, W. L., Warakomski, J. M. (1980) Amorphous silica solubilities—II. Effect of aqueous salt solutions at 25°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, *44*, 915–924.
- [146] Barker, P., Fontes, J.-C., Gasse, F., Druart, J.-C. (1994) Experimental dissolution of diatom silica in concentrated salt solutions and implications for paleoenvironmental reconstruction. *Limnol. Oceanogr.*, *39*, 99–110.
- [147] Dupuy, C., Auvray, X., Petipas, C., Rico-Lattes, I., Lattes, A. (1997) Anomeric Effects on the Structure of Micelles of Alkyl Maltosides in Water. *Langmuir*, *13*, 3965–3967.
- [148] Bergström, M., Skov Pedersen, J. (1999) Structure of pure SDS and DTAB micelles in brine determined by small-angle neutron scattering (SANS). *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *1*, 4437–4446.
- [149] Pähler, A., Banerjee, A., Dattagupta, J., Fujiwara, T., Lindner, K. P. G., Suck, D., Weber, G., Saenger, W. (1984) Three-dimensional structure of fungal proteinase K reveals similarity to bacterial subtilisin. *EMBO J*, *3*, 1311–1314.
- [150] Cardoso, M. B., Luckarift, H. R., Urban, V. S., O'Neill, H., Johnson, G. R. (2010) Protein Localization in Silica Nanospheres Derived via Biomimetic Mineralization. *Adv. Funct. Mater*, *20*, 3031–3038.
- [151] Brunner, E., Lutz, K., Sumper, M. (2004) Biomimetic synthesis of silica nanospheres depends on the aggregation and phase separation of polyamines in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *6*, 854.
- [152] Ando, T., Watanabe, S. (1969) A NEW METHOD FOR FRACTIONATION OF PROTAMINES AND THE AMINO ACID SEQUENCES OF SALMINE AND THREE COMPONENTS OF IRIDINE. *International Journal of Protein Research*, *1*, 221–224.
- [153] Zhang, Y., Wu, H., Li, J., Li, L., Jiang, Y., Jiang, Y., Jiang, Z. (2008) Protamine-Templated Biomimetic Hybrid Capsules: Efficient and Stable Carrier for Enzyme Encapsulation. *Chem. Mater*, *20*, 1041–1048.

- [154] Haase, N. R., Shian, S., Sandhage, K. H., Kröger, N. (2011) Biocatalytic Nanoscale Coatings Through Biomimetic Layer-by-Layer Mineralization. *Adv. Funct. Mater.*, *21*, 4243–4251.
- [155] Mattson, G., Conklin, E., Desai, S., Nielander, G., Savage, M. D., Morgensen, S. (1993) A practical approach to crosslinking. *Mol Biol Rep*, *17*, 167–183.
- [156] Hermanson, G. T. (2008) Bioconjugate techniques, Amsterdam, *Academic Press*.
- [157] Lomant, A. J., Fairbanks, G. (1976) Chemical probes of extended biological structures: Synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate). *Journal of Molecular Biology*, *104*, 243–261.
- [158] Staros, J. V. (1988) Membrane-impermeant crosslinking reagents: probes of the structure and dynamics of membrane proteins. *Acc. Chem. Res.*, *21*, 435–441.
- [159] Cuatrecasas, P., Parikh, I. (1972) Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose. *Biochemistry*, *11*, 2291–2299.
- [160] Thermo Scientific. Instructions SMPB and Sulfo SMPB. <http://www.piercenet.com/instructions/2161762.pdf>.
- [161] Yamauchi, S., Nimura, N., Kinoshita, T. (1993) Protamine-coated silica gel as packing material for high-performance liquid chromatography of carbohydrates. *Analyst*, *118*, 161.
- [162] Mao, A. H., Crick, S. L., Vitalis, A., Chicoine, C. L., Pappu, R. V. (2010) Net charge per residue modulates conformational ensembles of intrinsically disordered proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*, 8183–8188.
- [163] Wright, P. E., Dyson, H. J. (1999) Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *Journal of Molecular Biology*, *293*, 321–331.
- [164] Dyson, H. J., Wright, P. E. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*, 197–208.
- [165] Arellano, A., Canales, M., Jullian, C., Brunet, J. E. (1988) Fluorescence studies on clupein protamines: Evidence for globular conformation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *150*, 633–639.
- [166] Kedrov, A., Janovjak, H., Sapra, K. T., Müller, D. J. (2007) Deciphering Molecular Interactions of Native Membrane Proteins by Single-Molecule Force Spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, *36*, 233–260.
- [167] Janovjak, H., Sapra, K. T., Kedrov, A., Müller, D. J. (2008) From Valleys to Ridges: Exploring the Dynamic Energy Landscape of Single Membrane Proteins. *ChemPhysChem*, *9*, 954–966.
- [168] Miller, B. T., Collins, T. J., Rogers, M. E., Kurosky, A. (1997) Peptide Biotinylation with Amine-Reactive Esters: Differential Side Chain Reactivity. *Peptides*, *18*, 1585–1595.
- [169] Mädler, S., Bich, C., Touboul, D., Zenobi, R. (2009) Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities. *Journal of Mass Spectrometry*, *44*, 694–706.
- [170] Sewell, S. L., Wright, D. W. (2006) Biomimetic Synthesis of Titanium Dioxide Utilizing the R5 Peptide Derived from *Cylindrothecafusiformis*. *Chem. Mater.*, *18*, 3108–3113.
- [171] Cole, K. E., Ortiz, A. N., Schoonen, M. A., Valentine, A. M. (2006) Peptide- and Long-Chain Polyamine- Induced Synthesis of Micro- and Nanostructured Titanium Phosphate and Protein Encapsulation. *Chemistry of Materials*, *18*, 4592–4599.
- [172] Kröger, N., Dickerson, M. B., Ahmad, G., Cai, Y., Haluska, M. S., Sandhage, K. H., Poulsen, N., Sheppard, V. C. (2006) Bioenabled Synthesis of Rutile (TiO₂) at Ambient Temperature and Neutral pH. *Angew. Chem. Int. Ed.*, *45*, 7239–7243.
- [173] Jiang, Y., Yang, D., Zhang, L., Li, L., Sun, Q., Zhang, Y., Li, J., Jiang, Z. (2008) Biomimetic synthesis of titania nanoparticles induced by protamine. *Dalton Trans.*, 4165.
- [174] Choi, N., Tan, L., Jang, J.-R., Um, Y. M., Yoo, P. J., Choe, W.-S. (2012) The interplay of peptide sequence and local structure in TiO₂ biomineralization. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *115*, 20–27.

- [175] Chen, X., Mao, S. S. (2007) Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. *Chem. Rev.*, *107*, 2891–2959.
- [176] Möckel, H., Giersig, M., Willig, F. (1999) Formation of uniform size anatase nanocrystals from bis(ammonium lactato)titanium dihydroxide by thermohydrolysis. *J. Mater. Chem.*, *9*, 3051–3056.
- [177] Cole, K. E., Valentine, A. M. (2007) Spermidine and Spermine Catalyze the Formation of Nanostructured Titanium Oxide. *Biomacromolecules*, *8*, 1641–1647.
- [178] Fang, Y., Wu, Q., Dickerson, M. B., Cai, Y., Shian, S., Berrigan, J. D., Poulsen, N., Kröger, N., Sandhage, K. H. (2009) Protein-Mediated Layer-by-Layer Syntheses of Freestanding Microscale Titania Structures with Biologically Assembled 3-D Morphologies. *Chem. Mater.*, *21*, 5704–5710.
- [179] Fujishima, A., Honda, K. (1972) Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode. *Nature*, *238*, 37–38.
- [180] Kominami, H., Murakami, S.-y., Kato, J.-i., Kera, Y., Ohtani, B. (2002) Correlation between Some Physical Properties of Titanium Dioxide Particles and Their Photocatalytic Activity for Some Probe Reactions in Aqueous Systems. *J. Phys. Chem. B*, *106*, 10501–10507.
- [181] Lottspeich, F., Engels, J. W. (2006) Bioanalytik. 2nd ed., München, Heidelberg, Elsevier, *Spektrum, Akad. Verl.*
- [182] Ruban, A. V., Calkoen, F., Kwa, S. L. S., van Grondelle, R., Horton, P., Dekker, J. P. (1997) Characterisation of LHCII in the aggregated state by linear and circular dichroism spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1321*, 61–70.
- [183] Krupa, Z., Huner, N. P. A., Williams, J. P., Maissan, E., James, D. R. (1987) Development at Cold-Hardening Temperatures: The Structure and Composition of Purified Rye Light Harvesting Complex II. *PLANT PHYSIOLOGY*, *84*, 19–24.
- [184] Kjellman, T., Alfredsson, V. (2013) The use of in situ and ex situ techniques for the study of the formation mechanism of mesoporous silica formed with non-ionic triblock copolymers. *Chem. Soc. Rev.*, *42*, 3777.
- [185] Schmitt, J., Impéror-Clerc, M., Michaux, F., Blin, J.-L., Stébé, M.-J., Pedersen, J. S., Meneau, F. (2013) Formation of Nanostructured Silica Materials Templated with Nonionic Fluorinated Surfactant Followed by in Situ SAXS. *Langmuir*, *29*, 2007–2023.
- [186] Göbel, C., Schuster, B., Baurecht, D., Sleytr, U. B., Pum, D. (2010) S-layer templated bioinspired synthesis of silica. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *75*, 565–572.
- [187] Belton, D., Paine, G., Patwardhan, S. V., Perry, C. C. (2004) Towards an understanding of (bio)silicification: the role of amino acids and lysine oligomers in silicification. *J. Mater. Chem.*, *14*, 2231.
- [188] Annenkov, V. V., Danilovtseva, E. N., Likhoshway, Y. V., Patwardhan, S. V., Perry, C. C. (2008) Controlled stabilisation of silicic acid below pH 9 using poly(1-vinylimidazole). *J. Mater. Chem.*, *18*, 553.
- [189] Knecht, M. R., Wright, D. W. (2004) Amine-terminated dendrimers as biomimetic templates for silica nanosphere formation. *Langmuir*, *20*, 4728–4732.
- [190] Luckarift, H. R., Balasubramanian, S., Paliwal, S., Johnson, G. R., Simonian, A. L. (2007) Enzyme-encapsulated silica monolayers for rapid functionalization of a gold surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *58*, 28–33.
- [191] Khan, S. H., Farkas, K., Kumar, R., Ling, J. (2012) A versatile method to measure the binding to basic proteins by surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry*, *421*, 385–390.
- [192] Gershon, P. D., Khilko, S. (1995) Stable chelating linkage for reversible immobilization of oligohistidine tagged proteins in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *J Immunol Methods*, *183*, 65–76.

- [193] O'Shannessy, D. J., O'Donnell, K. C., Martin, J., Brigham-Burke, M. (1995) Detection and quantitation of hexa-histidine-tagged recombinant proteins on western blots and by a surface plasmon resonance biosensor technique. *Anal Biochem*, 229, 119–124.
- [194] Sigal, G. B., Bamdad, C., Barberis, A., Strominger, J., Whitesides, G. M. (1996) A self-assembled monolayer for the binding and study of histidine-tagged proteins by surface plasmon resonance. *Anal Chem*, 68, 490–497.
- [195] Nieba, L., Nieba-Axmann, S. E., Persson, A., Hamalainen, M., Edebratt, F., Hansson, A., Lidholm, J., Magnusson, K., Karlsson, A. F., Pluckthun, A. (1997) BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip. *Anal Biochem*, 252, 217–228.
- [196] Tahir, M. N., Theato, P., Müller, W. E. G., Schröder, H. C., Janshoff, A., Zhang, J., Huth, J., Tremel, W. (2004) Monitoring the formation of biosilica catalysed by histidine-tagged silicatein. *Chem. Commun*, 2848.
- [197] Wallace, A. F., DeYoreo, J. J., Dove, P. M. (2009) Kinetics of Silica Nucleation on Carboxyl- and Amine-Terminated Surfaces: Insights for Biomineralization. *J. Am. Chem. Soc*, 131, 5244–5250.
- [198] Savage, M. D. (1992) Avidin-biotin chemistry, Rockford, IL, *Pierce Chemical Co.*
- [199] Holmberg, A., Blomstergren, A., Nord, O., Lukacs, M., Lundeberg, J., Uhlen, M. (2005) The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis*, 26, 501–510.
- [200] Jing Liu (2005) Systematic Studies of Protein Immobilization by Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Spectroscopy. *Dissertation*, Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- [201] David E. Garfin (2003) Gel Electrophoresis of Proteins, Oxford UK, *Oxford University Press*.
- [202] Jansohn, M. (2012) Gentechnische Methoden. 5th ed., Heidelberg, *Spektrum Akademischer Verlag; Imprint: Spektrum Akademischer Verlag*.
- [203] Pignatti, P., Frossi, B., Pala, G., Negri, S., Oman, H., Perfetti, L., Pucillo, C., Imbriani, M., Moscato, G. (2013) Oxidative Activity of Ammonium Persulfate Salt on Mast Cells and Basophils: Implication in Hairdressers' Asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 160, 409–419.
- [204] Kato, M., Shimizu, S. (1987) Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation. *Bot.*, 65, 729–735.
- [205] Kuroda, M., Ozawa, T., Imagawa, H. (1990) Changes in chloroplast peroxidase activities in relation to chlorophyll loss in barley leaf segments. *Physiol Plant*, 80, 555–560.
- [206] Yamauchi, N. (1991) Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116, 58–62.
- [207] Matile, P., Hörtensteiner, S., Thomas, H. (1999) CHLOROPHYLL DEGRADATION. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 50, 67–95.
- [208] Chunhong Yang, Stephanie Boggasch, Winfried Haase, Paulsen, H. (2006) Thermal stability of trimeric light-harvesting chlorophyll a/b complex (LHCIIb) in liposomes of thylakoid lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757, 1642–1648.
- [209] 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.

8. Anhang

8.1. Berechnung des Isoelektrischen Punktes (pI) verschiedener LHCII-Varianten

Die in Kapitel I angegebenen pI wurden anhand der Aminosäuresequenz von LHCII bzw. R5LHCII mit Hilfe des PROTEIN CALCULATOR v3.3 (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>; 10.07.2013) berechnet. Hierbei ist zu beachten, dass nicht die gesamte Sequenz des LHCII zu seinem pI beiträgt, sondern nur die dem wässrigen Medium zugewandten Bereiche. Aus diesem Grund wurden die Membrandurchgangsbereiche (MDB) nicht in die Kalkulation mit einbezogen. Die Bereiche wurden so festgelegt, dass die pI-Werte den experimentell bestimmten von Müller (2011) in etwa entsprachen. Abb. 8. 1 zeigt eine Übersicht über die festgelegten Bereiche und in Tab. 8. 1 sind die entsprechenden kalkulierten pI zusammengefasst.

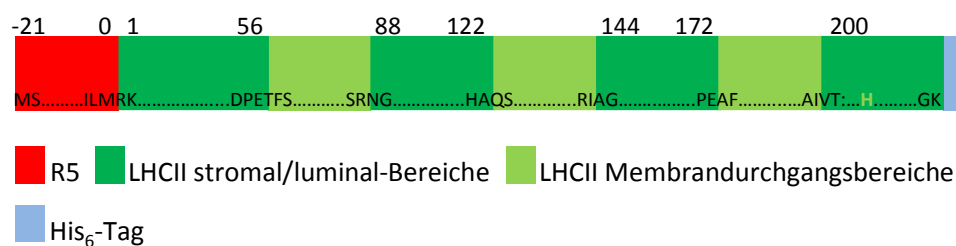


Abb. 8. 1: Einteilung LHCII-Bereich zur pI-Berechnung

Die Primärstruktur des LHCII/R5LHCII wurde in Membrandurchgangsbereiche und Nicht-Membrandurchgangsbereiche, sowie His₆-Tag und R5-Sequenz eingeteilt. Angegeben sind die Aminosäurepositionen wie sie im LHCII benannt sind.

Tab. 8. 1: Übersicht pI LHCII/R5LHCII

Mit Hilfe des PROTEIN CALCULATOR v3.3 wurden pI unter Berücksichtigung (+) bzw. Nicht-Berücksichtigung (-) bestimmter Sequenzbereiche berechnet und mit den Werten von Müller (2011) für den His₆-Tag-freien nativen LHCII und C3.2h verglichen.

R5	Nicht MDB	MDB	His ₆ -Tag	pI
-	+	+	+	6,3
-	+	-	+	5,2
-	+	-	-	4,5
+	+	-	+	6,7
+	+	-	-	5,3
nativer LHCII (Müller, 2011)				4-4,4
C3.2h (Müller, 2011)				5,1

Für den N-terminalen Bereich (bis Aminosäure 30 der LHCII-Sequenz) des LHCII und R5LHCII wurden separate pI bestimmt (Tab. 8. 2).

Tab. 8. 2: LHCII und R5 N-terminale pI

Mit Hilfe des PROTEIN CALCULATOR v3.3 wurden für die ersten 30 (LHCII) bzw. 51 (R5LHCII) N-terminalen Aminosäuren der pI berechnet.

Bereich	pI
N-Terminus AS 1-30	10,3
N-Terminus inkl. R5 AS -21-30	10,9

8.2. Sequenzen

In Kapitel I wurden die neuen R5-modifizierten LHCII-Varianten R5C3.2h und 5RC3.2h besprochen. Der Mutageneseerfolg wurde mittels Sequenzierung durch die Firma Starseq, Mainz, überprüft. Abb. 8. 2 zeigt den relevanten modifizierten N-terminalen Bereich der Varianten.

A

ATG	TCT	TCC	AAA	AAA	TCT	GGT	TCT	TAC	TCT
M	S	S	K	K	S	G	S	Y	S

GGT	TCC	AAA	GGT	TCC	AAA	CGT	CGT	ATC	CTG
G	S	K	G	S	K	R	R	I	L

AGC	ATG	CGT	AAA
S	M	R	K

B

ATG	CTG	ATT	CGC	CGC	AAA	AGC	GGC	AAA	TCT
M	L	I	R	R	K	S	G	K	S

GGT	AGC	TAT	AGC	GGT	TCT	AAA	AAA	AGC	TCT
G	S	Y	S	G	S	K	K	S	S

CTG	TAC	ATG	CGT	AAA
L	Y	M	R	K

Abb. 8. 2: Sequenzen der R5-modifizierten LHCII

R5C3.2h (A) und 5RC3.2h wurden mittels des Primers LHCP757kurz sequenziert und mittels SerialCloner 2.5 ausgewertet. In Rot die Bereiche des R5-Peptides, in Grün die des LHCP N-Terminus; in Weiß: durch Mutagenese eingeschobene Zwischenbereiche.

Die entsprechenden Cystein-Varianten von R5C3.2h wurden durch Daniel Palm hergestellt; die entsprechenden Sequenzierungsergebnisse sind seiner Staatsexamensarbeit zu entnehmen.

8.3. Abkürzungsverzeichnis

Neben den gängigen Abkürzungen für Maßeinheiten, chemische Symbole, Aminosäuren (Ein- und Dreibuchstabenschreibweise) und geläufige Formulierungen der deutschen Sprache wurden in dieser Arbeit folgende Abkürzungen verwendet:

AA	Acrylamid
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BAA	Bisacrylamid
Cam	Chloramphenicol
CD	Circulardichroismus
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
CL	Crosslinker
CL-Protamin	kovalent verknüpftes Produkt aus Protamin und Crosslinker
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDX	energiedispersive Röntgenspektroskopie
Em	Emission
EPR	Elektronenspinresonanz
FG	Fließgeschwindigkeit
GFP	grünfluoreszierendes-Protein
His ₆ -Tag	Hexahistidyl-Tag
HOMO	höchstes besetztes Molekülorbital
HPLC	Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie
Ib/s	Inclusion Body/ies
IP	Inkubationspuffer
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IDP	intrinsic disordered proteins
LB	Lysogeny Broth
L(S)[K]DS	Lithium(Natrium)[Kalium]dodecylsulfat
LHCII	majorer Lichtsammelkomplex des Fotosystems II, pflanzlicher Hauptlichtsammelkomplexes
Lhcb	Lichtsammelungs-Chlorophyll- <i>a/b</i> -bindendes Protein b
LHCP	Apoprotein des LHCII
Lm	Lösemittel
LM	Laurylmaltosid
Lp	Lösepuffer
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
MPS	(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NPQ	nicht-fotochemische Energielöschung

NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
OG	Octyl- β -D-glucopyranosid
PA	Protamin
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PES	Polyethersulfon
PG	Phosphatidylglycerol
pI	isoelektrischer Punkt
Phosphat ^{WERT}	Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von WERT
PS	Polystyrol
REM	Rasterelektronenmikroskopie
ri	refraktären Index
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDV	Silikatablagerungs-Partikel
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
sSMPB	Sulfosuccinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrat
SV	Säulenvolumen
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCaEP	Triscarboxyethylphosphin
TCP	total cell protein
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TiBALDH	Titanium(IV)-bis-(ammoniumlactato)-dihydroxid
TMOS	Tetramethoxysilan
Tris ^{WERT}	Tris-HCl Puffer bei einem pH-Wert von WERT
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifuge
VK	Vorkultur
Vol.	Volumen
WP	Waschpuffer

8.4. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. 1: Reaktionsschema Fotosynthese und Farbstoffsolarzelle	4
Abb. 1. 2: LHCI _{II} in Farbstoffsolarzellen	6
Abb. 1. 3: Fotosystem II-Superkomplex	7
Abb. 1. 4: Struktur des LHCI _{II}	8
Abb. 1. 5: Immobilisierungsmöglichkeiten von Proteinen.....	11
Abb. 1. 6: Biogene Silikat-bildende Verbindungen	14
Abb. 1. 7: Prozess der Silikatbildung	15
Abb. 1. 8: Säure-Base-katalysierte Kieselsäureverknüpfung.....	16
Abb. I.1: DNA-Längenstandards	54
Abb. I.2: Mutagenesestrategie R5C3.2h	59
Abb. I.3: Mutagenesestrategie 5RC3.2h	65
Abb. I.4: R5C3.2h-Überexpressionstest in verschiedenen <i>E.coli</i> -Stämmen	72
Abb. I.5: Herstellung und Aufreinigung von R5C3.2h und 5RC3.2h IBs.....	74
Abb. I.6: Vorkultureinfluss auf R5C3.2h-Expression	75
Abb. I.7: pH-Wert-Einfluss auf die Rekonstitution von R5C3.2h.	77
Abb. I.8: Puffereinfluss auf die UZ-Aufreinigung von R5C3.2h.....	79
Abb. I.9: Einfluss salzhaltiger Trimerisierungspuffer auf R5C3.2h-Trimerisierung.....	81
Abb. I.10: Einfluss von Salz in Gradienten und Rekonstitution bei R5C3.2h-Präparation.....	83
Abb. I.11: LiCl-Einfluss auf die Rekonstitution von R5C3.2h	84
Abb. I.12: LiCl-Konzentrationsabhängigkeit der R5C3.2h-Trimerisierung.....	85
Abb. I.13: Optimierung der präparativen R5C3.2h-Herstellung	87
Abb. I.14: Rekonstitution und Trimerisierung von 5RC3.2h.....	88
Abb. I.15: Präparation verschiedener Cysteinvarianten des R5C3.2h.....	89
Abb. I.16: Silikatfällungsverhalten von R5C3.2h	91
Abb. I.17: R5C3.2h Trimer-Integrität nach Silikateinschluss	91
Abb. I.18: REM-Aufnahmen von R5C3.2h gefällten.....	92
Abb. I.19: Stromale Ladungsdichteverteilung des LHCI _{II}	96
Abb. II.1: Copräzipitation von LHCI _{II} und Spermin	103
Abb. II.2: Grundstruktur des Farbstoffs DY-731	104
Abb. II.3: Pufferabhängige Silikatfällungsausbeuten.....	109
Abb. II.4: pH-Wert-abhängige Silikatauflösung	111
Abb. II.5: Zugänglichkeit für kleine destruktive Agenzien zu Silikat-präzipitiertem LHCI _{II}	152
Abb. II.6: Proteinase K-Abbau von LHCI _{II} in Lösung	153
Abb. II.7: Zugänglichkeit Proteinase K zu Silikat-präzipitiertem LHCI _{II}	154
Abb. II.8: Lagerungseinflüsse auf Stabilisierungspotential der Copräzipitation.....	155
Abb. II.9: REM-Aufnahmen R5C3.2h Copräzipitation mit Spermin in Phosphat ^{7,5}	156
Abb. II.10: Komplexverlust während Hitzeinkubation anhand des Fluoreszenzintensitätserhalts.....	156

Abb. II.11: pH-Wert-abhängige Silikatauflösung	161
Abb. III.1: MPS.....	169
Abb. III.2: Protamin-Modifikation von LHCII: Variation Crosslinker zu Protamin Verhältnis	178
Abb. III.3: Protamin-Modifikation von LHCII: Variation Reaktionszeit Crosslinker mit Protamin	179
Abb. III.4: Präparative Protaminanbindung an LHCII und Aufreinigung.....	180
Abb. III.5: Präparative Herstellung diverser Protamin-modifizierter LHCII Cysteinvarianten: Gradientenpuffer- Abhängigkeit.....	181
Abb. III.6: Positionsabhängige Anbindung von Protamin an monomere und trimere LHCII.....	184
Abb. III.7: Protamin-induzierter Silikateinschluss von LHCII unter verschiedenen pH-Bedingungen	186
Abb. III.8: Einfluss der Silikatfällung auf Integrität der Protamin-modifizierten 3xCh Trimere.....	187
Abb. III.9: Silikatfällungsverhalten verschiedener Protamin-modifizierter LHCII-Varianten mit und ohne Spermin.....	188
Abb. III.10: Einbauraten verschiedener Protamin-modifizierter LHCII-Varianten	189
Abb. III.11: Hitzestabilität von Silikat-eingeschlossenem Protamin-modifizierten LHCII	190
Abb. III.12: Protamin-induzierte Silikatstrukturen	191
Abb. III.13: Protamin-Modifizierbarkeit von verschiedenen R5LHCII und V151Ch.....	193
Abb. III.14: Silikatfällungsverhalten verschiedener R5LHCII-Cysteinvarianten	194
Abb. III.15: Crosslinkerüberschuss-abhängige Einbauraten bei LHCII-MPS Copräzipitationen	195
Abb. III.16: Crosslinkerüberschuss-abhängiger Einfluss auf Komplexintegrität bei Copräzipitationen.....	196
Abb. III.17: Trimere Cysteinabstände in S106Ch und S160Ch	198
Abb. III.18: Zugänglichkeitsabschätzung Position 106	199
Abb. III.19: Auswirkung von Silikatveränderungen auf Protamin-modifizierten LHCII	210
Abb. IV.1: Vermutete biogene Titandioxid-Bildungsmechanismen.....	215
Abb. IV.2: TiBALDH	217
Abb. IV.3: TiBALDH-Konzentrationsabhängigkeit bei Protamin-induzierten Titandioxidfällungen	219
Abb. IV.4: Protaminkonzentrationsabhängige Titandioxidfällung	220
Abb. IV.5: Sperminkonzentrationsabhängige Titandioxidfällung	220
Abb. IV.6: Titandioxidfällungen durch Protamin-modifizierten LHCII	221
Abb. IV.7: Protamin-modifizierte LHCII-Varianten in einer Titandioxid-Copräzipitation mit Protamin	222
Abb. IV.8: Protamin-modifizierte LHCII-Varianten in einer Titandioxid-Copräzipitation mit Spermin	223
Abb. IV.9: REM-Aufnahmen verschiedener Titandioxid-Präzipitate.....	224
Abb. V.1: Aktivierung NIP-Chipoberfläche	239
Abb. V.2: Selektive Messkanalanströmung 4-Port-Fließzelle	240
Abb. V.3: Konfiguration halbautomatisches Injektionsventil und Parallelanströmung 4-Port-Fließzelle	241
Abb. V.4: Serienanströmung von Mess- und Referenzkanal in 4-Port-Fließzelle	242
Abb. V.5: Aufgereinigter und aufkonzentrierter Sx3	245
Abb. V.6: Sx3 Immobilisierung auf Ni ²⁺ -Chelating funktionalisierter Chipoberfläche.....	246
Abb. V.7: Kieselsäurefällung durch immobilisiertes Sx3 und anschließende Regeneration mit NaOH.....	247
Abb. V.8: Reproduzierbarkeit der Kieselsäurefällung nach NaOH-Waschungen.....	248
Abb. V.9: Reproduzierbarkeit des SPR-basierten Monitoring von proteininduzierten Kieselsäurefällungen ...	249

Abb. V.10: Einfluss von EDTA auf die Rückbindefähigkeit von His ₆ -Tags an Ni ²⁺ -Chelatingmaterial	250
Abb. V.11: Einfluss von Küvetten und PAA auf spektroskopische Eigenschaften	252
Abb. V.12: Ammoniumsulfat-Einfluss auf LHCII über längere Lagerungszeiträume.....	253
Abb. V.13: Lagerungsexperimente von nativem LHCII in PAA	254
Abb. V.14: Zerfallskinetik von einpolymerisiertem LHCII	255
Abb. V.15: Schmelztemperaturen von einpolymerisiertem LHCII.....	256
Abb. V.16: Einfluss starker Temperatursprünge auf LHCII-Struktur	256

Abb. 8. 1: Einteilung LHCII-Bereich zur pI-Berechnung.....	279
Abb. 8. 2: Sequenzen der R5-modifizierten LHCII	280

In II.3.2 Publikationsmanuskript:

Fig. 1: Photographs (inserts) and SEM images of silica pellets precipitated under different pH and buffer conditions	125
Fig. 2: Extent of LHCII encapsulation in dependence on pH and buffer.	125
Fig. 3: Extent of LHCII stabilization by precipitation under different pH and buffer conditions.	129
Fig. 4: Dy-731 labeled LHCII efficiently collect excitation from non-labeled LHCII.	131
Fig. 5: Size relationship between an LM/LHCII micelle (green, 10 x 4 nm), a LM micelle (black, 7 x 4 nm [46]) and silica spheres.	135
Fig. S 1: SEM pictures of LHCII-free silica precipitates.	142
Fig. S 2: EDX measurement and element characterization.	142
Fig. S 3: Coprecipitation of LHCII at different N:Si ratios.	144
Fig. S 4: Post-precipitation LHCII binding.	145
Fig. S 5: Fluorescence spectra of LHCII at different conditions.	146
Fig. S 6: Encapsulation of LHCII into SiO ₂ promotes inter-LHCII energy transfer.	147
Fig. S 7: Normalized emission of encapsulated dye-labeled complexes.	147
Fig. S 8: Scheme of hypothetical encapsulation process into small silica particles (upper pathway) and large particles (lower pathway).	148

8.5. Tabellenverzeichnis

Tab. 3. 1: LHCII-Varianten.....	28
Tab. I.1: Übersicht Primer.....	51
Tab. I.2: Übersicht R5-modifizierte LHCII.....	53
Tab. I.3: Restriktionsansatz zur Insertion eines R5-Primerhybrids.....	60
Tab. I.4: Primerhybridisierung (Primhyb.cyc)	60
Tab. I.5: Ligation von Insert und Plasmid.....	61
Tab. I.6: Doppelverdau fehlerhafter R5C3.2h auf pDS12-Vektor	62

Tab. I.7: Reaktionsansatz Quikchange®-Mutagenese	63
Tab. I.8: Quikchange PCR-Programm pet21(+)-Vektor (petquik.cyc)	63
Tab. I.9: Reaktionsansatz Quikchange®-Lightning Multi Site Directed Mutagenese	64
Tab. I.10: Quikchange Multi Site PCR-Programm pET21(+)-Vektor (multiqc.cyc)	64
Tab. I.11: Doppelverdau R5C3.2hBsrGI auf pET21(+)-Vektor	66
Tab. I.12: Zusammensetzung Saccharosedichtegradienten für R5C3.2h-Aufreinigung	68
Tab. I.13: Messparameter Schmelzkurvenbestimmung mittels CD-Spektroskopie	69
Tab. I.14: Schmelztemperatur R5C3.2h	90
Tab. II.1: Übersicht verwendeter LHCII-Varianten Kapitel II	104
Tab. II.2: Silikatauflösung LHCII-haltiger Pellets	111
Tab. II.3: Fluoreszenzerhalt in Abhängigkeit des Inkubationspuffers (IP)	113
Tab. II.4: Optimierte Pigmentextraktion aus Silikat	115
Tab. II.5: Sulfateinfluss auf Copräzipitation	150
Tab. III.1: Silikatfällungseigenschaften von Protamin	177
Tab. III.2: Protamin-Modifikationsgrade verschiedener LHCII-Varianten	184
Tab. III.3: Protamin-Modifikationsgrade verschiedener R5LHCII-Varianten und V151Ch	193
Tab. 8. 1: Übersicht pI LHCII/R5LHCII	279
Tab. 8. 2: LHCII und R5 N-terminale pI	280

9. Danksagung

Mehr als 1200 Tage Arbeit stecken nun in dieser Schrift. Deshalb gilt es an dieser Stelle, denen Dank zu sagen, ohne deren Hilfe, Anleitung und Unterstützung diese Arbeit wohl ein deutlich steinigerer Weg gewesen wäre. Deshalb gilt mein ganz besonderer Dank...

meinem Doktorvater Prof. Dr. **H P** für die Möglichkeit, das unvollendete Projekt meiner Examensarbeit weiter beackern zu dürfen und seinem damit entgegengebrachten Vertrauen und auch für das Vermitteln einer sehr zielorientierten Arbeitsweise und dem damit verbundenen „in der Bahn halten“ meines Projektes.

meinem Supervisor Dr. **S H**. Für eine hervorragende Betreuung während der dreijährigen Arbeitsphase und darüber hinaus.

Herrn Prof. Dr. **J M** für die Übernahme des Zweitgutachtens für diese Dissertation.

der **gesamten AG Paulsen** mit allen Mitarbeitern, Mitdoktoranden, Diplomanden und allen anderen Kandidaten für das ausgesprochen gute Arbeitsklima.

der **Studienstiftung des deutschen Volkes** für die Finanzierung dieses Projektes im Rahmen eines Promotionsstipendiums.

meinen **Freunden** und meiner **Familie** für die ganz besondere Unterstützung während meiner Promotion. Ohne euch wäre das ganze Projekt viel beschwerlicher gewesen.

--gekürzte Danksagung für Veröffentlichungsversion--

10. Lebenslauf

Sebastian Röder

ADRESSE:
TELEFON:
GEBURTSDATUM: 03. Oktober 1983

Ausbildung

-
- | | |
|-------------|--|
| 2010 - 2013 | <p>Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Promotionsstudium Biologie
 <i>Lichtsammler hinter Glas: Stabilisierung und Funktionalisierung des pflanzlichen Hauptlichtsammelkomplexes (LHCII) durch biomineralische Einbettung in Nanopartikel</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Molekulargenetik (Mutagenesen), Proteinbiochemie, Spektroskopie (Fluoreszenz, Circular dichroismus, Oberflächenplasmonresonanz, Absorption) • Betreuung dreier Staatsexamensabschlussarbeiten und dreier Bachelorarbeiten • Vorträge auf nationalen und internationalen Tagungen (deutsch und englisch) |
| 2004 – 2010 | <p>Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 1. Staatsexamen für gymnasiales Lehramt
 Fächer: Biologie, Chemie und Bildungswissenschaften</p> <p>Staatsexamensarbeit: <i>Untersuchung der Eigenschaften eines polykationischen Proteins und dessen Kieselsäurefällungen</i></p> <p>2004 – 2006 Diplomstudiengang Biomedizinische Chemie, Vordiplom 2006</p> |
| 1995 - 2003 | <p>Wigbert Schule Hünfeld
 Allgemeine Hochschulreife</p> |

Stipendien und Auszeichnungen

-
- | | |
|----------------------|--|
| 07/2010 -
06/2013 | <p>Studienstiftung des deutschen Volkes</p> <p>Promotionsstipendium
 Kommissionsmitglied Auswahlverfahren Studienanfänger</p> |
| 12/2004 -
04/2010 | <p>Studienstiftung des deutschen Volkes</p> <p>Allgemeines Studienstipendium</p> |
| 10/2010 | <p>Biotechnica Studienpreis 2010</p> <p>Auszeichnung der Staatsexamensarbeit <i>Untersuchung der Eigenschaften eines polykationischen Proteins und dessen Kieselsäurefällungen</i> (3. Preis)</p> |

Praktische Erfahrungen

Lebenslauf

Weitere Qualifikationen/Interessen

11. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit verwendet habe.

Mainz,

Sebastian Röder