

Struktur- und Faltungsuntersuchungen am majoren Lichtsammelkomplex II mittels Elektronen-Paramagnetischer-Resonanz (EPR)

**Dissertation
Zur Erlangung des Grades**

„Doktor der Naturwissenschaften“

**Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

Niklas Fehr
geb. am 04.03.1984 in Wiesbaden-Dotzheim

Mainz, 25. September 2014

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	0
1	Die Photosynthese	1
2	Der LHCII	4
2.1	Non-Photochemical-Quenching (NPQ)	6
2.1.1	Fluoreszenzlöschung	6
2.1.2	State-Transitions	7
2.2	Biogenese des LHCII	8
3	Rekombinante Membranproteine	10
3.1	Rekonstitution	10
3.2	Faltung	11
3.2.1	Faltungskinetik des LHCII	12
4	Proteinstrukturanalytik	13
4.1	Elektronenparamagnetische-Resonanzspektroskopie (EPR) & „Site-directed Spin-Labeling“ (SDSL)	13
4.2	Zeitaufgelöste Proteinanalytik	15
5	Zielesetzung dieser Arbeit	17
II	Material & Methode	18
1	Geräte	19
2	Material	23
2.1	Chemikalien	23
2.2	Stickstoff	23
2.3	Proteinlabel	23

2.4	Längenstandards	24
2.4.1	Protein-Längenstandards	24
2.4.2	DNA-Längenstandards	24
2.5	Vektoren & Bakterienstämme	26
2.6	LHCP-Klone	26
3	Molekularbiologische Methoden	28
3.1	Klonierung	28
3.2	Transformation	29
3.2.1	Transformation in XL1-Blue/XL10-Gold	30
3.2.2	Transformation in JM101	30
3.3	Plasmidisolierung	31
3.4	Sequenzierung	31
3.5	Dauerkulturen	31
4	Präparative biochemische Methoden	32
4.1	Überexpression und Isolation des LHCP	32
4.1.1	Zellaufschluss mittels French-Press	33
4.1.2	Zellaufschluss mittels Ultraschall	33
4.2	Präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Reinigung des LHCP	34
4.3	Ortsgerichtete Spinmarkierung	35
4.4	Essigsäure Acetonfällung	36
4.5	Trichloressigsäure-Fällung	36
4.6	Etherdestillation	37
4.7	Gewinnung von Pigmenttotalextrakt aus Erbsen	37
4.8	Einzelpigmentisolierung	39
4.8.1	Xanthophyllverseifung	39
4.8.2	präparative Hochgeschwindigkeits-Flüssigchromatographie (HPLC)	39
4.9	Butanol-Extraktion	40
4.10	Detergenzwechsel-Rekonstitution (DWR)	41
4.11	Trimerisierung	41
4.12	Heterogene Trimerisierung	43
4.13	Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation	45
4.14	Komplexbildung	45
4.15	Verdünnungs-Rekonstitution	46
4.16	„Stopped-Flow“-Rekonstitution des LHCII	47

4.16.1	„Stopped-Flow“	47
4.16.2	Freeze-Quench	50
4.17	Kalibrierung des SF/FQ-Systems	50
4.18	EPR-Proben	51
4.19	Zweiphasen-Dünnschichtchromatographie	52
5	Analytische Methoden	53
5.1	Agarose-Gelelektrophorese	53
5.2	Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
5.2.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
5.2.2	Schwach denaturierende Deriphat-PAGE („Grüne Gele“)	55
5.3	Absorptionsspektroskopie	56
5.3.1	VIS-Absorptionsspektroskopie	56
5.3.2	UV-Absorptionsspektroskopie	57
5.4	Fluoreszenzspektroskopie	58
5.5	Circular dichroismus-Spektroskopie	58
5.6	Elektronenparamagnetische-Resonanzspektroskopie	59
5.6.1	„Continuous-Wave-EPR“ (CW-EPR)	60
5.6.2	„Double-Electron-Electron-Resonance-EPR“ (DEER-EPR)	61
III	Zeitaufgelöste Abstandsmessungen des LHCII	62
1	Ergebnisse	63
1.1	Anpassung der Rekonstitutionsparameter zur Herstellung zeitaufgelöster EPR-Proben	63
1.1.1	Einfluss verschiedener Reduktionsmittel	63
1.1.2	Adaption der Pufferzusammensetzung	65
1.1.3	Einfluss der Pigmente	67
1.1.4	Anpassung der Proteinkonzentration	73
1.1.5	CD-spektroskopische Bestimmung der Rekonstitutionsausbeute	74
1.2	Bestimmung der Markierungseffizienz	75
1.3	Aufreinigung des LHCP	76
1.4	Kalibrierung des „Stopped-Flow/Freeze-Quench“ Systems	81
1.4.1	Rekonstitutionstests	81
1.4.2	Kalibrierung	81
1.5	Untersuchung früher Faltungsereignisse des LHCII	84

1.5.1	Faltungszustand des LHCP in LDS und GuHCl	85
1.5.2	Zeitaufgelöste Abstandsmessungen verschiedener LHCII-Varianten	91
2	Diskussion	101
2.1	Die Rekonstitutionsausbeute des LHCII wird durch mehrere Faktoren beeinflusst	101
2.2	Die Aufreinigung des LHCP kann die Signalqualität in EPR-Messungen verbessern	104
2.3	Das „Stopped-Flow/Freeze-Quench“-System ist zur Untersuchung früher Faltungseignisse geeignet	105
2.4	In LDS ist die Sekundärstruktur des LHCII partiell ausgebildet	106
2.5	Zeitaufgelöste DEER-EPR Proben zeigen den Verlauf der Faltung	108
2.5.1	Formierung der Transmembranhelices	109
2.5.2	Ausrichtung der Helices und Bildung des Helixkreuzes	110
2.5.3	Stabilisierung der stromalen und lumenalen Bereiche	112
2.5.4	Zeitlicher Faltungsverlauf im Bezug auf Ligandenbindung und Membraninsertion des LHCII	113
2.6	Modell der Rückfaltung des LHCII in Detergenzmicellen	115
2.7	Ausblick	117
IV	Strukturuntersuchungen des LHCII	118
1	Ergebnisse	119
1.1	Vergleichende Strukturuntersuchungen flexibler Bereiche des LHCII im Monomer und Trimer	119
1.1.1	Überprüfung der Aggregation in aufgereinigten LHCII Proben	120
1.1.1.1	Test auf konzentrationsabhängige Aggregation durch Zentrifugation	120
1.1.1.2	Optimierung der Probenextraktion des LHCII aus Saccharosedichtegradienten	120
1.1.2	Strukturuntersuchungen der lumenalen Schleife	122
1.1.3	Strukturuntersuchungen des N-Terminus	133
2	Diskussion	139
2.1	Aggregationen in monomeren LHCII-Proben lassen sich minimieren	139
2.2	Die strukturelle Integrität der lumenalen Schleife hängt von Neoxanthin ab . . .	140
2.3	Die Lage des N-Terminus kann im Trimer über DEER-EPR bestimmt werden . .	143

V	Allgemeines	147
1	Zusammenfassung	148
2	Summary	149
3	Literaturverzeichnis	150
4	Anhang	161
4.1	Abkürzungen	161
4.2	Sequenzen	163
5	Danksagung	166
6	Lebenslauf	169
7	Erklärung	171

Abbildungsverzeichnis

I.1.1	Die Photosynthese	2
I.1.2	Der PSII Superkomplex	3
I.2.1	Der LHCII	4
I.2.2	LHCII Emitterpigmente	5
I.2.3	State Transitions	8
I.2.4	LHCII Biogenese	9
I.3.1	Membranproteine	11
I.3.2	„Two-Stage-Model“ der Membranproteinfaltung	12
I.4.1	EPR	14
I.4.2	Proxyl-Iodacetamid-Spinlabel am LHCII	15
II.2.1	Strukturformeln PROXYL-Label	24
II.2.2	DNA-Längenstandards	25
II.2.3	pDS12-RBSII Expressionsvektor	26
II.3.1	Klonierungsstrategie zur Ortsgerichteten Mutagenese	29
II.4.1	Autooxidationsreaktion des Diethylethers	37
II.4.2	Schema der SFM300	47
II.4.3	Reaktionsmechanismus der Metmyoglobin-Azid-Reaktion zur Kalibrierung des SF/FQ-Systems	51
III.1.1	Einfluss verschiedener Reduktionsmittel auf die Rekonstitutionsausbeute . . .	64
III.1.2	Einfluss der β -ME Konzentration und Hitzedenaturierung auf die Rekonstitutionsausbeute	64
III.1.3	Test der RK1 Pufferkomponenten	66
III.1.4	Variation der PG Konzentration	66
III.1.5	Einfluss der TX-Konzentration auf die Rekonstitutionsausbeute	67

III.1.6	Einfluss der LDS und TX-Konzentration	67
III.1.7	Anreicherung des Totalextraktes mit Xanthophyllen	68
III.1.8	Rekonstitution mit angereichertem Totalextrakt	68
III.1.9	Rekonstitutionsausbeute in Abhängigkeit des Pigment/LHCP Verhältnisses .	69
III.1.10	Aggregation der Pigmente im RK1	70
III.1.11	Rekonstitutionsausbeute mit alterndem RK1	70
III.1.12	HPLC Spektren der Pigmentextraktion aus Pellet und Überstand des RK1 .	70
III.1.13	Spektren der Einzelpigmente	71
III.1.14	Aggregation der Einzelpigmente im RK1	72
III.1.15	Einzelpigmentrekonstitution mit alterndem RK1	72
III.1.16	RK1-Butanolextraktion	73
III.1.17	Deriphat-PAGE der LHCP Konzentrationsreihe	74
III.1.18	LHCP-Konzentrationsreihe	74
III.1.19	Konzentrationsreihe aufgereinigter LHCII-Monomere	75
III.1.20	CW-EPR Spektren des Markierungstests	76
III.1.21	Markierungsausbeute	76
III.1.22	SDS-Page jeder achten Fraktion nach PrepPAGE	77
III.1.23	SDS-Page des PrepPAGE Laufs	77
III.1.24	SDS-Page des aufgereinigten LHCP	78
III.1.25	Primärdaten und Abstandsverteilungen der Rekonstitutionen mit aufgereinigtem LHCP	79
III.1.26	Rekonstitutionsvergleich SF/FQ	82
III.1.27	Kalibrierung im „Continuous-Flow-Mode“	83
III.1.28	Kalibrierung im „Interrupted-Flow-Mode“	84
III.1.29	UVCD-Spektren der GuHCl und LDS solubilisierter LHCP referenzen	87
III.1.30	EPR-Primärdaten und Abstandsverteilungen der GuHCl- und LDS-solubilisierter LHCP-Referenzen	90
III.1.31	CD-Spektren der Zeitaufgelösten Faltungsproben	93
III.1.32	Biochemische Charakterisierung der aufgereinigten LHCII Referenzen	94
III.1.33	EPR-Primärdaten und Abstandsverteilungen der zeitaufgelösten Proben im Vergleich zu vollständig ge- und entfalteten Komplexen	99
III.2.1	Ausbildung und Ausrichtung der Helices 1,3 & 4	110
III.2.2	Ausrichtung der Transmembranhelices zueinander	111
III.2.3	Ausrichtung der lumenalen und stromalen Bereiche.	113
III.2.4	Modell des zeitlichen Ablaufs der Faltung des LHCII	115

IV.1.1	CD-Spektren der LHCII-Monomere zur Überprüfung konzentrationsabhängiger Aggregation	121
IV.1.2	CD-Spektren der LHCII-Trimere zur Überprüfung konzentrationsabhängiger Aggregation	121
IV.1.3	CD-Spektren der Proben mit unterschiedlicher Extraktionsmethode	122
IV.1.4	Abstandsverteilungen der Proben mit unterschiedlicher Extraktionsmethode .	122
IV.1.5	Abstände der markierten Aminosäuren der lumenalen Schleife	123
IV.1.6	CD-Spektren der Klone der lumenalen Schleife	125
IV.1.7	Absorptionsspektren der Klone der lumenalen Schleife	127
IV.1.8	Fluoreszenzspektren der Klone der lumenalen Schleife	128
IV.1.9	EPR-Primärdaten und Abstandsverteilungen der LHCII-Klone der lumenalen Schleife	132
IV.1.10	CD-EPR Spektren der der N-terminalen LHCII-Klone	133
IV.1.11	Absorptionsspektren der N-terminalen LHCII-Klone	134
IV.1.12	Fluoreszenzspektren der N-terminalen LHCII Klone.	134
IV.1.12	EPR-Primärdaten und Abstandsverteilungen der LHCII-Klone des N-Terminus	138
IV.2.1	Neoxanthinbindung der Lumenalen Schleife	142
IV.2.2	Bewegungsfreiheit der Lumenalen Schleife	142
IV.2.3	Lagemodell des N-Terminus im Trimer	145
IV.2.4	Model der elektrostatischen Oberfläche in Grana angordneter LHCII-Trimere aus Daum et al. (2010)	146

Tabellenverzeichnis

II.2.1	Protein-Längenstandards	25
II.2.2	LHCP-Klone	27
II.4.1	PrepPAGE-Gele	35
II.4.2	Programme der präparativen HPLC	40
II.4.3	Parameter der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	45
II.4.4	EDL-Volumina	48
II.4.5	Stopped-Flow-Parameter Continuous-Flow	49
II.4.6	Stopped-Flow-Parameter Interrupted-Flow	49
II.5.1	Rezept zur Herstellung 10 Polyacrylamid-Gele	55
III.1.1	Detergenz-Konzentrationen	66
III.1.2	Pigmentstöchiometrien im RK1	73
III.1.3	SF Parameter „Continuous-Flow“Mode“	83
III.1.4	Ergebnisse „Continuous-Flow-Mode“	83
III.1.5	SF Parameter „Interrupted-Flow-Mode“	83
III.1.6	Ergebnisse „Interrupted-Flow-Mode“	84
III.1.7	UVCD-Analyse	86
IV.1.1	Probenkonzentrationen der LHCII-Klone der lumenalen Schleife	124
IV.1.2	Abstände der lumenalen Schleife zur stromalen Position 143	129
IV.1.3	Abstände des N-Terminus	135

Teil I.

Einleitung

1. Die Photosynthese

Sonnenlicht ist die häufigste und konstanteste Energiequelle der Erde, und wird von vielen biologischen Systemen seit mehreren Milliarden Jahren zur Aufrechterhaltung ihres Metabolismus genutzt. Die oxygene Photosynthese beschreibt den Prozess der Energiekonversion von Lichtquanten in energiereiche chemische Verbindungen unter Bildung von elementarem Sauerstoff (Suresh Kumar et al. (2014)). Sie wird von Cyanobakterien, Algen und Pflanzen betrieben und ist in den beiden letzten Gruppen in den Chloroplasten lokalisiert. Die Photosynthese ist in zwei Teilprozesse unterteilt, die als Licht- und Dunkelreaktion bezeichnet werden. In der Lichtreaktion wird die Sonnenenergie gespeichert und zur Herstellung von Energieäquivalenten genutzt, die in der Dunkelreaktion zum Aufbau energiereicher organischer Verbindungen dienen. Die enzymatischen Prozesse der Dunkelreaktion sind im Cytoplasma der Chloroplasten lokalisiert, während zur Absorption der Lichtquanten, zur Wasserspaltung und zur vektoriiellen Weitergabe von Elektronen und Protonen die Kombination mehrerer Proteinkomplexe in einem organisierten Membransystem vonnöten ist (Garab (2014)). Die inneren Membranen der Chloroplasten werden als Thylakoide bezeichnet und bilden neben freieren Bereichen (Stromathylakoide) dichte Stapel (Granathylakoide).

Die beiden größten Proteinkomplexe sind die Photosysteme I & II, zwischen die der kleinere Cytochrom- b_6/f -Komplex geschaltet ist. Das Photosystem I ist hauptsächlich in den Stromathylakoiden lokalisiert, PS II befindet sich in den Grana und der Cyt- b_6/f -Komplex ist ubiquitär über das Membransystem verteilt. Elektronen werden im PS II durch Lichtquanten auf ein höheres Energieniveau angehoben und reduzieren Plastochinon zu Plastohydrochinon, welches wiederum am Cyt- b_6/f -Komplex oxidiert wird. Die Elektronen werden zur Reduktion von Plastocyanin genutzt, welches diese auf das PS I überträgt. Nach erneuter Anregung dient das Elektron dann, an die Übertragung auf zwei Eisen-Schwefel-Proteine angeschlossen, zur Reduktion von Ferredoxin und schließlich zur Umsetzung des Reduktionsäquivalents NADPH zu $\text{NADP}^+ + \text{H}^+$. Plastochinon und -cyanin dienen als mobile Elemente zwischen den Membrangebundenen Komplexen, Plastochinon innerhalb der Membran, Plastocyanin frei im Stroma.

Der Kernkomplex des PS II, der aus den Untereinheiten D_1 , D_2 , CP43 und CP47 besteht, ist *in vivo* mit peripheren Antennenkomplexen assoziiert, den minoren Lichtsammlern CP29, CP26 und CP24 und dem majoren Lichtsammelkomplex II (LHCII) (Kouřil et al. (2012)). Die zentra-

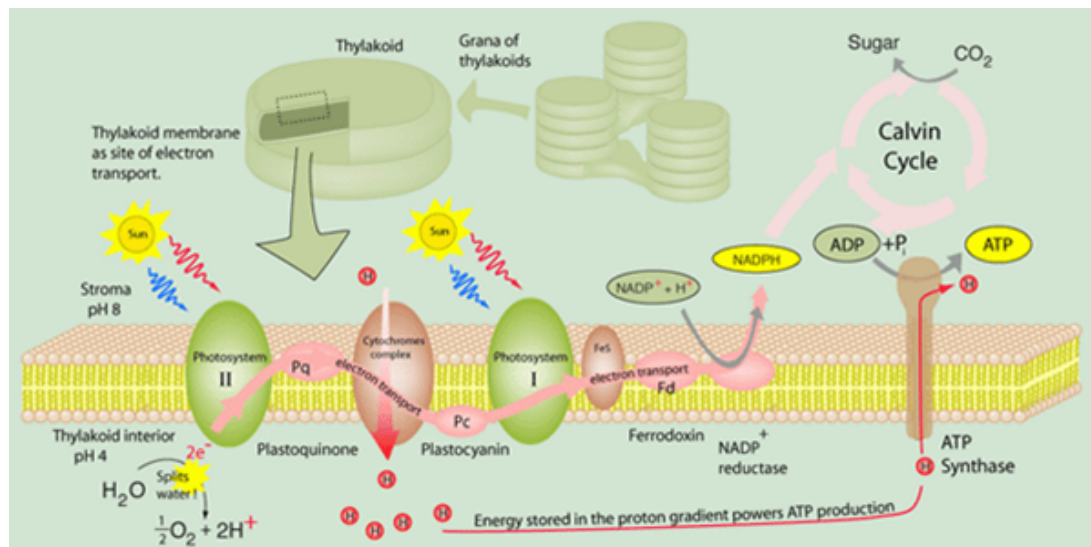


Abbildung I.1.1.: Die Photosynthese. Schematische Darstellung der Photosynthesereaktionen und der beteiligten Proteinkomplexe. Aus Moore (1995)

len D1/D2-Dimere erfüllen die Aufgabe der Wasserspaltung durch einen Tetramangan-Calcium-Cluster. Das eigentliche Reaktionszentrum des PSII besteht aus 4 Chlorophyll a-Molekülen und zwei Pheophytinen (Cox et al. (2013)). Die Absorption von Lichtquanten regen die zur Ladungstrennung fähigen *Chl a*-Moleküle an, wodurch es zur Reduktion des Pheophytins kommt, welches nun Elektronen auf Plastochinon übertragen kann und sie so in die weitere Reaktionskette der Lichtreaktion einspeist. Die Elektronen, die in der Wasserspaltung frei werden, schließen die durch Lichtanregung des Reaktionszentrums entstandene Lücke.

Die peripheren Antennenkomplexe die mit dem PSII assoziiert sind, optimieren die Aufnahme von Lichtquanten durch Erweiterung des absorbierten Farbspektrums und Vergrößerung der lichtabsorbierenden Oberfläche. Sie binden eine große Anzahl an Pigmenten, neben den Chlorophyllen a & b auch mehrere Carotinoide. Wird ein Lichtquant in einer der Lichtsammelantennen absorbiert, kommt es zur Anhebung eines Elektrons auf ein höheres Energieniveau. Das angeregte Elektron ist in der Lage, bei Rückfall in den Grundzustand ein benachbartes Pigment anzuregen, wodurch die schrittweise Weiterleitung der Energie hin zum Reaktionszentrum erfolgt.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf dem Größten dieser Lichtsammelproteine, dem LHCII. Neben dem strukturellen Aufbau dieses Hauptlichtsammlers sollen im folgenden weitere Aufgaben erläutert werden, die der LHCII in der Photosynthese erfüllt.

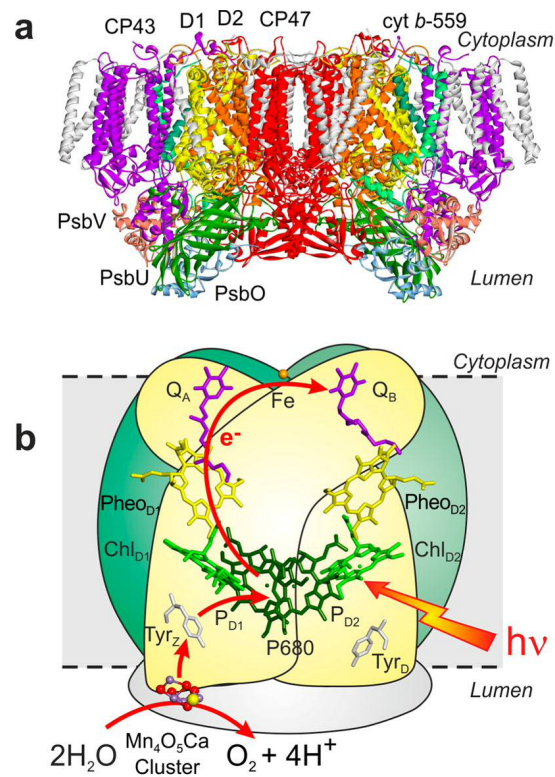


Abbildung I.1.2.: Der PSII Superkomplex. A: Röntgenkristallstruktur des PSII aus *Thermosynechococcus vulcanus* bei 1,9 Å; B: Anordnung der Kofaktoren im D₁/D₂ Komplex die an Ladungstrennung, Elektronentransport und Wasseroxidation beteiligt sind. Aus Cox et al. (2013)

2. Der LHCII

Als häufigstes Membranprotein der Erde, erfüllt der Hauptlichtsammelkomplex II in erster Linie die Aufgabe der Sammlung von Lichtenergie für den assoziierten Kernkomplex des PSII. Es liegt in der Peripherie des PS II-Superkomplexes in trimerer Form vor, bindet unter bestimmten Umständen jedoch auch an das PS I. Die Trimere bestehen aus verschiedenen Zusammensetzungen dreier zum Großteil identischer Proteine, die durch die Gene *Lhcb 1* bis 3 kodiert werden und *in vivo* im Verhältnis von 8:3:1 vorkommen (Jansson (1994)). Jedes Monomer bindet dabei eine Vielzahl von Liganden. Neben acht *Chl a*, sechs *Chl b*, zwei Luteinen, einem Violaxanthin und einem Neoxanthinmolekül, sind auch die Lipide Phosphatidylglycerin (PG) und Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) mit dem Protein assoziiert (Neilson and Durnford (2010), Standfuss et al. (2005)). Die gebundenen Pigmente verleihen dem LHCII strukturelle Integrität und ein charakteristisches Absorptionsspektrum, welches einen wesentlich größeren Wellenlängenbereich abdeckt als der Kernkomplex, der ausschließlich *Chl a* als photosynthetische Pigmente bindet. So erweitert der LHCII effektiv die Absorptionskapazität seines jeweiligen Photosystems.

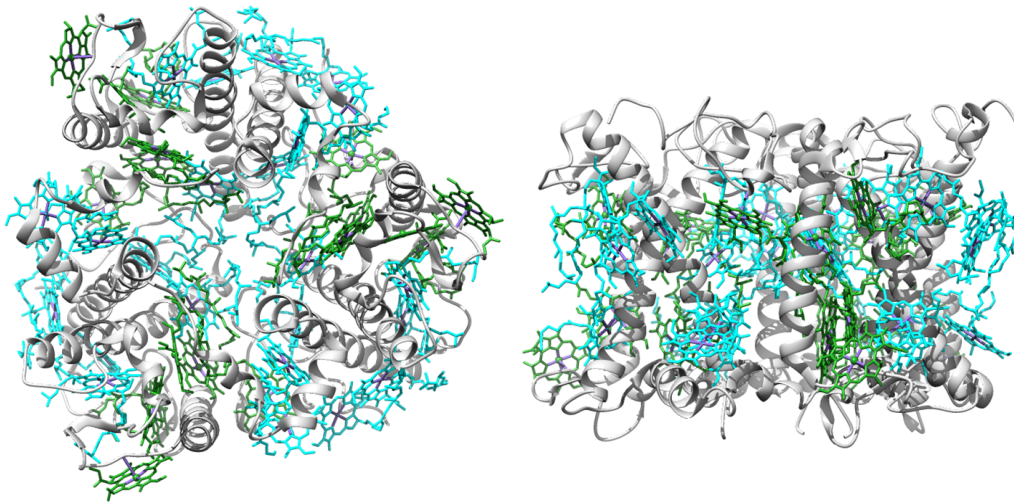


Abbildung I.2.1.: Der LHCII. links: Aufsicht auf die Kristallstruktur des LHCII-Trimers, rechts: Seitenansicht. *Chl a*-Moleküle in türkis, *Chl b* in grün. Erstellt mit USCF Chimera, Kristallstruktur 2BHW aus Standfuss et al. (2005)

Verschiedene Untersuchungen haben über die letzten Dekaden einen immer detaillierteren Blick in den Aufbau des LHCII ermöglicht. Im ersten Elektronenkristallographischen Strukturmodell von Kühlbrandt et al. (1994) wurde deutlich, dass der LHCII in der Thylakoidmembran über drei die Membran durchspannende α -Helices verankert ist, von denen zwei ein punktsymmetrisches Helixkreuz mit einem 30° Neigungswinkel zur Membranebene ausbilden. Eine kurze amphiphile Helix konnte am C-terminalen Ende in der Peripherie lokalisiert werden. Höher auflösende Röntgenkristallstrukturen zeigten eine weitere Helix in der lumenalen Schleife zwischen den ersten beiden Transmembranhelices und konnten genauen Aufschluss über die Interaktionspartner der gebundenen Pigmente geben (Liu et al. (2004), Standfuss et al. (2005)). Stromal sind fünf *Chl a*-Moleküle um das Helixkreuz angeordnet, welche dort durch drei Glutamatreste und ein Histidin komplexiert sind, eines bildet einen Phosphodiester mit PG aus. Drei *Chl b* binden ebenfalls über Glutamat an Helix 3 oder sind über eingelagertes Wasser stabilisiert. Die restlichen drei *Chl a*- und drei *Chl b*-Moleküle bilden auf lumenaler Seite einen Ring um das Helixkreuz, *Chl a*-Komplexpартner sind hier zwei Wassermoleküle und ein Glycin, bei *Chl b* sind es ein Wassermolekül, ein Histidin und ein Valin.

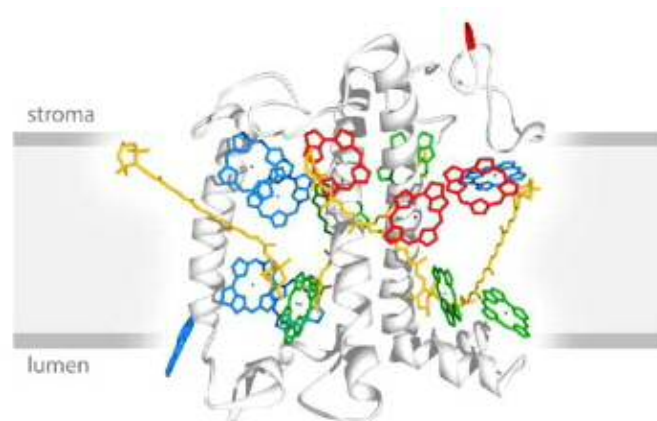


Abbildung I.2.2.: Die LHCII Emitterpigmente. Schema eines LHCII Monomers in der Thylakoidmembran mit gebundenen Pigmenten. Die terminalen Emitterpigmente der Energieübertragung sind in rot gekennzeichnet. Aus Garab (2014)

Begünstigt durch die Anordnung in zwei Schichten und zwei irregulären Doppelringen, die bei stromaler Betrachtung des Trimers zu erkennen sind, kann Energie effizient aus allen Richtungen aufgenommen und auf die Emitter Chlorophylle übertragen werden, welche als „Ausgang“ für

die absorbierte Energie dienen und sie auf benachbarte Lichtsammelkomplexe oder das Reaktionszentrum übertragen. Neben den Chlorophyllen, die den Großteil der Lichtsammlung und Energieweiterleitung übernehmen, sind zwei Luteinmoleküle in der Nähe des Helixkreuzes gebunden, ein 9-*cis* Neoxanthin liegt im Bereich der lumenalen Schleife und ein Violaxanthin ist reversibel im Bereich des Monomer-Monomer-Interface gebunden (Liu et al. (2004)). Besonders die letzten beiden der genannten Pigmente spielen eine Rolle in einer weiteren wichtigen Aufgabe des LHCII, dem Non-Photochemical-Quenching.

2.1. Non-Photochemical-Quenching (NPQ)

Während in Situationen mit moderaten oder schlechten Lichtverhältnissen die Optimierung der Photonenausbeute Hauptaufgabe der Photosysteme ist, hat unter Starklicht die Vermeidung von Schäden am Photosyntheseapparat höchste Priorität. Wird zu viel Licht absorbiert, können die Elektronen der Redoxkette der Photosynthese nicht vollständig auf die terminalen Akzeptoren übertragen werden, da die Reduktionsäquivalente nicht schnell genug regeneriert werden. Angeregtes Chlorophyll geht in den Singulettzustand über, aus dem es in den Grundzustand zurückfällt und dabei einen Akzeptor anregt. Bei einer hohen Lebensdauer des angeregten Zustands, die in Abwesenheit eines Akzeptors auftritt, kann Chlorophyll in den energetisch niedrigen Triplett-Zustand übergehen. Reagiert Triplettchlorophyll mit Sauerstoff, kommt es zur Bildung von hoch-reaktivem Singulett-Sauerstoff, welcher wiederum zur Degeneration des D₁-Proteins des PSII-Kernkomplexes führen kann. Die regulatorischen Mechanismen, die Energie abhängig von den Lichtbedingungen zwischen den Photosystemen verteilen und überschüssige Anregungsenergie in Wärme umwandeln, werden als „Non-Photochemical-Quenching“ (NPQ) bezeichnet (Nath et al. (2013)). NPQ ist dabei der Sammelbegriff für mindestens drei Prozesse, die anhand ihrer Abklinggeschwindigkeit nach Überanregung unterteilt werden. Sie werden als qE (Fluoreszenzlöschung), qT („State Transitions“) und qI (Photoinhibition) bezeichnet (Ikeuchi et al. (2014)).

2.1.1. Fluoreszenzlöschung

Der schnellste regulatorische Prozess, die Fluoreszenzlöschung, relaxiert schnell, innerhalb von Sekunden bis Minuten (Nath et al. (2013)). Sie hängt neben dem pH-Gradienten der Thylakoidmembran und der Funktion des PsbS-Proteins von der Umwandlung des Photosynthesepigments Violaxanthin, welches im LHCII gebunden ist, zu Antheraxanthin und Zeaxanthin ab (Kell et al. (2014)), ein Prozess der als Xanthophyll-Zyklus bekannt ist. Zeaxanthin bewirkt, dass Singulettanregungen im Lichtsammelkomplex als Wärme abgegeben werden können, bevor

es zur Bildung von Triplett-Chlorophyll kommt, während Violaxanthin eher als akzessorisches Pigment fungiert. Der Xanthophyllzyklus wird in Pflanzen durch die Protonierung von PsbS bei niedrigem lumenalem pH ausgelöst (Sunku et al. (2013)).

Auch den anderen im LHCII gebundenen Carotinoiden wird eine Beteiligung an einem Übergang in einen energiedissipativen Zustand zugeschrieben. Lutein ist in der Lage, Triplettchlorophyll zu „quenchen“, geht dabei selbst in den Triplettzustand über (Salvadori et al. (2012)) und vermeidet so die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Neoxanthin hingegen wird oft mit einer Konformationsänderung des LHCII zur effektiven Fluoreszenzlöschung in Verbindung gebracht. Eine Drehung des Neoxanthin-Moleküls führt bei dieser Hypothese zu einer Annäherung mit mehreren Chlorophyllen, wodurch eine direkte Energiebaleitung über das Carotinoid ermöglicht wird (Ruban et al. (2007)). Eine neuere Studie beobachtete eine Isomerisierung des Neoxanthins von 9'-cis zu 9',13-dicis, wodurch eine Übertragung der Energie von *Chl b* 605 auf das Carotinoid ermöglicht würde (Zubik et al. (2011)).

An einem weiteren diskutierter Mechanismus, der der Fluoreszenzlöschung im „Quenched State“ des LHCII zu Grunde liegen könnte, sind die Carotinoide nicht beteiligt. Die Energielöschung erfolgt hier durch die inter- und intramolekulare Übertragung von Singulettanregung zwischen Chlorophyllen („*Chl-Chl*-Charge-Transfer“), ein Vorgang der *in vitro* in aggregierten LHCII-Trimeren beobachtet werden konnte, welche allgemein als gutes Modell für den Energiedissipativen Zustand angesehen werden (Müller et al. (2010), Kell et al. (2014)).

2.1.2. State-Transitions

Der zweite regulatorischer Mechanismus zielt anstelle der Umwandlung überschüssiger Lichtenergie in Wärme auf die Umverteilung der aufgenommenen Energie zwischen den Photosystemen ab. Die Lichtqualität variiert aufgrund von Jahreszeit, Tageszeit, Wolkenbildung und Beschattung durch benachbarte Pflanzen zum Teil stark. Aufgrund der unterschiedlichen Pigmentaustattung der beiden Photosysteme, absorbiert das PSII mehr im blauen Wellenlängenbereich, während das PSI auch Licht längerer Wellenlängen nutzen kann. Sich ändernde Lichtverhältnisse führen so schnell zu einer ungleichen Menge absorbierter Lichtquanten. Da die in Reihe geschalteten Photosysteme Lichtenergie jedoch nur effektiv umwandeln können, wenn beide Photosysteme gleichermaßen angeregt werden, muss die absorbierte Energiemenge reguliert werden (Pesaresi et al. (2010)).

Die Regulation wird durch die Abwanderung eines mobilen Teils der mit dem PSII assoziierten majoren Lichtsammler erreicht. Gesteuert wird dies über den Oxidationszustand des Plastochinonpools. Bei vermehrter Anregung des PSII liegt Plastochinon hauptsächlich in reduzierter Form, als Plastohydrochinon (PQH₂) vor. PQH₂ aktiviert die Kinase Stt7 (*Chlamydomonas*

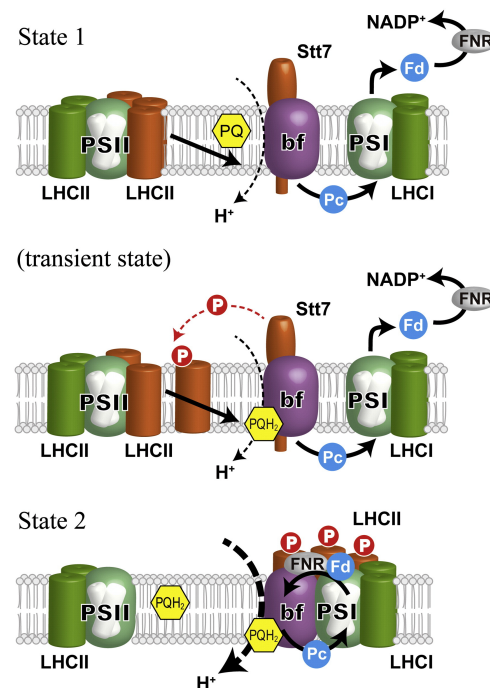


Abbildung I.2.3.: State Transitions. Schema der Abwanderung des LHCII vom PSII durch Phosphorylierung abhängig vom Oxidationsgrad des Plastochinonpools. Aus Minagawa (2011)

reinhardtii) bzw. Stn7 (*Arabidopsis thaliana*), die den LHCII am N-Terminus phosphoryliert, welcher dadurch aus den Grana in die Stromathylakoide übergeht und dort an PS I bindet (Allen and Pfannschmidt (2000), Madireddi et al. (2014)). Durch die vergrößerte Lichtsammelantenne wird die Lichtabsorption zwischen den beiden Photosystemen angepasst und ermöglicht einen gleichmäßigen Elektronenfluss, was die konstante Versorgung mit Energie- und Reduktionsäquivalenten zur Aufrechterhaltung der Dunkelreaktion gewährleistet.

2.2. Biogenese des LHCII

Der LHCII ist Teil einer im Kern lokalisierten Genfamilie, die neben den für den majoren Lichtsammeler codierenden Genen Lhcb 1, 2 und 3 auch die Gene der minoren Antennekomplexe (Lhcb 4-8), des PsbS und einer Reihe von LHC-ähnlichen Proteinen („early-Light-induced proteins“, ELIPS; „one-helix proteins“, OHPs; „stress-enhanced-proteins“, SEPs) mit verschiedenen Aufgaben beinhaltet (Ballottari et al. (2012)). Nach der Translation des 269 AS langen LHCII-Precursors (Cashmore (1984)), dem N-terminal ein Transitpeptid angehängt ist (Vainstein et al. (1989)), erfolgt die Translokation über die äußere und innere Chloroplastenmembran mithilfe der TOC/TIC-Komplexe unter Verbrauch von internem ATP. Nach dem Import wird

das Transit-Peptid durch die „stroma processing-peptidase“ (SPP) abgeschnitten (Shi and Theg (2013)). Das wasserunlösliche LHCP bildet mit dem CpSRP, das aus einer 54 kDa GTPase (cpSRP54) und einer fast vollständig aus Protein-Protein Interaktionsdomänen bestehenden 43 kDa Untereinheit (cpSRP43) zusammengesetzt ist, einen Transitkomplex. Die Bindung an cpSRP43 erfolgt über eine hochkonservierte Proteinsequenz im stromalen Loop des LHCII, das L18-Peptid (Stengel et al. (2008)), und wird anschließend mithilfe der Translocase ALB3 unter Beteiligung der zum Teil membrangebundenen GTPase cpFtsY in die Membran inseriert (Dunschede et al. (2011)). Vollständig funktional ist der LHCII jedoch, wenn er seine spezifische Tertiärstruktur mit allen gebundenen Liganden erreicht hat. Da auf dem Prozess der Faltung und der Pigmentbindung ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag, sollen grundlegende Aspekte der Faltung von Membranproteinen am rekombinanten LHCII im folgenden Abschnitt vorgestellt werden.

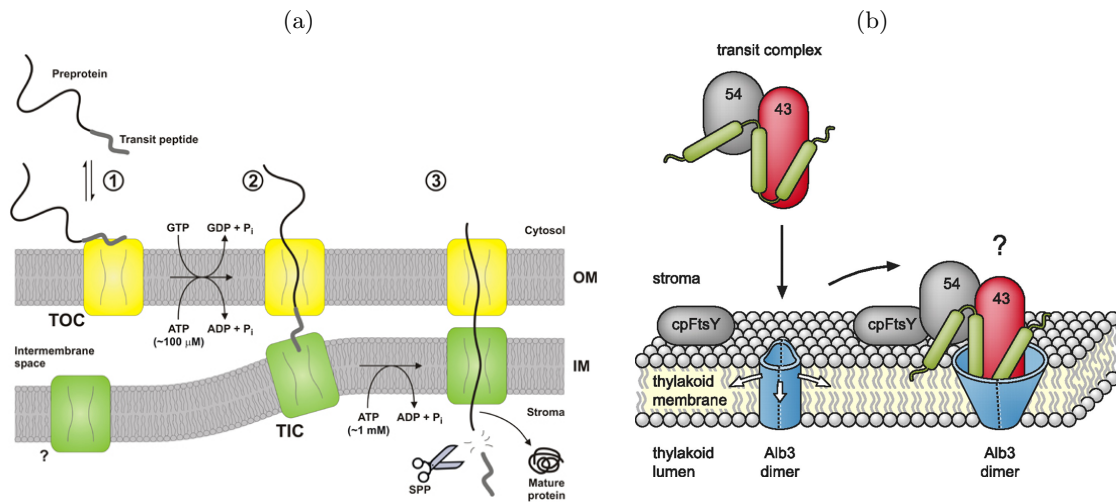


Abbildung I.2.4.: LHCII Biogenese. (a) Import eines Precursor-Proteins über die Chloroplastenmembran; Aus Jarvis (2008) (b) LHCP Membraninsertion, Darstellung aller bekannten beteiligten Proteine; Aus Dunschede et al. (2011)

3. Rekombinante Membranproteine

Membranproteine im allgemeinen stellen einen Anteil von 30% der Gene in bisher sequenzierten Genomen und bieten Ansatzpunkte für mehr als 50% der bekannten Arzneimittel (Heyden et al. (2012)). Daher ist neben der Struktur und Funktion auch die Membraninsertion und Faltung ein intensiv beforschtes Feld der modernen Naturwissenschaften. Zur Analyse *in vitro* müssen die Apoproteine meist nicht nativ gewonnen werden. Inseriert in einen Expressionvektor, können die Gene in einem geeigneten Wirtstamm überexprimiert und die Apoproteine aus dem Zelllysate extrahiert werden (Bujard et al. (1987)). Jedoch stellt die weitere Untersuchung eines Proteins, das *in vivo* eingebettet in eine amphiphile Lipiddoppelschicht mit stark hydrophoben Kern und peripheren Bereichen moderater Hydrophobizität vorliegt, im wässrigen Milieu ein experimentelles Problem dar. *In vitro*-Untersuchungen werden durch eine Reihe von Techniken ermöglicht, welche die natürliche Biomembran ersetzen und nachahmen sollen. Neben der Insertion in Lipidvesikel (Lyukmanova et al. (2012)) ist vor allem die Solubilisierung in Detergenz-Mizellen ein oft angewandtes Mittel (Hedin et al. (2011)). Ausgehend von starken ionischen Detergenzien wie SDS und LDS oder chaotropen Salzen wie Guanidinium-Hydrochlorid (GuHCl) ist es möglich, Membranproteine zu rekonstituieren, die ihren nativem Gegenstück strukturell und funktionell sehr ähnlich sind, wie am Beispiel von Bacteriorhodopsin, Lysozym oder eben dem LHCII, auf welchem der Fokus dieser Arbeit liegt, gezeigt werden konnte (Krishnamani and Lanyi (2011), Zhang et al. (2013), Paulsen et al. (1990)).

3.1. Rekonstitution

Zur Rekonstitution von Membranproteinen *in vitro* ist es notwendig, das entfaltete Apoprotein in eine Umgebung zu bringen, in der es seine native Struktur zurückerlangen kann. β -D-Octylglucosid (OG) ist ein mildes, anionisches Detergenz, mit welchem Membranproteine rückgefaltet oder sogar in aktiver Form nach Überexpression aus *E. Coli* extrahiert werden können, wie Arolas et al. (2014) an HtpX, einer integralen Membran-Metalloprotease, zeigen konnte. Auch der LHCII als integrales Membranprotein der Thylakoide grüner Pflanzen, kann durch die Überführung in OG-Micellen in seine native Form rückgefaltet werden, wenn zur Rekonstitution eine Pigmentmischung angeboten wird, die alle essentiellen Cofaktoren enthält

(Paulsen et al. (1990)). Grundsätzlich können dazu zwei Techniken angewandt werden. Bei der Ersten wird das LHCII-Apoprotein in SDS solubilisiert und mit einer pigmenthaltigen OG-Lösung gemischt. Durch Zugabe von Kaliumchlorid wird Dodecylsulfat ausgefällt und so ein Übergang des Apoproteins in OG Micellen erzwungen, bei dem es zur Rückfaltung des LHCII mit hoher Ausbeute kommt. Bei der zweiten Technik wird in LDS solubilisiertes Apoprotein mit einer Pigment-OG-Lösung verdünnt. Die Faltungsinduktion erfolgt durch die Bildung von Mischmicellen ab dem Zeitpunkt der Zugabe der OG-Lösung, und ermöglicht so die zeitaufgelöste Untersuchung des Rückfaltungsprozesses.

3.2. Faltung

Integrale Membranproteine werden aufgrund ihrer dominanten Sekundärstrukturen in zwei Klassen unterschieden, in die kleine Gruppe der „ β -Barrel“-Proteine und diejenigen, die durch α -Helices in der Membran verankert sind (Hedin et al. (2011)).

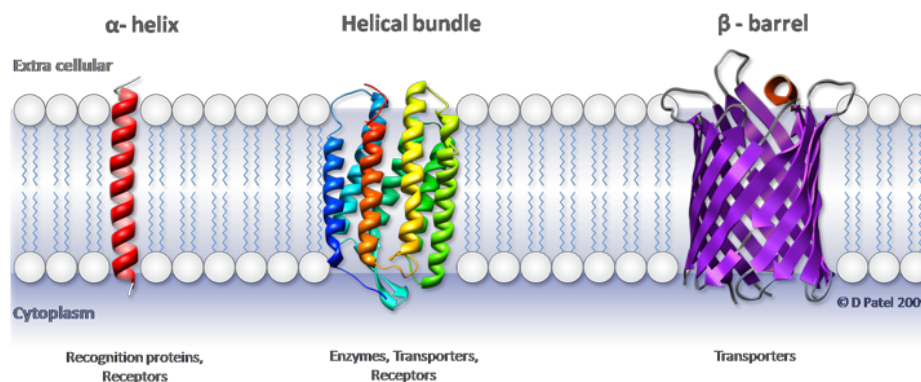


Abbildung I.3.1.: Membranproteine. verschiedene Typen von Membranproteinen und ihr Hauptaufgaben im Metabolismus von Pflanzen und Tieren. ©D. Patel, 2009.

Von Popot and Engelman (1990) wurde ein grundlegendes Modell der Faltung für diese zweite Gruppe formuliert. Es unterteilt die Faltung in zwei Phasen, und wird daher als „Two-Stage-Model“ bezeichnet. In der ersten Phase kommt es zur Insertion und Ausbildung der Sekundärstrukturelemente, in der Zweiten interagieren die Helices miteinander und führen so zur Ausrichtung in der Membran und Bildung der Tertiärstruktur. *In vivo* sind an diesem Prozess meist Translocasen beteiligt, die das durchschleusen hydrophiler Proteindomänen durch die hydrophobe Membran ermöglichen. 2003 wurde dieses Modell um eine dritte Phase erweitert, welche Ligandenbindung, die Bildung von Schleifen außerhalb der hydrophoben Membrumgebung und die Ausbildung der Quartärstruktur berücksichtigt (Engelman et al. (2003)).

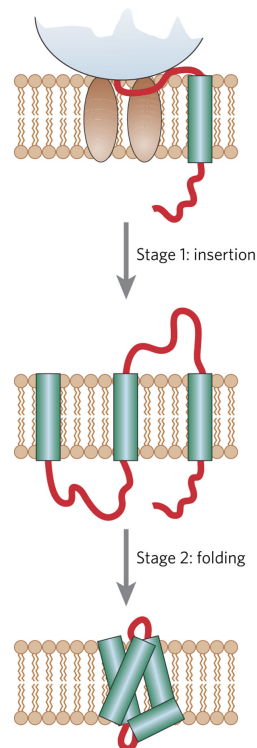


Abbildung I.3.2.: „Two-Stage-Model“ der Membranproteinfaltung. Aus Bowie (2005)

3.2.1. Faltungskinetik des LHCII

Die Faltung von Proteinen hin zu ihrer biologisch aktiven Form ist ein Prozess, der sich normalerweise im Mikro- bis Millisekundenbereich abspielt. Membranproteine benötigen dabei aufgrund der mit der Faltung einhergehenden Insertion meist länger als wasserlösliche Proteine, um ihre native Struktur zu erreichen. Weiter verlangsamt wird dieser Prozess, wenn zum Abschluss der Faltung die Bindung von Liganden notwendig ist. Beispielsweise sind Ligandenunabhängige Faltungsprozesse bei Bacteriorhodopsin bereits nach 20 ms abgeschlossen, die Ligandenbindung hingegen erstreckt sich über einen Zeitraum von 4 s und die vollständige Quartärstruktur wird erst nach 10 s erreicht (Pan et al. (2011)). Durch die hohe Anzahl an gebundenen Liganden faltet der LHCII vergleichsweise langsam. Die Bindung von *Chl a* folgt dabei einer Kinetik mit einer Zeitkonstante von $\tau_1 \leq 1$ min, die Bindung von *Chl b* ist mit $\tau_2 \leq 5$ min langsamer (Horn (2004a)). Durch diese große Zeitspanne ist der LHCII ein gutes Modellobjekt zur Untersuchung des Faltungsprozesses von Membranproteinen mit Ligandenbindung.

4. Proteinstrukturanalytik

Zur Untersuchung von Proteinstrukturen stehen eine Reihe von Analysemethoden zur Verfügung. Die wohl am häufigsten angewandten Techniken sind die Röntgenkristallographie und die Kernmagnetische-Resonanzspektroskopie (NMR), aber auch die Cryo-Elektronenmikroskopie oder Elektronenkristallographie können zu Modellen mit z.T. bemerkenswertem Detailgrad führen. All diese Methoden dienen der Analyse des gesamten Proteins, und kristallographische Techniken setzen stets einen Kristall voraus, der bei den meisten Membranproteinen schwer herzustellen ist (Tamm and Liang (2006)). Dies erschwert Strukturuntersuchungen an Membranproteinen, und die Erforschung von flexiblen Strukturen und Faltungsprozessen ist selbst bei gelungener Kristallisation kaum möglich. Die ortsgerichtete Markierung einzelner Aminosäuren ist in rekombinanten Proteinen aus bakteriellen Expressionssystemen leicht realisierbar und ermöglicht die genauere Beobachtung einzelner Teilbereiche. Neben der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, die sogar an einzelne Moleküle *in vivo* gebunden werden können, ist die kovalente Verknüpfung von Spinmarkern mit dem zu untersuchenden Peptid eine bevorzugte Vorgehensweise. In Kombination mit „Freeze-Quench“-Techniken und Elektronenparamagnetischer-Resonanzspektroskopie (EPR) lassen sich dynamische Veränderungen der Spinumgebung in Lösung messen. Die hier zuletzt angesprochenen Techniken sollen im Folgenden vorgestellt werden.

4.1. Elektronen-Paramagnetische-Resonanzspektroskopie (EPR) & „Site-directed Spin-Labeling“ (SDSL)

Die Elektronen-Paramagnetische-Resonanzspektroskopie ist eine Methode zur Untersuchung der räumlichen Verteilung und Dynamik paramagnetischer Spezies Volkov (2008). Bei EPR-Techniken werden im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie paramagnetische Zentren von Elektronen statt Kernen observiert (Göbl et al. (2014)), indem in einem starken Magnetfeld die Aufspaltung der Energieniveaus eines ungepaarten Elektrons erzwungen und durch hochfrequente Mikrowellenstrahlen ein Übergang des Elektronenspins in ein höheres Energieniveau angeregt wird. Die Relaxation in den energieärmeren Grundzustand kann gemessen werden und gibt Aufschluss über die nähere Umgebung des ungepaarten Elektrons.

In Proteinen tauchen jedoch nur selten native paramagnetische Spezies auf, sie sind beschränkt

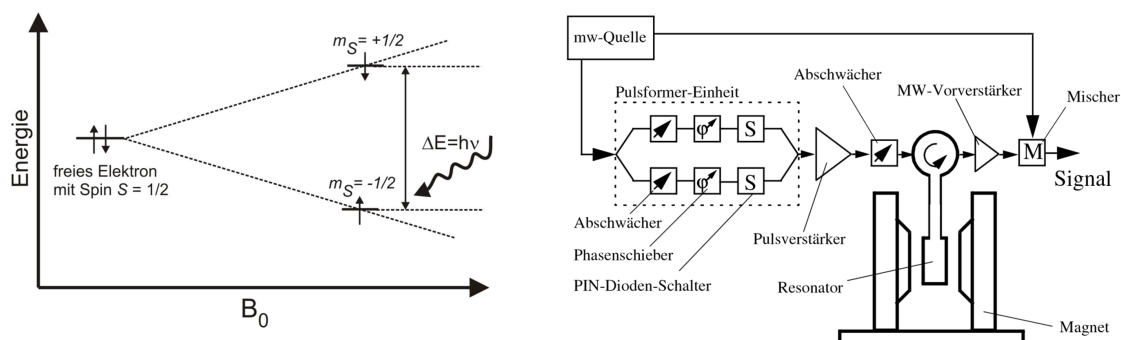


Abbildung I.4.1.: EPR. links: Elektronen-Zeeman-Effekt: Aufspaltung der Energieniveaus im Magnetfeld; rechts: Schematischer Aufbau eines Puls EPR Spektroskops. Aus Jeschke (1998)

auf Redox-aktive Metallkerne oder Aminosäuren in Intermediaten verschiedener Enzyme (Pievo et al. (2013)). Daher müssen sie meist artifiziell eingefügt werden, um EPR-Spektroskopische Messungen zu ermöglichen. Die Einführung ungepaarter Elektronen kann über die Reaktion verschiedener Aminosäuren mit kleinen Molekülen erreicht werden, die ein stabiles Radikal beinhalten. Das am Häufigsten verwendete Radikal ist Nitroxid, welches durch die Mesomerie zwischen einem Stickstoff- und Sauerstoffatom stabilisiert ist. Marker wie Tempo oder Proxyl-Iodacetamid, die über eine SH-reaktive Gruppe verfügen, können an native oder einklonierte Cysteine in Proteinen gebunden werden. Auf diese Weise werden Proteine mit paramagnetischen Zentren ausgestattet, denen intrinsische Radikale fehlen, so dass die Untersuchung mit einer großen Bandbreite an EPR-Techniken möglich wird. Die einzelnen Vorgehensweisen sind durch die jeweilige Fragestellung bestimmt. Mit CW-EPR („Continuous-Wave EPR“), lassen sich Spinkonzentrationen und kurze Abstände zweier Radikale messen (bis 2 nm), größere Abstände lassen sich mit DEER-EPR („Double-electron-Electron-Resonance-EPR“) untersuchen und ESEEM-EPR („Electron-Spin-Echo-Envelope-Modulation EPR“) gibt Aufschluss über die Wasserzugänglichkeit der Spinlabel (Göbl et al. (2014), Jeschke (2012), Volkov et al. (2009)). Während ein Radikal bei der ersten Methode konstanter Mikrowellenstrahlung in einem variablen Magnetfeld ausgesetzt wird, basieren die beiden letzten Techniken auf kurzen Mikrowellenpulsen in einem konstanten Magnetfeld. Dadurch lassen sich einzelne Dipol-Dipol-Interaktionen zwischen Spins voneinander separieren, wodurch eine gezielte Analyse einzelner Wechselwirkungen möglich wird (Jeschke and Polyhach (2007)).

Im Falle der DEER-EPR kann dadurch nur die Interaktion zweier Spins beobachtet werden. Eines von zwei benötigten Radikalen im markierten Protein dient dabei als „Pump-Spin“, welcher bei Anregung durch Mikrowellenpulse die Relaxation eines „Observer“-Spins beeinflusst.

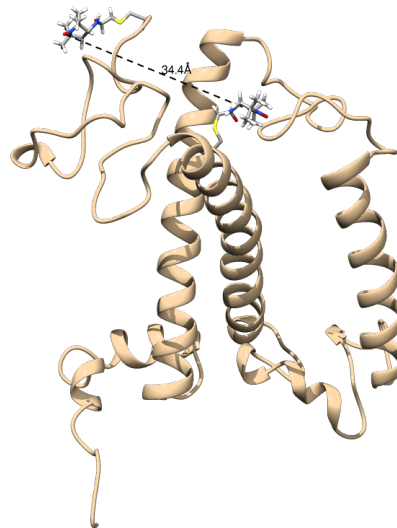


Abbildung I.4.2.: Proxyl-Iodoacetamid-Spinlabel am LHCII. Erstellt mit USCF Chimera, Kristallstruktur 2BHW aus Standfuss et al. (2005)

Das zeitabhängige Primärspektrum, welches sich aus Interaktionen mit weit entfernten Spins (Hintergrund) und der gekoppelten Spins innerhalb von 1,5 - 8 nm zusammensetzt, lässt sich per Fourier-Transformation in ein Frequenzabhängiges Spektrum umwandeln aus dem wiederum über Tikhonov-Regularisierung eine Verteilung der Spinabstände innerhalb des Messbereichs ermittelt werden kann (Jeschke et al. (2004), Jeschke et al. (2002)). Die Ausprägung der Abstandsverteilung gibt Aufschluss über die Positionen der markierten Aminosäuren relativ zueinander und ist in der Lage, Informationen über Vorzugskonformationen und flexible Domänen in einem Protein zu liefern. In Kombination mit „Rapid-Freeze-Quench“-Techniken zur Konservierung von Faltungsintermediaten lassen sich so auch zeitliche Abstandsveränderungen detektieren, die zur Untersuchung des Faltungsweges von Proteinen genutzt werden können (Dockter et al. (2009)).

4.2. Zeitaufgelöste Proteinanalytik

Untersuchungen an Intermediaten enzymatischer Reaktionen sowie Faltungsprozessen von Proteinen sind nur möglich, wenn der Vorgang in Echtzeit beobachtet werden kann oder es gelingt, die Zwischenstadien zu konservieren. Zur direkten Messung dieser dynamischen Ereignisse

bieten sich eine Vielzahl von Methoden wie Fluoreszenzspektroskopie, UV-Circulardichroismus-Spektroskopie, Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), Real-time“-NMR oder zeitaufgelöste CW-EPR Messungen an (Xie et al. (2011), Nettels et al. (2008), Le Duff et al. (2006), Horn et al. (2007), Qu et al. (1997)). Alle zeitaufgelösten Untersuchungen setzen dabei voraus, dass die enzymatische Reaktion oder Faltung eines Proteins zeitlich genau definiert gestartet werden kann. Bei Faltungsuntersuchungen wird hier meist durch die Zugabe eines Detergenz oder chaotropen Salzes die Entfaltung ausgelöst und der Prozess „rückwärts“ betrachtet (Ye et al. (2014)) oder es kommen die unter Abschnitt 3 angesprochenen Techniken zum Einsatz, um das Protein aus einem denaturierten Zustand zu rekonstituieren. Zur Induktion der schnell ablaufenden Prozesse kommen computergesteuerte „Stopped-Flow“-Geräte zum Einsatz, die mit dem Spektrometer der Wahl kombiniert werden und in der Lage sind, einzelne Komponenten der Reaktion im Nano- bis Millisekundenbereich zu mischen.

Ist eine Echtzeit Betrachtung des zu Untersuchenden Vorgangs nicht möglich, können Intermediate mithilfe von „Freeze-Quench“ Systemen in Milisekunden schockgefroren und so zur weiteren Analyse konserviert werden. Die erste „Rapid-Freeze-Quench“(RFQ)-Apparatur wurde bereits 1961 von Bray et. al (Bray (1961)) zur Untersuchung schneller chemischer Reaktionen vorgestellt und seither hat sich diese Technik stets weiterentwickelt, mit Systemen die einen immer schneller werdenden Reaktionsabbruch ermöglichen. Die Reaktionslösung wird durch Insertion in ein Bad mit einer tiefkalten Flüssigkeit wie Stickstoff oder gekühltem Isopentan schockgefroren und als Pulver gesammelt. RFQ-Proben können mit Techniken wie „solid-state-NMR“, Röntgenabsorption (Hu et al. (2010), Hwang (2000)) oder eben Pulse-EPR ausgewertet werden, wie es in dieser Arbeit zum Einsatz kam.

5. Zielesetzung dieser Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der strukturellen Analyse des majoren Lichtsammelkomplex II aus *Pisum sativum* durch Elektronen-Paramagnetische-Resonanzspektroskopie. Sie ist in zwei Teile aufgeteilt, die sich mit unterschiedlichen Fragestellungen auseinandersetzen.

Der Erste handelt von der Untersuchung früher Ereignisse während der Faltung des LHCII. Ziel war es, Informationen über die Positionierung von α -Helices und hydrophilen Segmenten sowie der Pigmentbindung während des Faltungsprozesses zu sammeln, um ein besseres Verständnis des LHCII-Faltungsweges und Membranproteinfaltung im Allgemeinen zu erreichen. Die Induzierbarkeit der Rückfaltung des LHCII durch Verdünnung von LDS mit einer pigmenthaltigen OG-Lösung ermöglicht die Konservierung verschiedener Faltungsstadien durch Schockfrieren der Reaktionslösung nach definierten Zeiten. Daher lag ein Fokus auf der Optimierung bereits etablierter Techniken zur Rekonstitution des rekombinanten LHCII (Dockter et al. (2009)), ausgehend vom denaturierten Zustand, um sie für den Einsatz in einem kombinierten „Stopped-Flow/Rapid-Freeze-Quench-Setup“ nutzbar zu machen. Desweiteren sollten Techniken zur Aufreinigung extrahierter LHCII-Apoproteine etabliert und ihr Mehrwert für zeitaufgelöste Messungen am LHCII eingestuft werden. Dadurch sollte die Produktion spinmarkierter tiefgefrorener Faltungsintermediate zur Abstandsanalyse einzelner Proteindomänen über DEER-EPR erreicht werden. Die Informationen aus diesen Messungen sollten zur Erstellung eines Faltungsmodells dienen.

Im zweiten Teil stand die Untersuchung flexibler Bereiche des LHCII im Fokus. Aufbauend auf den Arbeiten von C. Dockter und C. Dietz (Dockter (2009), Dietz (2012)), in denen die Möglichkeit der doppelten Spinmarkierung eines LHCII-Monomers im Trimerverbund entwickelt und optimiert wurde, sollten Abstände der lumenalen Schleife und der N-proximalen Sequenz zum rigiden Kern gemessen und ihre Lage im Monomer und Trimer verglichen werden. Auch hier kam DEER-EPR zum Einsatz, im Unterschied zum ersten Kapitel wurde hier jedoch an aufgereinigten, vollständig gefalteten Komplexen gearbeitet. Ziel dieser Analyse war die Ableitung des Aufenthaltsbereiches der in der Röntgenkristallstruktur nicht aufgelösten zwölf N-terminalen Aminosäuren sowie die Untersuchung des Einflusses der Neoxanthinbindung auf die Konformation der lumenalen Schleife.

Teil II.

Material & Methode

1. Geräte

Absorptions Spektrometer

Jasco V550 UV Vis Spectrophotometer, Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt

Software: Spectra Manager

Shimadzu UV 2101 PC UV-Vis Scanning Spectrophotometer, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg

Analytische HPLC

HPLC System von Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt

Entgaser: GASTORR 154

Gradientenmischer: LG 1580 04 Quaternary Gradient Unit

Pumpe: PU 1580 Intelligent Pump

Detektor: Diode Array Detector MD 1515

Säule: Chromolith Speed-Rod, RP 18E, Nr. 1.51450.0001

Software: Borwin PDA, Version 1.50

Autoklav

Systec DX 150, Systec GmbH Labortechnik, Wetterberg

Biophotometer

Eppendorf BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg

CD-Spektrometer

Jasco J 810, Jasco Labor- und Datentechnik, Groß-Umstadt

Kühlung: F200, Julabo, Seelbach

Software: Spectra-Manager

Digitalkamera

Canon Powershot A710IS, Canon Deutschland GmbH, Krefeld

Drehrad

Kulturenrad Typ Rotator, Bachofer GmbH, Reutlingen

Fluoreszenz Spektrometer

Fluoromax 2 ISA SPEX, Jobin Yvon, Grasbrunn

Software: Datamax Software Version 2.24

French Press

French Pressure Cell Press. SLM Instruments Inc., Rochester USA

Gel Elektrophorese

Gelgießsystem: Midget-Systems, Pharmacia LKB, Schweden

Spannungsquelle: Bio-Rad Power-Pac 3000, Hercules, USA

Geltrockner: 2003 Slab Gel.Dryer, LKB Bromma

Vakuumpumpe: Edwards RV5, Crawlex, Sussex, Großbritannien

Magnetrührer

Ikamag RCT, IKA-Labortechnik, Staufen

Mixer

Heavy Duty Blender, Blender Waring, New Hartford, USA

pH Meter

Inolab pH Level2, WTW GmbH, Weilheim

PCR Gerät

Primus 25 Legal PCR System. Modell 5524, MWG Biotech, Ewersberg

Präparative Gelelektrophorese

Model 491 Prep Cell, BioRad, München

Präparative HPLC HPLC System von Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt

Pumpen: PU 2080 Intelligent Pump

Detektoren: Shimadzu RF-535 Fluorescence HPLC Monitor; Gynotek Absorptionsspektroskop;

Kontron Instruments Diode Array Detector 440

Software: Borwin PDA, Version 1.50

Reinstwasseranlage

Optilab-Standard, Membra-Pure, Lörzweiler

Rotationsverdampfer

Heidolph VV2000, Heidolph Elektro, Kelheim

CVC 2000, Vacuubrand GmbH und Co, Wertheim

Kühlung: Minichiller, Huber, Offenburg

Schüttler

Certomat H., B. Braun Biotech International, Melsungen

Phero Shaker, Biotec Fischer, Reiskirchen

Sterilbank

Laminar Flow, SLEE Semiconductor Technik GmbH, Mainz

Stopped-Flow

SFM300, BioLogic, Claix, Frankreich

Software: Biokine32, BioLogic, Claix, Frankreich

Transilluminator

VersaDoc Imaging System, Modell 3000, BioRad, München

Software: QuantityOne Version 4.3.0, BioRad, München

Ultraschallbad

Sonorex Super RK 102H, Bandelin, Berlin

Ultraschallstab

Stab: V1A, V9906

Steuergerät: Vibra Cell, Sonic and Materials Inc., Danbury, Connecticut, USA

UV Lampe

SFB 184, Bachofer GmbH, Reutlingen

Vortexer

IKA Labortechnik, Staufen

Waagen

BP 2100S Präzisionswaage, Sartorius, Göttingen

A 200 S Analysewaage, Sartorius, Göttingen

Wärmeschrank

S12 Memmert, Memmert, Schwalbach

Wasserkocher

HB4 basic, IKA Labortechnik, Staufen

Wasserbad

Thermomix MM, B. Braun Biotech International, Melsungen

Zentrifugen

Tischzentrifugen: Hettich EBA 12, Rotor 1124, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Kühlzentrifugen: Beckmann Kühlzentrifuge J2HS Rotoren: JLA 10500; JA 25.50, Beckmann Instruments, München

Hettich Mikro 22R Rotoren 1015 und 1195, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Ultrazentrifugen: Optima XL 100K, Optima XL 90K, Optima XL 80K Rotoren SW60Ti, SW41, Beckmann Instruments, München

Airfuge Rotoren A 110 und A 95, Beckmann Instruments, München

2. Material

2.1. Chemikalien

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen: Agilent Technologies (Santa Clara, USA), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Avanti Polar Lipids (Hamburg), Alfa Aesar (Karlsruhe), Biomol (Hamburg), Biomers (Ulm), BioRad (München), BioLogic (Claix, Frankreich), Böhlinger (Mannheim), Carl-Roth (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren), Merck (Darmstadt), MobiTec (Göttingen), New England Biolab Inc. (Bad Schwalbach), PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen), Riedel de Häen (Hannover), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

2.2. Stickstoff

Gasförmiger Stickstoff 5.0 wurde ausschließlich von Widmann Gas (Gasecenter Herbarth, Budenheim) bezogen und zur Trocknung von Pigmenten und Übersichtung hygroskopischer Lösungen verwendet. Flüssiger Stickstoff wurde aus einem Tank der Firma Praxair (Düsseldorf) abgefüllt und bis zur weiteren Verwendung in einem 100 l Apollo Vorratsbehälter (Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen) gelagert.

2.3. Proteinlabel

Proteinmarkierungen für EPR-Messungen wurden mit SH-reaktivem 3-(2-Iodacetamido)-PROXYL (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) durchgeführt. Mit diesem sehr stabilen freien Radikal konnten bei spezifischer Markierung an Sulfhydrylgruppen hohe Markierungsausbeuten erreicht werden. Zum Vergleich von Labeling-Effizienzen wurde 4-(2-Iodacetamido)-TEMPO verwendet.

	3-(2-Iodacetamido)- PROXYL	4-(2-Iodacetamido)- TEMPO
Formel:	$C_{10}H_{18}IN_2O_2$	$C_{11}H_{20}IN_2O_2$
Molekulargewicht	325,7 g/mol	339,19 g/mol
Lösungsmittel	DMSO, DMF, H ₂ O, Ethanol	DMSO, DMF, H ₂ O, Ethanol
	Lichtempfindlich	Lichtempfindlich

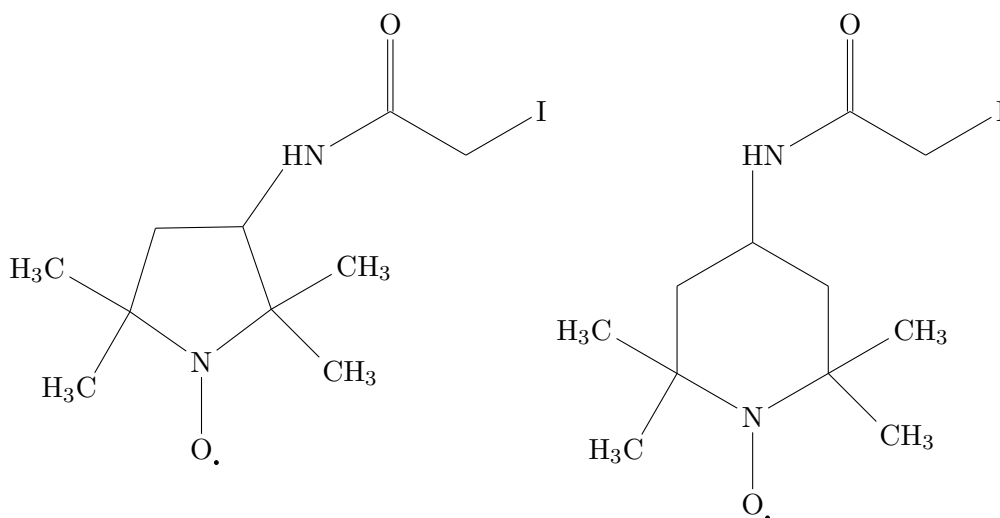


Abbildung II.2.1.: Strukturformel der PROXYL-Label. Links: 3-(2-Iodacetamido)-PROXYL; Rechts: 4-Hydroxy-TEMPO

2.4. Längenstandards

2.4.1. Protein-Längenstandards

Zur Bestimmung des Molekulargewichts auf SDS-Polyacrylamidgelen wurde „SDS-7“-Marker (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) sowie „Protein-Test-Mix-6“ (Serva, Heidelberg) verwendet (Tab. 2.4.1).

2.4.2. DNA-Längenstandards

Als DNA-Längenstandards wurden ein 100 Basenpaar und ein 1 Kilobasen-Marker der Firma NEB, Bad Schwalbach verwendet (Abb. 2.4.2). Die Längenstandards wurden bei 6°C in 10 mM-Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8,0 gelagert.

Tabelle II.2.1.: Protein-Längenstandards. SDS-7 in 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 5% β -ME, 0,002% Bromphenolblau. PTM-6 in 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 15% Glycerin, 10 mM DTT, 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Orange G.

SDS-7		PTM-6	
Protein	MW(kDa)	Protein	MW(kDa)
Albumin, Rind	66	Phosphorylase B	97,4
Albumin, Hühnerei	45	Albumin, Rind	67
Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase, Hasenmuskel	36	Albumin, Hühnerei	45
carboanhydrase, Rind	29	Trypsin Inhibitor, Sojabohne	20
Trypsinogen, Rinderpankreas	24	Cytochrom C	21
Trypsin Inhibitor, Sojabohne	20	Trypsin Inhibitor, Rinderlunge	12,5
α -Lactalbumin, Kuhmilch	14,2		6,5

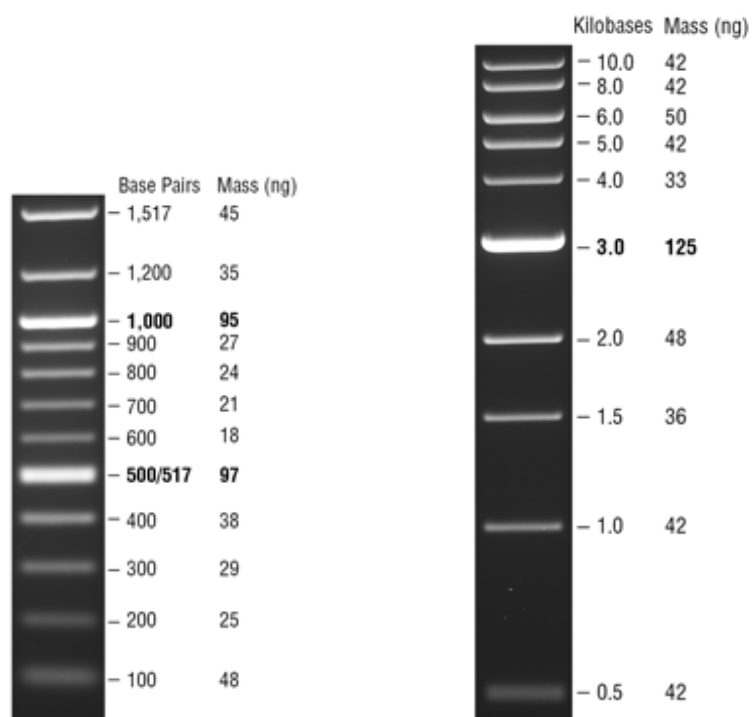


Abbildung II.2.2.: DNA-Längenstandards. links: 100 bp-Ladder; rechts: 1 kb-Ladder; gefärbt mit Ethidiumbromid auf einem 1,3% TAE-Agarose Gel. 0,5 μ g.

2.5. Vektoren & Bakterienstämme

Die Gene aller in dieser Arbeit produzierten und verwendeten LHCP-Klone lagen in der Multiple-Cloning-Site des Expressionsvektor pDS12-RBS II (Bujard et al. (1987)) vor und stehen unter Kontrolle eines Lac-Operons. Sie sind Abkömmlinge des murenen Lhcb1-Gens (lhcb1*2, AB80, Cashmore (1984)) aus *Pisum sativum*. Transformierten Bakterienstämmen verleiht der pDS12-RBS II eine Ampicillin- und Chloramphenicolresistenz. Die Konstruktgröße aus Vektor und Lhcb1 beträgt 4241 bp. Je nach Mutagenese-Strategie erfolgte die Transformation in chemokompetente *E. Coli*-Zellen des Stamms JM101 (NEB, Bad Schwalbach), oder in superkompetente *E. Coli*-Zellen der Stämme XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, USA) bzw. XL10-Gold (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

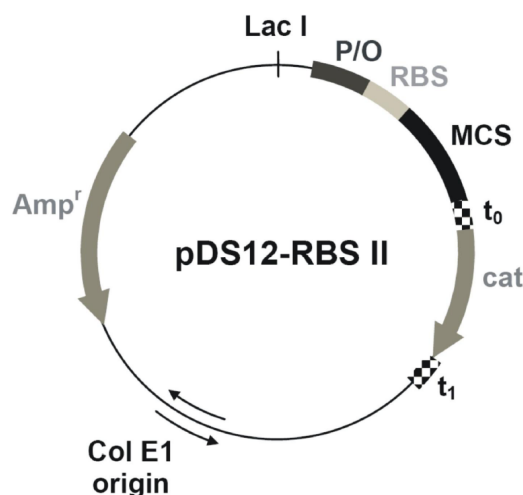


Abbildung II.2.3.: pDS12-RBSII Expressionsvektor. Col E1 Origin = Replikationsursprung; Amp^r = β -Lactamase-Gen (vermittelt Ampicillinresistenz); Lac I = Lac-Repressor-Gen; P = T5-Promotor P_N25; O = *E. Coli*-Lac-Operator; RBS = Ribosomen-Bindestelle; MCS = „Multiple Cloning Site“, Multiple Klonierungsstelle; t₀/t₁ = Terminatoren; cat = Chloramphenicol-Acetyltransferase (vermittelt Chloramphenicolresistenz). Verändert nach Heinemann and Paulsen (1999).

2.6. LHCP-Klone

In dieser Arbeit wurden folgende Varianten des murenen LHCP verwendet. Die Tabelle beinhaltet neben selbst hergestellten und bereits Vorhandenen auch LHCP-Klone, welche im Rahmen der Diplomarbeit von Maike Jung (2011) und der Bachelorarbeit von Timo Walz (2013) angefertigt wurden.

Tabelle II.2.2.: LHCP-Klone. Übersicht aller in der Dissertation verwendeten Varianten des Lhcb1. A = Alanin; S = Serin; V = Valin; I = Isoleucin; h = His₆-tag, st = einfacher Strep-tag; stst = doppelter Strep-tag; - = Spacer aus zwei Glycinen

Erstellt von	Bezeichnung	Abkürzung	Ausgangsklon
Zeitaufgelöste Faltungsuntersuchungen			
Dockter	S59C/V90C	59/90	C79S
Dockter	V90C/V196C	90/196	C79S
Dockter	S106C/S160C	106/160	C79S
Dockter	S123C/V196C	123/196	C79S
Dietz	V90C/S123C	90/123	C79S
Fehr	I124C/I143C	124/143	I124C
Fehr	A174C/V196C	174/196	C79S
Kosemund	C3.2h	-	D7f3/C2.4h
Walz	I143Ch	-	C79Sh
Lumenale Schleife			
Fehr	stV96C/I143Ch	st96/143h	stV96Ch
Fehr	stS102C/I143Ch	st102/143h	stS102Ch
Fehr	stV113C/I143Ch	st113/143h	stV113Ch
N-Terminus			
Dietz	S3C/S34C_sth	3/34	C79S_sth
Dietz	S7C/S34C_sth	7/34	C79S_sth
Dietz	S11C/S34C_sth	11/34	C79S_sth
Dietz	S3C/S59C_sth	3/34	C79S_sth
Dietz	S7C/S59C_sth	7/59	C79S_sth
Dietz	S11C/S59C_sth	11/59	C79S_sth
Dietz	S34C/S59C_sth	34/59	C79S_sth
Lauf	S34Csth	34	C79S
Dockter	S59C	59	C79S
Heterogene Trimere			
Jung	stst_C79Sh	-	C79Sh
Jung	st_C79Sh	-	C79Sh
Jung	st_S160Ch	-	C79Sh
Jung	stst_S160Ch	-	C79Sh
Jung	S160C_sth	-	C79Sh
Jung	S160C_ststh	-	C79Sh

3. Molekularbiologische Methoden

3.1. Klonierung

Um LHCP mithilfe SH-reaktiver Spinlabel markieren zu können, sind Sulfhydrylgruppen reduzierter Cysteine Voraussetzung. Da der mature LHCP nur an Position 79 ein Cystein besitzt, mussten Aminosäuren durch ortsgerichtete Mutagenesen des LHCP-Gens ausgetauscht werden. Position 79 war für die Untersuchungen in dieser Arbeit nicht von Interesse, daher diente der Klon C79S als Matrize für Mutagenesen, bei welchem das native Cystein gegen ein Serin getauscht ist. Mutationen auf Basis dieses Klons erfolgten mit dem „Quick-Change II site directed mutagenesis kit“/„Quick-Change Lightning-Kit“ (Agilent, Santa Clara) und Mutagenese-Primern (Biomers, Ulm), deren Sequenz für jeden Klon selbst erstellt wurde. In die Primer ist an den zu mutierenden Stellen ein „Mismatch“ eingefügt, so dass im zweiten Replikationsschritt der Einbau der gewünschten Basen erfolgt. Die Mutagenese wurde nach Kit-Anleitung mit halbierten Volumina durchgeführt. Um eine Transformation mit Parental-DNA zu vermeiden, musste vor Plasmidinsertion in superkompetente *E. Coli* (Stamm XL1 Blue/XL10 Gold) ein Restriktionsverdau mit dem Enzym DPN1 durchgeführt werden. DPN1 erkennt methylierte DNA und schneidet diese spezifisch. Da neu replizierte Plasmide keine Methylierung aufweisen, bleiben nach Dpn1 Verdau nur Plasmide übrig, welche die gewünschte Mutation tragen sollten. Den Mutageneseansätzen wurde daher 1 µl Dpn 1 zugegeben und eine Inkubation für 5 min bei 37 °C im Brutschrank durchgeführt.

Mutagenese Ansatz

10x Reaktionspuffer
25 ng Template-DNA
62,5 ng Fw Primer
62,5 ng Rv Primer
0,5 µl sNTP mix
QuickSolution reagent
ad 25 µl dh₂O (steril)
0,5 µl Lightning Enzyme

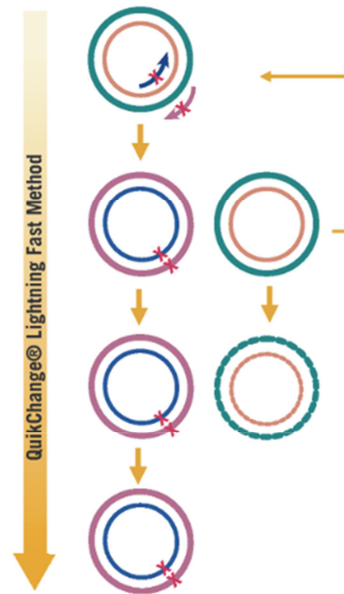


Abbildung II.3.1.: Klonierungsstrategie zur Ortsgerichteten Mutagenese

Phase	Temp.	Dauer	Zyklen
Aufheizen	110 °C	-	1x
Aktivierung	95 °C	2 min	1x
Denaturierung	95 °C	20 s	18x
Annealing	60 °C	10 s	
Amplifikation	68 °C	2 min 6 s	
Lagerung	4 °C	∞	1x

3.2. Transformation

Um rekombinanten LHCP überexprimieren zu können, musste amplifizierte DNA einer Mutagenese-PCR in *E. coli* eingebracht werden. Zunächst wurde eine Ligation und Amplifikation linearer Plasmid-DNA durch Transformation eines superkompetenten Stammes (XL1-Blue/XL10 Gold) erreicht und anschließend die Übertragung in einen Expressionstamm (JM101) durchgeführt. Da alle in dieser Arbeit verwendeten Gene im Expressionsvektor pDS12-RBS II vorla-

gen, konnte in diesem eine Überexpression durch Zugabe des Allolactose-Analogon IPTG erreicht werden. Die Selektion war durch die vermittelte Ampicillinresistenz auf LB-Amp-Platten möglich. Im Folgenden ist die Vorgehensweise je nach Bakterienstamm aufgeführt.

3.2.1. Transformation in XL1-Blue/XL10-Gold

Der superkompetente Bakterienstamm XL1-Blue war in älteren „Site-Directed Mutagenesis Kits II“ enthalten, XL10-Gold stammte aus dem „Lightning-Kit“. Beide waren durch ihre intrinsische Ligase geeignet mit linearer Plasmid-DNA transformiert zu werden. Es wurden 25 µl aliquotierte Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 25 ng Plasmid-DNA aus dem Mutagenese-Ansatz versetzt. Nach dreißigminütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien nach 45 s (30 s bei XL10-Gold) Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad und erneut 2 min auf Eis mit 225 µl NZY⁺-Medium gemischt. Nach Inkubation bei 37 °C (1 h) auf dem Drehrad konnten die transformierten Bakterien auf vorgewärmten (37 °C) LB-Amp-Platten mit einem sterilen Trigalski-Spatel ausgestrichen und über Nacht (37 °C) inkubiert werden. Am Abend wurde dann eine einzelne Bakterienkolonie gepickt und 50 ml LB-Flüssigmedium angeimpft, aus dem am nächsten Morgen die rekombinante Plasmid-DNA isoliert werden konnte.

3.2.2. Transformation in JM101

Der Expressionsstamm JM101 erzielt im Gegensatz zu superkompetenten *E. Coli* höhere Proteinausbeuten, eine direkte Transformation mit PCR-Produkt ist jedoch erst nach Ligation möglich. Die Transformation entsprach Abschnitt 3.2.1, jedoch erfolgte ein einminütiger Hitzeschock und es wurden 450 µl steriles LB-Flüssigmedium zu 50 µl Bakterien gegeben.

NZY⁺-Medium	22,45 g/l NZCYM BrothEZ Mix 12,5 mM MgSO ₄ 3,6 g D-Glucose
LB-Flüssigmedium	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl mit HCl auf pH 7,5 einstellen

LB-Amp Platten	1% Trypton
	0,5% Hefeextrakt
	1% NaCl
	mit HCl auf pH 7,5 einstellen
	1,5% Agarose
	100 µg/ml Ampicilin

3.3. Plasmidisolation

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem „Plasmid Miniprep Kit II“ der Firma PEQLAB Biotechnologie, Erlangen. Aus 15 ml beimpften LB-Amp Flüssigmedien konnten nach Anleitung so 2,5 - 12,5 ng Plasmid-DNA in 50 µl sterilem dH₂O gewonnen werden. Um die Plasmidausbeute zu erhöhen, wurde die Trocknungszentrifugation auf 2 Minuten ausgeweitet und Ethanol vor Elution der DNA von den Säulchen des Kits für 10 min evaporieren lassen.

3.4. Sequenzierung

Zur Sequenzierung neu erstellter LHCP-Varianten mussten 400 µg Plasmid-DNA mit Sequenzier-Primern versetzt und in ein PCR-Tube überführt werden. Alle Sequenzierungen wurden von der StarSEQ GmbH, Mainz, innerhalb von 1-3 Tagen nach Plasmidisolation durchgeführt. Zur Sequenzierung wurde der Primer seq195+ verwendet, der 195 bp Downstream des LHCP-Gens bindet und so eine Analyse des gesamten Gens sowie der Promotorregion ermöglichte. Die Analyse der Gensequenzen erfolgte mithilfe des Online Tools lalign (ExPASy, Algorithmus von Huang & Miller (1991)) oder des Programms pDRAW (acaclone.com).

3.5. Dauerkulturen

Die Langezeitlagerung der rekombinanten Bakterienzellen erfolgte durch Zugabe von 600 µl 80% Glycerin zu 400 µl Bakterienkultur und Verwahrung bei -80 °C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Parallel dazu wurden extrahierte Plasmid der erstellten Klone bei -20 °C in sterilem dH₂O gelagert.

4. Präparative biochemische Methoden

4.1. Überexpression und Isolation des LHCP

Zur Gewinnung rekombinanter LHCII-Apoproteine wurde das lhcb1-Gen in den Expressionsvektor pDS12-RBSII (Bujard et al. (1987)) einkloniert und dieser in den *e. Coli*-Stamm JM101 (NEB, Bad Schwalbach) transformiert. Auf dem Vektor stand so das LHCP-Gen unter Kontrolle des Lac-Operons und eine Überexpression konnte durch Zugabe von Isopropyl-Thiogalactosid (IPTG) induziert werden. IPTG, ein Analogon der Allolactose hebt dabei die Inhibition des Promotors auf, indem er den Repressor von diesem löst. Die nun mögliche Bindung der Polymerase an den Operator führt zur Expression des lhcb1-Gens und zur Bildung von LHCP, welches nicht von den *E. Coli*-Zellen metabolisiert und in „Inclusion-bodies“ angereichert wird.

Die Anzucht der transgenen *E. coli* erfolgte in 800 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler (175 rpm). Der Start der Überexpression wurde am nächsten Morgen durch Addition von 800 µl 1 M IPTG erreicht und das Bakterienmedium anschließend für weitere 4 h inkubiert. Die Pelletierung (Beckmann Kühlzentrifuge J2HS, Rotor: JLA 10500, 4°C, 8000 rpm) der Lösung ermöglichte die Aufnahme der Bakterien in je 30 ml Lysis-Puffer, in welchem der Zellaufschluss nach einer der folgenden Methoden durchgeführt wurde.

Lysispuffer	0,8 mg/ml DTT
	4 µg/ml DNase I

Detergentienpuffer	200 mM NaCl
	1% (w/v) Desoxycholat
	1% (w/v) Triton X-100
	20 mM Tris-HCl pH 7,5
	10 mM β-Mercaptoethanol
	2 mM EDTA

Tritonpuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA 0,5% (v/v) Triton X-100
Trispuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA

4.1.1. Zellaufschluss mittels French-Press

Die „French-Press“ (French Pressure Cell Press, SLM Instruments Inc., Rochester, USA) ist ein System zum mechanischen Aufschluss von Bakterienlösung. Das Bakterienlysat wurde in den Metallzylinder der „French-Press“ (French Pressure Cell Press, SLM Instruments Inc. Rochester, USA) gefüllt und der Kolben eingesetzt. Nach Start der Presse baut sich durch Vorschub des Kolbens Druck im Zylinder auf, und durch geringfügiges Öffnen des Auslassventils erfolgt der Zellaufschluss während das Lysat durch das enge Ventil gepresst wird. Um einen vollständigen Aufschluss zu gewährleisten, wurde das Prozedere dreimal wiederholt, bis das Bakterienlysat eine milchigweiße Farbe hatte.

4.1.2. Zellaufschluss mittels Ultraschall

Eine andere Möglichkeit des Zellaufschlusses war die Verwendung eines Ultraschallstabes. Die Aufschluss Technik ist ebenfalls mechanisch, und brachte gegenüber der „French-Press“ eine deutliche Zeitersparnis. Die Ultraschallwellen bringen die Bakterienzellen zum Zerreißen, welche so die Inclusion-Bodies freisetzen. Es wurden je 10 ml Bakterienlysat in ein Reagenzglas gefüllt und dieses in ein Eisbad gestellt. Nach Insertion des Ultraschallstabes (V1A, V9906, Vibra Cell, Sonic and Materials Inc., Danbury, Connecticut, USA) in die Lösung erfolgte die Beschallung für 5 min auf Stufe 5 (Mikrotip).

Aus dem Bakterienlysat mussten nach Zellaufschluss die IBs isoliert werden. Dazu wurde die Lösung zentrifugiert (Beckmann Kühlzentrifuge J2HS, Rotor: JA 25.50, 8000 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet in 16 ml Detergenzienpuffer resolubilisiert. Nach erneuter Zentrifugation (gleiche Parameter) konnte das Pellet in 8 ml Tritonpuffer aufgenommen und über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert werden. Am nächsten Morgen folgten dann zwei weitere Zentrifugations/Resuspensionsschritte, zunächst erneut mit 8 ml Triton-, dann mit 8 ml Tris-Puffer. Nach einer letzten Zentrifugation wurde das Pellet schließlich in 4 ml Tris-Puffer aufgenommen und die weitgehend reinen IBs bei -20 °C gelagert.

4.2. Präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Reinigung des LHCP

Da die Aufreinigungsschritte nach Überexpression des LHCP in *E. Coli* unspezifisch sind, verbleibt ein gewisser Grad an Fremdproteinen in den IB-Präparationen. Für die meisten Versuche ist dieser Anteil vernachlässigbar, da er relativ gering ist. Jedoch können Fremdproteine in Experimenten mit SH-reaktiven Markern schwer abzuschätzende Fehlerquellen darstellen, da die Anzahl der markierbaren Positionen unbekannt ist.

Zur spezifischen Trennung von Proteingemischen wurde daher ein präparatives Gelelektrophoresesystem (Model 491 Prep Cell & Mini Prep Cell, BioRad, München) verwendet. Hier erfolgt die Trennung des Zielproteins von Verunreinigungen in einer Zylindrischen Gelkammer. Zur Determination der Polyacrylamidkonzentration des Gels wurde zunächst ein analytisches Testgel angefertigt und der molekulare Gewichtsunterschied des Zielproteins zum nächsten Fremdprotein bestimmt. Lag dieser unter 10 %, mussten 15 prozentige präparative Gele verwendet werden. Um Luftblasenfreie Gele zu ermöglichen, ist die Polyacrylamid-Lösung 10 min im Ultraschallbad entgast worden, bevor die Polymerisation durch Zugabe von APS und TEMED gestartet wurde. Außerdem erfolgten alle Arbeitsschritte in einem Kühlschrank bei 6-10 °C. Eine Übersichtung mit 2-Butanol gewährleistete eine glatte Geloberfläche, es war jedoch darauf zu achten, dass sich das Butanol nicht mit dem Gel vermischte. Das Sammelgel wurde am nächsten morgen auf die gleiche Weise gegossen, jedoch waren hier nur vier Stunden Polymerisationszeit vonnöten. Zur Reinigung des LHCP wurden 50-75 mg Gesamtprotein in dem dreifachen Volumen Probenpuffer durch zehnminütiges Kochen solubilisiert und nach Abkühlen auf das Sammelgel gegeben. Nach Start der Elektrophorese (12 Watt, 50-60 mA, 200-400 V) erreichte die durch Bromphenolblau sichtbare Laufront das Ende des Gels und die Probenkollektion konnte gestartet werden. Es wurden 128 Fraktionen über 20 h gesammelt (0,2 ml/min), die Fraktionsgröße betrug 2 ml. Zwei aufeinanderfolgende analytische SDS-Gele ermöglichten zunächst die ungefähre Lokalisierung (jede achte Fraktion wurde untersucht) und dann eine genaue Analyse des Zielproteins (jede Fraktion, beschränkt auf den Elutionsbereich des Zielproteins). Nach Vereinigung der Fraktionen des Zielproteins konnte durch Fällung eine reine, LDS-freie Proteinprobe hergestellt werden.

PP-Laufpuffer(10x)	25 mM Tris
	192 mM Glyzin
	0,1 % (w/v) LDS
	pH 8,3

PP-Probenpuffer	60 mM Tris-HCl pH 6,8
	2% (w/v) LDS
	5% (v/v) β -ME
	10% (v/v) Glyzerin
	0,025% (w/v) Bromphenolblau

Tabelle II.4.1.: PrepPAGE-Gele.

	Trenngel		Sammelgel	
Konzentration	15%		6%	
Gelzylinder	28 mm	37 mm	28 mm	37 mm
Acrylamid	15 ml	40 ml	1,3 ml	3,25 ml
0,5 M Tris HCl	10 ml (pH 8,8)	26,7 ml (pH 8,8)	2,5 ml (pH 6,8)	6,25 ml (pH 6,8)
dH ₂ O	15 ml	40 ml	6,2 ml	15,5 ml
10 % APS	100 μ l	266,7 μ l	50 μ l	125 μ l
TEMED	10 μ l	26,7 μ l	10 μ l	25 μ l

4.3. Ortsgerichtete Spinmarkierung

Zur Untersuchung des LHCP durch Elektronenspinresonanz mussten zunächst ungepaarte Elektronen in das Apoprotein inseriert werden. In dieser Arbeit kam als Spinmarker ausschließlich Proxyl-Iodacetamid (Proxyl-IAA) zur Anwendung, da sich dieser als besonders stabil gezeigt und hohe Markierungsausbeuten erreicht hat (Dockter (2009)). Die Markierung erfolgt durch Bindung des SH-reaktiven-Nitroxid-Spinmarkers an Sulfhydrylgruppen im Protein vorhandener Cysteine unter Abspaltung von Iodwasserstoff. Die resultierende kovalente Thioether-Bindung gewährleistet eine stabile Markierung des Proteins mit hoher Spezifität. Zur Markierung wurden die gewünschte Menge LHCP zu 1 mg/ml in 0,15% LDS, 20 mM NaP pH 7,0 gelöst. Die Reduktion der Cysteine erfolgte durch Zugabe von 100 mM Tris-Cyaonethyl-Phospin in DMF (TCyEP, $\frac{1}{50}$ des Volumens, 2 mM Endkonz.). Reduktionsmittel wie β -ME oder DTT, die selbst Sulfhydrylgruppen tragen, konnten nicht verwendet werden, da die Spinmarker mit diesen reagieren würden und so nicht mehr zur Markierung zu Verfügung stünden. Nach einstündiger Reduktion bei 37 °C konnte die Markierung durch Zugabe des Spinmarkers ($\frac{1}{40}$ des Volumens, 10 mg/ml in DMSO) gestartet und über Nacht bei 37 °C inkubiert werden. Am nächsten Tag erfolgte dann die Fällung des Proteins.

Markierungsansatz	0,15% LDS
	20 mM NaP pH 7,0
	1 mg/ml Protein

4.4. Essigsäure Acetonfällung

Nach einer Proteinaufreinigung durch präparative Gelelektrophorese oder Spinmarkierung des LHCP wurde zur Rückgewinnung des Proteins in konzentrierter Form eine essigsäure Acetonfällung durchgeführt. Stammte das Protein aus einem PrepPage-Lauf, erfolgte zunächst die Titration mit 1 M Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,24, dem isoelektrischen Punkt des LHCP. Stammte das Protein aus einem Markierungsansatz, reichte die Zugabe von $\frac{1}{10}$ des Ansatzes an 100 mM Essigsäure aus, um gute Fällungsausbeuten zu erreichen. Danach wurde das 2,3fache Volumen eiskalten 100 prozentigen Acetons hinzugefügt (p.A.), gevortext und der gesamte Ansatz für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach erneutem Vortexen und Inkubation auf Eis für mind. 3 h, konnte das ausgefallene Protein durch Zentrifugation (Beckmann Kühltzentrifuge J2HS, Rotor: JLA 25.50, 4°C, 18000 rpm, 10 min) pelletiert und in 1,5 ml 70 prozentigem eiskaltem Ethanol aufgenommen werden. Das Protein wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, weitere dreimal pelletiert (Hettich EBA 12, Rotor: 1124, 18000 rpm, 10 min) und gewaschen (70% Ethanol). Im letzten Schritt erfolgte die Aufnahme des Pellets in 100 prozentigem Ethanol, so dass nach Zentrifugation (wie oben) eine rasche Trocknung an der Luft möglich war. Abschließend wurde das Protein in einer geringen Menge Tris-Puffer bei -20 °C gelagert.

4.5. Trichloressigsäure-Fällung

Eine weitere Fällungsmethode, die für Proben angewandt wurde, welche nach Markierung in hohen Konzentrationen gelöst werden mussten, war die Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung). Nachteil dieser Methode war, dass TCA Proxyl zu Hydroxylamin reduziert (Abakumov and Tikhonov (1969)) und daher möglichst rasch gearbeitet werden musste, um einer Zerstörung des Spinmarkers vorzubeugen. Die Fällung wurde durch direkte Zugabe von 15 prozentigem TCA ($\frac{1}{3}$ des Endvolumens) zur Proteinlösung induziert, die Lösung dann gevortext und für 7,5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren 2,5 min Inkubation bei 4°C in der Zentrifuge, erfolgte die Pelletierung des ausgefallenen Proteins (Hettich EBA 12, Rotor: 1124, 18000 rpm, 10 min). Alle weiteren Schritte glichen der Aceton-Fällung (Abschnitt 4.4), jedoch wurde ausschließlich eiskaltes dH₂O verwendet.

4.6. Etherdestillation

Zur Pigmentextraktion wurde Diethylether verwendet, welcher nicht gänzlich wasserfrei ist und daher vor Gebrauch destilliert werden musste. Dies wurde maximal drei Tage vor Verwendung in einem Rundkolben im Abzug durchgeführt. Zunächst wurde der Ether zwei Stunde unter Rückfluss gekocht (40°C, Wasserbad), dann konnte er in einer Laborflasche gesammelt werden. Diethylether neigt bei längerer Lagerung in Sauerstoffatmosphäre zur Bildung von explosiven Hydroperoxiden. Um diese in Form unlöslicher Kaliumsalze auszufällen, wurden allen etherhaltigen Lösungen KOH Plättchen zugegeben. Die Reaktionsgleichung, die der Autooxidation zu Grunde liegt, ist in Abb. 4.6 gezeigt.

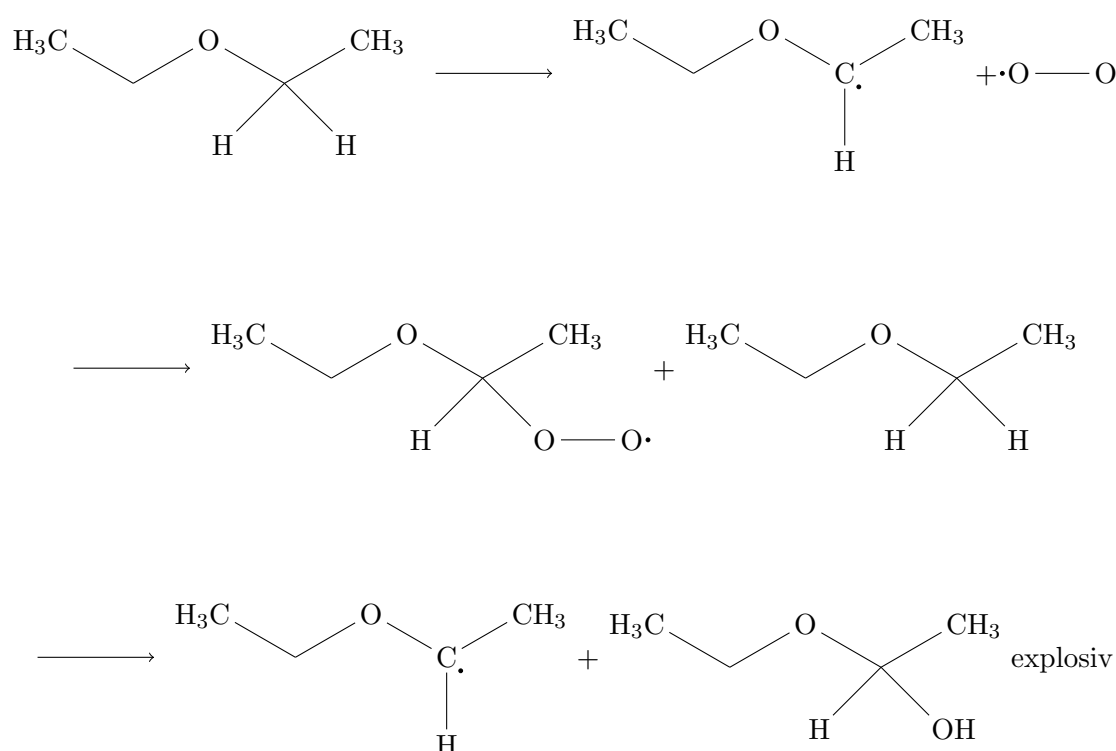


Abbildung II.4.1.: Autooxidationsreaktion des Diethylethers.

4.7. Gewinnung von Pigmenttotalextrakt aus Erbsen

Die Rekonstitution des LHCP zu LHCII erfordert neben dem Apoprotein eine Mischung der im Pigment/Protein-Komplex gebundenen pflanzlichen Farbstoffe. Neben den Hauptpigmenten *Chl*

a und *b* handelt es sich dabei um die Xanthophylle Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin. Diese können zusammen mit β -Carotin und den Lipiden DGDG, PG und MGDG aus jungen Erbsenpflanzen (*pisum sativum*) extrahiert und der so gewonnene Totalextrakt direkt zur Rückfaltung des LHCII verwendet werden.

Die Erbsensamen wurden dazu zunächst für ein bis zwei Tage unter ständiger Luftzufuhr eingequollen, anschließend in Vermiculit ausgesät und im Klimaraum bei 16 °C für 14-21 Tage angezogen. Bei dichtem Bewuchs der Vermiculit-Schalen erfolgte die Ernte der Erbsenblätter ohne Stiele. Das Blattmaterial wurde mit ca 1,5 l Aufschlusspuffer/kg Blattmaterial im Waring Blendor zerkleinert und über vier Lagen Baumwolltuch und eine Lage Gaze in 400 ml Zentrifugenbecher filtriert. Um Schaden an den Pigmenten zu vermeiden, erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte in Dämmerlicht oder grüner LED-Beleuchtung. Nach Zentrifugation der Lösung (Beckmann Kühlzentrifuge J2HS, Rotor: JLA 10500, 8000 rpm, 10 min, 4 °C) konnten die pelletierten Thylakoide in 100 prozentigem Aceton aufgenommen, gelöst und erneut zentrifugiert (s.o.) werden. Der Überstand enthielt nun den acetonischen Totalextrakt, welcher in einen Scheidetrichter überführt und mit peroxidfreiem Diethylether ($\frac{1}{5}$ des Volumens) versetzt wurde. Nach Zugabe von 5 M NaCl ($\frac{1}{5}$ des Volumens) bildeten sich zwei Phasen. Die wasserfreie Phase bestand dabei aus einer Aceton/Ethermischung, in welcher der Totalextrakt gelöst war. Durch mehrmaliges Ausschütteln und Zugabe von NaCl in sinkender Konzentration, konnte der Übergang des Acetons in die wässrige Phase erreicht werden. Die verbleibende pigmenthaltige Etherphase wurde in einen Rundkolben überführt, mit Parafilm luftdicht verschlossen und über Nacht bei -80 °C gelagert, um Restwasser auszufrieren. Am nächsten morgen mussten die gebildeten Eiskristalle über eine gekühlte Filterfritte unter Unterdruck (Wasserstrahlpumpe) abfiltriert werden, um wasserfreien Totalextrakt zu erhalten. Im Vakuum des Rotationsverdampfers erfolgte schließlich die Trocknung der Pigmente.

Zur späteren Verwendung in Experimenten wurde die Pigmentkonzentration nach Aufnahme der getrockneten Pigmente in 100 prozentig wasserfreiem Aceton per HPLC bestimmt und Aliquots in verschiedenen Größen angefertigt. Durch Trocknung unter konstantem Stickstoffstrom konnte eine spätere Oxidation der gelagerten Pigmente vermieden werden.

Aufschlusspuffer	1 M Tris-HCl pH 7,8
	1 mM DTT
	330 mM Sorbitol

4.8. Einzelpigmentisolierung

In dieser Arbeit wurde neben vollpigmentierten Komplexen auch neoxanthinfreier LHCII untersucht. Dazu musste Totalextrakt aufgetrennt und die einzelnen Pigmente isoliert werden. Zur Präzipitation der Chlorophylle wurde eine Dioxanfällung durchgeführt. Die Gewinnung der Pigmente glich dem unter Abschnitt 4.7 beschriebenen Prozess, jedoch erfolgte nach Aufnahme der Pellets in Aceton die Überführung in ein auf Eis gelagertes Becherglas, in dem die Fällung durch tropfenweise Zugabe von 150 ml Dioxan/1 l Aceton induziert wurde. Dies geschah unter ständigem Rühren der Pigment/Acetonmischung. Bevor der Fällungsansatz für eine Stunde bei 0 °C inkubiert werden konnte, mussten noch, ebenfalls tropfenweise, 350 ml Wasser über einen Scheidetrichter hinzugefügt werden. Die Trennung des chlorophyllhaltigen Pellets vom xanthophyllhaltigen Überstand wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 9000 rpm erreicht (Beckmann Kühlzentrifuge J2HS, Rotor: JLA 10500, 4 °C). Die weitere Verarbeitung des acetonschen Xanthophyllüberstandes glich vollständig der Vorgehensweise beim Ausschütteln des Totalextraktes (Abschnitt 4.7), bis die wasserfreie Etherphase im Rotationsverdampfer eingetrocknet werden konnte. Das Chlorophyllpellet hingegen wurde direkt in 200 ml Ether aufgenommen und mit 200 ml Wasser gewaschen, ausgeschüttelt, das Restwasser ausgefroren und am nächsten Tag eingetrocknet.

4.8.1. Xanthophyllverseifung

Zur vollständigen Trennung der Xanthophylle von im Überstand verbliebenen Chlorophyllen und Lipiden ist eine Verseifung durch Kaliumhydroxid(KOH)-Zugabe durchgeführt worden. Dazu wurden die eingetrockneten Xanthophylle aus Abschnitt 4.8 in 100 ml Ethanol aufgenommen, 5 min im Ultraschallbad inkubiert, unter Schwenken 10 ml 60 % KOH zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 30 °C im Dunkeln inkubiert. KOH trennt die Esterbindung zwischen dem Porphyrinring und dem Phytolschwanz der Chlorophylle; die nun wasserlöslichen Chlorophylle konnten am nächsten morgen durch Ausschütteln des Ansatzes mit NaCl und Wasser (siehe Abschnitt 4.7) entfernt werden, bevor die Xanthophylle im Rotationverdampfer getrocknet wurden.

4.8.2. präparative Hochgeschwindigkeits-Flüssigchromatographie (HPLC)

Die weitere Trennung der einzelnen Chlorophylle und Xanthophylle wurde durch präparative Hochgeschwindigkeits-Flüssigchromatographie (HPLC) erreicht. Dazu wurden die getrockneten Chlorophylle aus Abschnitt 4.8 in 86 ml Aceton solubilisiert, im Ultraschallbad homogenisiert und mit 14 ml dH₂O versetzt. Die Xanthophylle wurden direkt in 80 % Aceton aufgenommen und homogenisiert. Die Probenschleife musste zunächst auf Dichtheit des Stempels getestet und

dann mit der Rückseite an die Pumpe angeschlossen werden. Sitzt der Stempel nicht korrekt im „Super-Loop“, würde dies schon beim Probenauftrag zur Mischung des 85 % Acetons und der Probe führen, wodurch die Bindung der Pigmente an die Säule enorm eingeschränkt würde. Durch Starten des „Super-LoopProgramms“ erfolgte der Probenauftrag, die anschließende Trennung wurde durch Starten des jeweiligen Programms erreicht. Das Elutionsprofil der Pigmente konnte durch einen angeschlossenen Absorptions- (Sp-6V, Gynothek GmbH, Gemering, Deutschland) und Fluoreszenzdetektor (RF-535, Shimadzu corp., Kyoto, Japan) aufgenommen und die einzelnen Fraktionen entsprechend getrennt aufgefangen werden. Die genaue Analyse der Fraktionen erfolgte in der analytischen HPLC.

Tabelle II.4.2.: Programme der präparativen HPLC. Chlorophyll-Programm: CHLMOD; Xanthophyllprogramm: XGRADFF. Detektoreinstellungen Sp-6V: Absorption: 0,04, Response: Standard; Shimadzu RF 535: Exzitation: 435 nm, Emission: 680 nm, Response: Medium, Range: 2, Sensitivität: hoch

Programm	Aceton	Wasser	Laufzeit
CHLMOD	86%	14%	0
	86%	14%	100 min
	86%	12%	170 min
	100%	0%	50 min
XGRADFF	78%	22%	0 min
	78%	22%	200 min
	100%	0%	80 min

4.9. Butanol-Extraktion

Die Überprüfung von Pigmentstöchiometrien in Protein-Pigment-Komplexen und anderen pigmenthaltigen Lösungen wurde durch eine Butanolextraktion (Martinson and Plumley (1995)) erreicht. Dazu wurden 50 µl Pigmenthaltiger Lösung mit 33 µl 2-Butanol versetzt und 16,5 µl NaCl hinzugefügt. Nach Vortexen und Zentrifugation bei 12000 rpm (Hettich Mikro 22R, Rotor 1015) konnte der pigmenthaltige Überstand entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt werden. Sollte eine quantitative Bestimmung durchgeführt werden, wurde eine Nachextraktion der wässrigen Phase vorgenommen, die Überstände wurden in vorgewogene Reaktionsgefäße überführt und das Volumen bestimmt. Die Pigmentstöchiometrien bzw. -mengen konnten dann per analytischer HPLC bestimmt werden.

4.10. Detergenzwechsel-Rekonstitution (DWR)

Zur Rückfaltung des LHCP zu LHCII gibt es verschiedene Möglichkeiten. Sollten die Komplexe im weiteren Verlauf aufgereinigt oder trimerisiert werden, wurde eine Rekonstitution durch Wechsel des Detergenz durchgeführt. Bei dieser Technik, bei der hohe Faltungsausbeuten erzielt werden können, wird Natrium-dodecylsulfat(SDS) solubilisierter LHCP mit Pigmenttotal-extrakt versetzt und das nicht ionische Detergenz Octylglucosid hinzugefügt. Durch Zugabe von Kaliumchlorid (KCl) wird KDS ausgefällt und der hydrophobe LHCP faltet sich unter Pigmentbindung bei Insertion in OG-Mizellen. Zur Rekonstitution wurde 1,5 mg LHCP in 1875 µl 2x Solubilisierungs-Puffer gelöst und mit dH₂O auf 3750 µl aufgefüllt. Um Aggregationen zu vermeiden, wurden Disulfidbrücken mit 53,7 µl 1 M β-ME reduziert. Nachdem 2,5 mg Pigmente in 250 µl eiskalten Ethanol vorgelöst und unter Vortexen hinzugefügt worden waren, folgte eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Rückfaltung wurde durch Addition von 538 µl 10 % OG induziert und weitere zehn min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor SDS mit 538 µl 2 M KCl für 15 min auf Eis ausgefällt werden konnte. Bevor die gebildeten Komplexe für weitere Versuche zu Verfügung standen, musste das ausgefallene KDS durch 15-minütige Zentrifugation pelletiert und abgetrennt werden (Beckmann Kälzentrifuge J2HS, Rotor: JLA 25.50, 4°C, 12000 rpm, 15 min). Dieser Schritt wurde nach erneuter Inkubation auf Eis wiederholt, um möglichst reine LHCII-Monomere zu erhalten.

2x Solubilisierungs-Puffer(Trimere)	200 mM Tris-HCl pH 9,0
	4% SDS
	10 mM ε -Aminocapronsäure
	2 mM Benzamidin
	25% Saccharose
2x Solubilisierungs-Puffer(Monomere)	200 mM Tris-HCl pH 9,0
	4% SDS
	10 mM ε -Aminocapronsäure
	2 mM Benzamidin

4.11. Trimerisierung

Der LHCII liegt nativ in trimerer Form vor. Um diesen Organisationsgrad auch bei rückgefalteten Komplexen in Detergenzmizellen zu erreichen, wurde in dieser Arbeit eine Trimerisierung durch Assoziation His₆-tag tragender LHCII-Monomere an Nickel-Iminodiessigsäure-Sepharose-Säulen

(Ni-IDA-Sepharose) durchgeführt. Die Komplexe werden durch enge Bindung an das Säulenmaterial in räumliche Nähe gebracht und bilden bei Zugabe von Phosphatidylglyzerin (PG) spontan Trimere. Diese können dann eluiert werden und stehen weiteren Versuchen zu Verfügung.

Die Säulen mussten zunächst mit 1000 µl (1 Säulenvolumen, SV) Säulenmaterial pro mg in der Rekonstituion eingesetztem LHCP beladen und nacheinander mit 1 SV dH₂O und 3 SV 0,3 M Nickelchlorid (NiCl) gewaschen werden. Die Komplexierung der Ni-Ionen durch IDA färbte die Säule grün. Eine blaue Färbung ergab sich durch das Einstellen des pH-Wertes mithilfe 3 SV 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Nach einem abschließenden Waschschrift mit 1 SV OG-Puffer konnten die Säulen mit der Monomerlösung aus Abschnitt 4.10 beladen werden.

Freie Pigmente und ungebundene Komplexe wurden nach Durchlauf von 2 SV OG-Puffer entfernt, die Trimerisierung wurde durch 2 SV PG-haltigen TX-Puffer erreicht. Die Elution erfolgte dann je nach Färbung der Säulen mit 2-4 SV Elutionspuffer, nur schwach gefärbtes Eluat wurde dabei verworfen.

Zur Vorregeneration der Säulen wurden diese mit 4 SV SDS-Imidazolpuffer, 4 SV dH₂O, 2 SV 0,5 M EDTA und erneut 4 SV dH₂O gewaschen, bevor sie mit 20 prozentigem Ethanol in eine Laborflasche überführt werden konnte. Zur vollständigen Regeneration musste die gesammelte Sepharose wiederum mit 2 SV dH₂O, 4 SV SDS-Imidazolpuffer, 1 SV 0,5 M EDTA, 2 SV dH₂O und je einem SV 20, 60, 100, 60 und 20% Ethanol gespült werden. Nachdem sie für 10 min im Rotationsverdampfer unter Vakuum entgast wurde, konnte sie erneut für Trimerisierungen verwendet werden.

OG-Puffer	1% (w/v) OG 12,5% (w/v) Saccharose 0,1 M Tris/HCl pH 9,0
TX-Puffer	0,05% (v/v) Triton X-100 0,1 M Tris/HCl pH 7,5 0,1 mg/ml PG
Elutionspuffer	0,05% (v/v) Triton X-100 10 mM Tris/HCl pH 7,5 0,3 M Imidazol 0,1 mg/ml PG

SDS/Imidazol-Puffer	2% (w/v) SDS
	0,4 M Imidazol

4.12. Heterogene Trimerisierung

Soll doppelt spinmarkierter LHCP per DEER-EPR im Trimerverbund untersucht werden, darf nur ein Monomer des Trimers Marker tragen, da es ansonsten zu Kreuzsignalen kommt. Dies kann durch eine Präparationstechnik erreicht werden, bei der mit einem doppelten Tag-System und einem großen Überschuss unmarkierter Komplexe gearbeitet wird (Dockter (2009), Dietz (2012)). Voraussetzung war, dass der markierte Monomer neben einem His₆-tag zur Trimerisierung wie unter Abschnitt 4.11 beschrieben einen Strep-tag[®] zur Separierung von unmarkierten Trimeren trägt. Dieser Tag aus acht Aminosäuren ermöglicht die Bindung an Strep-Tactin-Macroprep[®] Säulenmaterial.

Zur heterogenen Trimerisierung wurden getrennte Rekonstitutionen mit 5 mg einer Doppelcysteinmutante die beide Tags trug sowie mit 4 x 10 mg C79Sh wie unter Abschnitt 4.10 durchgeführt. Die Rekonstitutionsansätze wurden aufgrund des großen Volumens nach KCl Zugabe zunächst zwei Stunden, nach dem ersten Zentrifugationsschritt über Nacht inkubiert. Eine Deriphat-PAGE gab Aufschluss über die Rekonstitutionsausbeute, war diese bei allen Ansätzen gleich hoch, wurden die Komplexe im Verhältnis 1:8 gemischt, was den rekonstituierten 5 mg der Doppelcysteinmutante und 40 mg des C79Sh entsprach.

Die Säulenvorbereitung entsprach Abschnitt 4.11, es war jedoch darauf zu achten, dass nach Komplexierung des Nickelchlorids das Säulenmaterial nicht aufgewirbelt wurde, da so ein großer Teil der gebundenen Komplexe später nicht mehr eluiert werden konnte. Es wurden 8 x 5 ml Ni-IDA-Sepharose verwendet, die Monomermischung auf diesen aufgeteilt und die Trimerisierung durchgeführt. Das Mischverhältnis von markierten zu unmarkierten Monomeren führt zur Bildung von vollständig unmarkierten (85,7%), 1x (12,5%), 2x (1,6%) und vollständig markierten Komplexen (0,2%). Da die vollständig unmarkierten Komplexe keinen Strep-Tag[®] tragen, führt die Trennung über eine Macroprep-Säule zu einem Verhältnis von 1x, 2x und 3x markierten Komplexen von 100:12,8:1,6. Die verwendeten Ni-Säulen wurden direkt durch Zugabe von 4 SV dH₂O, 4 SV Strep-SDS-Imidazolpuffer, 4 SV dH₂O und je 4 SV 20, 60, 100, 60% Ethanol vollständig regeneriert.

Zur Vorbereitung der Streptactin-Macroprep[®]-Säule wurden 5 x 500 µl des Materials in Säulchen gefüllt, mit 2 SV Puffer-W und 2 SV Strep-TX-Puffer gewaschen. Der gesamte Trimeransatz wurde dann auf die Säulen gegeben, der Durchlauf konnte hier mehrere Stunden in Anspruch nehmen. Die Elution erfolgte anschließend mit 4 SV Strep-Elutionspuffer, so dass das

Elaut zur Aufreinigung über Saccharosedichtegradienten bereit war.

Auch das Material der Strep-Säule war regenerationsfähig, dazu musste es zunächst einen Tag in Strep-Elutionspuffer und dann einen weiteren Tag mit 0,5% TX auf dem Drehrad inkubiert werden. In einer Säule erfolgte dann je ein Waschschrift mit 2 SV Puffer-W und 4 SV Regenerationspuffer. Die Bindung von 4-Hydroxy-Azobenzen-2-Carboxylsäure (HABA) auf der Säulen induzierte die Funktionsfähigkeit des Materials, blieb die Färbung aus musste das Strep-Taction[®] verworfen werden. Nachdem HABA mit 5 SV Waschpuffer entfernt wurde, konnte das Säulenmaterial bis zur erneuten Verwendung in Puffer-W bei 4 °C gelagert werden.

Strep- SDS/Imidazol- Puffer	2% (w/v) SDS 0,4 M Imidazol 0,5 M EDTA 20% Ethanol
Puffer-W	100 mM tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl
Strep-TX-Puffer	0,005% Triton X-100 100 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mg/ml PG 10% (v/v) Glyzerin
Strep-Elutionspuffer	0,05% Triton X-100 100 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mg/ml PG 10% (v/v) Glyzerin 2,5 mM D-Desthiobiotin
Regenerationspuffer	100 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM HABA

Waschpuffer	100 mM Tris-HCl pH 8,0
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA

4.13. Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation

Zur Separierung verschiedener Oligomerisierungsgrade des LHCII kann das Sedimentationsverhalten in einem Saccharosegradienten ausgenutzt werden. Friert man eine Saccharoselösungen in Zentrifugenröhrchen ein, bildet sich während des Auftauens ein Gradient aus, bei dem die Saccharosekonzentration nach oben hin stetig abnimmt. Durch Überschichtung des Gradienten mit der Probe und Ultrazentrifugation über Nacht kann so eine Trennung von LHCII Monomeren, Trimeren und freien Pigmenten erreicht werden.

In dieser Arbeit kamen Gradienten unterschiedlichen Volumens zum Einsatz, je nach aufzutrennender Probenmenge. Die Parameter der Zentrifugation sind Tab. II.4.3 zu entnehmen. Nach Abschluss der Auftrennung wurden die einzelnen Komplexbanden mithilfe einer 1 ml Spritze aus den Gradienten entnommen und auf Eis aufbewahrt.

Tabelle II.4.3.: Parameter der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation. Alle Gradienten enthielten neben den in der Tabelle angegebene Saccharosekonzentrationen 0,2% n-Dodecyl β -D-maltosid und 5 mM Tris-HCl pH 7,8

Rotor	SW60	SW41	SW28
Gradient	0,55 M	0,3 M	0,4 M
Vol. per Tube	4 ml	12 ml	36 ml
Max. Vol. Probe	800 μ l	1,5 ml	6 ml
Lauflänge	17 h	17 h	24 h
RPM	54000	38000	24000

4.14. Komplexkonzentration

Da die Komplexkonzentration nach DWR und Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation zu gering für EPR-spektroskopische Untersuchungen war, musste der LHCII konzentriert werden. Dies geschah in Amicon-Zentrifugalfiltern, die eine Ausschlussgröße von 30 kDa besaßen. Der LHCII hat mit 24,6 kDa zwar ein niedrigeres Molekulargewicht, jedoch wird dieses durch die Detergenzmizelle vergrößert und die Komplexe reicherten sich durch Zentrifugation bei maximal 7500 g (Hettich EBA 12, Rotor 1124) in den Filtereinheiten an. Gleichzeitig mit der Konzentration erfolgte ein Pufferwechsel gegen deuterierten EPR-Probenpuffer. Nachdem eine Konzentration von

80 µl erreicht war, konnten die Proben aus dem 50 µl-Reservoir der Filtereinheiten entnommen, weiter untersucht oder in EPR-Röhrchen gefüllt werden.

EPR-Probenpuffer	50 mM tris-HCl pH 7,8
	12,5% (w/v) Saccharose
	in D ₂ O

4.15. Verdünnungs-Rekonstitution

Zeitaufgelöste Faltungsuntersuchungen des LHCII erfordern eine Rekonstitutionsmethode, bei welcher die Komplexbildung zu einem definierten Zeitpunkt einsetzt. Da dies durch die Präzipitation des Dodecylsulfats während der DWR nicht gegeben ist, wurde für die Experimente, die der Untersuchung eines zeitlichen Ablaufs dienen, die Verdünnungs-Rekonstitution angewandt (Booth and Paulsen (1996)). Bei dieser wird die Faltungsinduktion durch Mischung des LDS-solubilisierten LHCP mit einer pigmenthaltigen Lösung nicht-ionischer Detergenzien erreicht. Die Verdünnung des SDS führt zur Bildung von Mischmizellen, in denen sich das Apoprotein unter Pigmentbindung zu funktionalen Komplexen rückfaltet. Die ursprüngliche Versuchsvorschrift wurde von Dr. C. Dockter zur Rekonstitution hochkonzentrierter Ansätze für DEER-EPR-Messungen angepasst (Dockter (2009)) und in dieser Arbeit weiter verändert. An dieser Stelle sei nur das optimierte Versuchsprotokoll erläutert.

Zur Rekonstitution wurden 1,5 ml Aliquots Pigment- (750 µl 2x Pigmentpuffer (RK1), 75 µl 1 M β-ME, 435 µl dH₂O, 4,5 mg Pigmente in 240 µl Ethanol vorgelöst (3,3 mM Endkonz.) und Proteinpuffer (750 µl 2x Proteinpuffer (RK2), 75 µl 1 M β-ME, 3,3 mg LHCP (90 µM Endkonz.), ad 1500 µl dH₂O) vorbereitet und diese 1:1 unter Vortexen gemischt. Sollten die Proben zur EPR-spektroskopischen Untersuchung herangezogen werden, mussten Puffer verwendet werden, in denen der gesamte Wasseranteil durch Deuteriumhydroxid (D₂O) ersetzt war. Auf diese Weise konnten Ergebnisse mit besserem Signal-Rausch Verhältnis erzielt werden. Die Pigmente wurden vor Zugabe zum RK1 in Ethanol gelöst, im Ultraschallbad homogenisiert und der ungelöste Anteil für 30 s bei 12000 RPM in der Tischzentrifuge pelletiert. Wichtig war, dass die Rekonstitution nach Zugabe der Pigmente zum RK1 zeitnah durchgeführt wurde, um Aggregation zu vermeiden.

2xPigmentpuffer(RK1)	10% (w/v) OG
	3% (v/v) Triton-X100
	0,06% (w/v) Na-Deoxycholat
	0,52% (w/v) PG
	25% (w/v) Saccharose
	200 mM Li-Borat pH 8,1

2xProteinpuffer(RK2)	2% LDS
	200 mM Li-Borat pH 8,1

4.16. „Stopped-Flow“-Rekonstitution des LHCII

4.16.1. „Stopped-Flow“

Die Untersuchung geringer Faltungszeiten des LHCII war aufgrund der experimentellen Totzeit der manuellen Probenproduktion nicht möglich. Daher wurde in dieser Arbeit ein „Stopped-Flow“ System (SFM 300, BioLogic, Frankreich) zur computergesteuerten Mischung von Reaktionslösungen im Milisekundenbereich verwendet. Die „Stopped-Flow“ besitzt drei Spritzenkammern zur Aufnahme der Reaktanden, so dass diese über separate Mixereinheiten in zwei Stufen bei variabler Geschwindigkeit gemischt werden können (Abb. II.4.2).

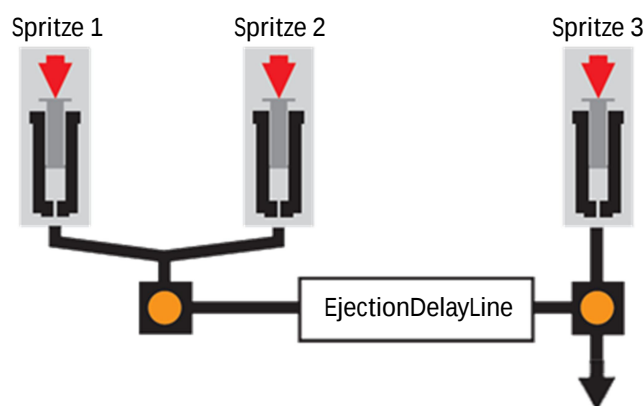


Abbildung II.4.2.: Schema der SFM300

Wird die „Stopped-Flow“ wie hier nur mit zwei der drei Spritzen betrieben, bieten sich zwei unterschiedliche Operationsmodi. Beim „Continuous-Flow-Mode“ erfolgt die Variation der Alterungsdauer nach Mischen der Lösungen durch Veränderung der Flussgeschwindigkeit. Bei langsamen Spritzenvorschub benötigt die Lösung nach Mischung in der Mixereinheit 1 mehr Zeit bis zur Auslassdüse und verlässt diese folglich nach längerer Reaktionsdauer als bei höheren Flussraten. Vorteil dieses Modus ist, dass sehr schnelle Reaktionen untersucht und Proben beliebig großer Volumina hergestellt werden können. Das Probenalter ist jedoch durch die maximale Flussrate begrenzt. Für Proben mit längeren Reaktionszeiten wird daher der „Interrupted-Flow-Mode“ verwendet. Bei diesem wird das Probenalter durch die Länge einer Vorschubspause geregelt, bei der die Reaktionslösung in der „Ejection-Delay-Line“ (EDL) verbleibt. Die Vorschubgeschwindigkeit der Spritzen bleibt konstant. Hier ist das maximale Probenvolumen jedoch auf das Fassungsvermögen der EDL beschränkt. Die Parameter, die in das Steuerprogramm der SFM300 zur Steuerung des Experiments eingegeben werden müssen, können wie folgt berechnet werden:

$$\text{„Continuous-Flow“: Alterungszeit} = \text{EDL Volumen} / \text{Totale Flussrate}$$

$$\text{„Interrupted-Flow“: Alterungszeit} = \text{Inkubationszeit} + (\text{EDL Volumen} / \text{Totale Flussrate})$$

Je nach verwendeter Methode zum Abstoppen der Reaktion, ist zum EDL-Volumen noch das Volumen der Leitung bis zum Reaktionsende hinzuzurechnen. In dieser Arbeit wurde die SFM300 in Kombination mit einem an der ETH Zürich entworfenen Freeze-Quench-Setup kombiniert, bei dem dieses Volumen dann über den Durchmesser der Auslassdüsen und der Strecke zu den Silberwalzen der Freeze-Quench berechnet wurde. Die totale Flussrate ergab sich aus den addierten Flussraten der einzelnen Spritzen. Die Reaktionsabfolge beinhaltet vor der Probenkollektion eine Phase, in der die Lösung entsprechend dem dreifachen EDL-Volumen verworfen wird. So kann eine Kontamination der Proben mit Lösung inkorrektter Alterungszeit vermieden werden.

Tabelle II.4.4.: EDL-Volumina. Volumen = Volumen der Austauschbaren EDL. Ges. Volumen = EDL-Volumen + $0,25 \text{ mm}^2 \times 75 \text{ mm}$ (37,8 μl)

EDL	Volumen	Ges. Volumen
17	43,7 μl	84,5 μl
40	60,1 μl	97,9 μl
90	116,7 μl	154,5 μl
190	216,9 μl	254,7 μl

Tabelle II.4.5.: Stopped-Flow-Parameter Continuous-Flow. Stopped-Flow Einstellungen bei Verwendung der EDL40

Phase 1				Phase 2		
Alter	Vol.	FR	t	Vol.	FR	t
50 ms	120 µl	0,8 ml/s	147 ms	120 µl	0,8 ml/s	147 ms
60 ms	120 µl	0,7 ml/s	147 ms	120 µl	0,8 ml/s	147 ms
70 ms	120 µl	0,6 ml/s	147 ms	120 µl	0,8 ml/s	147 ms
80 ms	120 µl	0,5 ml/s	147 ms	120 µl	0,8 ml/s	147 ms
90 ms	120 µl	0,5 ml/s	147 ms	120 µl	0,8 ml/s	147 ms
100 ms	120 µl	0,4 ml/s	147 ms	120 µl	0,8 ml/s	147 ms

Tabelle II.4.6.: Stopped-Flow-Parameter Interrupted-Flow. Stopped-Flow Einstellungen bei Verwendung der EDL190

Phase 1				Phase 2			Phase 3		
Alter	Vol.	FR	t	Vol.	FR	t	Vol.	FR	t
255 ms	360 µl	0,5 ml/s	720 ms	-	1 ms	-	110 µl	0,5 ml/s	220 ms
300 ms	360 µl	0,5 ml/s	720 ms	-	45 ms	-	110 µl	0,5 ml/s	220 ms
400 ms	360 µl	0,5 ml/s	720 ms	-	145 ms	-	110 µl	0,5 ml/s	220 ms
500 ms	360 µl	0,5 ml/s	720 ms	-	245 ms	-	110 µl	0,5 ml/s	220 ms
600 ms	360 µl	0,5 ml/s	720 ms	-	345 ms	-	110 µl	0,5 ml/s	220 ms
1000 ms	360 µl	0,5 ml/s	720 ms	-	745 ms	-	110 µl	0,5 ml/s	220 ms
20000 ms	360 µl	0,5 ml/s	720 ms	-	19745 ms	-	110 µl	0,5 ml/s	220 ms
40000 ms	360 µl	0,5 ml/s	720 ms	-	39745 ms	-	110 µl	0,5 ml/s	220 ms
70000 ms	360 µl	0,5 ml/s	720 ms	-	69745 ms	-	110 µl	0,5 ml/s	220 ms
500000 ms	360 µl	0,5 ml/s	720 ms	-	499745 ms	-	110 µl	0,5 ml/s	220 ms

4.16.2. Freeze-Quench

Zum Abstoppen der über die „Stopped-Flow“ gesteuerten Rückfaltung wurde ein an der ETH Zürich entworfener „Freeze-Quencher“ verwendet. Bei diesem System erfolgt die Konservierung des Reaktionszustandes durch Schockfrieren auf mit Flüssigstickstoff gekühlten Silberwalzen. Die Reaktionslösung wird dabei auf die rotierenden, kalten Walzen gesprüht und augenblicklich zu feinem Granulat zermahlen. Dieses kann dann über einen, in einem Dewar gelagerten Teflontrichter, direkt in EPR-Röhrchen gesammelt werden.

Zur eigentlichen Probenproduktion wurde den Aliquots aus Abschnitt 4.15 mit einer 1 ml Spritze Protein- und Pigmentpuffer entnommen und in die Spritze 1/2 der SFM 300 gefüllt. Durch mehrmaliges Einsaugen und Ausstoßen der Lösungen wurden Luftpfeinschlüsse in den Spritzenkammern entfernt, bevor die Rekonstitution im Programm BioEdit v.7 gestartet wurde. Wichtig war, dass vor dem Füllen der Kammern sämtliche Geräte verbunden und die Vakuumpumpe des Abfallbehälters angeschaltet wurde, da es sonst zu Programmabstürzen kommen konnte. Über die Silberwalzen wurde während dem Experiment Stickstoffgas geleitet, damit sich keine Luftfeuchtigkeit niederschlug. Das Probengranulat musste mit einem Stößel in die EPR-Röhrchen geschoben werden. Um die gesamte Probe aufzufangen, konnte damit gewartet werden, bis der Stickstoff im Teflontrichter evaporierte und sich das Granulat anreicherte. Die Lagerung der EPR-Röhrchen erfolgte bis zur Messung in flüssigem Stickstoff.

4.17. Kalibrierung des SF/FQ-Systems

Um bei der Produktion zeitaufgelöster Proben im SF/FQ-Setup das Probenalter genau bestimmen zu können, mussten die Systemeinstellungen kalibriert werden. Es wurde dazu eine Testreaktion mit Met-Myoglobin und Natriumazid durchgeführt, mithilfe derer die Bestimmung der Frierzeit auf den stickstoffgeköhlten Silberwalzen der Freeze-Quench möglich war (Potapov and Goldfarb (2010)). Bei der Testreaktion wird der Sauerstoffligand des Häms durch Azid ersetzt, die Reaktionsgeschwindigkeit ist dabei direkt von der eingesetzten Azidkonzentration abhängig und kann wie folgt berechnet werden:

$$[HS] = -k\left(\left(1 - \frac{k_d}{k_{obs}}\right)e^{-k_{obs}t} + \frac{k_d}{k_{obs}}\right)$$

$$k_{obs;2,5mMN_3} = 10,64s^{-1}; k_{obs;0,5mMN_3} = 2,43s^{-1}; k_d = 0,14s^{-1}$$

Der Ligandentausch führt zu einem Shift des Continuous-Wave EPR Signals von 1200 Gauss zu 3100 Gauss. Durch Integration der CW-EPR Spektren kann über die Signalverteilung das Alter der Proben bestimmt werden.

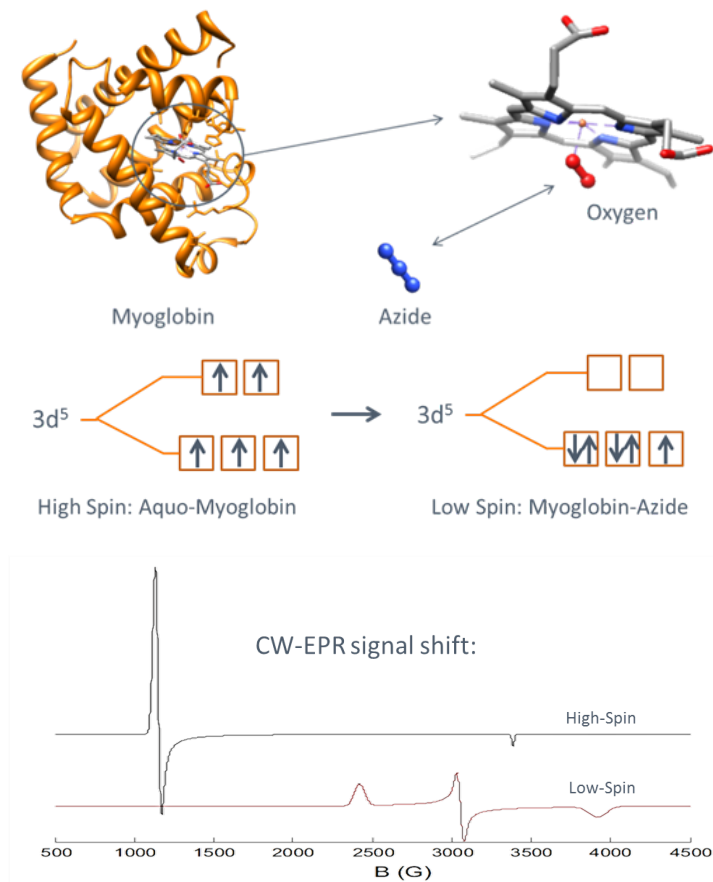


Abbildung II.4.3.: Reaktionsmechanismus der Metmyoglobin-Azid Reaktion zur Kalibrierung des SF/FQ-Systems.

4.18. EPR-Proben

Die Messung aller EPR-Proben erfolgte in Quarzglas-EPR Röhrchen mit einem maximalen Durchmesser von 3 mm. Zeitaufgelöste Proben wurden bereits in gefrorenem Zustand in die Glasröhrchen gefüllt. Allen anderen Proben mussten mit deuteriertem Glyzerin versetzt werden, um Glasbruch während dem Frieren zu vermeiden. Die Proben wurden mithilfe einer 50 Öl Hamilton Spritze in die Röhrchen gefüllt und diese anschließend mit der unteren Spitze vorsichtig in flüssigem Stickstoff gefroren.

4.19. Zweiphasen-Dünnschichtchromatographie

Lipide und Pigmente können mithilfe einer Dünnschichtchromatografie voneinander getrennt werden. Diese Technik wurde dazu verwendet, Pigmenttotalextrakt bezüglich seiner Lipidkomposition zu untersuchen. Die verschiedenen Pigmente und Lipide binden dabei mit unterschiedlichen Affinitäten an die stationäre Phase. Hier wurden poröse HPTLC-Platten verwendet. Durch die unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten in der unpolaren, mobilen Phase kommt es zu einer Trennung der aufgetragenen Stoffe. Um eine optimale Trennung von Pigmenten und Lipiden zu erreichen, mussten zwei verschiedene Laufmittel eingesetzt werden. Es wurden zunächst zwei DC-Kammern mit den beiden Laufpuffer gefüllt, anschließend 1 µl Totalextrakt auf die HPTLC-Platte aufgetragen und die Platte in die erste Kammer gestellt (Lipidtrennung). Nachdem die Laufmittelfront die Mitte der Platte erreicht hatte, wurde die Platte in die Kammer mit dem zweiten Laufmittel gestellt (Pigmenttrennung). Die Färbung der Lipide erfolgte durch besprühen mit „Godins Spray“ im Abzug und Trocknung bei 95 °C für 10 min im Wärmeschrank.

1. Laufmittel	70,2% (v/v) Chloroform 24% (v/v) Methanol 1,9% (v/v) Essigsäure
2. Laufmittel	79,8% (v/v) Hexan 18,8% (v/v) Diethylether 1,4% (v/v) Essigsäure
Godins Spray	0,5% (w/v) Vanillin 1,5% (w/v) Perchlorsäure 50% (v/v) Ethanol

5. Analytische Methoden

5.1. Agarose-Gelelektrophorese

Der Erfolg einer Mutagenese-PCR kann einfach über eine Gelelektrophorese überprüft werden. Dazu kamen in dieser Arbeit Agarose-Minigele zum Einsatz, auf welche jeweils 5 µl des PCR-Produkts sowie jeweils 5 µl eines 100bp/1kbp Längenstandards aufgetragen wurden. Die Gele wurden zuvor durch Aufkochen einer einprozentige Agarose-TAE-Lösung in der Mikrowelle vorbereitet. Die Lösung wurde, sobald sie auf ca 50 °C abgekühlt war, mit einer 10 ml Glaspipette auf Glasplatten aufgetragen und mit Gelkämmen versehen. Es konnten neun Minigele gleichzeitig gegossen und für spätere Verwendung in angefeuchteten Zellstofftüchern bei 7 °C gelagert werden. Vor Auftrag wurden die Proben mit $\frac{1}{10}$ Volumen 10x Minigel-Laufpuffer versetzt. Da dieser Bromphenolblau enthielt, war die Laufront während der Auftrennung im TAE-Bad bei 190 V (ca. 30 min) sichtbar. Die Gele konnten anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff CyberRed angefärbt werden, welcher zwischen den DNA-Basen interkaliert im Gegensatz zu Ethidiumbromid jedoch weniger kanzerogen ist. Die Färbung erfolgte mit $\frac{1}{10000}$ Volumen CyberRed in TAE-Puffer für 60 min.

10x TAE-Puffer

400 mM Tris
1,14% (v/v) Essigsäure
2 mM EDTA

Minigel-Auftragspuffer

0,025% (w/v) Bromphenolblau
0,025% (w/v) Xylencyanol
50% (v/v) Glycerin
50 mM Tris-HCl pH 8,0
10 mM EDTA

5.2. Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

5.2.1. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteingemischen ihrem Molekulargewicht entsprechend (Laemmli (1970)). Die Trennung wird erreicht, indem Proteine im elektrischen Feld durch eine poröse Polyacrylamid Matrix wandern. Diese kann durch Radikalkettenpolymerisation aus Acrylamid und Bisacrylamid durch Zugabe des radikalbildenden Ammoniumpersulfat (APS) unter N,N,N,N-tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)-Katalyse synthetisiert werden. Die Porengröße wird dabei durch die Konzentration und das Verhältnis von Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt. Durch Kochen in dem ionischen Detergenz Natrium-Dodecylsulfat werden Sekundärstrukturen denaturiert und die Eigenladung der Proteine überlagert, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit mit der Proteingröße korreliert. Die Kombination eines Trenngels mit einem großporigen Sammelgel, durch das die Proteine weitgehend ungehindert wandern können, resultiert in scharfen Proteinbanden. Der Übergang zum Trenngel bewirkt ein Abbremsen der Wanderungsgeschwindigkeit, wodurch die Proteine „gestaut“ werden (diskontinuierliche Laufgeschwindigkeit).

Zur Vorbereitung der SDS-PAGE mussten zunächst Gele gegossen werden. Dazu wurden zehn Glasplatten mit 0,75 mm Spacern versehen, mit Aluminiumoxidplatten abgedeckt und in eine Gelgießkammer eingesetzt. Die Stammlösung des Trenngels ist dann mit APS und TEMED gemischt und zügig in die Gießkammer gefüllt worden. Durch Übersichtung mit 400 µl Wasser konnte eine gleichmäßige Oberfläche erreicht werden. Nach einstündiger Polymerisationszeit wurde das Wasser mit einem Filterpapier entfernt und entsprechend das Sammelgel gegossen, welches nach Einsetzen der Kämme für die Geltaschen über Nacht im Kühlraum polymerisierte. Am nächsten Tag konnten die Gele entnommen und bis zur weiteren Verwendung in Cellophan verpackt im Kühlschrank gelagert werden.

Zur eigentlichen Proteinauftrennung wurden Proben mit $\frac{1}{4}$ Probenvolumen 4x-Spasmix versetzt und eine Minute bei 100 °C im Wasserbad inkubiert, bevor sie mit einer 20 µl Pipette in die Geltaschen appliziert werden konnten. Zuvor war ein 15% Gel in eine Laufkammer eingesetzt und mit SDS-Laufpuffer befüllt worden. Die Trennung dauerte 30-45 min, die Spannung wurde nach dem Einlaufen der Proben (ca. 10 min) von 80 V auf 180 V erhöht. Hatte die Laufront das Ende erreicht konnte das Gel entnommen und gefärbt werden.

Tabelle II.5.1.: Rezept zur Herstellung 10 Polyacrylamid-Gele.

Stamm	Trenngel 10%	Trenngel 15%	Sammelgel 4,5%
30% Acrylamid 1% Bisacrylamid	18 ml	27,4 ml	6 ml
1M Tris-HCl pH 8,8	22,6 ml	22,6 ml	-
1M Tris-HCl pH 6,8	-	-	5,2 ml
80% Glycerin	3,4 ml	3,4 ml	5 ml
dH ₂ O	11,2 ml	1,8 ml	23,4 ml
APS 10%	400 µl	400 µl	200 µl
TEMED	26 µl	26 µl	20 µl

4x-Spaxmix

4% SDS
 1,4 M β -ME
 24% Glycerin
 100 mM Tris-HCl pH 7,0
 20 mM Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris
 192 mM Glyzin
 0,1% (w/v) SDS
 0,5 mM EDTA

5.2.2. Schwach denaturierende Deriphat-PAGE („Grüne Gele“)

Zur Untersuchung von Proteinkomplexen unter Konservierung ihrer Tertiärstruktur wurde eine schwach denaturierende PAGE nach Peter and Thornber (1991) durchgeführt. Damit war es möglich, LHCI verschiedene Oligomerisierungsgrade voneinander und von ungefalteten Proteinen sowie freien Pigmenten zu trennen. Je nach Komplexkonzentration wurden 2-20 µl ohne weitere Behandlung in die Geltaschen eines, mit Deriphat-Laufpuffer gefüllten Geles (10%) appliziert. Um eine Hitzedenaturierung der Komplexe zu vermeiden, wurde das Gel während des Laufs gekühlt, die Auftrennung erfolgte mit 40-80 V im Dunkeln.

Deriphat-Laufpuffer	0,15% Deriphat
	48 mM Glyzin
	12 mM Tris

5.3. Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektroskopie ist ein Verfahren, mit dem Spektren von Gasen, Flüssigkeiten und zum Teil transparenten Festkörpern ermittelt werden können. Eingestrahktes Licht wird durch einen Monochromator in einzelne Wellenlängen zerlegt und die Absorption gemessen, indem die Intensität des durch die Probe scheinenden Lichtes mit der eines Referenzstrahles verglichen wird. Delokalisierte π -Elektronensysteme in Kohlenwasserstoffen senken die Energie, die zur Anregung eines Elektrons benötigt wird. Daher absorbieren Pigmente im langwelligen, sichtbaren Spektrum des Lichtes, aber auch Proteine und Nukleinsäuren können durch ihre Aromaten im UV-Bereich spektroskopisch mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes quantifiziert werden.

$$E_{\lambda} = \lg\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \varepsilon_{\lambda} * c * d$$

E_{λ} = Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge; I_0 = Anfangsintensität;
 I_1 = Intensität; ε_{λ} = Extinktionskoeffizient; c = Konzentration; d = Schichtdicke

Die Absorptionsspektroskopie wurde in dieser Arbeit zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung von Nukleinsäuren, Proteinen, Pigmenten und Pigment-Protein Komplexen verwendet. Die einzelnen Vorgehensweisen und Parameter sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

5.3.1. VIS-Absorptionsspektroskopie

LHCII und freie Pigmente wurden im sichtbaren Wellenlängenbereich vermessen, da hier die Absorption der Pigmente in einem charakteristischen Spektrum resultiert. Es wurden Spektren im Bereich von 400-750 nm aufgezeichnet. Zur Untersuchung der Pigmentkomposition in Totalextrakt aus *Pisum sativum* konnte über die Extinktion bei 663,6 und 646,6 nm das Verhältnis der Chlorophylle ermittelt werden (Porra and Thomson (1989)).

$$chl\ a = 12,25 * E_{663,6} - 2,55 * E_{646,6} = (\mu\text{g/ml}) * \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$chl\ b = 20,31 * E_{646,6} - 4,91 * E_{663,6} = (\mu\text{g/ml}) * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Konzentration aufgereinigter Pigment-Protein-Komplexe wurde anhand des molaren Extinktionskoeffizienten des LHCII (Butler and Kühlbrandt (1988)) und der Extinktion bei 670 nm bestimmt.

$$\varepsilon_{LHCII} = 5,46 * 10^5 \text{ cm}^{-1} * \text{M}^{-1}$$

Alle Absorptionsspektren im sichtbaren Wellenlängenbereich wurden im Jasco V550 UV Vis Spectrophotometer, Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt bzw. Shimadzu UV 2101 PC UV-Vis Scanning Spectrophotometer, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg mit folgenden Parametern aufgezeichnet:

	Jasco V550	Shimadzu UV2101PC
Spektrum	400-750 nm	400 - 750 nm
Method	Abs	Abs
Band Width/Slit Width	2 nm	2 nm
Scanning Speed	200 nm/min	Medium
Data Pitch/Sampling Interval	1 nm	1nm

5.3.2. UV-Absorptionspektroskopie

Aufgrund der Eigenabsorption von Nukleobasen und aromatischen Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin) ist es möglich, bei bekanntem Extinktionskoeffizienten DNA- und Proteinkonzentrationen zu bestimmen. Zur DNA-Quantifizierung wurde die Absorption bei 260 nm gemessen, Proteine bei 280 nm. Der Quotient aus beiden Werten gibt Aufschluss über die Reinheit einer Plasmidextraktion, reine DNA weist dabei einen Wert von $E_{260/280} = 1,8$ auf. Proteinspektren wurden zwischen 200 und 350 nm mit sonst gleichen Parametern wie unter Abschnitt 5.3.1 aufgezeichnet, Proben zuvor 100fach mit A280-Puffer solubilisiert und 0,1% 1M β -ME hinzugefügt. Die DNA-Quantifizierung erfolgte unter 35 facher Verdünnung der Plasmidextraktion im Biophotometer (Eppendorf GmbH, Wessling-Benzdorf).

A280-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 6,8
	2% SDS
	1 mM β -ME

$$\varepsilon_{DNA,260nm} = 0,02 (\mu\text{g/ml})^{-1} * \text{cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{LHCP,280nm} = 1,89 * 10^{-3} (\mu\text{g/ml})^{-1} * \text{cm}^{-1}$$

5.4. Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenz entsteht durch die spontane Emission zuvor absorbierten Lichtes; das emittierte Licht ist dabei energieärmer und besitzt folglich eine größere Wellenlänge. Mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie ist es möglich, Energieübertragungen zwischen Fluorophoren zu detektieren, da diese im Verbund eine andere Emissionswellenlänge als in monodisperser Lösung besitzen. Im LHCII erfolgt die Energieweiterleitung im intakten Komplex von *Chl b* zu *Chl a*. Da die Absorption des LHCII bei 470 nm fast gänzlich auf gebundenes *Chl b* zurückzuführen ist, kann man anhand des Emissionsspektrums Aussagen über die Komplexqualität treffen. Intakte Komplexe übertragen die gesamte Anregungsenergie auf *Chl a*, was sich in Abwesenheit eines Akzeptors in einer Emissionswellenlänge von 680 nm äußert. Geschädigter oder mit freien Pigmenten verunreinigter LHCII wird hier eine *chl b* Fluoreszenz (650nm) aufweisen.

Die Messung aufgereinigten LHCII's aus Saccharosegradienten erfolgte in 5 mm Quarzküvetten bei Raumtemperatur im Fluoromax II bzw. FLuoromax III (ISA SPEX, Jobin Yvon, Gräbrunn). Je nach Komplexkonzentration, wurde entweder eine 90° (<0,5 µM LHCII) oder „Front-Face“-Anordnung (>0,5 µM LHCII) des Strahlenganges gewählt.

	Fluoromax II/III
Spektrum	600-750 nm
Increment	1
Excitation	470 nm
Integration	0,5

5.5. Circular dichroismus-Spektroskopie

Ein chirales Molekül absorbiert zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark, je nachdem, welcher Drehrichtung es folgt. Die Absorptionsdifferenz ergibt für nicht zufällig orientierte chirale Stoffe ein charakteristisches Muster, welches man in der CD-Spektroskopie nutzt, um Aussagen über die molekulare Architektur und die strukturelle Komplexität eines Stoffes zu treffen. Sekundärstrukturen von Proteinen lassen sich im UV-Bereich analysieren, während die Pigment-Pigment-Interaktionen des LHCII eine Untersuchung im sichtbaren Spektrum des Lichts ermöglichen (Miloslavina et al. (2012)). Der Absorptionsspektroskopie entsprechend wird Licht durch einen Monochromator auf eine einzelne Wellenlänge reduziert, jedoch wird es dann durch einen photoelastischen Modulator in einem elektrischen Wechselfeld zirkular polarisiert, bevor es durch die Probenkammer geleitet wird (Lottspeich (2012)). Das Ausgabesignal stellt ein Differenzspektrum der Absorption aus rechts- und linkszirkular polarisiertem Licht dar und wird

als Elliptizität (θ) bezeichnet. Zum konzentrationsunabhängigen Vergleich von CD-Spektren reiner Proteinproben kann dieses Signal in die mittlere Elliptizität pro Aminosäure-Rest ($[\theta]$) umgerechnet werden.

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

$$[\theta]_{mrw} = \frac{\theta}{d * c * AS} \text{ [deg cm]}$$

θ = Elliptizität; $[\theta]$ = Mittlere Elliptizität per Aminosäure; c = Konzentration;
d = Schichtdicke; AS = Anzahl der Aminosäuren des Proteins;
 $\varepsilon_{L/R}$ = Intensität des rechts/linksdrehenden Lichtes

Messungen im sichtbaren Bereich wurden je nach Komplexkonzentration in 0,1 bzw. 2 mm Quarzglas Küvetten bei 4 °C durchgeführt, UV-Messungen zur Determinierung von Sekundärstrukturen ausschließlich in der 0,1 mm Küvette. Um Schäden an den Oxidationsempfindlichen Spiegeln des Geräts (J810-S, Shimadzu, Duisburg) zu vermeiden, musste vor Messung das gesamte System mit Stickstoff-Gas durchflutet werden. Neben Spektren konnte auch die zeitliche Entwicklung des Circular dichroismus einer bestimmten Wellenlänge aufgezeichnet werden.

	J810-S
Sensitivität	Standrad (100 mdeg)
Data Pitch	1 nm
Scanning Mode	Continuous
Scanning Speed	100 nm/min
Response	4 s
Band Width	4 nm
Accumulation	1 - 5
Channel 1	CD
Channel 2	HT

5.6. Elektronenparamagnetische-Resonanzspektroskopie

Die Elektronenspinresonanz- oder Elektronenparamagnetische-Resonanz-Spektroskopie (EPR) ist eine Technik zur Untersuchung von Struktur, räumlichen Verteilung und Dynamik paramagnetischer Spezies (Volkov (2008)). Mit ihr ist es möglich, das Verhalten stabiler Radikale in Wechselwirkung benachbarter Elektronenspins zu beobachten, indem die resonante Absorption

von Mikrowellenstrahlung in einem äußeren Magnetfeld gemessen wird. Je nach Fragestellung wurden in dieser Arbeit verschiedene experimentelle Techniken angewandt, die im Folgenden näher erläutert werden.

5.6.1. „Continuous-Wave-EPR“ (CW-EPR)

Bei der „Continuous-Wave“ EPR-Spektroskopie werden durch Mikrowellen induzierte Spinübergänge in einem variablen Magnetfeld observiert. Durch die Hyperfeinstruktur der Energieniveaus des ungepaarten Elektrons von Nitroxidradikalen wie dem hier verwendeten 3-(2-Iodacetamido)-Proxyl in einem magnetischen Feld, ergeben sich Resonanzlinien die bei konstanter Mikrowellenfrequenz durch Veränderung der Magnetischen Feldstärke gemessen werden können (Klare (2013)). Die Analyse des Absorptionsprofils des Nitroxid-Labels ermöglicht Aussagen über die nähere Spinumgebung, wie z.B. die Spin-Spin Interaktionen von Markern mit geringen Abständen $< 25 \text{ \AA}$ oder die Seitenketten-Mobilität in Proteinen gebundener Spinlabel. Durch doppelte Integration des Signals und Vergleich mit einer Referenzprobe lässt sich die Spinkonzentration bestimmen.

Da die Labeling-Effizienz in DEER-Spektroskopischen Untersuchungen einen starken Einfluss auf die Signalqualität hat, wurde in dieser Arbeit CW-EPR verwendet, um vorab die Markierungsausbeute des „Site-Directed-Spin-Labeling“ (SDSL) zu kontrollieren. Proben wurden im Miniscope ms200 (Magnettech, Berlin) „Benchtop“ EPR-Spektroskop bei Raumtemperatur gemessen und die Spektren mit einem von Yevhen Polyhach (AG Jeschke, ETH Zürich) geschriebenen Skript im Programm MatLab (MathWorks, Ismaning) ausgewertet.

Miniscope ms200	
Center Field	3350 G
Sweep Width	123 G
Steps	4096
Sweep Time	60s
Number (pass)	3
Modulation	200 mG
MW alter	22 dB
Gain	$2 \cdot 10^2$

5.6.2. „Double-Electron-Electron-Resonance-EPR“ (DEER-EPR)

Im Gegensatz zur CW-EPR ist die DEER-EPR eine Technik, bei der bei einem konstanten äußeren Magnetfeld ein Spinübergang durch kurze Mikrowellenpulse mit großer Bandbreite angeregt wird. Durch die Wahl geeigneter Parameter können so einzelne Interaktionen der Spins isoliert betrachtet. DEER-EPR fokussiert dabei die Wechselwirkung zweier oder mehrerer Elektronenspins miteinander, wie zum Beispiel einfachmarkierte Proteine im Komplex oder doppelt markierte Monomere. Alle DEER-Messungen in dieser Arbeit wurden im 4-Puls-Experiment mit einer Pulsfrequenz von $(\pi/2)mw_1 - \tau_1 - (\pi)mw - \tau_1 - (\pi)mw_2 - \tau_2 - (\pi)mw_1 - \tau_2 - echo$ mit einer Pulsdauer von 12 ns für alle Pulse durchgeführt. Die „Pump“-Frequenz (mw_1) wurde auf die Maximalabsorption des Nitroxidspektrums eingestellt und die „Observer“-Frequenz (mw_2) lag 80 MHz niedriger. Je nach transversaler Relaxation und Konzentration der Spin-Label lag die Länge der Aufzeichnung zwischen 2 und 6 μ s. Die Zeitpunkte wurden mit einer Wiederholrate von 300 Hz aufgezeichnet und die Aufzeichnungen der dipolaren Evolution akkumulierten über mehrere Stunden. Die Auswertung der Primärdaten erfolgte mit dem Programm „DEER-Analysis“ (Jeschke et al. (2006)). Nach Hintergrundkorrektur wurde aus dem resultierenden Fourier-transformierten DEER-Spektrum über Thikonov-Regularisierung die Abstandsverteilung der jeweiligen Probe berechnet.

Teil III.

**Zeitaufgelöste Abstandsmessungen des
LHCII**

1. Ergebnisse

1.1. Anpassung der Rekonstitutionsparameter zur Herstellung zeitaufgelöster EPR-Proben

In dieser Arbeit standen frühe Ereignisse in der Faltung des LHCP hin zu funktionsfähigem LHCII im Fokus. Zur Untersuchung dieser Ereignisse musste eine experimentelle Umgebung geschaffen werden, in welcher die Faltung induziert und nach definierter Zeit gestoppt werden kann. Dies wurde durch die Modifizierung der Verdünnungs-Rekonstitution (Horn (2004a), Dockter et al. (2009)) in Kombination mit einem Stopped-Flow/Freeze-Quench Setup erreicht.

Bei der Verdünnungs-Rekonstitution erfolgt die Rückfaltung des LHCII durch die Verdünnung von LDS mit einer Mischung aus nicht-ionischen Detergenzien. Das LHCP ist dabei im LDS-Puffer (RK2) solubilisiert, die zur Rekonstitution benötigten Pigmente sind in den nicht-ionischen Detergenzien (RK1) vorgelöst. Durch die Verdünnung des LDS wird die Bildung von Mischmizellen erzwungen, in welchen sich LHCP und Pigmente spontan zu LHCII rückfalten.

Die Ergebnisse der Anpassung der einzelnen Rekonstitutions-Parameter werden in den folgenden Abschnitten aufgeführt.

1.1.1. Einfluss verschiedener Reduktionsmittel

Die EPR-spektroskopischen Untersuchungen erforderten LHCII-Klone mit einem bzw. zwei Cysteinen, welche die Markierung mit SH-reaktiven Spinmarkern ermöglichten. Um die Beeinflussung der Rekonstitution durch Proteinaggregate zu verhindern, welche durch die Bildung von Disulfidbrücken zwischen nicht reduzierten Thiolgruppen zustande kommen können, wurde dem Puffersystem ein Reduktionsmittel hinzugegeben. Dies galt sowohl für unmarkierte Testansätze, als auch für Proben mit spinmarkiertem LHCP. Auch in diesen war ein geringer Teil unmarkierter Proteine zu erwarten, deren Aggregation die Rekonstitution negativ beeinflussen könnte.

Im Folgenden wurde der Einfluss verschiedener Reduktionsmittel auf die Rekonstitutionsausbeute untersucht. Die Testansätze enthielten neben RK1 bzw. RK2 jeweils eines der Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol (β -ME), Dithioreithol (DTT), Tris-Carboxyethyl-Phosphin (TCEP) oder Tris-Cyanoethyl-Phosphin (TCyEP) in einer Konzentration von 10 mM. Nach Pigmentzu-

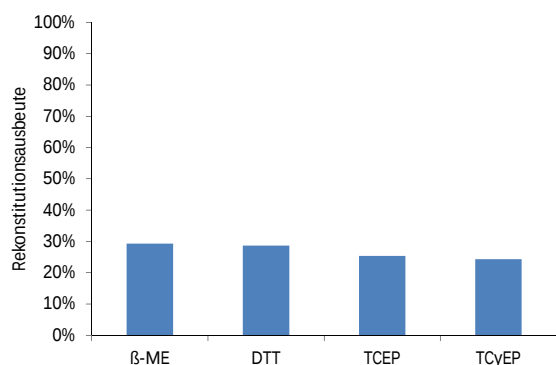


Abbildung III.1.1.: Einfluss verschiedener Reduktionsmittel auf die Rekonstitutionsausbeute. Vergleich der negativen Elliptizität bei 493 nm nach Rekonstitution des LHCII mit 120 μ M LHCP, 3,3 mM Pigmenten und 10 mM des jeweiligen Reduktionsmittels.

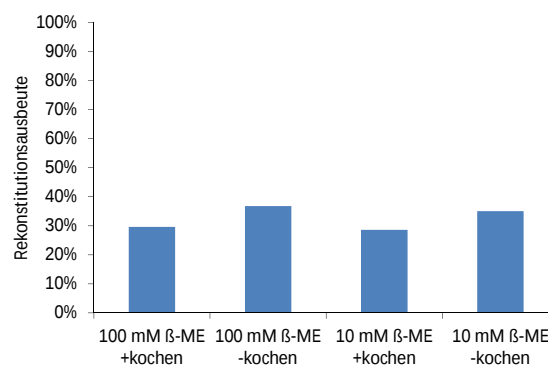


Abbildung III.1.2.: Einfluss der β-ME Konzentration und Hitzedenaturierung auf die Rekonstitutionsausbeute. Vergleich der negativen Elliptizität bei 493 nm nach Rekonstitution des LHCII mit 120 μ M LHCP, 3,3 mM Pigmenten und 10 mM bzw. 100 mM β-ME. Bei der Hälfte der Proben erfolgte eine Hitzedenaturierung des LHCP im RK2 bei 100°C im Wasserbad (1 min). Bei diesen Proben wurde β-ME erst nach Abkühlen auf Raumtemperatur zugegeben, dann erfolgte die Rekonstitution.

gabe zum RK1 (3,3 mM Endkonz.) erfolgte die Induktion der Faltung durch Mischen der beiden Puffer. Die Proteinkonzentration lag bei 120 μ M LHCP des Klons 90/196 im RK2, die maximale Komplexausbeute bei theoretischen 100% Rückfaltung betrug 60 μ M LHCII. Die tatsächliche Rekonstitutionsausbeute der einzelnen Ansätze wurde CD-spektroskopisch überprüft. Abb. III.1.1 zeigt einen Vergleich der Rekonstitutionsausbeuten, die anhand der negativen Elliptizität bei 493 nm mit dem unter Abschnitt 1.1.5 ermittelten Extinktionskoeffizienten berechnet wurden. Die 493 nm-Absorption im CD-Spektrum wurde in dieser Arbeit als Maß für den Rekonstitutionserfolg herangezogen, da in den hier beschriebenen Ansätzen nur der LHCII ein negatives Signal bei dieser Wellenlänge lieferte. Wie später gezeigt wird, korreliert dieser Wert direkt mit der Konzentration der in Lösung befindlichen Komplexe.

Die verschiedenen Reduktionsmittel hatten nur einen geringen Einfluss auf die Rekonstitutionsausbeute. Die besten Ergebnisse zeigten β-ME und DTT, aber auch TCEP und TCyEP brachten nur einen geringfügig schlechteren Rekonstitutionserfolg. Im Folgenden wurden alle weiteren Versuche unter Verwendung von β-ME durchgeführt, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit mit anderen Rekonstitutionsprotokollen zu wahren.

In einem weiteren Versuchansatz wurde der Einfluss der β-ME-Konzentration überprüft und gleichzeitig die Notwendigkeit einer Hitzedenaturierung des LHCP vor der Rekonstitution getestet. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen des Reduktionsmittelvergleiches, jedoch wurde

bei Proben mit einem Hitzedenaturierungsschritt β -ME erst nach Abkühlen zum RK2 gegeben.

Abb. III.1.2 zeigt einen Vergleich der Ergebnisse der CD-spektroskopischen Untersuchung wie im vorigen Versuch. Die Erhöhung der β -ME-Konzentration zeigte keinerlei Einfluss auf die Rekonstitutionsausbeute, jedoch war ein negativer Effekt durch die Hitzedenaturierung zu erkennen. Dieser wurde daraufhin weggelassen, solange der RK2 nach Solubilisierung des LHCP vollständig klar war, da hier von monodispers vorliegendem LHCP ausgegangen werden konnte.

1.1.2. Adaption der Pufferzusammensetzung

Die Zusammensetzung des Pigment- (RK1) und Proteinpuffers (RK2) ist essentiell für eine erfolgreiche Rekonstitution des LHCII. Da bei Verwendung des „Stopped Flow/Freeze-Quench“-Setups, im Vergleich zu den Arbeiten von R. Horn (Horn (2004b)) und C. Dockter (Dockter (2009)), mit veränderten Pigment- und Proteinkonzentrationen gearbeitet wurde, mussten auch die Konzentrationen der Pufferkomponenten angepasst werden. Die Komposition der Mischmizellen hängt direkt von der Konzentration der eingesetzten Detergenzien ab und hat großen Einfluss auf die Ausbeute der Rekonstitution (Dockter (2009)).

Der RK1 enthält eine Mischung aus den nicht-ionischen Detergenzien Octylglucosid (OG) und Triton X-100 (Tx), geringe Mengen des ionischen Detergenz Deoxycholat (Dxc), sowie ein Lipid (Phosphatidylglyzerin (PG)) zur Stabilisierung der Komplexe. Diese wurden in ihren Konzentrationen variiert um eine optimale Pufferzusammensetzung zu erreichen. Die weiteren Komponenten des Puffers wurden konstant gehalten, da ihr Effekt auf die Rekonstitutionsausbeute als gering eingestuft wurde.

Abb. III.1.3 zeigt die CD-spektroskopische Auswertung des Detergenztests. Es wurden 120 μ M des Klons 90/196 im RK2 eingesetzt, und je 100 μ l RK2 mit 100 μ l RK1 gemischt. Die Konzentration des Gesamtchlorophylls (*chl a* + *chl b*) im RK1 betrug 3,3 mM. Es wurde für alle Ansätze das gleiche Pigmentaliquot verwendet.

Die CD-spektroskopische Auswertung zeigte, dass besonders das Verhältnis der beiden Detergenzien OG und Tx zueinander große Auswirkung auf die Rekonstitutionsausbeute hatte. Auch eine Erniedrigung der Dxc-Konzentration beeinflusste die Ausbeute negativ. In Abb. III.1.3 lag die maximale Faltungsausbeute bei nur 27% des eingesetzten LHCP. Da OG einen hohen Kostenfaktor in der Probenproduktion darstellte, wurden weitere Versuche nicht mit dem besten Ergebnis (8% OG, 2,5% Tx und 0,003% Dxc, Probe 1) durchgeführt, sondern die Konzentrationen gewählt, die Probe 12 in Tab. III.1.1 entsprachen (5% OG, 1,5% Tx, 0,03% Dxc), da das Rekonstitutionsergebnis mit 25% nur geringfügig schlechter war. Auch ließ sich dieser Puffer aufgrund der geringeren Viskosität der Stammlösung leichter pipettieren. Mit dieser Detergenz-

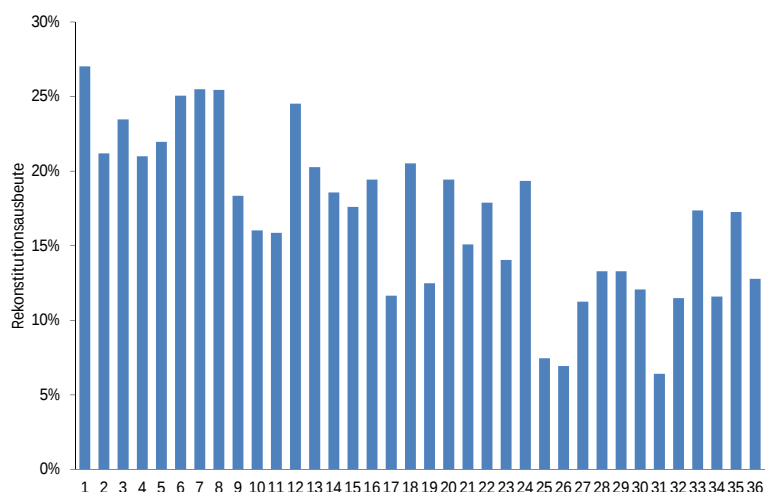


Abbildung III.1.3.: Test der RK1 Pufferkomponenten.Vergleich der Komplexausbeute des LHCII nach Rekonstitution mit verschiedenen Pigmentpuffern. Die Zusammensetzung der verwendeten Pigmentpuffer (RK1) kann Tab. III.1.1 entnommen werden. Klon: 90/196

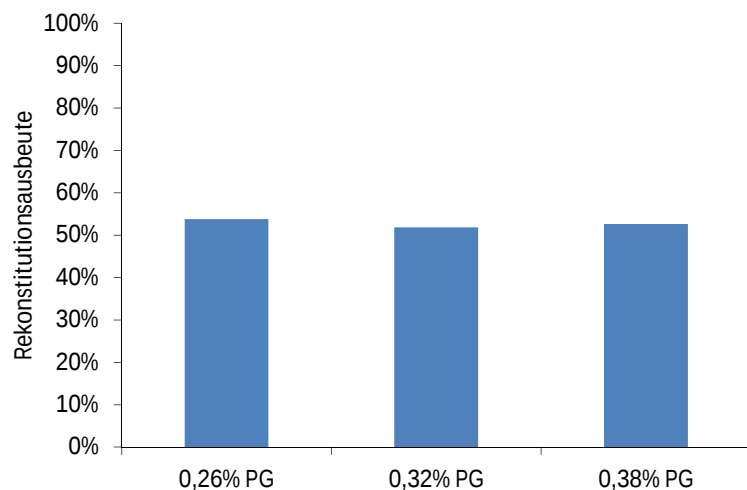


Abbildung III.1.4.: Variation der PG Konzentration.Vergleich der Komplexausbeute des LHCII nach Rekonstitution mit variierender PG-Konzentration im RK1. Die Puffer entsprachen Tab. III.1.1, Probe Nr. 12. Klon: C70Sh

Tabelle III.1.1.: Detergenz-Konzentrationen im RK1.

Zusätzlich zu den angegebenen Detergenzkonzentrationen enthielten die Puffer 50 mM Li-Borat pH 8,1, 10 mM β -ME, 12,5 Sacc., 0,26% PG. RK2: 1% LDS, 50 mM Li-Borat pH 8,1, 120 μ M LHCP, 10 mM β -ME, 12,5% Sacc.

Nr.	OG	Tx	Dxc
1	8%	2,5%	0,03%
2	7%	2,5%	0,03%
3	6%	2,5%	0,03%
4	5%	2,5%	0,03%
5	8%	2,0%	0,03%
6	7%	2,0%	0,03%
7	6%	2,0%	0,03%
8	5%	2,0%	0,03%
9	8%	1,5%	0,03%
10	7%	1,5%	0,03%
11	6%	1,5%	0,03%
12	5%	1,5%	0,03%
13	8%	2,5%	0,02%
14	7%	2,5%	0,02%
15	6%	2,5%	0,02%
16	5%	2,5%	0,02%
17	8%	2,0%	0,02%
18	7%	2,0%	0,02%
19	6%	2,0%	0,02%
20	5%	2,0%	0,02%
21	8%	1,5%	0,02%
22	7%	1,5%	0,02%
23	6%	1,5%	0,02%
24	5%	1,5%	0,02%
25	8%	2,5%	0,01%
26	7%	2,5%	0,01%
27	6%	2,5%	0,01%
28	5%	2,5%	0,01%
29	8%	2,0%	0,01%
30	7%	2,0%	0,01%
31	6%	2,0%	0,01%
32	5%	2,0%	0,01%
33	8%	1,5%	0,01%
34	7%	1,5%	0,01%
35	6%	1,5%	0,01%
36	5%	1,5%	0,01%

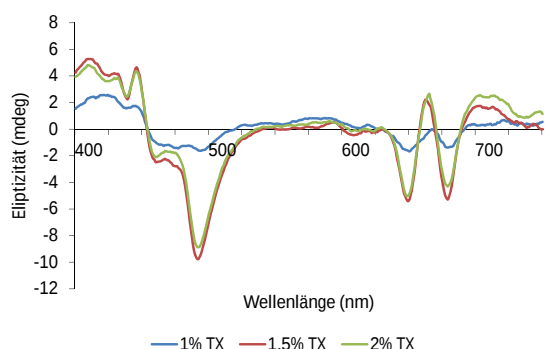


Abbildung III.1.5.: Einfluss der TX-Konzentration auf die Rekonstitutionsausbeute. CD-Spektren der Rekonstitution mit variierenden TX-Konzentrationen. Zusätzlich zu den angegebenen Detergenzkonzentrationen enthielten die Puffer 5% OG, 0,26% Na-Deoxycholat, 50 mM Li-Borat pH 8,1, 10 mM β -ME, 12,5 Sacc., 0,26 % PG. RK2: 1% LDS, 50 mM Li-Borat pH 8,1, 90 μ M LHCP (Klon: 90/196), 10 mM β -ME, 12,5 % Sacc.

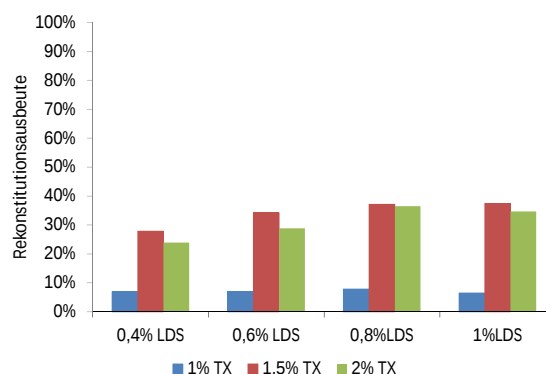


Abbildung III.1.6.: Einfluss der LDS und TX-Konzentration. Vergleich der Komplexausbeute nach Rekonstitution des LHCII mit variierender TX Konzentration im RK1 sowie LDS Konzentration im RK2. Sonstige Parameter wie in Abb. III.1.5.

mischung wurde der Einfluss der Lipidkonzentration getestet. Zwar zeigte eine Variation der PG-Konzentration keine messbaren Auswirkungen auf den Rekonstitutionserfolg, jedoch konnten mit dem cysteinfreien Klon C79Sh, der in diesem Test verwendet wurde, Rekonstitutionsausbeuten von über 50% erzielt werden (Abb. III.1.4).

Da eine zu hohe LDS-Konzentration im RK2 dazu führen konnte, dass der LHCP beim Mischen mit RK1 in einer pigmentfreien LDS-Mizelle verblieb, und es zu keiner Induktion der Faltung kam, wurde in einem weiteren Versuchsansatz der Einfluss LDS-Konzentration auf die Faltungsausbeute getestet. Dies geschah in Abhängigkeit der Tx-Konzentration im RK1, da sich diese Detergenzkonzentration als besonders wichtig für den Rekonstitutionserfolg gezeigt hat. Jedoch war bei einer LDS-Konzentration zwischen 0,4 und 1 % keine Veränderung der Rekonstitutionsausbeute festzustellen. Die besten Ergebnisse wurden hier mit einer 1,5%igen Tx-Konzentration erzielt, geringere Konzentrationen verhinderten die Rückfaltung.

1.1.3. Einfluss der Pigmente

Die Rekonstitution des LHCII wird neben der Pufferumgebung vor allem durch die Qualität und die Verfügbarkeit der zur Komplexbildung angebotenen Pigmente beeinflusst. Die folgenden Versuche zielten darauf ab, die Rekonstitutionsbedingungen unter diesen Aspekten zu optimieren.

Im Pigmenttotalextrakt aus *pisum sativum* stellen die Xanthophylle Neoxanthin, Violaxan-

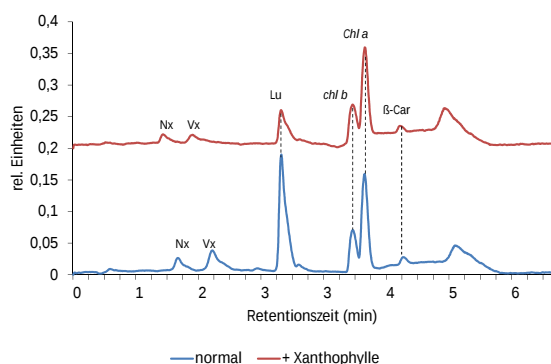


Abbildung III.1.7.: Anreicherung des Totalextraktes mit Xanthophyllen. HPLC-Spektren von Pigmenttotalextrakt aus *Pisum Sativum* vor und nach Anreicherung mit isolierten Xanthophyllen.

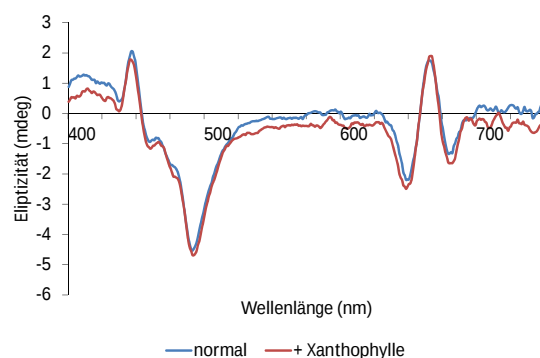


Abbildung III.1.8.: Rekonstitution mit angereichertem Totalextrakt. CD-Spektren des Rekonstitutionsergebnisses. RK2: 120 μ M LHCP, Klon 90/196.

thin und Lutein den geringsten Anteil. Insbesondere Lutein ist jedoch essentiell für die Komplexbildung des LHCII, da es bei Mangel an anderen Xanthophyllen zum Teil deren Bindestellen besetzen und so die Faltung des LHCII ermöglichen kann (Hobe et al. (2000)). Um einen limitierenden Einfluss der Luteinmenge auszuschließen, wurde der Totalextrakt mit einer Xanthophyllmischung angereichert (Abb. III.1.7) und eine Rekonstitution durchgeführt (Abb. III.1.8). Dazu wurden parallel zwei 1 ml Aliquots RK1 mit 3 mg TE versetzt und bei 15000 RPM (Hettich EBA 12, Rotor 1124) zentrifugiert, um unlösliche Pigmentaggregate zu entfernen. Zu einem wurden zusätzlich 200 μ g einer Xanthophyllmischung (Lu, Vx, Nx, ca. 4:1:1), gelöst in 30 μ l eiskaltem p.A. Ethanol, hinzugegeben. Die Rekonstitution erfolgte mit 100 μ l RK1 und 100 μ l RK2, welcher 120 μ M LHCP des Klons 90/196 enthielt. Wie an den CD-Spektren in Abb. III.1.8 zu erkennen ist, konnte auch auf diesem Wege keine Steigerung der Komplexausbeute erreicht werden. Dies sprach dafür, dass die Xanthophyllkonzentration nicht der limitierende Faktor der Faltungsausbeute war.

Ein weiteres Problem war die geringe Stabilität der Pigmente im RK1. Bereits nach kurzer Zeit kam es zu Aggregationen, welche die Rekonstitutionsausbeute stark einschränkten und eine spektroskopische Auswertung verhinderten. Die benötigte Pigmentkonzentration für eine erfolgreiche Rückfaltung des LHCII wurde über Rekonstitutionen mit 120 μ M LHCP des Klons C3.2h im RK2 und steigender Pigmentmenge im RK1 determiniert.

Abb. III.1.9 zeigt die CD-spektroskopische Auswertung des Rekonstitutionsergebnisses. Als Messpunkte dienen hier für die Monomerausbeute wiederum die negative Elliptizität bei 493 nm, für den Grad an Pigmentaggregation die positive Elliptizität bei 700 nm (Agostiano et al. (1993)). Es konnte beobachtet werden, dass bis zu einem Überschuss von drei Mol Gesamtchloro-

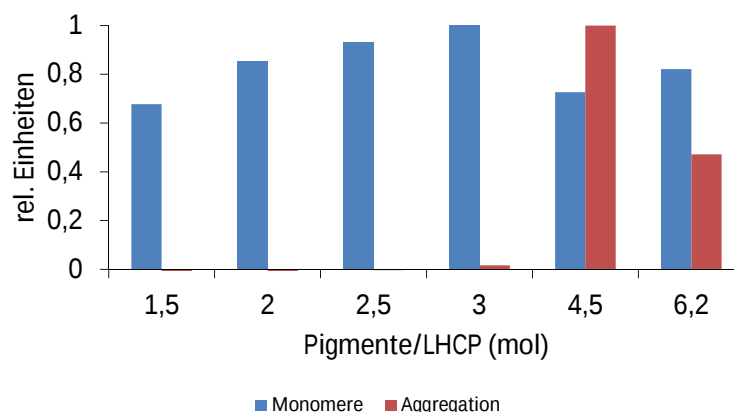


Abbildung III.1.9.: Rekonstitutionsausbeute in Abhängigkeit des Pigment/LHCP Verhältnisses. Es wurden Rekonstitutionen mit steigenden Pigmentkonzentrationen im RK1 durchgeführt. Andere Komponenten des RK1 wurden nicht variiert. RK2: 120 μ M LHCP, Klon C3.2h.

phyll pro Mol LHCP eine Zunahme der Rekonstitutionsausbeute zu verzeichnen war, bei höheren Pigmentkonzentrationen schränkte die zunehmende Aggregation der Pigmente die Ausbeute ein.

Da jedoch auch ein dreifacher molarer Überschuss an Pigmenten bedeutete, dass Chlorophylle in Konzentrationen von 18,75 mg/ml in Ethanol gelöst werden mussten, stellte auch diese Menge ein experimentelles Problem dar.

Das Aggregationsverhalten der Pigmente im RK1 wurde weiter untersucht, da eine höhere Stabilität eine wesentlich einfachere Produktion zeitaufgelöster Proben im „Stopped-Flow/Freeze-Quench“-System ermöglichen würde. Durch ein stabiles Puffersystem könnten Proben vieler verschiedener Alterungsgrade aus einem Ansatz angefertigt werden.

Die Aggregation der Pigmente im RK1 wurde über einen Zeitraum von 50 min im CD-Spektroskop gemessen (Abb. III.1.10). Die Aggregation äußerte sich nach 20 min in einer Zunahme der Absorption bei 700 nm. Verglich man diese Ergebnisse mit der Entwicklung der Komplexausbeute einer Rekonstitution mit alterndem RK1 (Abb. III.1.11), sah man die direkte Auswirkung der zunehmenden Aggregation auf die Faltungsausbeute. War mit einem Pigmentpuffer nach 30 min die Rekonstitutionsausbeute mit 28% nur geringfügig niedriger als mit frischem RK1 (30% Rekonstitutionsausbeute), sank diese mit 60 min altem RK1 auf nur 12%. Dies bedeutete für die zeitaufgelösten Proben, dass nur ein Zeitfenster von 20-30 min zur Probenproduktion zu Verfügung stand.

Zur näheren Untersuchung des Ursprungs der Aggregation, wurde der Pigmentpuffer nach einer Stunde zentrifugiert und eine Butanolextraktion von Überstand und Pellet durchgeführt.

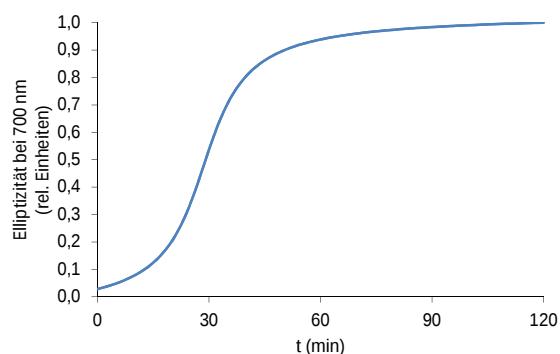


Abbildung III.1.10.: Aggregation der Pigmente im RK1. Messung der Elliptizität bei 700 nm im RK1 über Zeit im CD-Spektroskop. Die Messung wurde direkt nach der Zugabe der Pigment zum RK1 gestartet. 0,1 mm Quarz Küvette, 4°C.

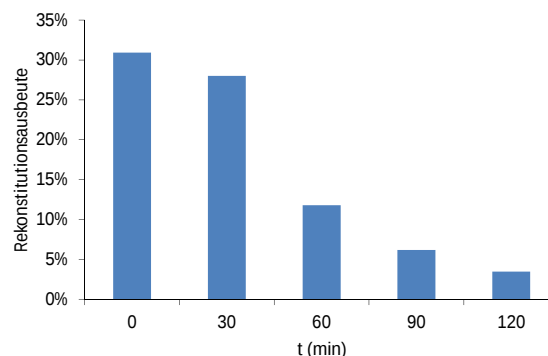


Abbildung III.1.11.: Rekonstitutionsausbeute mit altem RK1. Es erfolgte alle 30 min eine Rekonstitution. Die Faltungszeit betrug 10 min. Klon: 90/196.

Durch Mischen von 50 µl des Überstandes, 33 µl Butanol und 16,5 µl 5 M NaCl konnte eine Phasentrennung erreicht werden. Das Pellet wurde direkt in 33 µl Butanol gelöst und 16,5 µl 5 M NaCl hinzugefügt. Nach Zentrifugation bei 12000 rpm (Hettich EBA 12, Rotor 1124) wurden 20 µl des Überstandes in 100 µl 70 % Aceton gelöst und in der HPLC vermessen. Abb. III.1.12 zeigte, dass neben einem Teil *chl a*, *chl b*, Violaxanthin, Neoxanthin und Lutein fast das gesamte β -Carotin pelletierte.

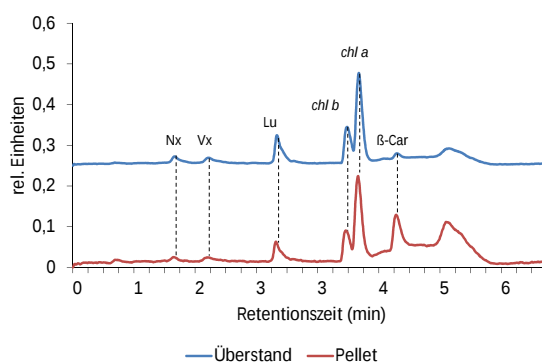


Abbildung III.1.12.: HPLC Spektren der Pigmentextraktion aus Pellet und Überstand des RK1 nach Butanol-Extraktion. Auftragsvolumen 20 µl.

Hier lag die Vermutung nahe, dass β -Carotin auch für die restlichen Pigmente als Aggregationskeim dienen könnte. Da β -Carotin im LHCII nicht gebunden wird und somit für die Rückfaltung kein essentielles Pigment darstellt, wurde im Folgenden die Rekonstitution mit Einzelpigmenten getestet. Die Mischung von Xanthophyllen und Chlorophyllen erfolgte in Stöchiometrien, die

dem Vorkommen der Pigmente im LHCII entsprach (Abb. III.1.13). Es wurden 1,44 mg *chl a* (1,61 μmol), 1,08 mg *chl b* (1,2 μmol), 0,23 mg Lutein (0,4 μmol) und je 0,12 mg Vx/Nx (0,2 μmol) in insgesamt 160 μl eiskaltem Ethanol gelöst und zu 840 μl RK1 gegeben.

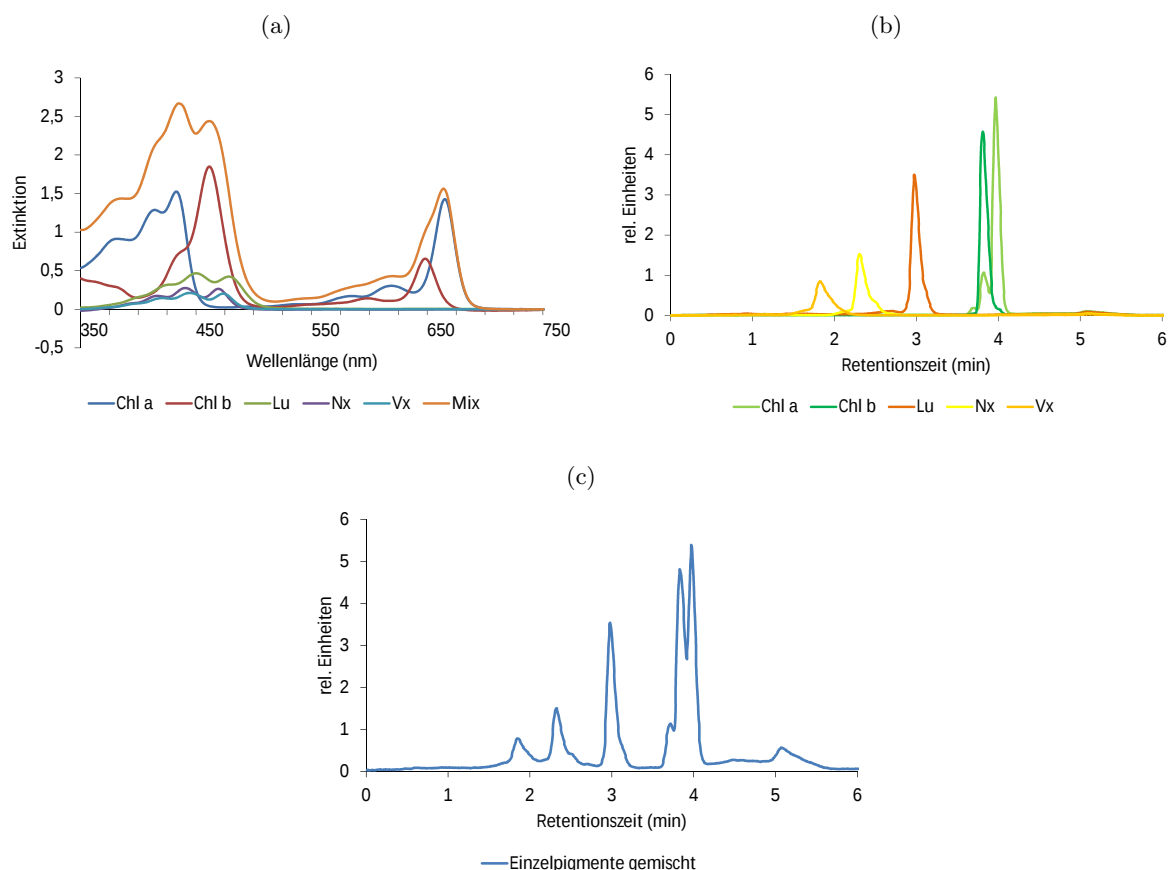


Abbildung III.1.13.: Spektren der Einzelpigmente. (a) Absorptionsspektren der Einzelpigmente und des Pigmentgemisches. Gemessen in einer 1 cm Küvette aus optischem Spezialglas (OG). Pigmente in 70 % Aceton. (b) HPLC-Spektren der Einzelpigmente. Auftragsvolumen 20 μl . (c) HPLC-Spektrum der Pigmentmischung. Auftragsvolumen 20 μl .

Die gemischten Einzelpigmente wurden zunächst auf ihr Aggregationsverhalten im RK1 untersucht und mit Totalextrakt verglichen (Abb. III.1.14). Nach 50 min konnte im Gegensatz zum Totalextrakt (TE) keine Aggregation festgestellt werden. Eine Zentrifugation des RK1 nach Zugabe des TE führte zu einer Verringerung der Aggregation (Abb. III.1.14, roter Graph). Die Rekonstitution mit Einzelpigmenten brachte Ausbeuten, die mit denen unter Verwendung von Totalextrakt erzielten vergleichbar waren. Es war hier auch eine Rekonstitution mit bereits 24h altem RK1 möglich (Abb. III.1.15). Jedoch zeigte sich bei weiteren Versuchen, dass die gelagerten Einzelpigmente im getrockneten Zustand wesentlich instabiler als Totalextrakt waren, was

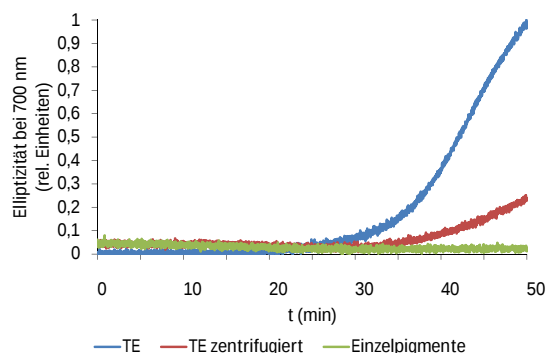


Abbildung III.1.14.: Aggregation der gemischten Einzelpigmente im RK1. Messung der Elliptizität bei 700 nm im RK1 über Zeit im CD-Spektroskop

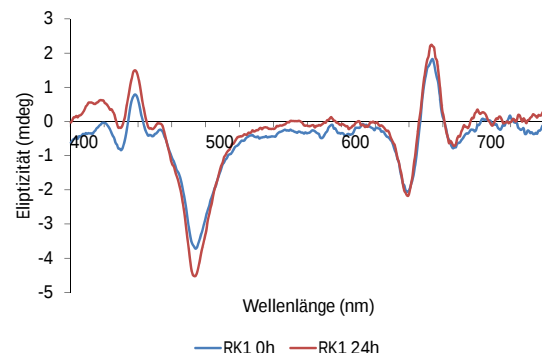


Abbildung III.1.15.: Einzelpigmentrekonstitution mit alterndem RK1. Dem mit Einzelpigmenten versetzten RK1 wurde nach den angegebenen Zeiten je 50 µl entnommen und eine Rekonstitution mit 50 µl RK2 durchgeführt, der 90 µM LHCP des Klon 90/196 enthielt.

zu unbrauchbaren Proben führen konnte. Verbunden mit dem großen experimentellen Aufwand zur Gewinnung der Pigmente, stellte dieses Vorgehen keine Alternative zur Verwendung von Totalextrakt dar.

Da die Zusammensetzung des Totalextraktes nicht der limitierende Faktor der Rekonstitutionsausbeute zu sein schien, lag die Vermutung nahe, dass die zur Rückfaltung angebotene Pigmentmenge die Komplexausbeute einschränkte. Durch eine Quantitative Butanolextraktion der Pigmente aus RK1 nach Zentrifugation wurde überprüft, wie viele Pigmente dem LHCP tatsächlich zur Rekonstitution zur Verfügung standen.

Es wurden 3 x 50 µl aus dem mit Pigmenten versetzten, zentrifugierten (10.000 g, 1 min) RK1 entnommen und mit 66 µl Butanol und 33 µl 5 M NaCl versetzt und gevortext. Nach Zentrifugation (Hettich EBA 12, Rotor 1124) und Entnahme des Überstandes, konnten die restlichen Pigmente aus der wässrigen Phase mit 100 µl Butanol nachextrahiert werden. Die zwei Butanolphasen jedes Ansatzes wurden in je einem gewogenen 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt. Davon wurden 10 µl mit 990 µl 70 % Aceton versetzt und in der HPLC vermessen. Die gemittelten Ergebnisse sind in Abb. III.1.16 und Tab. III.1.2 dargestellt. Die eingesetzten Pigmentmengen ergaben sich aus den Stöchiometrien des eingesetzten Totalextraktes und betrugen 0,33 mM Nx & Vx, 0,7 mM Lu, 1,1 mM chl b und 2,5 mM chl a. Daraus resultierte, dass ca. 70 % der eingesetzten Xanthophylle, 90 % des chl b und nur 55% chl a zur Rekonstitution zur Verfügung standen. Die tatsächlichen molaren Verhältnisse bei der Rekonstitution bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge sind in Tab. III.1.2 berechnet. Folglich war die Komplexausbeute in der Verdünnungsrekonstitution durch die Pigmentverfügbarkeit im RK1 limitiert.

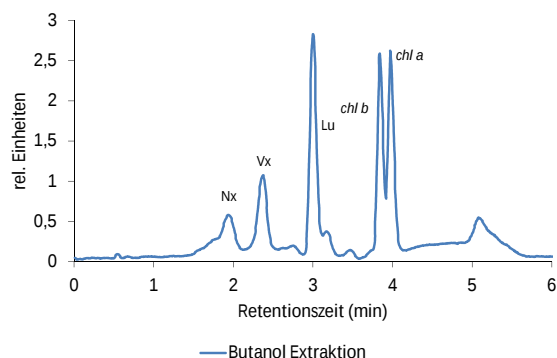


Abbildung III.1.16.: RK1-Butanolextraktion. HPLC-Spektrum der Pigmente nach quantitativer Butanol-Extraktion aus RK1.

Tabelle III.1.2.: Pigmentstöchiometrien im RK1. Menge der Pigmente im RK1 nach quantitativer Butanolextraktion. 120/90/60= Überschuss an Pigmenten pro Bindestelle im LHCP bei eingesetzten Proteinkonzentrationen von 120/90/60 textmu M

Pig.	n(ng)	c(mM)	120	90	60
Nx	8,5	0,24	2	3	4
Vx	7,8	0,22	1,8	2,8	3,7
Lu	18,4	0,55	2,3	3,4	4,6
Chl b	52,2	0,99	1,4	2,1	2,7
Chl a	74,4	1,39	1,4	2,2	2,9

1.1.4. Anpassung der Proteinkonzentration

Für DEER-Messungen ist neben der Signalstärke das Verhältnis von Signal zu Hintergrund ausschlaggebend. Da die Komplexausbeute durch die Löslichkeit der Pigmente limitiert ist, sollte durch eine Senkung der Proteinkonzentration eine Verschiebung des LHCII zu LHCP Verhältnisses zugunsten der gefalteten Komplexe erreicht werden. Dazu wurden Rückfaltungen nach Standardprotokoll der Verdünnungs-Rekonstitution mit verschiedenen Proteinkonzentrationen und gleichbleibender Pigmentkonzentration durchgeführt. Die Bestimmung der Komplexausbeute erfolgte im CD-Spektroskop und über eine Deriphat-PAGE.

Abb. III.1.17 zeigt einen Vergleich der Rekonstitutionsergebnisse. Die untere Bande zeigt den gefalteten Komplex, die obere LHCP. Es ist zu erkennen, dass die Bandenstärke zwischen den verschiedenen Proteinkonzentrationen eines Klonen zwischen beiden Doppelcysteinmutanten (90/196 & 106/160) nicht stark variierte. Klon C79Sh zeigte eine geringe Abnahme der Bandenstärke bei einer Proteinkonzentration von 60 μ M. Insgesamt fiel bei diesem Klon die Komplexausbeute deutlich stärker aus als bei den Cystein tragenden Klonen. Im CD-Spektrum wiesen der Klon 90/196 & 106/160 nur ca. 50 % der Signalstärke (bei 493 nm) des Klons C79Sh (Abb. III.1.18) auf. Die Banden des ungefalteten LHCP nahmen mit sinkender Proteinkonzentration geringfügig ab, daraus ergab sich ein größeres LHCII/LHCP-Verhältnis mit geringeren LHCP-Konzentrationen.

Die Komplexausbeute schien neben der Pigmentkonzentration auch abhängig von der gewählten Mutante des LHCP zu sein. Da bei Klon C79Sh die Komplexausbeute mit 60 μ M LHCP im Gegensatz zu 90 μ M eingeschränkt war, erfolgte die weitere Probenproduktion mit 90 μ M LHCP im RK1. Damit sollte bei optimiertem LHCII/LHCP Verhältnis eine Limitation der Komplexausbeute durch die LHCP-Konzentration ausgeschlossen werden.

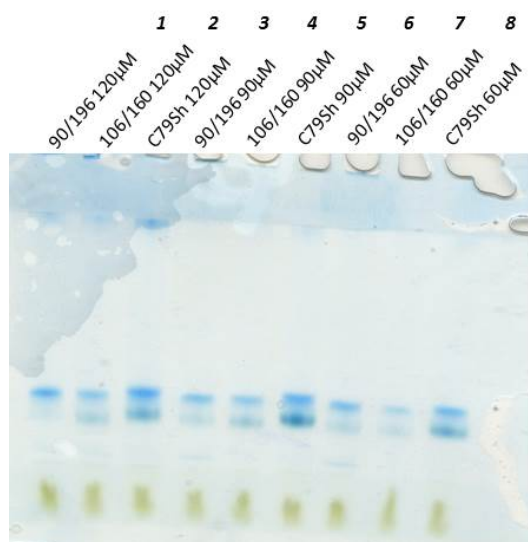


Abbildung III.1.17.: Deriphat-PAGE der LHCP Konzentrationsreihe. Es wurden je 3 µl Des Rekonstitutionsergebnisses aufgetragen. Parameter: 40 V, 30 min; 80 V 5 std.. das Gel wurde mit Coomassie für 20 min gefärbt und ÜN entfärbt.

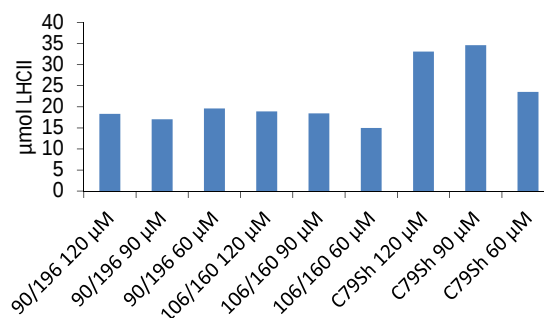


Abbildung III.1.18.: LHCP-Konzentrationsreihe. Vergleich der negativen Elliptizität bei 493 nm des LHCII nach Rekonstitution mit verschiedenen LHCP-Konzentrationen im RK2 und RK1 mit 3,3 mM TE (alle Proben).

1.1.5. CD-spektroskopische Bestimmung der Rekonstitutionsausbeute

Die densitometrische Auswertung schwach denaturierender Deriphat-Gele von Rekonstitutionsansätzen ist aufgrund vieler möglicher Fehlerquellen eine relativ ungenaue und langwierige Methode zur Bestimmung der Komplexausbeute. Deshalb wurde eine Konzentrationsreihe aufgereinigter LHCII-Monomere parallel im CD- und Absorptionsspektroskop untersucht, um so den Zusammenhang der CD-Absorption bei 493 nm in Abhängigkeit der Komplexkonzentration zu messen. Die Ergebnisse sind in Abb. III.1.19. Es konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Peakintensität bei 493 nm im CD-Spektrum und der LHCII-Konzentration nachgewiesen werden. Dieser galt allerdings nur für Proben, deren Extinktion geringer als 1 war. Mit zunehmender Verdünnung der Proben nahm die Qualität der CD-Spektren ab, was sich in der stärkeren Abweichungen dieser Messwerte vom linearen Trend widerspiegelt. Aus den ermittelten Werten wurde ein Extinktionskoeffizient ermittelt, mit dem die Quantifizierung des LHCII in ungereinigten Rekonstitutionsansätzen möglich war.

$$\epsilon_{LHCII,493nm,CD} = -38076490 \text{ mdeg} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

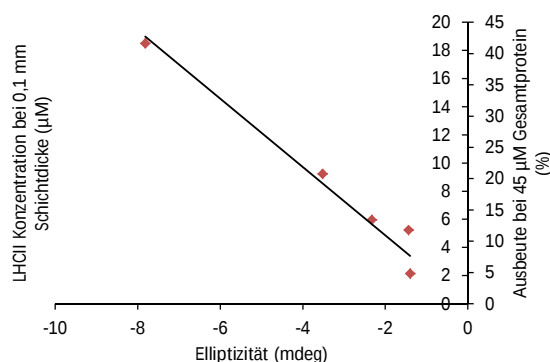


Abbildung III.1.19.: Konzentrationsreihe aufgereinigter LHCII-Monomere. Klon C3.2h, extrahiert aus Saccharosedichtegradienten mit 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 12,5 % Saccharose, 0,1% DM. Gemessen in 0,1 mm OG Küvette. Rechte Skala: Prozentuale Ausbeute bezogen auf eine Rekonstitution mit 45 µM LHCP Gesamtprotein (d.h. 90 µM LHCP im RK2 vor Rekonstitution).

1.2. Bestimmung der Markierungseffizienz

Die Qualität von DEER-EPR-Proben ist neben Reinheit und Proteinkonzentration auch stark von der Effizienz der ortsgerichteten Spinmarkierung abhängig. Eine niedrige Markierungseffizienz senkt die Qualität des Signals drastisch. Da in einem 4-Puls DEER-Experiment jeweils ein Elektronenspin observiert wird (Observer Spin), während ein anderer angeregt wird (Pump-Spin), darf jeweils nur ein Teil der Spinsonden angeregt werden. Die gleichzeitige Anregung zweier Spins in einem Protein ist nicht messbar. Da die Anregung willkürlich geschieht, tragen von Grund auf nicht alle markierten Positionen zur Signalbildung bei. Daher ist es umso wichtiger, dass so viele Proteine wie möglich doppelt markiert vorliegen. Eine Ausbeute von 50 % bedeutet, dass 50 % der Proteine einfach markiert, 25 % doppelt markiert und 25 % unmarkiert vorliegen. So liefern nur 25 % des Gesamtproteins einer Probe ein potentielles Signal. Die Markierungsausbeute konnte mittels Continuous-Wave-EPR gemessen und so die Spinkonzentration in unterschiedlichen Proben bestimmt.

Der in dieser Arbeit ausschließlich angewandte Spinmarker war 3-(2-Iodacetamido)-Proxyl (Proxyl-IAA). Um eine hohe Löslichkeit zu gewährleisten, wurden markierte Proteine über TCA-Fällungen präzipitiert und gewaschen. Zur Überprüfung der Markierungsausbeute wurden Proben mit markiertem LHCP und Mischungen aus LHCP und freiem Proxyl-IAA verglichen. Als Referenz diente ein Markierungsansatz des Klons C79Sh, der keine Cysteine enthält und somit nicht die Fähigkeit hat, SH-reaktive Spinmarker zu binden. Dem unmarkierten LHCP wurde freier Proxylmarker in zweifach molarem Überschuss zugegeben, da der verwendete Klon 90/196 zwei Markierungspositionen besaß. Die Primärdaten des CW-EPR Spektroskops wurden mithilfe des Programms MatLab und eines von der AG-Jeschke bereitgestellten, selbstgeschriebenen

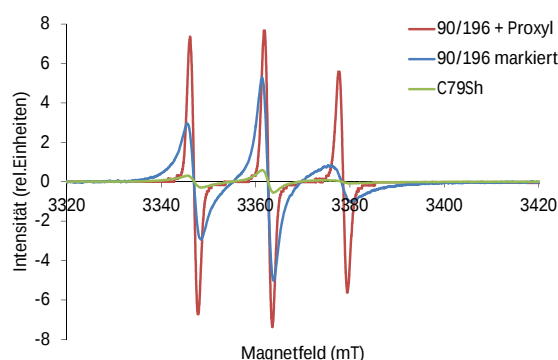


Abbildung III.1.20.: CW-EPR Spektren des Markierungstests. Primärdaten der CW-EPR Messung im Magnetech MiniScope MS200 Benchtop CW-EPR Spektroskop (X-band, 9.4 GHz). Field-Sweep = 200 G

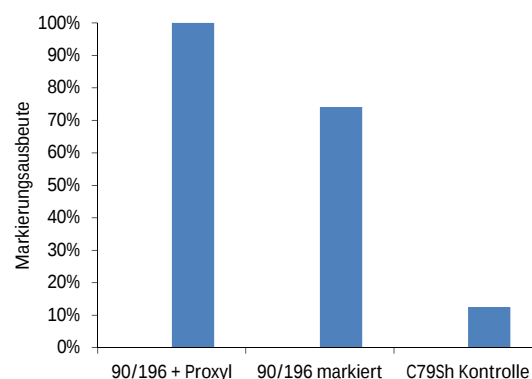


Abbildung III.1.21.: Markierungsausbeute. Prozentuale Markierungsausbeute bezogen auf die Referenz 90/196 + Proxyl. Verglichen wurde das zweite Integral des Hintergrundbereinigten CW-EPR Spekttrums aus Abb. III.1.20

Skripts ausgewertet. Durch doppelte Integration des CW-Spektrums konnte so die Spinkonzentration der Proben ermittelt und verglichen werden (Abb. III.1.20).

Die Markierungsausbeute betrug im Mittel 75 %. Es konnte jedoch auch in der Referenzprobe des Klon C79Sh eine Spinkonzentration von 12,5% festgestellt werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass während der Markierung entweder nicht der gesamte freie Proxylmarker aus den Ansätzen entfernt werden konnte, oder eine Markierung von Fremdproteinen stattgefunden hat.

1.3. Aufreinigung des LHCP

Da bei der Aufreinigung des LHCP nach Überexpression in *E. coli* kein spezifischer Trennungsschritt erfolgt, sind die extrahierten Inclusion Bodies zu einem geringen Teil mit Fremdproteinen kontaminiert. Da diese Fremdproteine aller Wahrscheinlichkeit nach Sulfhydrylgruppen besitzen, die in der Lage sind Spinmarker oder Fluoreszenzfarbstoffe zu binden, stellen sie bei Experimenten mit markiertem Protein eine schwer einzuschätzende Fehlerquelle dar. Schon eine geringe Menge an mehrfach markierbarem Fremdproteinen führt zu einem Störsignal. Fremdproteine mit benachbarten Cysteinen würden in DEER-EPR Experimenten im Auftreten falscher Abstände resultieren. Da unter Abschnitt 1.2 gezeigt wurde, dass dieses Grundsignal bei Versuchen mit spinmarkiertem LHCP zwar gering, jedoch vorhanden ist, sollte eine spezifische Aufreinigung des LHCP mittels präparativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese erreicht werden. Des weiteren sollte hiermit ein Einfluss der Fremdproteine auf die Rekonstitutionsausbeute bei Rückfaltung des LHCP zu LHCII ausgeschlossen werden.

Es wurde ein präparatives Gelelektrophoresesystem von BioRad verwendet (BioRad PrepCell).

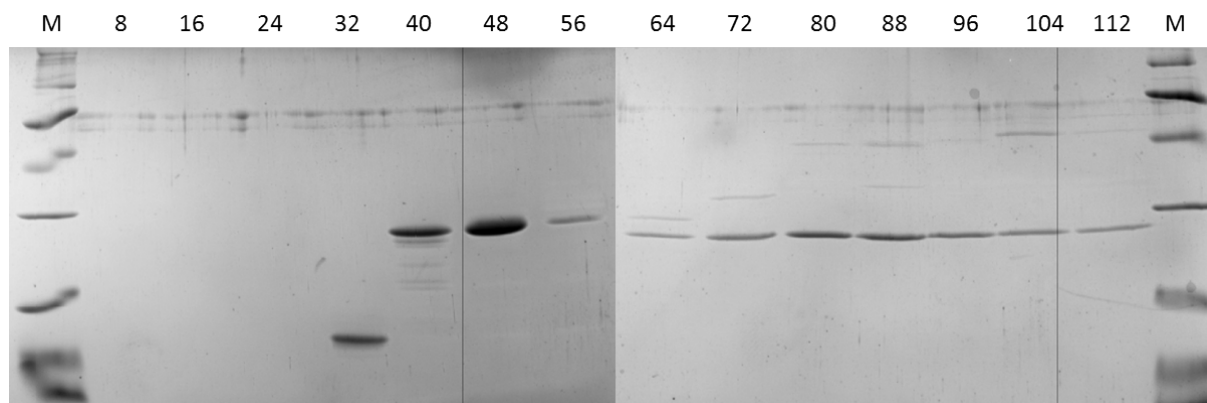


Abbildung III.1.22.: SDS-Page jeder achten Fraktion nach PrepPAGE. 15% SDS-PAGE, 180 V. M=Protein Test-Mix 6 Marker. Es wurden 2 x 20 μ M der Fraktionen der PrepPAGE aufgetragen. PrepPAGE Eluat: 0,1 % LDS, 25 mM Tris, 192 mM Glyzin, pH 8,3. Alle Proben wurden vor Auftrag mit 1/4 Volumen 4x Sparmix versetzt.

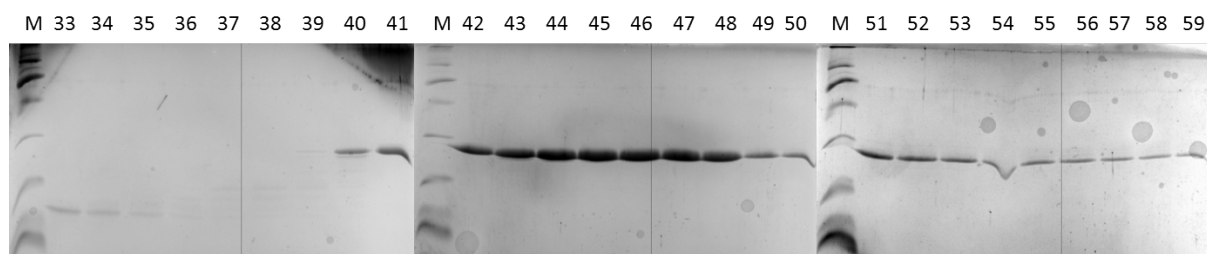


Abbildung III.1.23.: SDS-Page des PrepPAGE Laufs. 15% SDS-PAGE, 180 V. M=Protein Test-Mix 6 Marker. Es wurden 2 x 20 μ M der Fraktionen der PrepPAGE aufgetragen. PrepPAGE Eluat: 0,1 % LDS, 25 mM Tris, 192 mM Glyzin, pH 8,3. Alle Proben wurden vor Auftrag mit 1/4 Volumen 4x Sparmix versetzt.

Vor dem eigentlichen PrepPAGE-Lauf ist die Konzentration des zu verwendenden Trenngels mithilfe eines Testgels bestimmt worden. Dabei wurde der Abstand des LHCP zum nächsten Fremdprotein bestimmt. Da der molekulare Gewichtsunterschied unter 10 % lag, kamen 15 %ige Trenngele zum Einsatz. Pro Lauf wurden 50-75 mg IBs in 7,6 ml Probenpuffer aufgenommen und auf das Sammelgel appliziert. Die Auftrennung erfolgte für 20 h bei 12 W, 50 mA und 400 V. Die Sammelgeschwindigkeit wurde über eine angeschlossene Peristaltikpumpe (BioRad EconoPump) auf 0,2 ml/min gestellt. Die Fraktionsgröße betrug 2 ml bei 128 Fraktionen.

Zur Identifizierung der Fraktionen, welche das Zielprotein enthielten, wurde zunächst jede achte Fraktion auf ein 15 prozentiges SDS-Gel aufgetragen (Abb. III.1.22). Das Zielprotein trat hauptsächlich in den Fraktionen 40 & 48 auf, jedoch wiesen auch alle späteren Fraktionen eine Bande in diesem Molekulargewichtsbereich auf. Niedermolekulare Komplexe konnten bis zur Fraktion 40, Proteine mit höherem Molekulargewicht ab Fraktion 64 nachgewiesen werden. Der interessante Fraktionsbereich wurde anschließend detailliert über eine SDS-Page jeder Fraktion

untersucht (Abb. III.1.23). Der Großteil des LHCP eluierte in den Fraktionen 42-48. In diesen Fraktionen zeigten sich in der SDS-Page keine Fremdproteine.

Die Fraktionen 42 - 48 wurden vereinigt und eine essigsäure Acetonfällung durchgeführt. Zur Optimierung der Präzipitation ist die Proteinlösung zunächst mit 1 M Essigsäure auf pH 5,24 titriert worden. Dies entsprach dem isoelektrischen Punkt des LHCP, bei dem die niedrigste Löslichkeit in Aceton vorliegt. Nach Zugabe des 2,3fachen Volumen 100 %igen Acetons konnte das Protein abzentrifugiert, in 70 % Ethanol (p.A.) gewaschen und in Tris-Puffer aufgenommen werden. Die Reinheit des Proteins wurde per SDS-PAGE mit den ungereinigten IBs verglichen. Abb. III.1.24 zeigt die Aufreinigungsergebnisse separater Läufe. Das Ergebnis des Laufs mit den hier beschriebene Parametern entspricht Bahn Nr. 4 in Abb. III.1.24. Hier waren immer noch geringe Verunreinigungen mit niedermolekularem Fremdprotein zu beobachten, der Aufreinigungserfolg im Vergleich zu ungereinigten IBs (Abb. III.1.24, IB) war jedoch deutlich sichtbar. Es konnten jedoch bei 75 mg eingesetztem Ausgangsprotein nur 4,5 mg gereinigtes Protein wiedergewonnen werden.

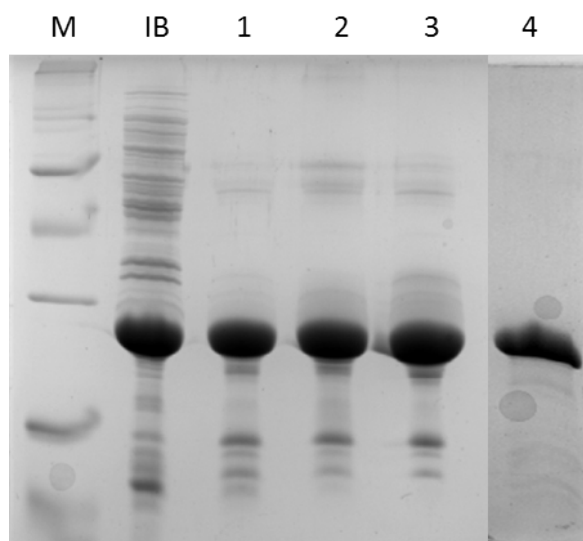


Abbildung III.1.24.: SDS-Page des aufgereinigten LHCP. 15 % SDS-PAGE, 180 V. M=Protein Test-Mix 6 Marker. Es wurden 2 x 20 μ M der Fraktionen der PrepPAGE aufgetragen. PrepPAGE Eluat: 0,1 % LDS, 25 mM Tris, 192 mM Glyzin, pH 8,3. Alle Proben wurden vor Auftrag mit 1/4 Volumen 4x Sparmix versetzt.

Mit den aufgereinigten Proteinen wurden Verdünnungs-Rekonstitutionen nach Standardprotokoll mit einer Proteinkonzentration von 90 μ M LHCP, durchgeführt, um Effekte der Fremdproteine auf die Faltungsausbeute zu überprüfen. Die Anfertigung von EPR-Proben diente dem Vergleich der Probenqualität zur Standardmethode. Da die Ausbeute des aufgereinigten Proteins sehr gering war, sind die EPR-Proben, ohne Verwendung der Stopped-Flow, per Hand

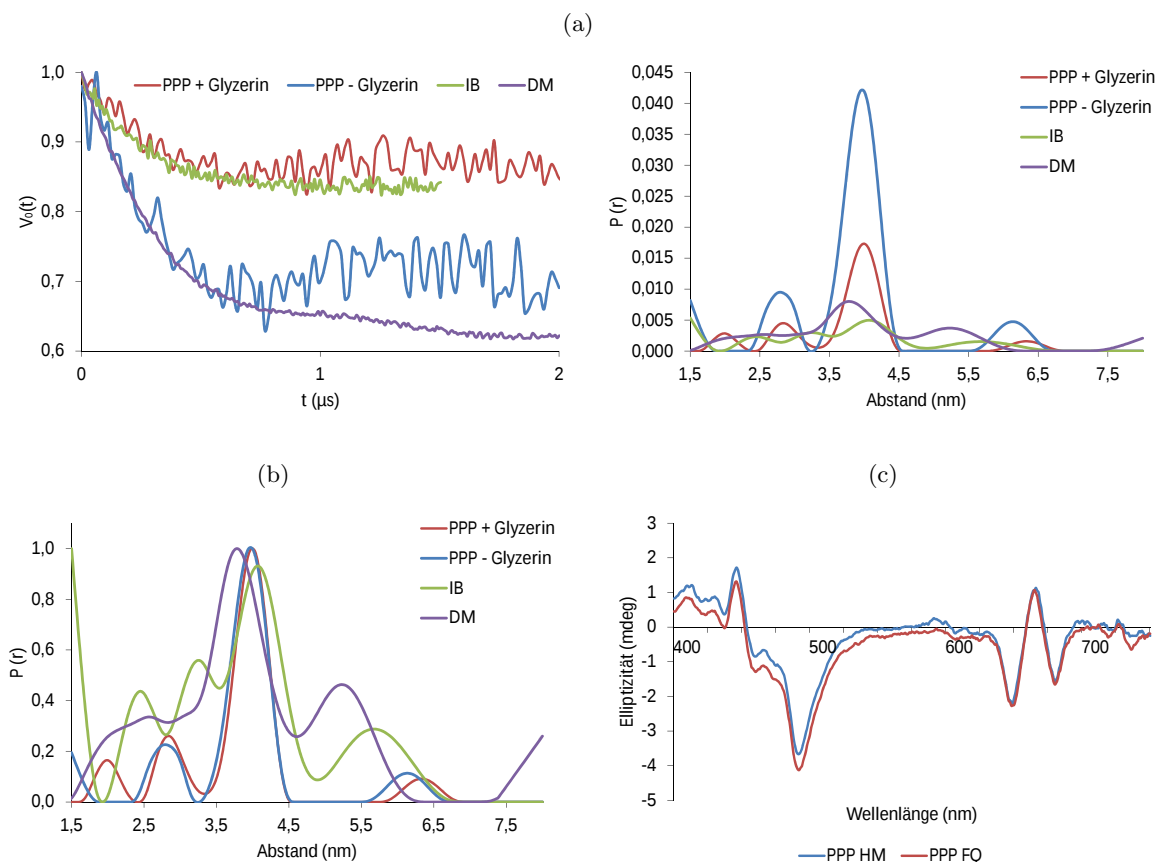


Abbildung III.1.25.: Primärdaten und Abstandsverteilungen der Rekonstitutionen mit aufgereinigtem LHCP. (a) PPP = Prep. PAGE aufgereinigt; IB = Reko mit ungereinigten Inclusion Bodies; DM = über Saccharosedichtegradienten aufgereinigte LHCII Proben in DM-Micellen; PPP-HM = Rekonstitution mit aufgereinigten IB per VD-Reko durch manuelles mischen; PPP-FQ = Rekonstitution mit aufgereinigten IB per VD-Reko durch Stopped-Flow/Freeze-Quench-Apparatur; links: Primärdaten des 4-Puls-DEER-Experiments. Rechts: Abstandsverteilungen, abgeleitet aus DEER-Spektrum (nicht gezeigt) durch Tikhonov-Regularisierung mit berechneter L-Kurve. Parameter der PPP-Proben: Dipolare Evolutionszeit = 3000 ns, CutOff = 2088 ns, Start der Hintergrundkorrektur = 672 ns, $\varnothing$ Abstand = 3,8 nm. Die Parameter der anderen Proben können Abb. III.1.33 entnommen werden. (b) Auf Maximalamplitude = 1 normierte Abstandsverteilung aus Abb. III.1.25 (c) CD-Spektren der Rekonstitutionen mit aufgereinigtem LHCP. Klon 90/196, 90 μ M LHCP in RK2. 3,3 mM Pigmente in RK1. 0,1 mm Quarz Küvette, 4°C.

gemischt worden, da so die Verwendung geringerer Volumina möglich war. Eine Probe wurde mit 27% Glycerin versetzt, in ein EPR-Röhrchen gefüllt und in flüssigem Stickstoff gefroren, bei einer zweiten erfolgte das Schockfrieren per Freeze-Quench. Dabei musste die Lösung direkt auf die Silberwalzen pipettiert werden. Ein Teil dieser Probe wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und CD-spektroskopisch vermessen.

Es zeigte sich, dass die Aufreinigung keinen positiven Effekt auf die Komplexausbeute der Verdünnungs-Rekonstitution hatte, die Proben zeigten vor und nach Frieren ein CD-Spektrum, das in Form und Amplitude den mit ungereinigten IBs produzierten Komplexen entsprach (Abb. 1.24(c)). Die EPR-Proben wiesen jedoch eine Verbesserung des Signals im Vergleich zu ungereinigten IBs auf. Sie zeigten sogar einen deutlicheren Peak als Komplexe in DM, die nach Detergenzwechsel-Rekonstitution über Saccharosedichtegradienten aufgereinigt worden waren (Abb. III.1.25). Zur besseren Vergleichbarkeit der Signalqualität erfolgte die Normierung der Abstandsverteilungen in Abb. III.1.25. Es war zu beobachten, dass Nebenmaxima im Gegensatz zu den mit IBs angefertigten Proben stark reduziert werden konnten. Auch der Beitrag an langen Abständen, die in der DM-Probe relativ stark ausgeprägt waren, erwies sich in den aufgereinigten Proben als sehr gering. Glycerin hatte keinen Einfluss auf die Signalqualität. Die Aufreinigung des LHCP sah sehr vielversprechend aus, konnte jedoch leider aus zeitlichen Gründen in dieser Arbeit nicht mehr zur Herstellung zeitaufgelöster Faltungsproben angewandt werden.

1.4. Kalibrierung des „Stopped-Flow/Freeze-Quench“ Systems

Zur Herstellung zeitaufgelöster DEER-EPR Proben kam in dieser Arbeit das System SFM 300 (SF) von Bio-Logic zur steuerbaren Mischung von Lösungen im Millisekundenbereich mit einer an der ETH Zürich entworfenen „Freeze-Quench (FQ)“-Einheit zum Einsatz. Damit war es möglich, Proben mit definierter Faltungszeit herzustellen, welche in gefrorenem Zustand EPR-spektroskopisch vermessen werden konnten.

Im Vorfeld der Probenproduktion musste zunächst die Anwendbarkeit der Verdünnungs-Rekonstitution in diesem Setup überprüft, die genauen Frierzeiten ermittelt sowie die Geräteeinstellungen kalibriert werden.

1.4.1. Rekonstitutionstests

Die folgenden Versuche zielten darauf ab, die Rückfaltung des LHCII im SF/FQ-Setup nachzuweisen. Die Spritze 1 des SFM 300 wurde dazu mit 1 ml 120 μ M LHCP (Klon C3.2h) in RK2 beladen. Es wurden dann 3 mg Pigmente in 160 μ l Ethanol gelöst, 30 s zentrifugiert (Hettich Mikro 22R, Rotor 1015) und zu 840 μ l RK1 unter vortexen hinzugefügt. Um Aggregationen zu vermeiden, wurden alle weiteren Schritte möglichst schnell durchgeführt, so dass ab Pigmentzugabe nicht mehr als 15 min vergingen. Nachdem die Lösung in die Spritze 2 der SFM 300 gefüllt worden war, erfolgte die computergesteuerte Rekonstitution.

Die Ergebnisse des Tests sind in Abb. III.1.26 dargestellt. Die erste Probe wurde direkt aus der SF entnommen (RM Maschine RT), die Zweite nach 10 min mithilfe der FQ gefroren, über einen Teflontrichter gesammelt und auf Eis aufgetaut (RM 600s). Zum Vergleich ist mit einem Teil des RK1/RK2, der für die SF vorbereitet wurde, eine manuelle Rekonstitution in einem Reaktionsgefäß durchgeführt worden (Abb. III.1.26, RM Hand RT).

In der Intensität des negativen Peaks bei 493 nm bestand zwischen der per Hand gemischten Probe und der in der Stopped-Flow-Gemischten kein Unterschied. Die schockgefrorene Probe zeigte einen etwas niedrigeren Wert. Dieser konnte durch Denaturierung eines geringen Teils der Monomere zustande gekommen, oder aber durch einen Eintrag an Kondenswasser über die kalten Silberwalzen der Freeze-Quench bedingt sein.

1.4.2. Kalibrierung

Um genaue Aussagen über den Faltungszustand des LHCII zu einem bestimmten Zeitpunkt machen zu können, mussten die Parameter der SFM300 kalibriert werden. Dazu wurde eine Testreaktion mit Aquo-Metmyoglobin und Na-Azid verwendet. In dieser Reaktion wird der Sauerstoff-Ligand des hydrierten Metmyoglobins mit einer konstanten Rate gegen Azid aus-

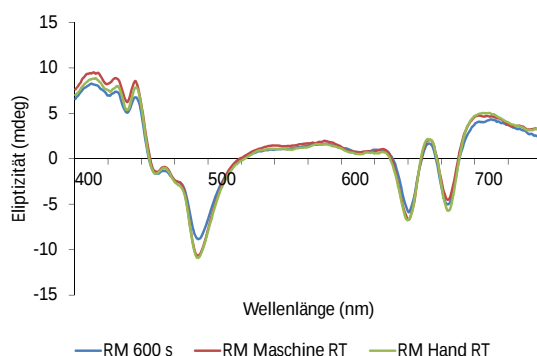


Abbildung III.1.26.: Rekonstitutionsvergleich SF/FQ. CD-Spektren der Rekonstitution durch manuelles mischen (RM Hand RT), „Rapid-Mixing“ in der SF (RM Maschine RT) und „Rapid-Mixing“ mit Schockfrieren, (SF/FQ, RM 600s). Die Faltungszeit betrug 10 min.

getauscht. Dies führt zu einer Verschiebung des CW-EPR Signals von 1200 Gauss („High-Spin Aquo-Metmyoglobin“) zu 3100 Gauss („Low-Spin Myoglobin-Azid“). Die gewählte Azid Konzentration bestimmt hierbei die Reaktionsgeschwindigkeit. Aus dem Verhältnis der „High-Spin“- zu „Low-Spin“-Signalstärke lässt sich das Alter der Probe genau bestimmen. Die Reaktion folgt dabei der Kinetik:

$$[HS] = -k \left(\left(1 - \frac{k_d}{k_{obs}}\right) e^{-k_{obs}t} + \frac{k_d}{k_{obs}} \right)$$

$$k_{obs;2,5mMN_3} = 10,64s^{-1}; k_{obs;0,5mMN_3} = 2,43s^{-1}; k_d = 0,14s^{-1}$$

Die „Stopped-Flow“-Apparatur kann in zwei Operationsmodi betrieben werden. Für sehr kurze Zeiten wurde der „Interrupted-Flow-Mode“ gewählt. Bei diesem wird die Faltungszeit durch die Flussrate (FR) des Systems, welche über die Vorschubgeschwindigkeit der Spritzen regulierbar ist, bestimmt. Bei niedriger Geschwindigkeit verstreicht mehr Zeit zwischen der Mischung der Proben und dem Frieren auf den Silberwalzen der Freeze-Quench.

In diesem Modus wurden Proben mit Alterungszeiten zwischen 50 ms und 100 ms hergestellt. Es kam 0,25 mM Aquo-Metmyoglobin in Spritze 1 und 2,5 mM Na-Azid in Spritze 2 zum Einsatz. Die Parameter der SFM300 sind Tab. III.1.3 zu entnehmen.

Das über den High-Spin Anteil des CW-EPR Signals ermittelte, tatsächliche Alter der Proben korrelierte nicht mit den Stopped-Flow Einstellungen (Tab. III.1.4; Abb. III.1.27). Das High-Spin Signal lag bei allen Proben zwischen 33% und 37%, was einer Reaktionsdauer von 93 bis 107 ms entsprach (Tab. III.1.4). Auch bei mehrmaliger Wiederholung des Experiments konnte keine Kalibrierung im „Continuous-Flow-Mode“ erreicht werden.

Da in diesem Operationsmodus die Flussrate der Lösungen von Probe zu Probe variiert wird, wirkt sich hier der Durchmesser der Auslassdüse eventuell limitierend auf die minimale Reaktionsdauer aus. Bei einer hohen Flussrate muss über eine kurze Zeit ein großes Volumen die

Tabelle III.1.3.: SFM300 Parameter „Continuous-Flow-Mode“. Einstellungen der SFM300 für Proben mit Faltungszeiten unter 100 ms. Alter = theoretische Alterungszeit der Probe beim Schockfrieren; FR ges. = Gesamtflussrate; FR 1/2 = Flussrate in Phase 1/2; Vol. 1/2 = Verwendetes Probenvolumen in Phase 1/2; t 1/2 = Spritzen-Vorschubsdauer in Phase 1/2.

Alter	FR _{ges.}	Vol. 1	FR 1	t 1	Vol. 2	FR 2	t 2
50ms	1,6ml/s	120µl	0,8ml/s	147ms	120µl	0,8ml/s	147ms
60ms	1,4ml/s	120µl	0,7ml/s	177ms	120µl	0,7ml/s	177ms
70ms	1,2ml/s	120µl	0,6ml/s	206ms	120µl	0,6ml/s	206ms
80ms	1,0ml/s	120µl	0,5ml/s	236ms	120µl	0,5ml/s	236ms
90ms	0,9ml/s	120µl	0,5ml/s	265ms	120µl	0,5ml/s	265ms

Tabelle III.1.4.: Ergebnisse „Continuous-Flow-Mode“. t_{th.} = theoretische Alterungszeit nach SFM300-Einstellungen; HS = High Spin Anteil der CW-EPR Messung; t_{calc.} = tatsächliche Alterungszeit berechnet aus HS

Nr.	t _{th.}	HS	t _{calc.}
I	50ms	0,33	106ms
II	60ms	0,38	93ms
III	70ms	0,37	96ms
IV	80ms	0,36	98ms
V	90ms	0,33	107ms

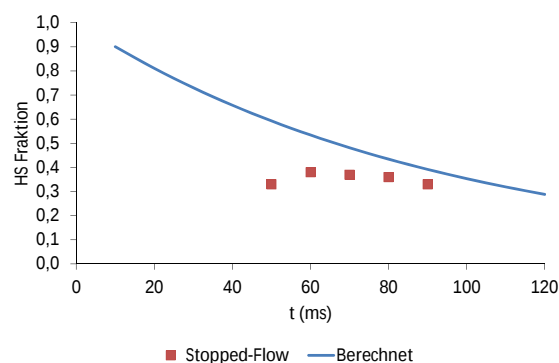


Abbildung III.1.27.: Kalibrierung im „Continuous-Flow-Mode“. Messergebnisse der „Stopped-Flow“-Proben im „Continuous-Flow-Mode“ im Vergleich zu den berechneten HS Werten der Aquo-Metmyoglobin/Azid Reaktion. 0,25 mM Myoglobin, 2,5 mM N₃, 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM NaNO₃

Tabelle III.1.5.: SFM300 Parameter „Interrupted-Flow-Mode“. Einstellungen der SFM300 für Proben mit Faltungszeiten über 255 ms. Alter = theoretische Alterungszeit der Probe beim Schockfrieren; FR ges. = Gesamtflussrate; FR 1/2=Flussrate in Phase 1/2; Vol. 1/2 = Verwendetes Probenvolumen in Phase 1/2; t 1/2 = Spritzen-Vorschubsdauer in Phase 1/2; t_d = Pause mit FR=0 ml/s.

Alter	FR _{ges.}	Vol. 1	FR 1	t 1	t _d	Vol. 2	FR 2	t 2
255ms	1,0ml/s	360µl	0,5ml/s	720ms	0ms	110µl	0,5ml/s	220ms
300ms	1,0ml/s	360µl	0,5ml/s	720ms	45ms	110µl	0,5ml/s	220ms
400ms	1,0ml/s	360µl	0,5ml/s	720ms	145ms	110µl	0,5ml/s	220ms
500ms	1,0ml/s	360µl	0,5ml/s	720ms	245ms	110µl	0,5ml/s	220ms
600ms	1,0ml/s	360µl	0,5ml/s	720ms	345ms	110µl	0,5ml/s	220ms

Tabelle III.1.6.: Ergebnisse „Interrupted-Flow-Mode“. $t_{th.}$ = theoretische Alterungszeit nach SFM300-Einstellungen; HS = High Spin Anteil der CW-EPR Messung; $t_{calc.}$ = tatsächliche Alterungszeit berechnet aus HS

Nr.	$t_{th.}$	HS	$t_{calc.}$
VI	255ms	0,51	300ms
VII	300ms	0,54	280ms
VIII	400ms	0,39	430ms
IX	500ms	0,37	450ms
X	600ms	0,28	590ms

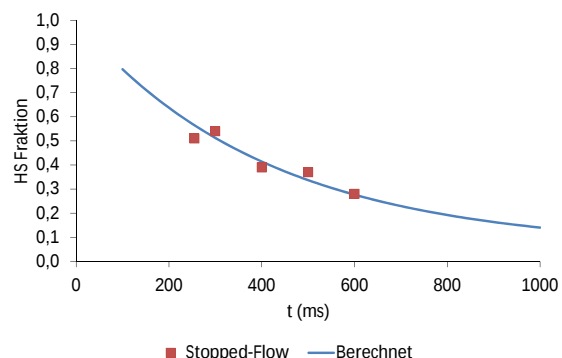


Abbildung III.1.28.: Kalibrierung im „Interrupted-Flow-Mode“. Messergebnisse der „Stopped-Flow“-Proben im „Interrupted-Flow-Mode“ im Vergleich zu den berechneten HS Werten der Aquo-Metmyoglobin/Azid Reaktion. 0,25 mM Myoglobin, 0,5 mM N_3 , 50 mM HEPES pH 7,0, 100 mM $NaNO_3$

Düse passieren, welche dann als Widerstand wirkt. Die Wahl einer kürzeren „Delay-Line“ und geringerer Flussrate war keine Option, da so nicht das benötigte Probenvolumen erreicht werden konnte.

Der zweite Operationsmodus der Stopped-Flow sieht zwischen der Mischung der Lösungen und dem Stoppen der Reaktion eine Wartezeit vor und wird als „Interrupted-Flow-Mode“ bezeichnet. Im Gegensatz zum „Continuous-Flow-Mode“ wird hier die Flussrate konstant gehalten und das Probenalter über die Dauer der Vorschubspause variiert.

Die Messwerte zeigten in diesem Operationsmodus stimmten mit einer geringen Abweichung gut mit den über die Software eingestellten bzw. berechneten Zeiten überein (Tab. III.1.6; Abb. III.1.28). Ursachen für die auftretenden Abweichungen können neben Ungenauigkeiten beim Spritzenvorschub aber auch geringe Temperaturschwankungen zwischen den einzelnen Proben gewesen sein.

Aufgrund der Ergebnisse der Kalibrierung wurde von der Herstellung von Faltungsproben mit geringeren Faltungszeiten als 255 ms abgesehen und alle Proben im „Interrupted-Flow-Mode“ angefertigt.

1.5. Untersuchung früher Faltungsereignisse des LHCII

Um genaue Informationen über den Faltungszustand des LHCII zu verschiedenen Zeitpunkten zu erhalten, wurden unter Verwendung des in Abschnitt 1.4 beschriebenen „Stopped-Flow/Freeze-Quench“-Setup frühe Stadien der Rückfaltung des LHCP zu LHCII konserviert. Durch die

Einführung von Proxyl-IAA Spinmarkern an jeweils zwei in die Primärsequenz eingklonierten Cysteinen, konnten Informationen über die Abstände verschiedener Positionen zueinander gesammelt werden. Die Abstandsveränderung der markierten Positionen sollte hierbei Aufschluss über frühe Faltungsereignisse liefern.

1.5.1. Faltungszustand des LHCP in LDS und GuHCl

Als Referenzen der Zeitreihen wurden Proben im Grundzustand des LHCP bei Faltungsbeginn angefertigt. Da von Horn (2004a) gezeigt wurde, dass der LDS-solubilisierter LHCP bereits einen gewissen Grad an α -Helices enthält, wurden zum Vergleich GuHCl solubilierte Proben hergestellt. Ab einer Konzentration von 5 M GuHCl liegt in der LHCP in diesem chaotropen Salz vollständig entfaltet vor.

Die Überprüfung der Sekundärstruktur erfolgte CD-spektroskopisch im Bereich von 207-250 nm und mittels EPR-Spektroskopie. α -Helices zeigen im UVCD einen negativen Peak bei 222 nm und 208 nm sowie einen positiven Peak bei 193 nm (Greenfield (2007)). Die Messung geringerer Wellenlängen als 207 nm war jedoch aufgrund der intrinsischen Absorption des GuHCl nicht möglich. Proben, die kein GuHCl enthielten, wurden im Bereich von 190-250 nm untersucht.

Die verschiedenen proxylmarkierten LHCP-Klone wurden zu 90 μ M in 1 % LDS bzw. 6 M GuHCl, 1 M β -ME, 50 mM Li-Borat pH 8,1 in D₂O gelöst und in einer 0,1 mm Quarzglas-Küvette im CD-Spektroskop vermessen. Je 100 μ l der Proben wurde direkt über die Silberwalzen der Freeze-Quench in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Messung erfolgte im Q-Band-EPR-Spektroskop.

Die UVCD-Spektren aller gemessenen Klone zeigten sowohl im rückgefalteten als auch im LDS-solubilierten Zustand ein Signal, das auf α -Helices schließen ließ (Abb. III.1.29). Die Intensität des Signals lag bei gefalteten Komplexen höher. Die UVCD-Spektren der LDS-solubilierten und rückgefalteten Komplexe wurden gemittelt und mit dem Softwarepaket CDPro (Colorado State University, Colorado, USA) analysiert. Da die Spektren im Bereich von 190-195 nm durch die Absorption der freien Pigmente stark verrauscht waren, wurde die Analyse sowohl für 190-240 nm als auch für 195-240 nm durchgeführt. Der prozentuale Anteil an α -Helices des LHCP in LDS lag bei 30,1 (190 nm), 26,1 (195 nm) bzw. 25,6% (207 nm), was gut mit Daten des in 0,2% SDS solubilierten LHCP übereinstimmte (Horn and Paulsen (2002)). Der helikale Anteil in rückgefalteten Komplexen lag mit 34,2 (190 nm), 31,6 (195 nm) bzw. 43,9% (207 nm) deutlich höher als im LDS solubilierten LHCP (Tab. III.1.7). Dies konnte auf die Ausbeute der Rückfaltung per Verdünnungs-Rekonstitution zurückzuführen sein, welche bei 15-30% lag. Ungefalteter LHCP in den Proben senkte den Zuwachs an helicalem Anteil um 65% dessen, was in früheren Untersuchungen (Horn and Paulsen (2002)) an reinem LHCII gemessen wer-

den konnte. Die GuHCl Proben ergaben im UVCD ein „random-coil“-Signal, die Auswertung mit CDPro erbrachte keine Ergebnis. Dies zeigte, dass hier der LHCP keine Sekundärstruktur aufwies.

Tabelle III.1.7.: Selcon3 UVCD-Analyse. Output-Daten der Analyse der UVCD-Spektren aus Abb. III.1.29 mit dem Selcon3-Algorithmus. Es wurde das CDPro-Software Packet verwendet (Colorado State Univesity, Colorado, USA).

Probe	% Helix	% sheet	% Trn/rnd. coil
LHCP 1% LDS (190-240nm)	30,1	15,9	53,6
LHCII gefaltet (190-240nm)	34,2	20	60,53
LHCP 1% LDS (195-240nm)	26,1	21,5	52,1
LHCII gefaltet (195-240nm)	31,6	12	57,5
LHCP 1% LDS (207-240nm)	25,6	20,8	43,5
LHCII gefaltet (207-240nm)	43,9	9,7	37,3

In den Abstandsverteilungen waren bei den Proben der Klone 59/90, 90/123, 123/196 und 124/143 Maxima im Bereich von 1,5-6,5 nm im LDS solubilisierten Zustand zu verzeichnen, wohingegen der LHCP in GuHCl keine distinkten Abstände in diesem Bereich aufwies. Die Klone 90/196, 106/160 und 174/196 zeigten nur geringfügige Unterschiede in der Signalintensität zwischen LDS und GuHCl. Die Klone 59/90, 124/143 und 174/196 trugen jeweils an den Endpunkten der membrandurchspannenden Helices I, III und IV Proxyl-IAA-Label, während mithilfe der restlichen Klone Interhelicale Abstände gemessen wurden. Der in den UVCD-Spektren erkennbare, helicale Anteil des LDS-solubilierten LHCP, war laut EPR-Daten hauptsächlich auf die Helices I (59/90) und III zurückzuführen (Abb. III.1.30 (a), Abb. III.1.30 (f), Abb. III.1.30 (g)). Die breite Abstandsverteilung des Klons 59/90 ließ auf eine nur teilweise ausgebildete und dadurch flexible Helix schließen, während die schmalere Abstandverteilung des Klons 124/143 ein Indiz für eine bereits vollständig ausgebildete Helix in einem geringen Prozentsatz des Proteins war.

Bei den gemessenen interhelicalen Abständen zeigten die Proben des Klons 90/123 (Helix I zu III, lumenal) das stärkste Signal, aber auch bei Klon 123/196 (Helix III zu IV, lumenal) war ein deutliches Signal erkennbar. Vor allem die lumenalen Enden der Helices schienen sich in LDS-solubiliertem Zustand bereits in räumlicher Nähe zu befinden, jedoch nicht in der im LHCII auftretenden Konfiguration. Wäre dies der Fall, wären auch bei Klon 90/196 in LDS bereits Abstände unter 6 nm zu erwarten gewesen, was nicht der Fall war (Abb. III.1.30 (a)).

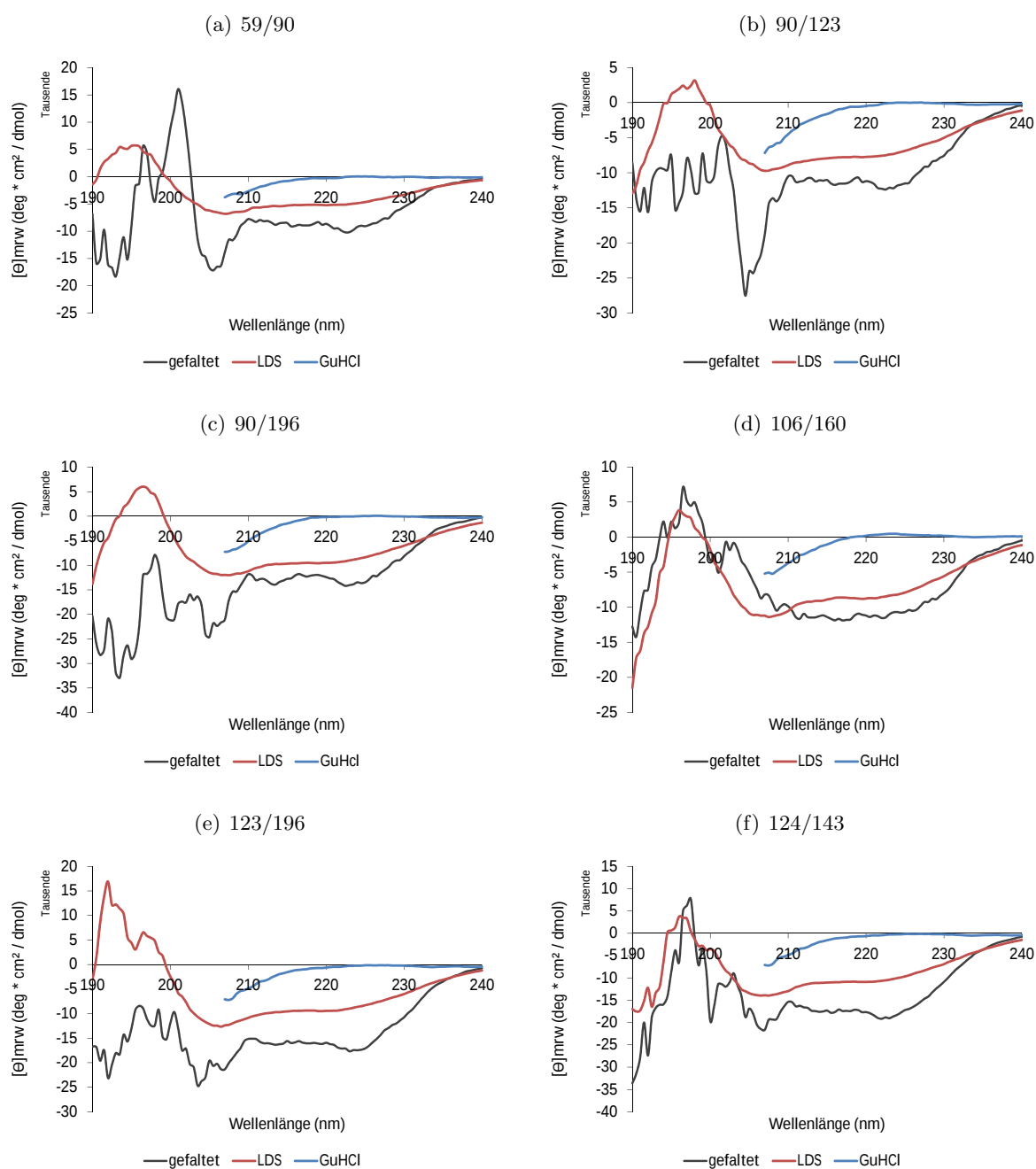
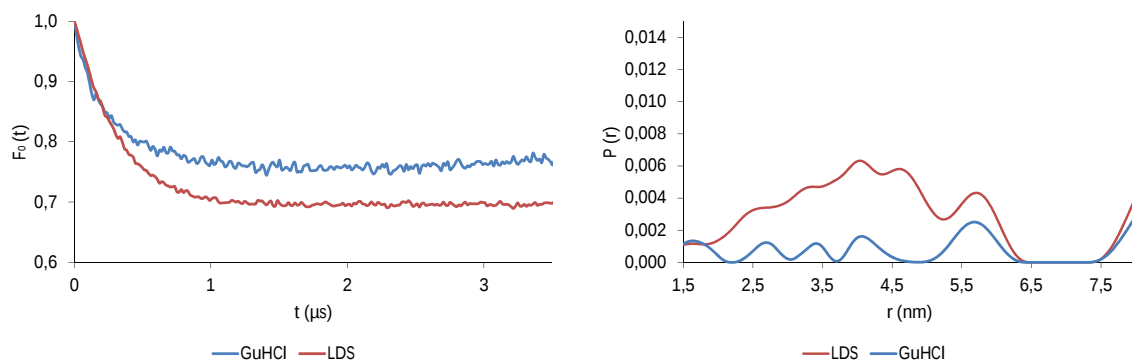
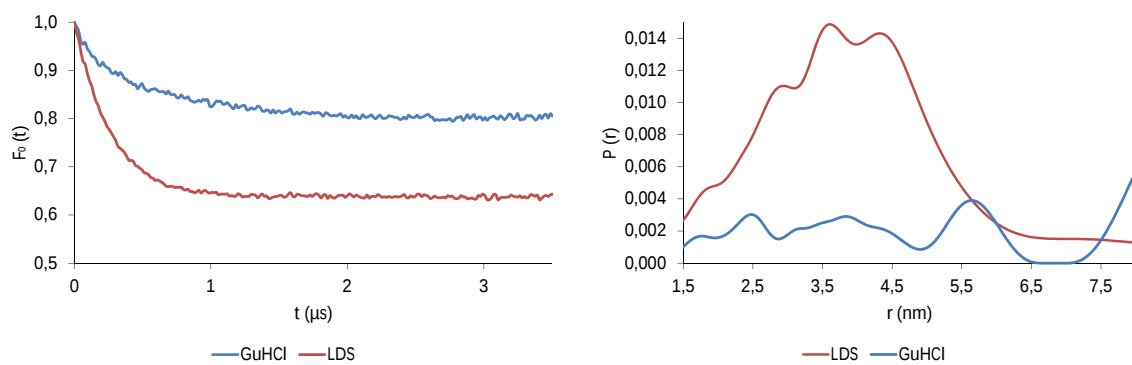


Abbildung III.1.29.: UVCD-Spektren der GuHCl und LDS solubilisierte LHCP-Referenzen. Alle Proben wurden in 6M GuHCl/1 % LDS, 10 mM β -ME, 50mM Tris-HCl pH 8,1 in D_2O hergestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Konzentration wurden die Primärspektren in Mean Residue Ellipticity-Einheiten umgerechnet. Die Konzentrationen der GuHCl und der gefalteten Proben betrug 45 μM , die der LDS-Proben 90 μM .

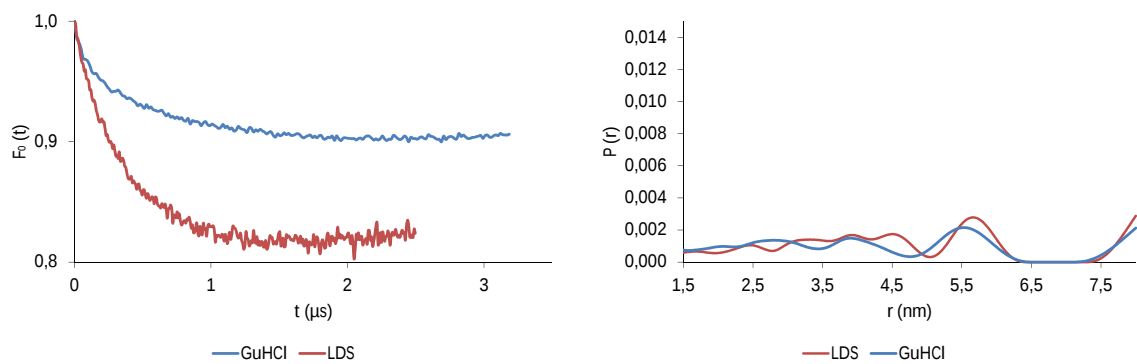
(a) 59/90



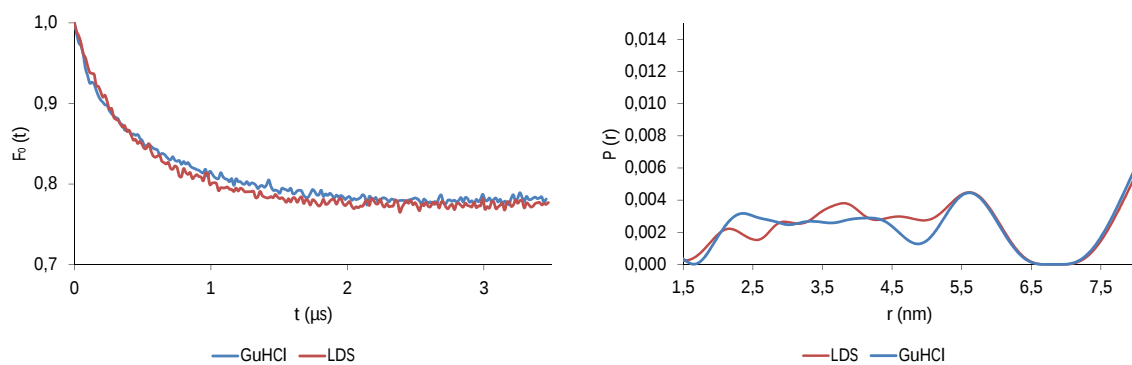
(b) 90/123



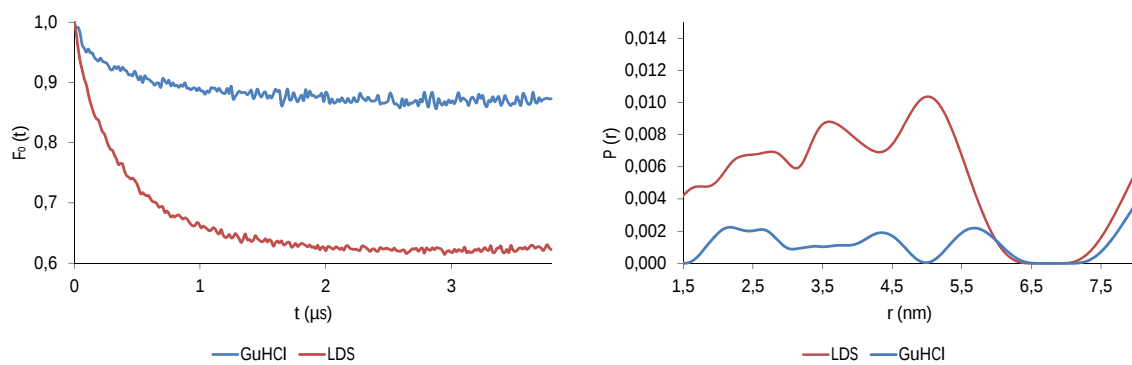
(c) 90/196



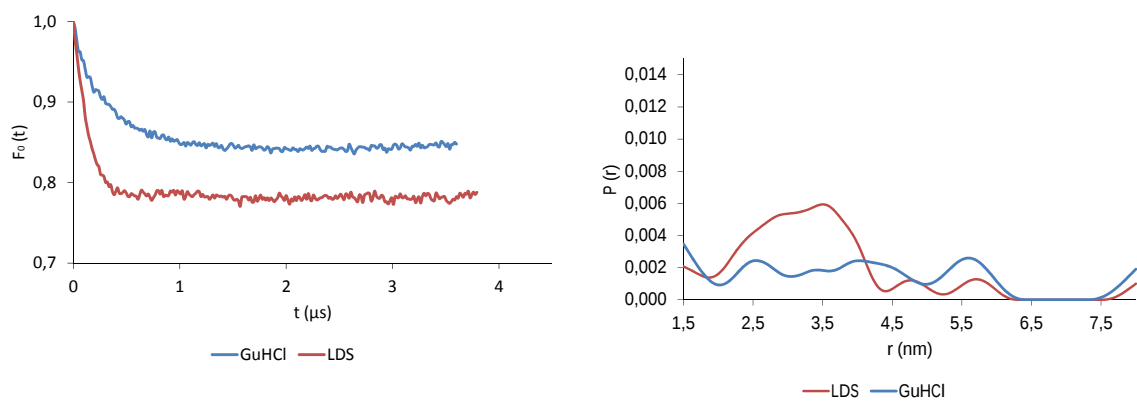
(d) 106/160



(e) 123/196



(f) 124/143



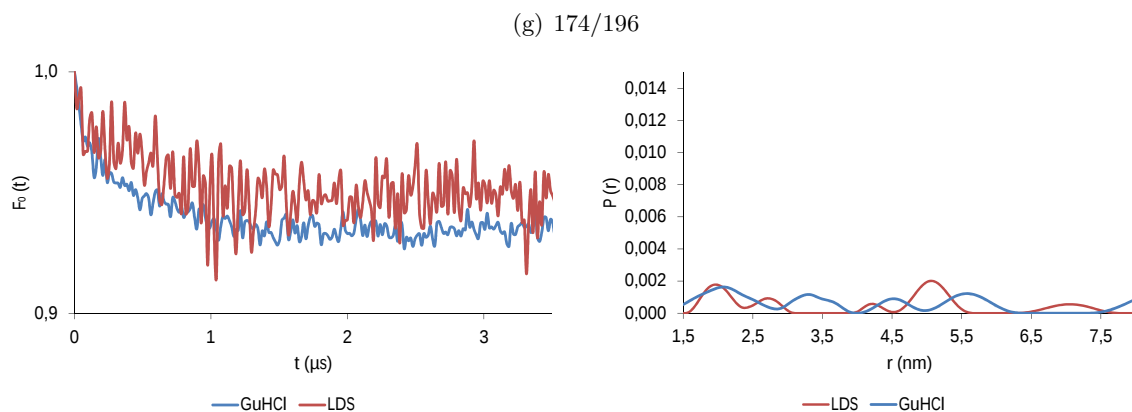


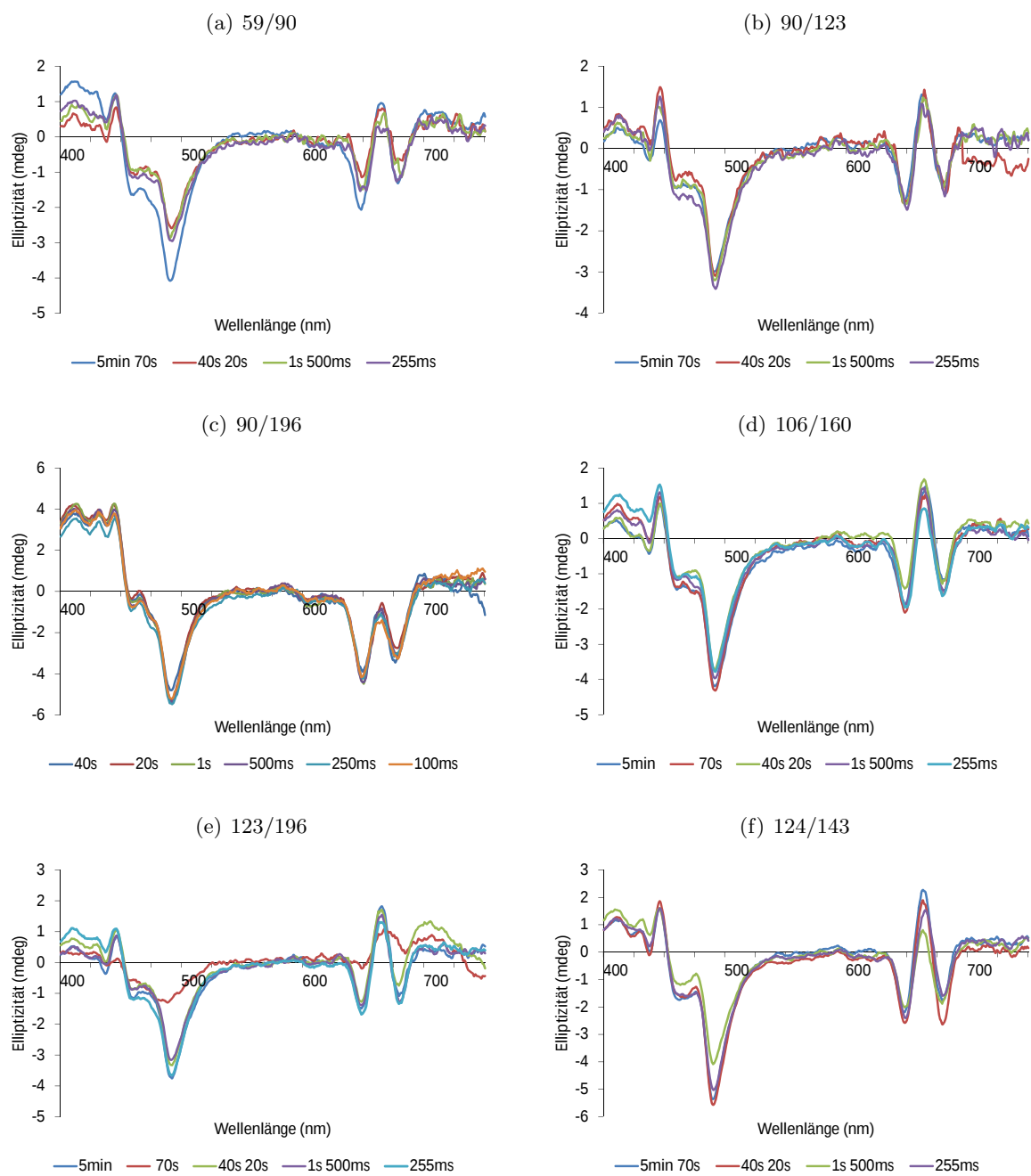
Abbildung III.1.30.: GuHCl und LDS solubilisierte LHCP-Referenzen. Alle Proben wurden in 6M GuHCl/1 % LDS, 10 mM β -ME, 50mM Tris-HCl pH 8,1 in D_2O hergestellt. Links: Hintergrundbereinigte Primärdaten des 4-Puls DEER-Experiments. Die Dipolare Evolutionszeit (D_2) aller Proben betrug 4500 ns, der Time-Shift 123 ns. Rechts: Abstandsverteilung der markierten Positionen der jeweiligen LHCP-Klone. Abgeleitet aus DEER-Spektrum (nicht gezeigt) durch Thikonov-Regularisierung mit berechneter L-Kurve. Parameter der DEER-EPR Messung:

	Probe	CutOff	BckCorr	ØAbstand
(a) 59/90	GuHCl	3600 ns	1500 ns	4,59 nm
	LDS	3800 ns	1048 ns	4,21 nm
(b) 90/123	GuHCl	3600 ns	1500 ns	4,55 nm
	LDS	2000 ns	1000 ns	3,93 nm
(c) 90/196	GuHCl	3192 ns	1500 ns	4,09 nm
	LDS	3700 ns	926 ns	4,16 nm
(d) 106/160	GuHCl	3456 ns	2000 ns	4,54 nm
	LDS	3472 ns	2000 ns	4,63 nm
(e) 123/196	GuHCl	3800 ns	2000 ns	4,45 nm
	LDS	3800 ns	2000 ns	4,38 nm
(f) 124/143	GuHCl	3600 ns	1048 ns	4,01 nm
	LDS	3800 ns	1048 ns	3,27 nm
(g) 174/196	GuHCl	3600 ns	1000 ns	3,77 nm
	LDS	33600 ns	1000 ns	3,93 nm

1.5.2. Zeitaufgelöste Abstandsmessungen verschiedener LHCII-Varianten

Die eigentlichen Zeitreihen der verschiedenen unter Abschnitt 1.5.1 eingeführten Klone sind unter Rückfaltung im Stopped-Flow/Freeze-Quench Setup produziert worden. Dazu wurde LHCP zu 90 μM in D_2O -haltigem RK2 gelöst und mit 50 mM $\beta\text{-ME}$ versetzt. Das Probenvolumen betrug 1,2 ml. Die Vorbereitung eines Aliquots mit 1,24 ml RK1 mit ebenfalls 50 mM $\beta\text{-ME}$ erfolgte dazu parallel. In dieses wurden möglichst zeitnah vor der Herstellung der Proben 4,5 mg Pigmenttotalextrakt in 260 μl eiskaltem Ethanol (p.A.) hinzugegeben. Die Endkonzentration der Pigmente betrug so 3,3 mM. Aufgrund der in Abschnitt 1.1.3 gezeigten Aggregationsprobleme sind jeweils nur zwei Proben unterschiedlichen Alters hergestellt worden, bevor die SF vollständig gereinigt wurde. Vor dem Füllen der Spritze 1 der SF mit Pigmentlösung und der Spritze 2 mit Proteinklösung erfolgte die Entnahme von jeweils 50 μl von jedem Puffer. Durch manuelles Mischen in einem Reaktionsgefäß konnte so eine Kontrollprobe für die Messung der Faltung im CD-Spektroskop angefertigt werden. Wie in Abschnitt 1.4.1 gezeigt, lässt eine erfolgreiche Rekonstitution im Reaktionsgefäß auf eine ebenfalls erfolgreiche Rekonstitution im SF/FQ-Setup schließen. Die Faltungszeiten der Proben betrugen 255 ms, 500 ms, 1 s, 20 s, 40 s und 5 min.

Die CD-Spektren der Kontrollproben zeigten ein monomertypisches Spektrum mit unterschiedlichen Intensitäten. Da eine negative Elliptizität bei 493 nm von 3-6 mdeg und 45 μM Protein Faltungsausbeuten zwischen 15-30 % widerspiegeln (Abschnitt 1.1.5) und die Pigmente in einem dreifachen molaren Überschuss zugegeben wurden, betrug das Verhältnis von freien zu komplexgebundenen Pigmenten schätzungsweise 15/1. Daher wurden die gezeigten Spektren mit dem Spektrum einer Referenz korrigiert, die 1,45 mM Gesamtchlorophyll in RK1+RK2 enthielt.



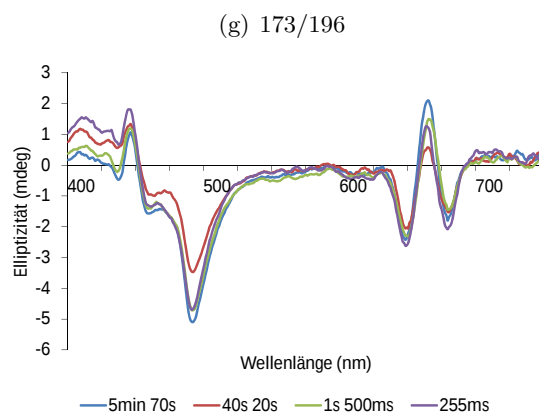


Abbildung III.1.31.: CD-Spektren der Zeitaufgelösten Faltungsproben. Die CD-Spektren wurden spätestens 1h nach Rekonstitution in einer 0,1 mm Küvette aufgenommen. Sie dienen zur Kontrolle der Faltungsfähigkeit des Rekonstitutionsansatzes und zeigen den vollständig gefalteten Komplex der Rekonstitutionsmischung, die jeweils zur Anfertigung der Probe mit angegebener Faltungszeit verwendet wurde. 45 μ M LHCP in RK1/RK2, 3,3 mM Pigmente. Da in der SF/FQ bis zu zwei Proben in Folge hergestellt wurden, entsprachen einige Kontrollproben den Rekonstitutionsmischungen zweier Messzeiten. Die CD-Spektren wurden mit einem Pigment-Blank korrigiert (1,5 mM Pigmente in RK1/RK2 zu gleichen Teilen)

Die zeitaufgelösten Proben wurden mit über Saccharosegradienten aufgereinigten Komplexen verglichen. Im Gegensatz zu den SF/FQ-Proben konnte bei diesen Komplexen eine vollständige Charakterisierung des korrekten Faltungszustandes per CD-, Fluoreszenz- und Absorptionsspektroskopie durchgeführt werden, da sie weitgehend frei von ungefaltetem Protein und ungebundenen Pigmenten vorlagen. Die Ergebnisse sind in Abb. III.1.32 dargestellt. Abb. 1.31(a) zeigt die Absorptionsspektren der aufgereinigten LHCII-Komplexe. Diese wurden direkt nach Extraktion aus den Gradienten vermessen und ihre Konzentration bestimmt. Der Faltungszustand der Komplexe ist sowohl im CD-Spektroskop als auch per Fluoreszenz-Spektroskopie gemessen worden. Die CD-Spektren zeigten alle einen für LHCII-Monomere typisches Spektrum (Abb. 1.31(b); Hobe et al. (1994)). An den Fluoreszenzspektren ist zu erkennen, dass ein vollständiger Energietransfer von *chl b* auf *chl a* stattgefunden hat, was sich in einem distinkten Peak bei 680 nm widerspiegelt und auf korrekt gefaltete Komplexe schließen lässt (Abb. 1.31(c); Werwie et al. (2012)). Zur Vermessung im EPR-Spektroskop erfolgte ein Pufferaustausch gegen 50 mM Tris-HCl, 12,5 % Saccharose in D₂O über Amicon Zentrifugalfilter mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa. Dabei war darauf zu achten, dass das eingesetzte Probenvolumen zu keinem Zeitpunkt überschritten wurde, um eine zu starke Verdünnung des Detergenz DM zu verhindern. Nach Puffertausch erfolgte eine Konzentration der Proben auf 160 μ M, so dass die Endkonzentration der EPR-Proben nach Versetzen mit dem gleichen Volumen 80 % deuteriertem Glycerin 80 μ M betrug.

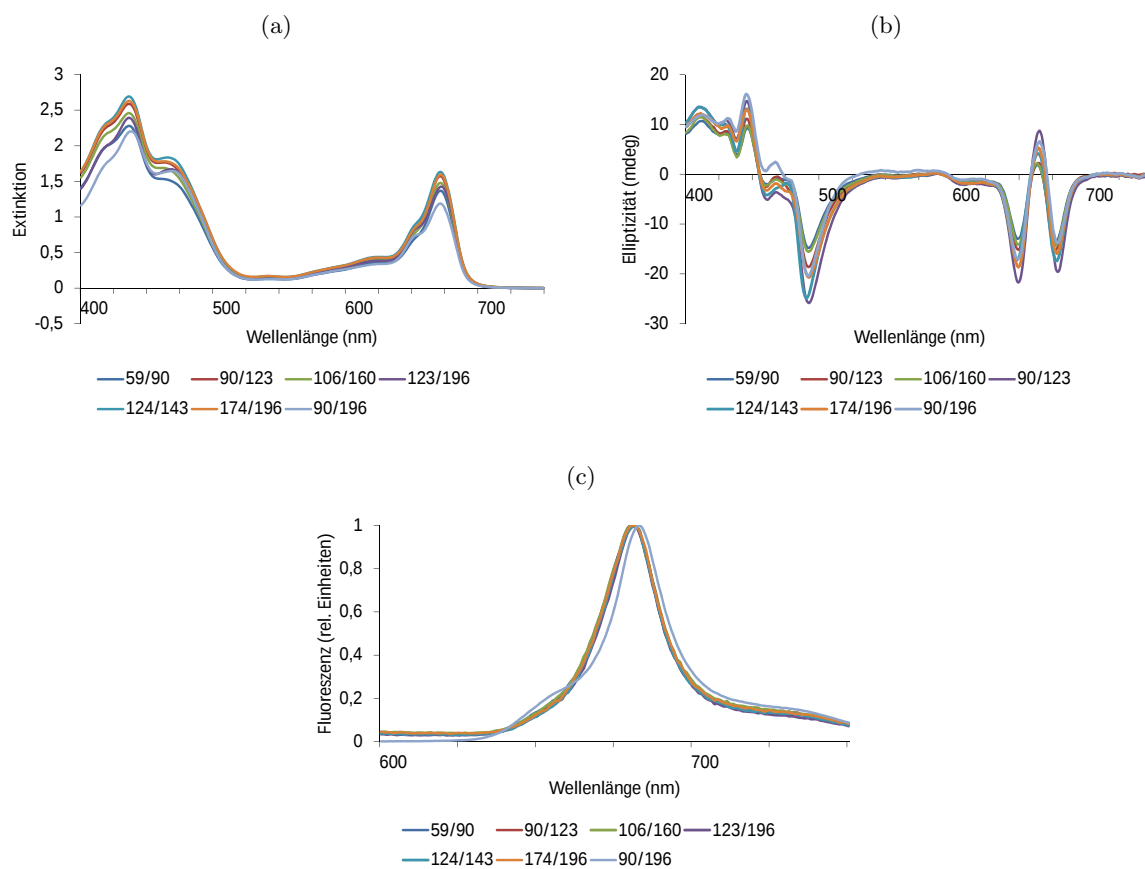


Abbildung III.1.32.: Biochemische Charakterisierung der aufgereinigten LHCII Referenzen. Alle Klone rekonstituiert nach Standardprotokoll mit 1,5 mg LHCP und 3 mg Pigmenten, extrahiert aus 0,55 M Saccharose-Dichtegradienten, 0,2 % LM, 50 mM Tris-HCl pH 7,8 (a) Absorptionsspektren der aufgereinigten LHCII-Klone. Gemessen in 2 mm OG Küvette, 1 nm Spaltbreite (b) CD-Spektren der aufgereinigten LHCII-Klone. Gemessen in 2 mm OG Küvette (c) Fluoreszenzspektren der aufgereinigten LHCII-Klone. Normiert auf 680 nm

Die Abstandsmessungen der proxylmarkierten Positionen wurden im 4-Puls-DEER-Experiment im Q-Band-EPR-Spektroskop an der ETH Zürich von Inés Garcia Rubio und Yhevhén Polyhach durchgeführt, die Vorgehensweise glich der unter Abschnitt 1.5.1 beschriebenen.

Der erste vermessene Klon trug Proxyl-IAA-Label an den Positionen 59 und 90. Durch ihn sollte die Veränderung des Abstandes innerhalb der Helix I des LHCII gemessen werden. Wie bereits unter Abschnitt 1.5.1 gezeigt, besaß dieser Klon scheinbar einen gewissen Grad an Vorfaltung im LDS solubilisierten Zustand (Abb. III.1.33 (a), LDS). Die Probe mit 255 ms Faltungszeit zeigte zwei Peaks bei den Abständen 2,7 und 4,6 nm, die in ihrer Intensität und Breite die Abstandsverteilung der LDS-solubilisierten Probe nicht übertrafen (Abb. III.1.33 (a), 255 ms). Bei der 40 s-Probe war ein Hauptpeak bei 5,2 nm ausgeprägt, mit weiteren Nebenmaxima bei 2,1 nm, 3 nm und 4 nm (Abb. III.1.33 (a), 40 s). Die über Saccharosedichtegradienten aufgereinigte Probe zeigte ein distinktes Maximum bei 5 nm (Abb. III.1.33 (a), DM). Die Abstandsverteilung der Probe mit fünfminütiger Faltungszeit ähnelte stark der aufgereinigten Probe in DM. Der Hauptpeak war um 0,3 nm verschoben. Die Verschiebung des Maximums zwischen den Faltungszeiten von 40 s, 5 min und dem vollständig gefalteten Komplex waren ein Hinweis auf fortschreitende Konformationsänderungen bei längeren Faltungszeiten, wenn auch die grundlegende Helixbildung in den ersten 40 s der Faltung abgeschlossen zu sein schien.

Klon 90/123 (Interhelicaler Abstand HI-HII) zeigte eine etwas schmalere Abstandsverteilung bei 255 ms Faltungszeit als im LDS-solubilisierten Zustand, während die Intensität des Signals vergleichbar war. Das Maximum erstreckte sich von 1,5-4,7 nm mit einem Nebenmaximum bei 4,8 nm (Abb. III.1.33 (b), 255 ms). Auch das Spektrum der Probe mit 40 sekundiger Faltungszeit wich nur geringfügig von diesem ab, mit einem etwas stärker ausgeprägten Peak bei 3 nm (Abb. III.1.33 (b), 40 s). Die aufgereinigte Probe dieses Klons lieferte auch nach mehrmaliger Präparation kein Auswertbares EPR-Spektrum, die Abstandsverteilung wies keine distinkten Peaks auf. Die Lage des Hauptpeaks der Abstandsverteilung aller zeitaufgelösten Proben glich der LDS-solubilisierten Probe, die Breite der Abstandsverteilung und Nebenmaxima nahmen bei längerer Faltungszeit ab. Die lumenalen Enden der Helices I & II waren folglich bereits in LDS grundlegend zueinander orientiert, ihre Ausrichtung stabilisierte sich durch die Induktion der Faltung innerhalb der ersten 255 ms.

Bei Klon 90/196 wurden zusätzlich zu Faltungszeiten von 255 ms und 40 s auch noch Zwischenzeiten vermessen. Die Spektren der Zeiten von 255 ms-20 s zeigen jeweils mehrere Maxima bei einer allgemein breiten Abstandsverteilung mit geringer Intensität (Abb. III.1.33 (c), 255 ms, 500 ms, 1 s, 20 s). Erst bei 40 s Faltungszeit zeigt sich eine Abstandsverteilung, welche der des aufgereinigten LHCII entspricht (Abb. III.1.33 (c), 40 s, DM). Die Positionen schienen auch bei langen Faltungszeiten eine große Flexibilität zueinander zu wahren, mit einem Vorzugsabstand (3,7 nm), der sich zwischen 20 s und 40 s Faltungszeit ausprägte.

Bei Klon 106/160 wurden wie bei Klon 90/196 Zwischenzeiten vermessen, die Probe mit einsekündiger Faltungszeit war jedoch nicht messbar. Auch hier war erst bei 40 s Faltungszeit ein distinkter Peak bei 3,6 nm erkennbar, der im Vergleich zum 4 nm Peak des LHCII in DM-Micellen verschoben war (Abb. III.1.33 (d), 40 s, DM). Auffällig war auch, dass sich die Spektren der 255 ms und 40 s Probe ähnelten, bei unterschiedlicher Intensität. Beide zeigten ein stark ausgeprägtes Maximum bei 4,9 nm. Die Spektren der anderen Zeiten wiesen jeweils breite Abstandsverteilungen auf, die denen der GuHCl- und LDS-Referenzen ähneln (Abb. III.1.33 (d), 500 ms, 1 s 20 s, LDS, GuHCl). Wie schon anhand des Klons 90/196 gesehen, stabilisierte sich die Ausrichtung der lumenalen zur stromalen Schleife zwischen 20 und 40sekündiger Faltungszeit. Dagegen sprach jedoch die 5 Minuten Probe, da diese scheinbar keinerlei Faltung aufwies. Da zu diesem Zeitpunkt die Rückfaltung des LHCII jedoch weitgehend abgeschlossen ist, war hier von einem Fehler in der Produktion auszugehen.

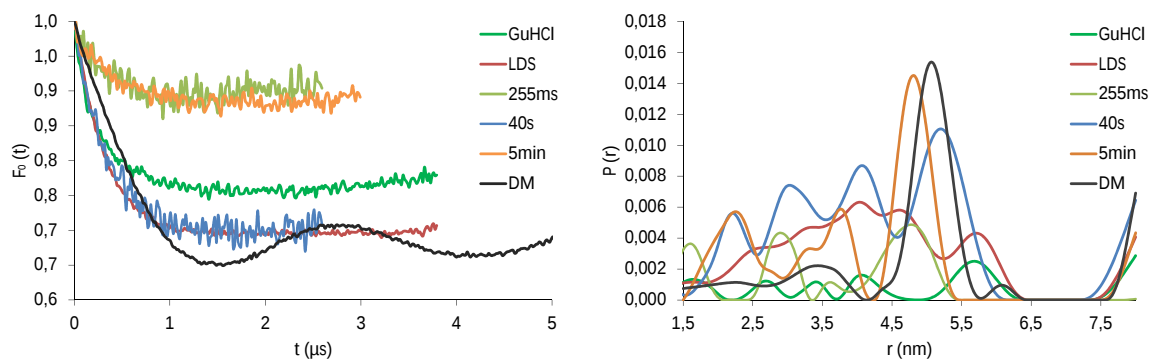
Klon 123/196, welcher die Orientierung der Enden der Helix III und IV widerspiegelte, zeigte keine eindeutigen Veränderungen in den Abstandsverteilungen der einzelnen Faltungszeitpunkte. Auch hier lag der Abstand der beiden Positionen bereits in LDS unter 6 nm, bei 255 ms war bereits ein breites Maximum bei 3,2 nm ausgeprägt. Im Verlauf der Faltung blieb das Spektrum der Abstände weitgehend unverändert, die Amplitude variierte in den Proben aufgrund unterschiedlicher Rekonstitutionsausbeuten und Messparameter (Abb. III.1.33 (e)).

Klon 124/143 zeigte wie Klon 90/123 bereits im LDS solubilisierten Zustand eine Abstandsverteilung, die sowohl denen der zeitaufgelösten Proben als auch der der aufgereinigten Komplexe entsprach. Die Breite der Abstandsverteilung nahm mit zunehmender Faltungszeit geringfügig ab. Bei 40sekündiger Faltungszeit trat ein Nebenmaximum bei 4,5 nm auf (Abb. III.1.33 (f)). Auch hier war die Ausbildung der α -Helix bereits in LDS weitgehend abgeschlossen, die Flexibilität verringerte sich mit der Zeit.

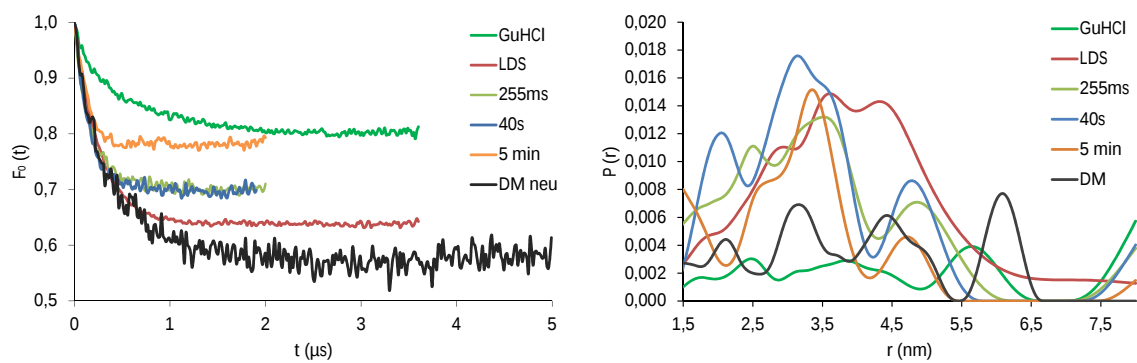
Die LDS- und GuHCl-Referenzen des Klons 174/196 zeigten keinen distinkten Abstand in ihren DEER-Spektren. Die Proben mit 255 ms und 40 s Faltungszeit wiesen ebenfalls nur ein schwaches Signal (Abb. 1.32(g) 255 ms, 40 s. LDS, GuHCl) auf. Bei 40 s war ein schwach ausgeprägter Peak bei einem Abstand von 2,8 nm zu erkennen. Bei diesem Abstand lag auch in aufgereinigten Komplexen das dominante Maximum (Abb. III.1.33 (g) 40 s, DM). Im Gegensatz zu Helix I & III war in Helix IV keine bereits im LDS-solubilisierten Zustand ausgebildete Struktur zu erkennen. Diese schien sich erst im späteren Faltungsverlauf zu etablieren.

Anhand der hier gemessenen Proben ergab sich eine zeitliche Abfolge in der Faltung des LHCII, in der sehr schnell die Helices I & II ausgebildet wurden und sich zueinander ausrichteten (< 255 ms). Im späteren Verlauf der Faltung erfolgte dann die Etablierung der Helix III sowie die Ausrichtung der lumenalen und stromalen Schleifen (20 s-40 s), während sich die Stabilisierung der gemessenen Abstände dieser Bereiche bis zum vollständigen Abschluss der Faltung hinzog.

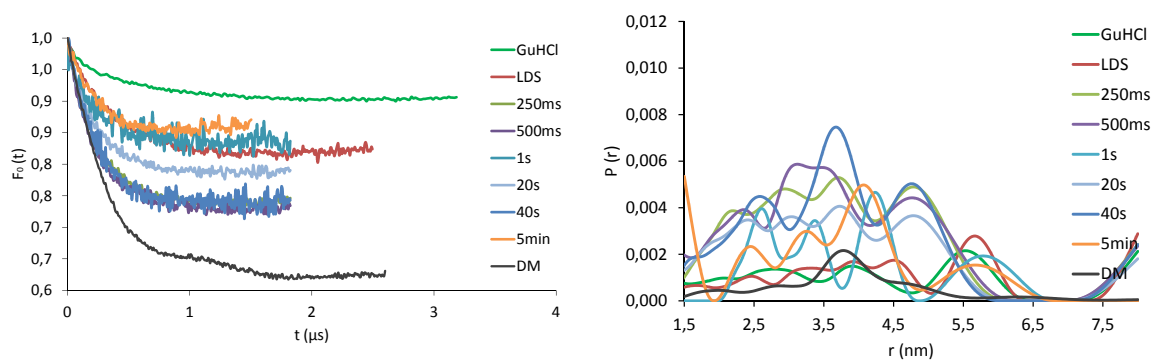
(a) 59/90



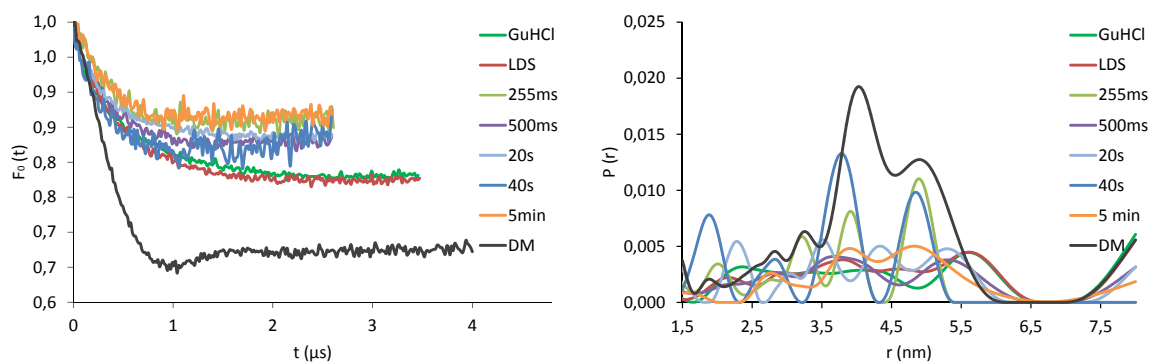
(b) 90/123



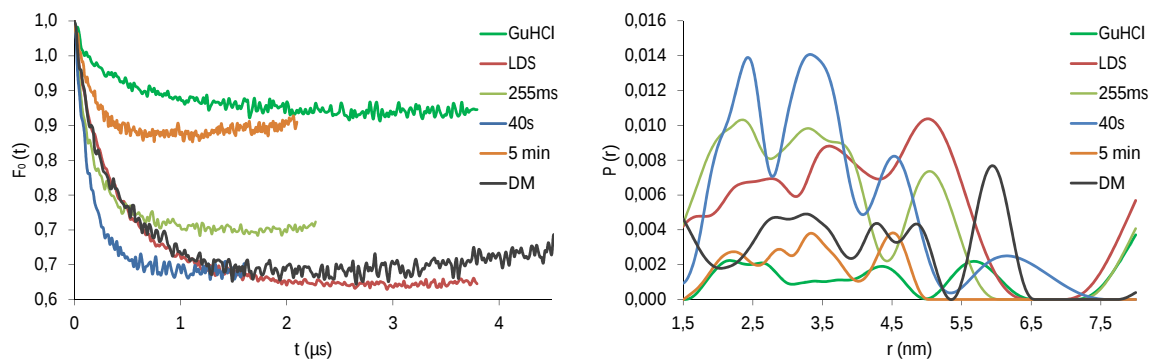
(c) 90/196



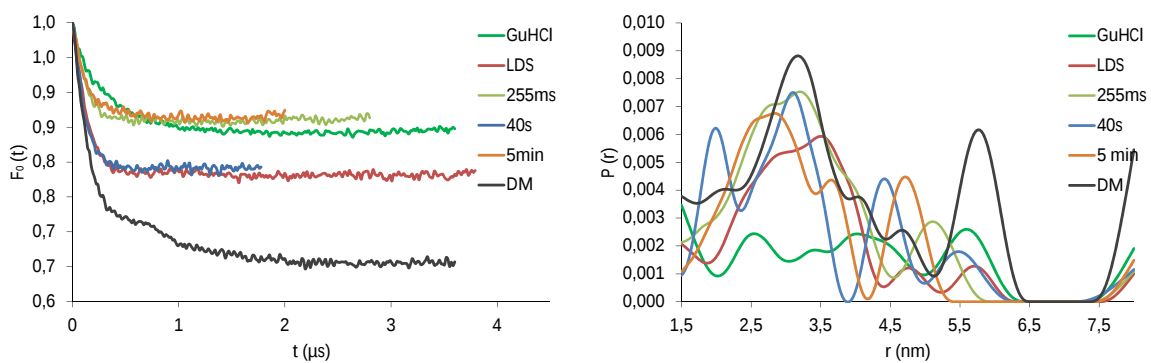
(d) 106/160



(e) 123/196



(f) 124/143



(g) 174/196

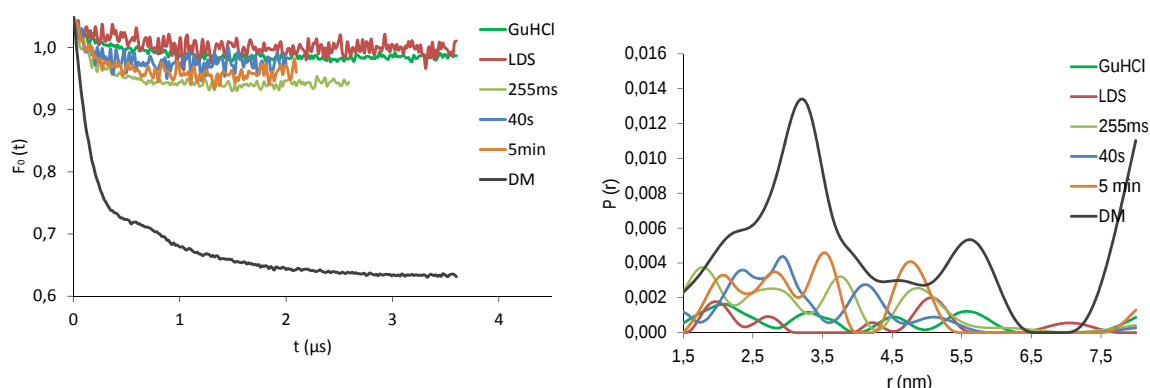


Abbildung III.1.33.: EPR-Primärdaten und Abstandsverteilungen der Zeitaufgelösten Proben im Vergleich zu vollständig ge- und entfalteten Komplexen. Faltungsproben: 45 μ LHCP, 50 mM Li-Borat pH 8,1, 50 mM β -ME, in D_2O ; DM: aufgereinigte Komplexe in 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 % n-Dodecyl- β -D-maltoside, 27,7 % Glycerol- d_8 , in D_2O ; LDS: 45 μ M LHCP in 1 % LDS, 50 mM Li-Borat pH 8,1, in D_2O ; GuHCl: 45 μ M LHCP in 6 M GuHCl, 50 mM Li-Borat pH 8,1, in D_2O . Links: Primärdaten des 4-Puls DEER-Experiments. Time Shift = 123 ns bei allen Proben. Die Parameter der LDS und GuHCl Proben können Abb. III.1.30 entnommen werden. Rechts: Abstandsverteilungen, abgeleitet aus DEER-Spektrum (nicht gezeigt) durch Tikhonov-Regularisierung mit berechneter L-Kurve. Parameter der DEER-EPR Messung:

	Probe	D2	CutOff	BckCorr	ØAbstand
(a) 59/90	255 ms	3500 ns	2600 ns	384 ns	3,56 nm
	40 s	3500 ns	2600 ns	1000 ns	4,25 nm
	5min	3000 ns	2688 ns	432 ns	3,91 nm
	DM	6000 ns	5096 ns	1424 ns	4,81 nm
(b) 90/123	255 ms	2500 ns	2000 ns	1000 ns	3,45 nm
	40s	2500 ns	1904 ns	1000 ns	3,4 nm
	5 min	2500 ns	2000 ns	560 ns	3,24 nm
	DM	6000 ns	5000 ns	1424 ns	4,3 nm
(c) 90/196	255 ms	2500 ns	1824 ns	1000 ns	3,81 nm
	500 ms	2500 ns	1824 ns	1000 ns	3,71 nm
	1 s	2500 ns	1824 ns	1000 ns	3,41 nm
	20 s	2500 ns	1824 ns	1000 ns	3,69 nm
	40 s	2500 ns	1824 ns	1000 ns	3,8 nm
	5 min	2000 ns	1504 ns	426 ns	3,68 nm
	DM	3500 ns	2600 ns	1500 ns	4,28 nm
(d) 106/160	255 ms	2900 ns	2600 ns	320 ns	3,53 nm
	500 ms	2900 ns	2600 ns	1500 ns	4,07 nm
	20 s	3500 ns	2600 ns	1500 ns	4,07 nm
	40 s	2900 ns	2600 ns	1500 ns	4,42 nm
	5 min	2500 ns	1800 ns	1800 ns	4,4 nm
	DM	5000 ns	4004 ns	2000 ns	4,42 nm
(e) 123/196	255 ms	2900 ns	2272 ns	1000 ns	3,44 nm
	40 s	2000 ns	1696 ns	424 ns	3,38 nm
	5 min	2500 ns	2100 ns	232 ns	3,33 nm
	DM	5000 ns	4688 ns	624 ns	4,06 nm

Ergebnisse

	Probe	D2	CutOff	BckCorr	ØAbstand
(f) 124/143	255 ms	3500 ns	2800 ns	256 ns	3,15 nm
	40 s	3500 ns	2600 ns	1000 ns	3,38 nm
	5 min	2500 ns	2000 ns	560 ns	3,3 nm
	DM	5000 ns	4088 ns	1172 ns	3,9 nm
(g) 174/196	255 ms	2900 ns	2592 ns	648 ns	3,35 nm
	40 s	2900 ns	2000 ns	1000 ns	3,1 nm
	5 min	2500 ns	2100 ns	560 ns	3,49 nm
	DM	4500 ns	3600 ns	3000 ns	4,08 nm

2. Diskussion

2.1. Die Rekonstitutionsausbeute des LHCII wird durch mehrere Faktoren beeinflusst

In der vorliegenden Arbeit standen statische und zeitaufgelöste Strukturuntersuchungen am rekombinanten Lichtsammelkomplex II im Fokus. Verschiedene spektroskopische und kristallographische Untersuchungsmethoden haben in der Vergangenheit die Vergleichbarkeit des in Detergenzmizellen oder Liposomen inserierten LHCII mit nativem Komplex gezeigt (Hobe et al. (1994), Dockter et al. (2012)). Faltungsuntersuchungen an Membranproteinen stellen eine große experimentelle Herausforderung dar (Seddon et al. (2004)) und zeitaufgelöste Messungen *in vivo* entziehen sich bis zum heutigen Tag weitgehend den experimentellen Möglichkeiten. Die Rekonstitution des LHCII *in vitro* durch Detergenzverdünnung ermöglicht die Untersuchung der Faltung im Modellsystem (Horn (2004a), Dockter et al. (2009)). Die Kombination der Rekonstitution mit einem computergesteuerten Misch- („Stopped-Flow“) sowie einem selbstgebauten „Freeze-Quench“-System erforderten die Anpassung der experimentellen Parameter früherer Untersuchungen, um hohe Komplexausbeuten für zeitaufgelöste EPR-Messungen zu erzielen. Da nach dem Abstoppen der Rekonstitution durch Schockfrieren keine abschließende Aufreinigung des LHCII möglich ist, stellt das Verhältnis von ungefaltetem Protein zu rückgefaltetem Komplex einen essentiellen Punkt für die Qualität der DEER-EPR Spektren dar. Die mögliche Aggregation doppelt spinmarkierter Apoproteine in Proben mit gefalteten Komplexen konnte zur Verbreiterung von Abstandsverteilungen der markierten Position durch einen Beitrag ungewollter Abstände führen (Abschnitt 1.3).

Die Rekonstitutionsausbeute ist vor allem durch die Detergenzkonzentrationen der Reaktionslösungen und die Pigmentverfügbarkeit während der Rückfaltung limitiert. Neben diesen beiden zentralen Punkten, die später diskutiert werden, spielen weitere Faktoren eine Rolle. So konnte bei dem cysteinfreien LHCP-Klon C79Sh reproduzierbar eine im Vergleich fast doppelt so hohe Komplexausbeute wie bei Doppelcysteinmutanten festgestellt werden (Abb. III.1.17, Abb. III.1.17). Die Vermutung, dass intra- und intermolekulare Disulfidbrücken die Komplexausbeute einschränken, konnte durch Erhöhung der Reduktionsmittelkonzentration ausgeschlossen und durch die Beobachtung widerlegt werden, dass markierte Komplexe vergleichbare Aus-

beuten erzielen. Eine spontane Racemisierung der Cysteine und damit einhergehende eingeschränkte Faltungsfähigkeit der Apoproteine, ist bei den Lagerungs- (-20°C) und Versuchsbedingungen (RT, pH 8,1) der Proteinproben sehr unwahrscheinlich (Amano et al. (2011)). Eine andere Vermutung war, dass die verringerte LHCP-Ausbeute der Cysteinmutanten nach Überexpression in *E. Coli* des Stamms JM101 im Vergleich zu Klon C79Sh und das dadurch schlechtere Verhältnis von Fremd- zu Zielprotein in den IB-Aliquots ausschlaggebend für die eingeschränkte Rekonstitutionsfähigkeit ist. Jedoch zeigten Kontrollversuche mit über präparative Gelelektrophorese aufgereinigtem LHCP keine gesteigerte Komplexausbeute (Abschnitt 1.3). Es konnte nicht abschließend geklärt werden, ob ein direkter Zusammenhang der einklonierten Cysteine mit der Komplexausbeute besteht. Aus der Übereinstimmung der Daten aus Deriphat-Gelelektrophoresen, CD- und EPR-Spektren kann geschlossen werden, dass sich die Einschränkungen durch ortsgerichtete Mutationen lediglich auf die Komplexausbeute der Detergenzverdünnungs-Rekonstitution, nicht jedoch auf die strukturelle Integrität des LHCII oder die Komplexausbeuten der Detergenzwechsel-Rekonstitution auswirken (Abb. 1.24(b), Booth and Paulsen (1996)).

Die Zusammensetzung des Pigmentpuffers hat wie bereits angesprochen einen großen Einfluss auf den Rekonstitutionserfolg im Detergenzverdünnungs-Ansatz. Hier zeigten nur die Detergenzien einen Einfluss auf die Rekonstitutionsausbeute, nicht jedoch Saccharose oder Phosphatidylglyzerin (PG). PG ist im LHCII-Trimer an den intermolekularen Schnittstelle der Monomere gebunden (Liu et al. (2004)), spielt eine wichtige Rolle in der Assemblierung der trimeren Form (Nussberger et al. (1993)) und übt einen de-aggregierenden Effekt aus (Schaller et al. (2011)). Für die Rekonstitution von monomerem LHCII ist es jedoch nicht essentiell und es besteht keine Abhängigkeit der Komplexausbeute von der PG-Konzentration im Pigmentpuffer (Abb. III.1.4). Wie von Dockter (2009) gezeigt wurde, sind Spuren des ionischen Detergenz Na-Deoxycholat essentiell für den Rekonstitutionserfolg bei hochkonzentrierten EPR-Proben, eine Konzentrationsabhängigkeit konnte jedoch auch hier nicht festgestellt werden. Hingegen hat insbesondere das Verhältnis der beiden nicht-ionischen Detergenzien Octylglucosid (OG) und Triton-X100 (Tx) einen starken Effekt auf die Komplexausbeute, bei einem größeren Verhältnis als 3:1 (OG:Tx) ist keine Rekonstitution mit hohen LHCP- und Pigment-Konzentrationen möglich. Eine mögliche Erklärung könnte sein, das Triton-X100 als ein stärkeres Detergenz eine höhere Affinität zum LHCII besitzt als Octylglucosid und bei hohen LDS-Konzentrationen benötigt wird, um einen effektiven Übergang des Apoproteins vom LDS-denaturierten Zustand in gemischte OG-Tx-LDS Micellen und eine damit einhergehende Induktion der Faltung zu ermöglichen. Der Problematik des rapiden Entfernens des ionischen Detergenz zur Rückfaltung von Membranproteinen und Vermeidung von Aggregationen kann durch Bildung eines artifiziellen Chaperon-Komplexes durch Addition von Cyclodextrin begegnet werden (Zhang et al. (2013)), jedoch wird dabei

Einfluss auf die Kinetik der Faltung genommen (Yazdanparast and Khodagholi (2006)), daher stellte dieses Vorgehen zur Untersuchung des Faltungsweges keine Alternative dar.

Den größten Einfluss auf die Komplexausbeute hat die Pigmentverfügbarkeit im RK1. Die Löslichkeit der Pigmente in dem Gemisch aus nicht-ionischen Detergenzien ist eingeschränkt, was zu einer fortschreitenden Aggregation nach Addition in Ethanol vorgelöster Pigmente führt und in einer sinkenden Konzentration gefalteter Komplexe resultiert (Abb. III.1.9). Die schlechteste Löslichkeit im Pigmentpuffer wies β -Carotin auf. Als hydrophobstes Pigment des Pflanzentotalextraktes (TE), viel es schon wenige Minuten, nachdem ein TE-Aliquot gelöst wurde, aus. Diese schnelle Aggregatbildung des β -Carotin hat auch Einfluss auf die Löslichkeit der restlichen Pigmente des Totalextraktes im Pigmentpuffer, β -Carotin schien hier als Aggregationskeim zu wirken. Die Aggregation kann zwar durch die Verwendung von Einzelpigmentgemischen, die kein β -Carotin enthalten, gemindert werden, jedoch rechtfertigt der Gewinn an Zeit, die nach Pufferansatz zur Herstellung von EPR-Proben zur Verfügung steht, nicht den experimentellen Aufwand zur Herstellung der Einzepigmente in den Mengen, die für zeitaufgelöste Messungen benötigt werden. Die praktikabelste Lösung des Aggregationsproblems ist das Arbeiten in einem Zeitfenster von 15 min nach Zugabe der Pigmente zum Pigmentpuffer, da eine Pigmentaggregation in dieser Zeit nicht über ein positives Signal im CD-Spektrum bei 700 nm nachweisbar ist und keinen Effekt auf die Rekonstitutionsausbeute hat (Abschnitt 1.1.3).

Ein ausreichender Pigmentüberschuss ist notwendig, um eine korrekte Rückfaltung des LHCP zu LHCII zu gewährleisten. Bedingt durch die eingeschränkte Löslichkeit der Pigmente im Pigmentpuffer steht dem LHCII nur ein molarer Überschuss von zwei Chlorophyllen pro Bindestelle im LHCP zur Verfügung. Durch das Abzentrifugieren unlöslicher Pigmente verschiebt sich das *Chl a/Chl b* Verhältnis des Pigmentpuffers hin zu 1,4 (Tab. III.1.2). Da dieses Verhältnis den gebundenen Chlorophyllen im nativen LHCII entspricht, und Untersuchungen an aufgereinigten Komplexen mit diesen Stöchiometrien zu Komplexen mit normalen *Chl a/Chl b*-Verhältnis geführt haben (Hobe et al. (2003)), ist von einer korrekten Besetzung der Chlorophyll-Bindestellen im gefalteten Komplex auszugehen. Jedoch wird die totale Rekonstitutionsausbeute scheinbar durch den geringen Überschuss an Pigmenten während der Rückfaltung limitiert. Eine weitere Verringerung der eingesetzten Proteinmenge zur Herstellung der EPR-Proben kann hier Abhilfe schaffen, jedoch stößt man dann mit der totalen Komplexkonzentration an die Grenzen der Nachweisbarkeit im EPR-Spektroskop. Die optimale Konzentration für DEER-Messungen im Q-Band-EPR-Spektroskop liegt zur Zeit bei 50 μ M, geringere Konzentrationen gehen mit Einbußen im Signal-Rausch-Verhältnis der Messungen einher (Jeschke (2012)). Da die Sensitivität in der Vergangenheit jedoch kontinuierliche Fortschritte gemacht hat, ist davon auszugehen, dass in Zukunft zeitaufgelöste Messungen mit geringeren LHCP-Konzentrationen möglich sein werden und so Proben mit einem optimierten Verhältnis an LHCP zu LHCII hergestellt werden

können.

Auch mit dem derzeitigen Rekonstitutionsprotokoll ist es möglich, Proben zur zeitaufgelösten Vermessung im DEER-Verfahren unter Einbeziehung einer computergesteuerten Rekonstitution im Milisekundenbereich herzustellen. Die Verwendung des „Stopped-Flow/Freeze-Quench“-Setups hat keinen Einfluss auf die Rekonstituierbarkeit des LHCP zu funktionalem Komplex (Abb. III.1.26).

2.2. Die Aufreinigung des LHCP kann die Signalqualität in EPR-Messungen verbessern

Ein Ansatzpunkt zur Optimierung der Probenqualität für zeitaufgelöste EPR-Messungen ist die Aufreinigung der eingesetzten LHCP-Inclusion Bodies von coexprimierten nativen Proteinen des *E. coli*-Metabolismus. Zwar liegt das rekombinante LHCP-Gen auf dem Vektor pDS12-RBSII im Expressionsstamm JM101, einem „high-copy“-Plasmid (Bujard et al. (1987)) und führt nach Expressionsinduktion zu einer starken Anreicherung des Zielproteins im Verhältnis zu basal exprimierten Proteinen, jedoch können auch geringe Verunreinigungen in Messungen mit ortsgerichteter Markierung einzelner Cysteine störend wirken. Die Aufreinigungsschritte im Standardprotokoll der LHCP-Überexpression senken den Anteil an Fremdproteinen in IB-Präparationen auf 5-10% (Abb. III.1.24). Markierungsexperimente mit dem cysteinefreiem LHCP-Klon C79Sh zeigten ein Restsignal im CW-EPR, dass 12,5% der Signalstärke einer markierten Doppelcysteinmutante entsprach (Abb. III.1.21). Dieser Anteil an Grundsignal ist jedoch nicht gleichzusetzen mit einer Störung des EPR-Signals einer DEER-Messung in gleichem Ausmaß, da hier nur doppelt markierte Fremdproteine bzw. Proteinaggregate messbar sind, in denen Spinlabel einen geringeren Abstand als 8 nm aufweisen (Klare (2013)). Da eine geordnete Struktur der Fremdproteine in dem für die Rückfaltung des LHCP optimierten System unwahrscheinlich ist, wirken sich Verunreinigungen hauptsächlich auf das Signal-Rausch-Verhältnis von Messungen aus und führen zum Auftreten von Aggregatpeaks, die in Abstandsverteilungen ihre Ausprägung abhängig von der angewandten Hintergrundkorrektur ändern (mündl. Mitteilung AG Jeschke). Das Vorkommen von distinkten Abständen, die mit intramolekularen Abständen des Zielproteins verwechselt werden können, ist unwahrscheinlich.

Ein Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses ist jedoch im Hinblick auf ein experimentelles System, in dem neben gefalteten Komplexen auch ungefaltete Apoproteine vorliegen, die bereits zu einer Einschränkung der Signalqualität führen können, wünschenswert. Die Trennung der Fremdproteine vom LHCP durch eine präparative Gelelektrophorese ist eine praktikable Möglichkeit, um EPR-Proben mit einer gesteigerten Signalqualität herzustellen. Es konnte

gezeigt werden, dass LHCII-Präparationen per Detergenzverdünnungs-Rekonstitution aus mit PrepPAGE gereinigten IBs eine Signalqualität erreichen können, die mit der nachträglich über Saccharose-Dichtegradienten aufgereinigter Komplexe vergleichbar ist (Abb. 1.24(b)). Ein Einfluss der Aufreinigung auf die Komplexausbeute der Rekonstitution oder die spektroskopischen Eigenschaften der Komplexe konnte nicht nachgewiesen werden. Daher kann ein Einfluss der Fremdproteine in ungereinigten IB Proben auf die Faltung oder strukturelle Integrität gefalteter Komplexe ausgeschlossen werden (Abb. 1.24(c)). Die Proteinausbeute einer Auftrennung ist mit 2-5 mg reinem LHCP relativ gering, so dass auch hier davon profitiert werden würde, geringere Probenkonzentrationen einsetzen zu können.

2.3. Das „Stopped-Flow/Freeze-Quench“-System ist zur Untersuchung früher Faltungseignisse geeignet

Durch die Verwendung einer computergesteuerten Mischeinheit (Stopped-Flow) und einer an der ETH-Zürich entworfenen „Freeze-Quench“-Apparatur konnte in dieser Arbeit die experimentelle Totzeit zur Herstellung von zeitaufgelösten EPR-Proben von 37 s (Dockter et al. (2009)) auf 255 ms verringert werden. Diese, im Vergleich zu neueren Arbeiten mit microfluidalen Mixereinheiten, die Mischzeiten von 10 μ s erreichen (Li et al. (2014)), immer noch relativ hohe Totzeit, ist zum einen durch die benötigten Probenvolumina wie durch die Tatsache bedingt, dass DEER-Abstandsmessungen an markierten Proteinen nicht im Durchfluss durchgeführt werden können, sondern Messungen des in flüssigem Stickstoff konservierten Faltungszustandes mehrere Stunden bis Tage dauern können.

Prinzipiell sind mit dem hier verwendeten „Stopped-Flow“-System auch geringere Zeiten erreichbar, da es in zwei Operationsmodi betrieben werden kann, jedoch war eine Kalibrierung im schnelleren „Continuous-Flow“-Modus, bei dem die Alterungszeit der Probe durch die Durchflussgeschwindigkeit (Flussrate) im System reguliert wird, nicht möglich. In diesem Modus sollten Totzeiten von 50 ms erreicht werden können, jedoch wichen die Daten der Kontrollreaktion, in welcher der Übergang von Aquo-Metmyoglin zu Myoglobin-Azid durch Kontrolle des Signalshifts im Continuous-Wave-EPR Spektroskops gemessen wird (Potapov and Goldfarb (2010)), stark von der berechneten Kinetik ab (Abb. III.1.27). Im „Interrupted-Flow“-Modus, in dem die Alterungszeit der Probe durch eine Pause im Probenvorschub durch das System bestimmt wird, korrelierten die experimentell ermittelten Zeiten gut mit der Kinetik der Reaktion (Abb. III.1.28). Daher ist naheliegend, dass die Abweichung der Reaktionszeiten von den über das Kontrollprogramm Eingeegebenen auf den Unterschied zwischen diesen beiden Modi zurückzuführen ist. Da dieser einzig in der Variation der Flussrate besteht, scheint es eine inkonsistente Abweichung

des Pumpenvorschubs von der im System eingestellten Geschwindigkeit bei verschiedenen Flussraten zu geben. Eventuell wirkt auch die Auslassdüse der SFM-300 bei hohen Flussraten (< 1 ml/s) als Widerstand und erhöht so die Alterungszeit der Proben. Jedoch wäre in diesem Fall eine reproduzierbare Abweichung hin zu längeren Alterungszeiten zu erwarten gewesen, was nicht der Fall war. Aufgrund der fehlenden Kalibrierung des Systems bei Verwendung variabler Flussraten, muss von der Herstellung von Proben mit dem SFM300 und Totzeiten unter 255 ms abgesehen werden. Wird jedoch konstant bei der optimalen Flussrate von 0,5 ml/s (pro Spritze) gearbeitet (schriftl. Mitteilung BioLogic Kundendienst), ist eine Produktion von Proben mit definierter Alterungszeit möglich. Aufgrund der relativ langsamen Faltungskinetik des LHCII reichte diese Totzeit aus, um weitreichende Einblicke in frühe Ereignisse der Rückfaltung des LHCII *in vitro* zu erhalten.

2.4. In LDS ist die Sekundärstruktur des LHCII partiell ausgebildet

Die Untersuchung des Rückfaltungsprozesses ausgehend von einem in LDS-solubilisierten Apoprotein, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, wirft die Frage auf, in welchem Grundzustand sich der LHCP bei Faltungsbeginn befindet. Untersuchungen von Ruth Horn (Horn and Paulsen (2002)) haben einen helikalen Anteil von 27% im SDS solubilisierten Zustand nachgewiesen, während in dem chaotropen Salz Guanidinium-Hydrochlorid (GuHCl) keine Sekundärstruktur nachweisbar war. Die Zuordnung des helikalen Anteils zu einzelnen Protein-domänen war in dieser Studie aufgrund nur geringer Änderungen im helikalen Anteil zwischen verschiedenen Deletionsmutanten, nicht möglich.

Der LDS-solubilierte Zustand, im Vergleich zum komplett denaturierten Protein in GuHCl, konnte mithilfe von Abstandsmessungen markierter Inter- und Intrahelikalen Positionen der Transmembranhelices in Kombination mit UVCD-Messungen genauer untersucht werden. Die Aminosäuren der markierten Positionen wurden zum Teil in dieser Arbeit durch ortsgerichtete Mutagenese mit Cysteinen ausgetauscht, oder lagen bereits als Dauerkulturen aus früheren Untersuchungen vor. Der Austausch der Aminosäuren Serin, Valin, Isoleucin oder Alanin aller verwendeten Klone hat keine Auswirkung auf die Rekonstitution, die Trimerisierbarkeit, oder die strukturellen Eigenschaften des LHCII, wie durch eine biochemische Charakterisierung mittels Fluoreszenz-, CD- und Absorptionsspektroskopie gezeigt werden konnte (Abb. 1.30(g), Abb. III.1.32). Die Helix 1, die im vollgefalteten Komplex spiegelsymmetrisch mit Helix 4 ein Helixkreuz bildet, wurde durch eine Abstandsmessung der Positionen 59/90 untersucht. Position 59 befindet sich am Ende der Helix auf stromaler Seite, Position 90 lumenal. Im Vergleich zum Zustand in GuHCl lässt eine breite Abstandsverteilung der Spinlabel auf eine bereits zum Teil ausgebildete Struktur dieser Helix schließen (Abb. III.1.30 (a)). In der Kristallstruktur des tri-

meren LHCII beträgt der Abstand der Positionen 4,3 nm (Standfuss et al. (2005)), vollständig denaturiert entzieht sich der Abstand dem Messbereich eines 4-Puls-DEER-EPR-Experiments. Zieht man die Flexibilität der Spinlabel in Betracht, die zu einer Verbreiterung der Abstandsverteilung in geringem Maße führen, weist vor allem der direkte Vergleich mit der Abstandsverteilung des aufgereinigten, vollständig rekonstituierten Komplex, der einen distinkten Peak mit geringer Breite zeigt, auf eine hohe Flexibilität der beiden Positionen zueinander hin. Auch die dritte Helix, markiert an den Positionen 124 (Ile, lumenal) und 143 (Ile, stromal), wies im LDS-denaturierten Zustand eine Abstandsverteilung auf (Peak bei 3,5 nm), die unter Beachtung der 0,5 nm langen Spinlabel gut mit dem Abstand der Positionen in der Kristallstruktur übereinstimmt (3 nm). Auch hier ist die Abstandsverteilung breiter als im rekonstituierten Komplex, der Unterschied ist jedoch weniger prägnant als bei Helix 1 (Abb. III.1.30 (f)). Helix 4 hingegen zeigt in der Abstandsverteilung ein Spektrum dass mit dem vollständig denaturierten Zustand in GuHCl vergleichbar ist. Der Abstand in der Kristallstruktur beträgt 3,5 nm, eine zum Teil ausgebildete Struktur sollte also bereits eine Abstandsverteilung hervorrufen, die geringer als 8 nm liegt und somit im EPR-Spektrum sichtbar wäre (Abb. III.1.30 (g)). Daher kann geschlossen werden, dass der helicale Anteil im LDS-solubilisiertern Zustand zum Großteil auf die Helices 1 & 3, nicht jedoch auf Helix 4 zurückzuführen. Ein Beitrag der peripheren Helices 2 & 5 konnte mit den verwendeten LHCP-Mutanten nicht untersucht werden. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Daten der DEER-EPR-Spektren für eine Vorfaltung der Transmembranen Helices 1 & 3 sprechen, während Helix 4 in Dodecylsulfat-solubilisiertem Zustand vollständig entfaltet vorliegt.

Der per UVCD-Analyse ermittelte, helicale Anteil des LDS-solubilisierten LHCP ist mit dem in SDS identisch und beträgt 27% (Tab. III.1.7; Horn and Paulsen (2002)). Im Rückfaltungsansatz lag der Anteil mit 31,6% niedriger als in aufgereinigtem LHCII (36%), jedoch entspricht dies dem erwarteten Anteil in einer ungereinigten LHCII-Probe mit einer Rekonstitutionsausbeute von 30%. Der Vergleich mit den Ergebnissen der Deletionsmutanten von Horn and Paulsen (2002) zeigt, dass die Daten der Vorstellung einer vollständig entfalteten Helix 4 nicht widersprechen, jedoch auch nicht durch diese gesichert sind. Zwar konnte über die UVCD-Analyse keine eindeutige Zuordnung des helicalen Anteils zu einzelnen Proteindomänen vorgenommen werden, jedoch war auch dort die größte Abweichung vom erwarteten helicalen Anteil in einer Deletionsmutante zu verzeichnen, die nur die Helices 1, 4 & 5 beinhaltete (60%). Die Deletionsmutanten, die nur Helix 1 & 2 bzw. Helix 1,2 & 3 beinhalteten, zeigten eine größere Übereinstimmung mit dem vorhergesagten helicalen Anteil (85% bzw. 78%), was die These der ungefalteten Helix 4 stützt. Eine weitere Mutante, welche die Helices 2,3,4 & 5 umfasste zeigte jedoch ebenfalls eine 78 prozentige Übereinstimmung mit der Vorhersage aus der Elektronenkristallographischen Aufnahme von Kühlbrandt et al. (1994). Hier wäre bei entfalteter Helix 4 weniger zu erwarten

gewesen.

Die Ausrichtung der Transmembranhelices zueinander wurde mithilfe der Klone 90/123 (Helix 1 zu 3, lumenal), 123/196 (Helix 3 zu 4, lumenal) und 90/196 (Helix 1 zu 4, lumenal) untersucht. Die Klone 90/123 und 123/196 zeigten dabei breite Abstandsverteilungen, während bei Klon 90/196 keine Detektion der Spins untereinander möglich war (Abb. III.1.30 (b), Abb. III.1.30 (c), Abb. III.1.30 (e)). Dies spricht dafür, dass sich die stromalen Enden der Helices 1 & 3 sowie 3 & 4, nicht jedoch 1 & 4 in räumlicher Nähe befinden. Zieht man diese Ergebnisse in Betracht, scheint das LHCP in LDS in einer Form vorzuliegen, in der die hydrophilen Schleifenregionen zwischen den Helices nicht vollständig relaxiert sind, so dass der Abstand zwischen den Helixenden verringert ist und diese EPR-spektroskopisch detektierbar sind. Jedoch ist keine höhergradige Struktur, wie beispielsweise ein bereits ausgebildetes Helixkreuz vorhanden, da die Enden der Helices 1 & 4 weit voneinander entfernt sind und auch der Klon 106/160, der die Orientierung der lumenalen zur stromalen Schleifenregion widerspiegelt, kein Signal lieferte (Abb. III.1.30 (d)). Diese Vorstellung lässt sich einem Modell wie der „decorated-Micelle“ vereinbaren, bei dem hydrophobe Bereiche in der Detergenzmicelle abgeschirmt werden und hydrophile Bereiche sich um die Micelle winden (Otzen (2011)). Für Rinderserum-Albumin und Ovalbumin konnte eine solche micelläre Anordnung über SANS („small-angle-neutron-scattering“) nachgewiesen werden, die Komplexe bildeten je nach Detergenzkonzentration eine oder mehrere individuelle Micellen aus (Guo et al. (1990)).

2.5. Zeitaufgelöste DEER-EPR Proben zeigen den Verlauf der Faltung

Weiterführende Faltungsuntersuchungen ausgehend von dem LDS-denaturierten Komplex konnten wie bereits beschrieben durch Insertion des LHCP in OG-Tx-LDS-Mischmicellen über Verdünnungs-Rekonstitution durchgeführt werden. Die Faltungsproben dieser Arbeit wurden durch Inés Garcia Rubio (AG Jeschke, ETH Zürich) im Q-Band-EPR-Spektroskop im 4-Puls-DEER-Verfahren vermessen, nachdem sie in der SFM300 in pigmenthaltige Og-Tx-LDS-Mischmicellen überführt und auf einer an der ETH Zürich entwickelten „Freeze-Quench“-Apparatur schockgefroren wurden, die in ihrem Prinzip der von Manzerova et al. (2011) vorgestellten glich. Die LHCP-Klone, mit denen die Faltung untersucht wurde, entsprachen den zuvor in denaturiertem Zustand analysierten (siehe Abschnitt 2.4). Anhand der Abstandsentwicklung der markierten Positionen der einzelnen Klone im Verlauf der Faltung konnten Aussagen über das Verhalten einzelner Teilbereiche des LHCP gemacht werden. Im Folgenden wird die Formierung und Ausrichtung der Helices sowie die Ausbildung und Stabilisierung der Loopregionen anhand der

erhobenen Daten erläutert.

2.5.1. Formierung der Transmembranhelices

Die Formierung der ersten Transmembranhelix (Helix 1) des LHCII wurde mithilfe des Klons 59/90 untersucht. Im vollgefalteten Komplex liegen diese Positionen an den Enden der Helix 1 in der Detergenzmicelle. Die Mutante wurde in denaturierter Form (GuHCl), in LDS, nach 255 ms, 40 s, 5 min & vollständig gefaltet und aufgereinigt vermessen. Die sehr breite Abstandsverteilung in LDS weicht bereits nach 255 ms einem Maximum bei 4,8 nm (Abb. III.2.1 (a), links), welches in seiner Intensität in der 40 s- & 5 min-Probe zunimmt, bei gleichzeitiger geringfügiger Verschiebung der Lage (Abb. III.2.1 (a), rechts; Abb. III.1.33 (a)). Eine breite Abstandsverteilung bedeutet, dass die Spinmarker eine hohe Flexibilität zueinander aufweisen und viele verschiedene Abstände einnehmen können. Da die Spinmarker mit einer Länge von 0,5 nm und einer eingeschränkten Rotationsfreiheit am Rückrat des markierten Proteins nur zu einem Teil selbst zur Flexibilität beitragen, kann aus dem großen Spektrum der möglichen Abstände der DEER-Messung des Klons 59/90 in LDS auf eine erhöhte Beweglichkeit dieser Domäne geschlossen werden, die in den ersten 255 ms der Faltung bereits erheblich abnimmt. Folglich wird bereits kurz nach Faltungsbeginn die in LDS präformierte Helix stabilisiert, und so den Spinmarkern geringere Flexibilität zueinander vermittelt. Die bis zur vollständigen Faltung fortschreitende Zunahme der Peakintensität bei gleichzeitiger Abnahme der Nebenmaxima zeigt, dass die Möglichkeit anderer Konformationen der Spinmarker zueinander mit fortschreitender Faltungsdauer geringer wird. Hier wird die Helix in ihrer finalen Konformation stabilisiert, bis die Spinlabel im vollgefalteten Komplex einen distinkten Abstand von 5 nm einnehmen.

Die Formierung der zweiten Transmembranhelix (Helix 3), repräsentiert durch den Klon 124/143, folgt einem ähnlichem Schema. Die Abstandsverteilung ist bereits in LDS schmal, mit einer Peakbreite von 2 nm. In der Breite ist in den ersten 255 ms Faltungszeit kein Unterschied festzustellen, erst die 40 s Probe zeigt hier eine weitere Verringerung und ein Spektrum, das dem der vollgefalteten Probe gleich (Abb. III.2.1 (b), links). Verglichen mit Helix 1 scheint die Struktur also von Vorneherein stabiler zu sein, weitere Festigung der Helix findet zwischen 255 ms und 40 s der Faltung statt und ist dann weitestgehend abgeschlossen (Abb. III.2.1 (b), rechts).

Der zeitliche Ablauf der Formierung der Helix 4 konnte nicht eindeutig mithilfe des Klons 174/196 verfolgt werden. Nur die aufgereinigte Probe zeigte einen distinkten Peak bei dem erwarteten Abstand (Abb. III.2.1 (c)). Dieser trat auch in der Probe mit 40 s Faltungszeit auf, jedoch mit verglichen zu einem bei 2,1 nm auftretenden Nebenmaximum geringerer Intensität. Da weder in LDS noch in den frühen Faltungsproben ein eindeutiger Hauptabstand der Spinlabel detektiert werden konnte, spricht dies für eine späte Formierung der Helix 4. Der geringe Peak

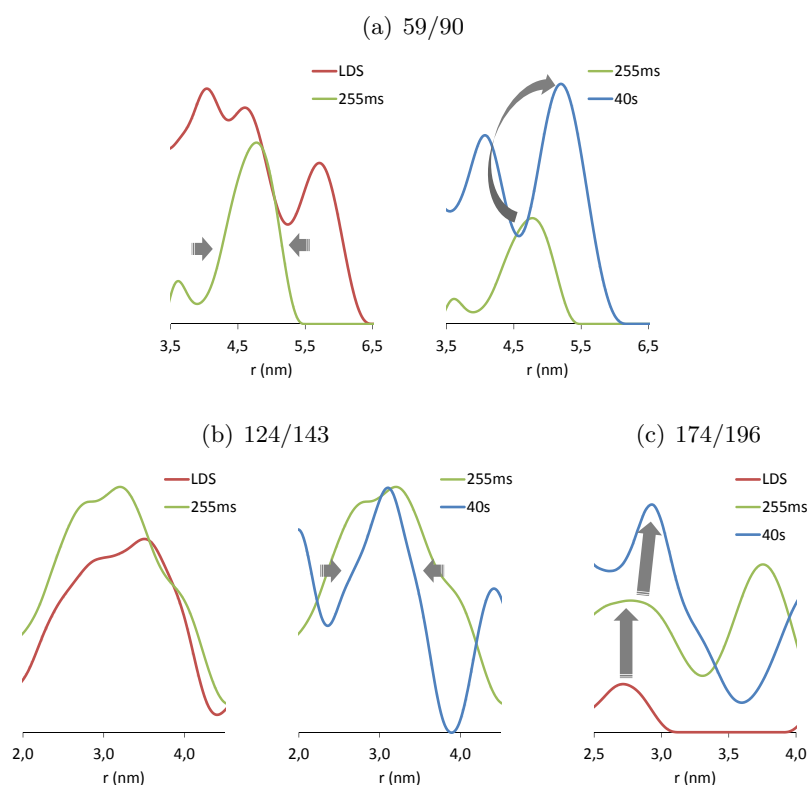


Abbildung III.2.1.: Ausbildung und Ausrichtung der Helices 1,3 & 4. Ausschnitt aus den Abstandsverteilungen der DEER-EPR Spektren mit Fokus auf den jeweiligen Hauptabstand

in der Probe mit 40 s Faltungszeit zeigt, dass sich die Spinlabel zu diesem Zeitpunkt in einem Teil der Proben „sehen“, deutet also auf die beginnende Formierung zwischen 255 ms und 40 s Faltungszeit hin.

2.5.2. Ausrichtung der Helices und Bildung des Helixkreuzes

Die Ausrichtung der einzelnen Transmembranelices zueinander gibt weiteren Aufschluss über den Ablauf der Faltung. Die Orientierung der im gefalteten Komplex luminal liegenden Enden der Helix 1 & 3, wurden mithilfe des Klons 90/123 untersucht. Betrachtet man die Daten des Klons, fällt auf, dass sich die Abstandsverteilung zwischen LDS solubilisiertem Zustand und 255 ms Faltungszeit bereits stark verschmälert, jedoch auch zwischen 40 s und 5 min Faltungszeit ist eine weitere, wenn auch wesentlich geringere Abnahme der Peakbreite zu verzeichnen (Abb. III.2.2 (a), Abb. III.1.33 (b)). Eine Auswertung aufgereinigter Komplexe war mit Klon 90/123 unglücklicherweise bisher nicht möglich, die Rekonstitution in DM-Micellen zeigte im DEER-Spektrum Anzeichen starker Aggregatverunreinigungen und die Peakintensitäten lagen

sogar unter denen der ungereinigten Faltungsproben. Die Peakentwicklung hin zur Probe mit fünfminütiger Faltungszeit lässt auf eine frühe Ausrichtung der beiden Helices innerhalb der ersten 255 ms der Faltung schließen, mit einer späteren endgültigen Stabilisierung zwischen 40 s und 5 min.

Die Vorstellung einer späten Formierung der Helix 4 wird auch durch Messungen an Klon 90/196 unterstützt (Abb. III.1.33 (c)). Die markierten Positionen, die im gefalteten Komplex an den lumenalen Enden der Helix 1 & 4 liegen, sollten nur bei einem ausgebildeten Helixkreuz und damit einhergehend vollständig ausgebildeten Konformation der beteiligten Helices einen Abstand aufweisen, der der Kontrollprobe in DM entspricht (3,8 nm). Von Dockter et al. (2009) wurde bereits eine langsame Kinetik mit einer Faltungskonstante von 294 s ermittelt. Da zu diesem Klon bereits DEER-EPR Daten über der damaligen Totzeit von 37 s vorlagen, erfolgte eine engmaschigere Überprüfung der frühen Faltungszustände für diese Mutante. Die Ausbildung eines distinkten Peaks konnte erst bei 40 s Faltungszeit beobachtet werden, jedoch war auch hier die Abstandsverteilung breit und es traten Nebenmaxima auf, deren Ursprung nicht eindeutig geklärt, jedoch anhand des Vergleichs mit über präparative Gelelektrophorese aufgereinigten Proben wahrscheinlich auf Aggregationen von Fremdproteinen zurückzuführen waren. Die Probe mit fünfminütiger Faltungszeit konnte aufgrund eines sehr schwachen EPR-Signals nicht ausgewertet werden. Betrachtet man nur den Peak bei 3,8 nm, kann ein stetiger Zuwachs mit fortschreitender Faltung beobachtet werden, bei stetiger Abnahme der Nebenmaxima. Die endgültige Ausrichtung des Helixkreuz scheint jedoch im späteren Verlauf der Faltung, nach 40 s stattzufinden (Abb. III.2.2 (b)).

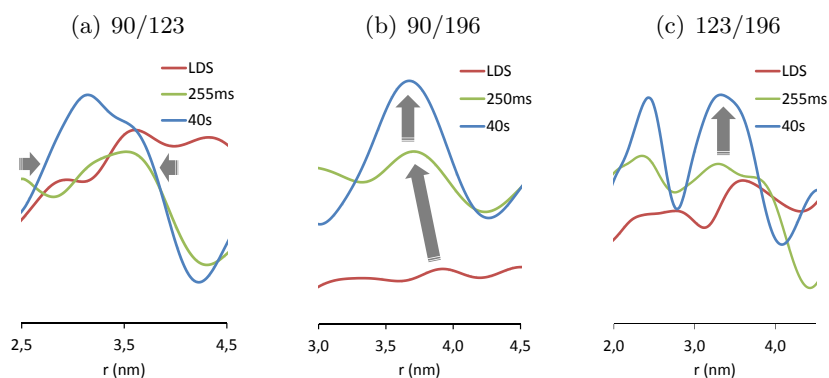


Abbildung III.2.2.: Ausrichtung der Transmembranhelices zueinander Ausschnitt aus den Abstandsverteilungen der DEER-EPR Spektren mit Fokus auf den jeweiligen Hauptabstand

Die lumenalen Enden der Helix 3 & 4 scheinen bereits im solubilisierten Zustand grundlegend ausgerichtet, die Abstandsverteilungen des Klons 123/196 blieben bis zu 40 s Faltungszeit breit,

die Dominanz des Peaks bei 3,5 nm nahm dabei jedoch zu (Abb. III.2.2 (c), Abb. III.1.33 (e)). Dies spricht für eine hohe Flexibilität dieses Bereiches, die über die ersten 40 Sekunden erhalten bleibt. Die in DM rekonstituierte Probe zeigte auch nach mehrmaliger Wiederholung starke Anzeichen von Aggregaten im DEER-EPR Spektrum und geringe Intensitäten der Hauptpeaks, wodurch keine klare Aussage über die Entwicklung der Abstände der Helixenden nach den ersten 40 Sekunden der Faltung möglich ist.

2.5.3. Stabilisierung der stromalen und lumenalen Bereiche

Neben der Ausrichtung der Helices ist auch die Orientierung der peripheren Bereiche, insbesondere des stromalen und lumenalen Loops von Interesse. Informationen über diese Bereiche wurden mit einer Mutante gesammelt, die Spinmarker an den Aminosäuren 106 (lumenaler Loop) & 160 (stromaler Loop) trug. Der Abstand der Spinlabel dieses Klon wird neben der angesprochenen Ausbildung der Schleifenregionen vor allem durch die Ausbildung der Helix 3, in weitaus geringerem Maße auch durch Bildung der anderen beiden Transmembranhelices beeinflusst. Mit der anhand der LDS-solubilisierten Klone gezeigten Präformation der Helix 1 & 3, und der sehr frühen Stabilisierung dieser innerhalb der ersten 40 s, ist anzunehmen, dass Abstandsänderungen nach 40 s hauptsächlich auf die Ausrichtung der Loopregionen zurückzuführen sind. Der Klon 106/160 wurde ebenfalls bereits in früheren Studien untersucht, ihm wurde im Gegensatz zu Klon 90/196 jedoch eine Faltungskonstante von 50 - 60 s nachgewiesen (Dockter et al. (2009)). Aussagen über die zeitliche Abfolge der Faltungsereignisse sind auch bei diesem Klon schwierig, da in den meisten Proben starke Aggregationen auftraten, erkennbar an der Ausprägung eines Peaks bei 5 nm, der seine Ausprägung abhängig von der angewandten Hintergrundkorrektur änderte. Beschränkt man sich auf die Proben, die geringe Aggregationen aufwiesen (255 ms, 40 s und DM), ist eine stetige Zunahme eines Peaks im Bereich von 3,5 - 4,5 nm zu verzeichnen. Die Lage des Peaks verschiebt sich zunächst hin zu einem kürzeren Abstand, bis er im vollgefalteten Zustand bei 4 nm ausgeprägt ist (Abb. III.2.3, (Abb. III.1.33 (d))). Es kommt also zu einer schnellen grundlegenden Ausrichtung der Bereiche, die sich bis zum vollgefalteten Komplex hinzieht. Die schnelle Annäherung der Spinlabel ist, zieht man die Daten der Klone zur Überprüfung der Transmembranhelices hinzu, auf die Ausbildung dieser zurückzuführen, die späteren Änderungen in der Peakintensität weisen auf konformationelle Änderungen in den Loopregionen hin.

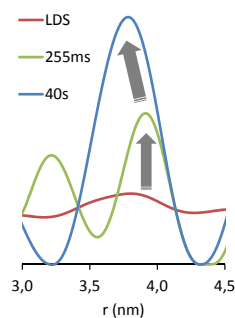


Abbildung III.2.3.: Ausrichtung der lumenalen und stromalen Bereiche (Klon 106/160). Ausschnitt aus der Abstandsverteilung des DEER-EPR Spektren mit Fokus auf den Hauptabstand

2.5.4. Zeitlicher Faltungsverlauf im Bezug auf Ligandenbindung und Membraninsertion des LHCII

Faltungsereignisse im LHCII müssen immer im Zusammenhang mit der konsekutiven Bindung der Chlorophylle und Carotinoide gesehen werden, da elektrostatische Wechselwirkungen der gebundenen Pigmente maßgeblich zur Strukturintegrität des vollgefalten Komplex beitragen und ohne sie keine Rückfaltung möglich ist. Im Folgenden werden daher Überlegungen zu möglichen Ligandeninteraktionen im Kontext des beobachteten Faltungsverlaufs dargestellt. Die Nomenklatur der Liganden folgt dabei der von Liu et al. (2004).

Im vollgefalteten Komplex binden an die Helix 1 die Chlorophylle *a* 602 (Glu 65) und *a* 603 (His 68) (Liu et al. (2004)). Da gezeigt wurde, dass die Bindung von *Chl a* einer schnellen Kinetik folgt (Horn (2004b)), könnte hier eine rasche Interaktion dieser Chlorophylle zu einer Stabilisierung der Helix führen, wie sie aus den oben diskutierten Daten hervorgeht. Helix 3 hingegen ist mit keinem *Chl a*-Molekül ligiert, das zentrale Magnesium des Porphyrinrings von *Chl b* 609 bindet an das durch ein Ionenpaar mit Asparagin 142 ladungsneutrale Glutamat 139 (Kühlbrandt et al. (1994)). Da die C₁₃-ketogruppe dieses *Chl b*-Moleküls gleichzeitig eine Wasserstoffbrücke mit dem in Helix 1 lokalisierten Histidin 68 ausbildet, ist eine stabilisierender Effekt auf die Ausrichtung der Helices zueinander durch Bindung von *Chl b* 609 wahrscheinlich. Eine sehr frühe Bindung von *Chl b*-609 widerspricht jedoch der generellen *Chl b*-Bindungskinetik (Horn (2004b)), daher ist die schnelle Stabilisierung und die rasche Ausrichtung der Helices zueinander (0-255 ms), gezeigt an den Messungen zu Klon 90/123, wohl eher auf die Micelleninsertion ohne Ligandenbindung zurückzuführen und die Stabilisierung zwischen 40 s und 5 min Faltungszeit durch die spätere Bindung des *Chl b*-609 bedingt.

Helix 4 liegt im vollgefalteten Komplex spiegelsymmetrisch zur Helix 1 in der Membran und bindet die *Chl a*-Moleküle 610, 612 und 613 über Glu 180, Asn 183 und Gln 197 (Liu et al.

(2004)). Die ausschließliche Bindung von *Chl a* an diese Helix widerspricht einer Ausbildung nach 40 s, da dies nicht mit der schnellen Kinetik der *Chl a*-Bindung vereinbar ist. Zieht man die Daten der EPR-Messungen zu Klon 174/196 in Betracht, ist hier von einer Helixbildung zwischen 255 ms und 40 s auszugehen, im Vergleich mit den anderen Transmembranhelices, die bereits präformiert sind und innerhalb der ersten 255 ms stabilisiert werden, langsam.

Eine erste Stabilisierung des stromalen Loops ist zu erwarten, nachdem *Chl a* 610 gebunden wurde. Dieses *Chl*-Molekül ist, wie bereits angesprochen, am Glu 180 der Helix 4 komplexiert, bildet jedoch über seine C₁₃-ketogruppe eine Wasserstoffbrücke mit Gly 158 des stromalen Loops (Liu et al. (2004)). Geht man von einer Bindung nach Ausrichtung der Helix 4 aus, könnte dies ein Hinweis auf eine Fixierung des stromalen Loops innerhalb der ersten 40 s der Faltung sein. Die konsekutive Bindung der *Chl b*-Moleküle 609 und 606 sowie die Bindung von Neoxanthin, welches mit *chl b* 606 in Kontakt steht und über eine Wasserstoffbrücke an Tyr 112 des lumenalen Loops gebunden ist (Belgio et al. (2013)), könnte hier im späteren Verlauf der Faltung (> 40 s) zu einer vollständigen Ausrichtung der Positionen 106/160 zueinander führen.

In vivo bildet der LHCP einen Transitkomplex mit dem Chaperonen cpSRP54/cpSRP43 und bindet dabei mit der L18 Region (Val 153-Asp 168) an cpSRP43 (Stengel et al. (2008)). Die Insertion in die Membran erfolgt durch Interaktion des cpSRP43 mit dem ins Stroma reichenden C-terminalen Bereich der Translocase ALB3, welche eine Membranpore bildet, wie Dunsche et al. (2011) zeigen konnte. Einige Daten derselben Studie sprechen dafür, dass dabei der cpSRP43 in die gebildete Membranpore eintaucht. Da die einzig bekannte Interaktion zwischen LHCP und cpSRP43 auf Helix 4 und die L18 Region zurückzuführen ist, diese also wahrscheinlich als einziger Bereich komplexgebunden vorliegt, ist so auch *in vivo* eine zeitversetzte Freisetzung und Ausrichtung der Helix 4 nach den anderen beiden Transmembranhelices vorstellbar. Auch die Ausrichtung des Helixkreuzes und der stromalen Loopregion könnte mit dem Transitkomplex in Verbindung stehen. Da in Modellen des Transitkomplexes die L18-Region, die zwischen Helix 3 & 4 liegt, an das cpSRP43 gebunden ist und die angrenzenden Helices in einer hydrophoben Grube zu liegen kommen (Stengel et al. (2008)), ist eine frühere grundlegende Ausrichtung der beiden angrenzenden Bereiche, und eine anschließende Ausrichtung des Loops bei hoher Flexibilität auch *in vivo* denkbar. Eine direkte Übertragung des Faltungsmodells in Detergenzmicellen ist natürlich aufgrund der wesentlich höheren Komplexität der Thylakoidinsertion *in vivo* nicht möglich, jedoch kann aufgrund der Vergleichbarkeit rekonstituierter und nativer Komplexe angenommen werden, dass die Pigmentbindung und damit einhergehende Stabilisierung von Proteinbereichen des LHCII in der Detergenzmicelle und der Membran ähnlich verlaufen.

2.6. Modell der Rückfaltung des LHCII in Detergenzmicellen

Fasst man alle Beobachtungen, die anhand der zeitaufgelösten Abstandsmessungen während des Detergenzwechsels und der Pigmentbindung gemacht werden konnten, zusammen, ergibt sich ein Modell des zeitlichen Ablaufes der Faltungsereignisse das in Abb. III.2.4 schematisch dargestellt ist. Im Zeitbereich zwischen 0 und 255 ms inserieren die bereits im LDS-solubilisierten Zustand weitgehend ausgebildeten Helices 1 & 3, bzw. führt die Micelleninsertion zu einer Fixierung der helicalen Struktur dieser Bereiche. Innerhalb der ersten 40 s der Rückfaltung kommt es dann zu einer weiteren Stabilisierung der Helix 1. Die Ausrichtung der Helix 3 erfolgt langsamer, bis zum voll gefalteten Zustand ist eine erhöhte Flexibilität zu verzeichnen. Helix 4 wird ebenfalls erst spät stabilisiert, Teile der helicalen Struktur scheinen hier erst nach 255 ms Faltungszeit ausgebildet zu werden, die Ausrichtung des Helixkreuzes beginnt zwischen 20 und 40 s und ist erst im vollgefalteten Komplex abgeschlossen. Die stromalen und lumenalen Loop-Regionen richten sich ebenfalls innerhalb der ersten 60 s weitgehend durch Bildung der Helices im weiteren Verlauf aus.

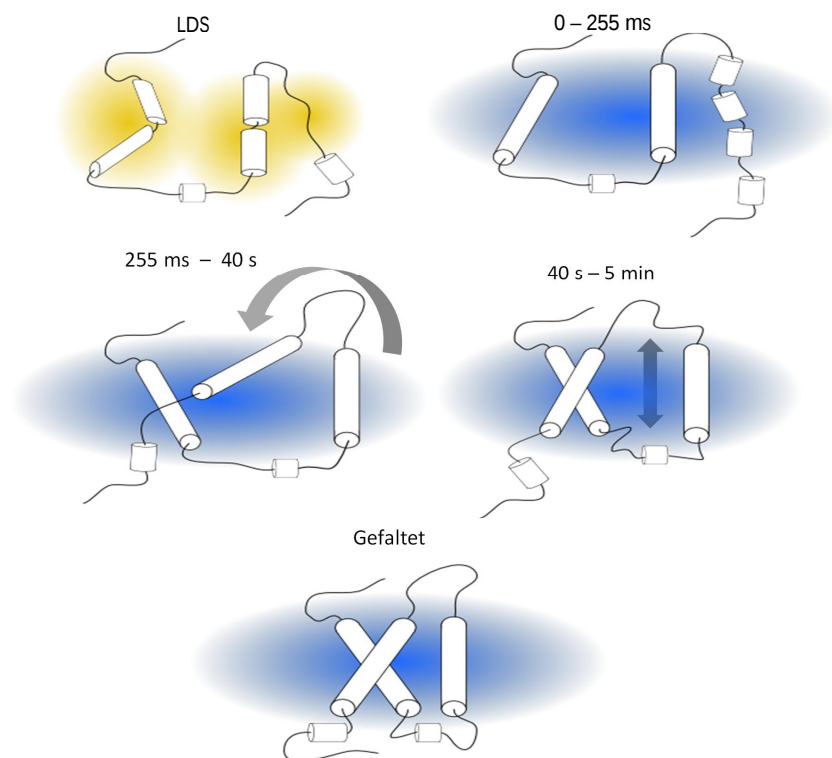


Abbildung III.2.4.: Modell des zeitlichen Ablaufs der Faltung des LHCII

Die zeitaufgelösten Faltungsuntersuchungen dieser Arbeit basierten auf den in Dockter et al. (2009) angestellten Untersuchungen und bestätigen zum Großteil das dort diskutierte Bild der Faltung. Das größere Portfolio an untersuchten LHCP-Varianten und der direkte Vergleich mit dem denaturierten Grundzustand lassen ein detaillierteres Modell des Faltungsverlaufes zu. Die diskutierte langsame Ausrichtung des Helixkreuzes konnte anhand des Klons 90/196 erneut bestätigt werden, die Faltungsuntersuchungen der Transmembranhelices zeigen, dass hierfür hauptsächlich die späte Formierung der Helix 4 verantwortlich zu sein scheint. Auch die auf Klon 106/160 zurückgeführte Kinetik konnte bestätigt werden, jedoch weist die bereits zu Faltungsbeginn ausgebildete Helix 3 auf eine größere Beteiligung der flexiblen Loopregionen an der Abstandsentwicklung hin.

Grundlegend kann nach diesem Modell die Faltung des LHCII in die sehr schnelle Insertion bzw. Ausbildung helicaler Strukturen und die langsamere Stabilisierung und Ausrichtung durch konsekutive Ligandenbindung unterteilt werden. Mit spezifischen Abweichungen ist dies, wie auch von Dockter et al. (2009) diskutiert, mit dem „Two-Stage-Model“ vereinbar, das für die generelle Insertion und Faltung von Membranproteinen von Popot and Engelman (1990) postuliert und in Engelman et al. (2003) um Ligandenbindung erweitert wurde („3-Stage-Model“), was anhand von Bacteriorhodopsin und der Bindung des Cofaktors Retinal veranschaulicht werden konnte. Es weichen jedoch einige Aspekte der Faltung des LHCII von diesem Modell ab. Ermöglicht bei Bacteriorhodopsin die Helixassoziation eine Umgebung für die Bindung von Retinal (Popot et al. (1987)), ist im Faltungsprozess des LHCII die Bindung bestimmter Chlorophylle notwendig, um die Assoziation und vollständige Ausbildung der Helices zu ermöglichen (Paulsen et al. (1993)), da im vollgefalteten Komplex die Strukturintegrität durch Komplexbildung und die Ausbildung von H-Brücken zwischen Chlorophyllen und Apoprotein gegeben (Liu et al. (2004)) sowie ohne Pigmente eine Rückfaltung des LHCII nicht möglich ist (Horn et al. (2007), Cammarata and Schmidt (1992), Paulsen and Hobe (1992)). Zieht man die unterschiedliche Kinetik der Bindung der Chlorophylle, die in einen schnellen *Chl a* und einen langsameren *Chl b* Schritt unterteilt werden kann (Horn et al. (2007)) und die Ergebnisse dieser Arbeit in Betracht, spricht dies eher für ein abgewandeltes Faltungsmodell mit mehreren Phasen, bei der zunächst Helixinsertion die Bindung von *Chl a* ermöglichen, welches wiederum weitere Helixbildung und Interaktionen ermöglicht, die zur Bindung von *Chl b* und zur finalen Struktur des LHCII führen. Denkbar ist hier die Verkettung von „Sub-Stages“, die in sich dem „3-Stage-Model“ (Helixbildung-Interaktion-Ligandenbindung) entsprechen und für die einzelnen *Chl*-Moleküle und Carotinoide nacheinander oder parallel ablaufen.

2.7. Ausblick

Die zeitaufgelöste Untersuchung der Rekonstitution des LHCII mit geringer Totzeit brachte erweiterte Einblicke in den zeitlichen Ablauf der Rückfaltung. Das System aus computergesteuerter Mischeinheit und „Rapid-Freeze-Quench“-Apparatur ist geeignet, um DEER-EPR Proben mit definierter Alterungszeit herzustellen. Die Probenqualität wird jedoch durch mehrere Faktoren beeinflusst. Die relativ hohe Probenkonzentration, die für DEER-Messungen derzeit noch benötigt wird, bedingt ein Arbeiten an der Löslichkeitsgrenze der eingesetzten Pigmente, was zu einer eingeschränkten Komplexausbeute bei der Rekonstitution des LHCII per Detergenzverdünnung führt. Durch die fehlende Möglichkeit der Aufreinigung der zeitaufgelösten Proben nach Rekonstitution und dem damit verbundene erhöhte Anteil an ungefaltetem Protein, wird die Signalstärke und Signalqualität der DEER-Messungen eingeschränkt. An dieser Stelle ist eine Verbesserung des Signals durch den Einsatz geringerer Pigment und Proteinkonzentrationen zu erwarten, wenn bereits hohe Sensitivität des Q-Band-EPR-Spektroskops weiter gesteigert werden kann. Auch die Wiederholung der durchgeführten Untersuchungen mit vor Rückfaltung aufgereinigten Inclusion-Bodies ist geeignet, um eine bessere Probenqualität und DEER-Spektren mit reduzierten Nebenmaxima zu erreichen. Dies würde die Interpretation der aufgenommenen Faltungsprozesse vereinfachen und eine eindeutigere Zuweisung der einzelnen Peaks ermöglichen.

Teil IV.

Strukturuntersuchungen des LHCII

1. Ergebnisse

1.1. Vergleichende Strukturuntersuchungen flexibler Bereiche des LHCII im Monomer und Trimer

Ein großer Vorteil der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (EPR) ist, dass markierte Proteine in Lösung vermessen werden können (Jeschke (2012)). So können Informationen über flexible Bereiche in Proteinen gesammelt werden, die mit Techniken wie Röntgenkristallographie oder NMR nicht möglich wären. Zwei interessante flexible Bereiche sind im LHCII in der Peripherie zu finden. Zum Einen die lumenale Schleife, die aus der Thylakoidmembran in das Lumen reicht und deren Rolle in regulatorischen Prozessen wie pH-Sensing und State Transitions in der Literatur immer wieder diskutiert wird (Zhang et al. (2014), Belgio et al. (2013)). Zum Anderen die N-terminale Domäne des LHCII, die zur Organisation der Grana beiträgt und deren genaue Lage durch die Röntgenkristallographie bisher nicht aufgeklärt werden konnte (Dockter et al. (2012), Standfuss et al. (2005)).

In dieser Arbeit wurden Strukturuntersuchungen an der lumenalen Schleife sowie, ergänzend zu Untersuchungen von C. Dietz, der n-terminalen Domäne des LHCII durchgeführt. Um vergleichende Informationen über die Lage dieser flexiblen Bereiche im Monomer und Trimer zu erhalten, wurden heterogen spinmarkierte LHCII-Trimere verwendet. Die Präparationstechnik wurde von C. Dockter und C. Dietz im Rahmen ihrer Dissertationen entwickelt und optimiert (Dietz (2012), Dockter (2009)). Sie ermöglichte es, nur einen Monomer im Trimerverbund des LHCII mit einem Spinlabel-Paar zu markieren, indem Rekonstitution und Trimerisierung mit einer Mischung aus unmarkierten und markierten Proteinen durchgeführt wird. Die unmarkierten Proteine werden im Überschuss (8:1) eingesetzt. Trimere, die mindestens ein markiertes Monomer enthielten, wurden über einen Strep-Tag von vollständig unmarkierten Trimeren und Monomeren getrennt. Die Trennung der heterogenen Trimere von markierten Monomeren erfolgte im Saccharosedichtegradienten.

Hier wurden die Abstände der eingeführten Spinmarker zueinander an der ETH Zürich im Q-Band-EPR-Spektroskop gemessen und mit den Daten der biochemischen Charakterisierung verglichen, um so Aussagen zur Struktur der Bereiche treffen zu können. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den folgenden Abschnitten aufgeführt.

1.1.1. Überprüfung der Aggregation in aufgereinigten LHCII Proben

Aggregationen stellen ein immer wieder auftretendes Problem bei der Messung von Abständen im DEER-EPR-Verfahren dar. Wenn sich zwei oder mehr Proteine zusammenlagern, befinden sich die Proxyl-Label der markierten Positionen benachbarter Proteine in räumlicher Nähe. Da sich die ungepaarten Elektronen der benachbarten Spinsonden beeinflussen, führt dies zu Störsignalen im EPR-Spektrum. Dies äußert sich bei ungeordneten Aggregationen in einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis der EPR-Messung, sollte es zu geordneten Aggregationen kommen, bei denen sich die Abstände zwischen Spinsonden benachbarter Proteine gleichen, treten Nebenmaxima mit irreführenden Abstandsinformationen auf. Um den Einfluss von Aggregationen auf LHCII-EPR-Spektren zu minimieren, wurden die im Folgenden beschriebenen Versuche durchgeführt.

1.1.1.1. Test auf konzentrationsabhängige Aggregation durch Zentrifugation

Aggregierte Pigmente zeigen einen charakteristischen Peak bei 700 nm im CD-Spektrum (Agostiano et al. (1993)). Dieser Peak kann in aufgereinigten Komplexen als Maß für die Aggregation des LHCII herangezogen werden, da die Proben weitestgehend frei von ungebundenen Pigmenten oder ungefalteten Proteinen sind. Zur Überprüfung des Aggregationsverhaltens wurden LHCII Mono- und Trimere des Klons C3.2h per Saccharosedichtegradient aufgereinigt und über Amicon 30 kDa Zentrifugalfilter aufkonzentriert. Die Ausgangskonzentrationen betrugen 2,75 μM (Monomere) bzw. 2,3 μM (Trimere) LHCII. Nach jeweils zehnminütiger Zentrifugation bei 6000 g (Hettich Mikro 22R, Rotor 1195), wurde den Proben 30 μl entnommen und ein CD-Spektrum aufgezeichnet. Wie in Abb. IV.1.1 und Abb. IV.1.2 zu sehen ist, kam es auch bei Konzentrationen über 400 μM LHCII weder bei Monomeren noch bei Trimeren zu einer Ausbildung eines Aggregationspeaks. Eine Aggregation der gefalteten, pigmentbesetzten Komplexe durch Aufkonzentration konnte damit ausgeschlossen werden. Die Aggregation sich evtl. noch in Lösung befindlicher, unpigmentierter LHCP, konnte mit dieser Messmethode jedoch nicht detektiert werden.

1.1.1.2. Optimierung der Probenextraktion des LHCII aus Saccharosedichtegradienten

In einigen EPR-Proben aufgereinigter Komplexe traten trotz voriger biochemischer Überprüfung Aggregationen auf, die sich in Nebenmaxima in den Abstandsverteilungen der DEER-Spektren zeigten. Da dies, wie unter Abschnitt 1.1.1.1 gezeigt, nicht auf Aggregationen pigmentierter Komplexe zurückzuführen sein konnte, lag die Vermutung nahe, dass die Proben mit unpigmentierten Aggregaten verunreinigt waren. Unpigmentierter LHCP zeigt im Saccharosedichtegradient ein nur geringfügig langsames Sedimentationsverhalten als LHCII-Monomere. Daher war eine Kontamination während der Extraktion der Komplexe aus dem Gradienten wahrscheinlich.

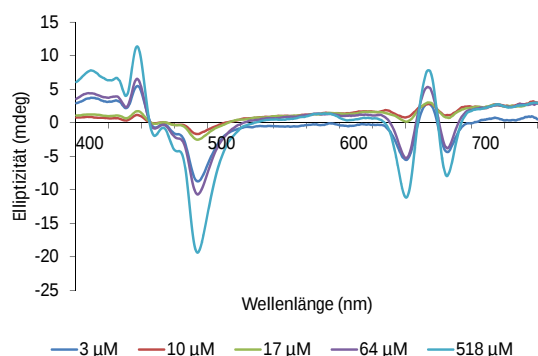


Abbildung IV.1.1.: CD-Spektren der LHCII Monomere zur Überprüfung konzentrationsabhängiger Aggregation. Alle Klone rekonstituiert nach Standardprotokoll. Die CD-Spektren wurden in einer 2 mm OG Küvette bei 4°C aufgenommen. Extrahiert aus Saccharosedichtegradienten mit 0,55 M Saccharose, 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,1 % DM

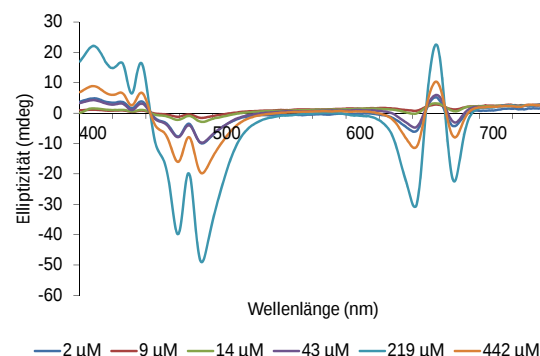


Abbildung IV.1.2.: CD-Spektren der LHCII Monomere zur Überprüfung konzentrationsabhängiger Aggregation. Alle Klone rekonstituiert nach Standardprotokoll. Die CD-Spektren wurden in einer 2 mm OG Küvette bei 4°C aufgenommen. Extrahiert aus Saccharosedichtegradienten mit 0,55 M Saccharose, 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,1 % DM

Zur Überprüfung dieser Vermutung und Optimierung der Probenqualität wurden verschiedene Extraktionsmethoden durchgeführt und die so gewonnenen Proben im DEER-EPR-Spektroskop vermessen. In Abb. IV.1.3 sind die CD-Spektren der Komplexe nach Extraktion aus den Saccharosedichtegradienten gezeigt. Es wurde neben dem Standardvorgehen, bei dem die gesamte Monomerbande mit einer 1 ml Spitze abgezogen wird, einmal nur der obere, und einmal der untere Teil der Bande aus dem Gradienten entnommen. Bei zwei weiteren Proben wurde die DM-Konzentration der Gradienten auf 0,2 bzw 0,3% erhöht. Hiermit sollte überprüft werden, ob eventuell eine zu geringe Detergenzkonzentration nach Probenkonzentration zu Aggregaten führen könnte. Die CD-Spektren keiner Probe zeigten Hinweise auf Aggregationen.

Die Abstandsverteilungen der einzelnen Proben wurden mit einer Simulation des EPR-Monomer-Spektrums verglichen, welche durch eine auf der Röntgenkristallstruktur basierenden Rotamerdatenbank der Proxyl-Label erstellt wurde (Polyhach et al. (2011)). Die aus der Kristallstruktur erwartete Abstandsverteilung zeigt je ein Maximum bei 2,2 und 2,5 nm (Abb. IV.1.4). Ein deutliches Maximum bei 2,2 nm war nur bei der Probe zu sehen, die nach Standardverfahren hergestellt wurde. Dies kann durch den geringen Abstand der Proxyl-Label im Klon 34/59 zueinander bedingt sein, da dieser mit 2,2 nm nahe an der Auflösungsgrenze des DEER-EPR lag (1,5 nm). Die Standardprobe zeigt jedoch auch starke Aggregationspeaks im Bereich von 3-4,8 nm. Diese treten auch in den anderen Proben auf. Die Erhöhung der DM-Konzentration und das Weglassen der Waschschrte mit deuteriertem Puffer schien keinen Einfluss auf die Probenqualität zu haben. Die Probe, bei der nur der untere Teil der Monomerbande aus dem

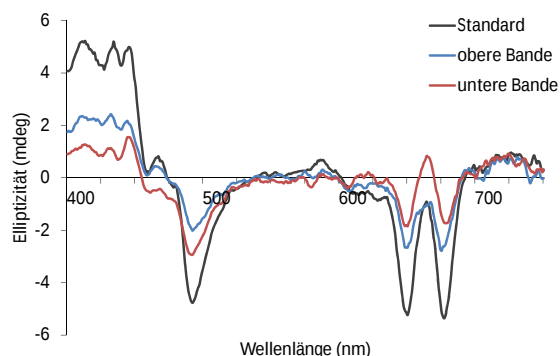


Abbildung IV.1.3.: CD-Spektren der Proben mit unterschiedlicher Extraktionsmethode. Alle Klone rekonstituiert nach Standardprotokoll. Die CD-Spektren wurden in einer 2 mm OG Küvette bei 4°C aufgenommen. Extrahiert aus Saccharosedichtegradienten mit 0,55 M Saccharose, 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,1 % DM (wenn nicht anders angegeben).

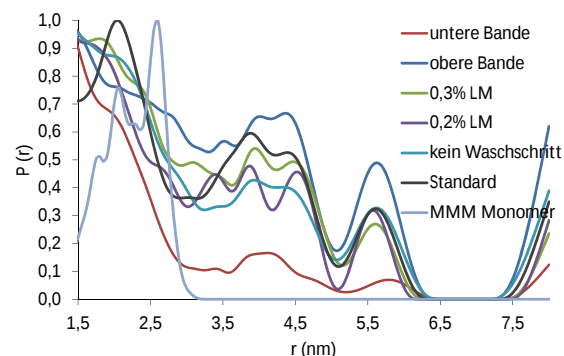


Abbildung IV.1.4.: Abstandsverteilungen der Proben mit unterschiedlicher Extraktionsmethode. Parameter des 4-Puls-DEER-Experiments aller Proben: Dipolare Evolutionszeit ($D2$) = 4000 ns, CutOff = 3400, Start der Hintergrundkorrektur = 2000 ns. Abstandsverteilung abgeleitet aus DEER-Spektrum (nicht gezeigt) durch Thikonov-Regularisierung mit berechneter L-Kurve.

Dichtegradienten extrahiert wurde, zeigte jedoch einen wesentlich geringeren Anteil an Maxima mit größeren Abständen als 2,2 nm. Die auftretenden Aggregationen waren zum Großteil also auf unpigmentierten LHCP zurückzuführen, der sich im Dichtegradienten direkt über der Monomerbande befand. Um diesen Aggregateintrag bei der weiteren Probenproduktion zu minimieren, wurden bei allen weiteren Präparationen nur der untere Teil der Monomerbande extrahiert und der Rest verworfen.

1.1.2. Strukturuntersuchungen der lumenalen Schleife

Die Lage der lumenalen Schleife wurde in dieser Arbeit im Monomer und im Trimer untersucht. Wie bereits beschrieben, erfordern Abstandsmessungen in DEER-EPR Experimenten, dass sich nur zwei ungepaarte Elektronen in Nähe zueinander befinden. Daher mussten für Strukturuntersuchung heterogene Trimere verwendet werden. In diesen war nur ein Monomer im Trimerverbund markiert.

Als lumenale Schleife wird der Abschnitt des LHCII zwischen AS 90 und 123 bezeichnet. Er enthält einen kurzen α -helicalen Bereich (AS 101-105) sowie eine Bindestelle für Neoxanthin (Tyrosin 112). Es wurden die Abstände der Position 96, 102 und 113 der lumenalen Schleife zu Position 143 auf stromaler Seite gemessen. Diese Positionen wurden gewählt, da ihre Abstände der Kristallstruktur zur Folge im optimalen Bereich für DEER-EPR liegen und durch den Austausch von Valin (96), Serin (102) und Lysin (113) gegen Cystein der Einfluss auf die Struktur

des LHCII gering gehalten werden sollte.

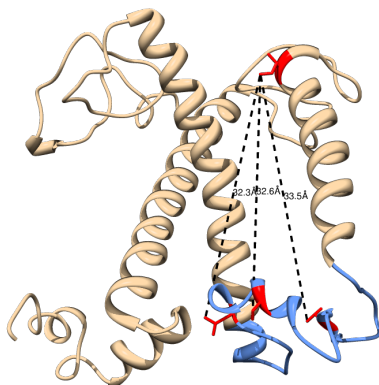


Abbildung IV.1.5.: Abstände der markierten Aminosäuren der lumenalen Schleife. Aus Standfuss et al. (2005). Kristallstruktur 2BHW, verändert mit USCF Chimera (Abteilung für Biocomputing, Visualisierung und Informatik, University of California, San Francisco. Pettersen et al. (2004)).

Die Klone wurden zum Einen nach Standardprotokoll und zum Anderen mit Einzelpigmenten rekonstituiert. So konnten neoxanthinfreie Komplexe hergestellt und der Einfluss des Xanthophylls auf die Lage und Stabilisierung der lumenalen Schleife überprüft werden. Der Rekonstitutionserfolg wurde über Fluoreszenz-, Absorptions- und CD-Spektroskopie nachgewiesen.

Zur Herstellung der Monomere wurden 1,5 mg LHCP des jeweiligen Klons nach Standardprotokoll rekonstituiert. Bei neoxanthinfreien Proben musste der verwendete Totalextrakt durch eine Mischung aus Einzelpigmenten ersetzt werden, die aus *chl a*, *chl b* und Lutein bestand (Verhältnis 8:6:2). Die Bindestelle für Violaxanthin kann in Abwesenheit desselben von Lutein besetzt werden, während die Neoxanthinbindestelle frei bleibt (Hobe et al. (2000), Phillip et al. (2002)). Die Monomere wurden im Saccharosedichtegradienten aufgereinigt, extrahiert, vermessen und anschließend mit Amicon-30 kDa-Zentrifugalfiltern aufkonzentriert, bis eine Konzentration von 120 μ M erreicht war. Während der Konzentration erfolgte ein Puffertausch gegen 50 mM Tris-HCl pH 7,8 in D₂O. Die Proben wurden mit $\frac{1}{3}$ des Gesamtvolumens an 80 % deuteriertem Glycerin versetzt (Endkonz. 27,7 %) und in flüssigem N₂ gefroren.

Bei heterogenen Trimeren erfolgten parallele Rekonstitutionen mit 5 mg markiertem LHCP des jeweiligen Klons und 40 mg unmarkiertem LHCP des Klons C79Sh. Es wurde Totalextrakt zu 75 mg Gesamtchlorophyll bzw. Einzelpigmente zu 75 mg Gesamtchlorophyll und 6,8 mg Lutein verwendet. Der Rekonstitutionserfolg wurde über ein Deriphatgel überprüft, die Ansätze im Verhältnis 1:8 gemischt und über 8 x 5 ml Ni-NTA-Säulen trimerisiert. Das Eluat der Ni-

Tabelle IV.1.1.: Probenkonzentrationen der LHCII-Klone der lumenalen Schleife. Alle Proben nach rekonstituiert nach Standardprotokoll. In 0,2% DM50 mM, Tris-HCl pH 7,8, 12,5 % Saccharose in D₂O. Aufkonzentriert auf 50 µl Volumen in 30 kDa Amicon Zentrifugalfiltereinheiten, schockgefroren in flüssigem N₂.

Probe	Konz.	Glyzerin-d8
st96/143h Monomer	80 µM	27 %
st96/143h Monomer -Nx	80 µM	27 %
st102/143h Monomer	80 µM	27 %
st102/143h Monomer -Nx	80 µM	27 %
st113/143h Monomer	80 µM	27 %
st113/143h Monomer -Nx	80 µM	27 %
st96/143h het. Trimer	20 µM	12,5 %
st96/143h het. Trimer -Nx	12 µM	16 %
st102/143h het. Trimer	4 µM	12,5 %
st102/143h het. Trimer -Nx	10 µM	16 %
st113/143h het. Trimer	15 µM	12,5 %
st113/143h het. Trimer -Nx	10 µM	16 %

Säule ist über 5 x 0,5 ml Strep-Tactin-Macroprep Säulen weiter aufgetrennt worden. Der letzte Schritt war die Aufreinigung der heterogenen Trimere über Saccharosedichtegradienten und die den Monomeren entsprechende Weiterverarbeitung. Da die erhaltene Trimermenge meist sehr gering war, wurde die Konzentration an deuteriertem Glyzerin je nach Probenqualität angepasst, die niedrigste verwendete Konzentration betrug 12,5%. Auch diese geringe Menge an Glyzerin reichte aus, um die EPR-Röhrchen vor dem Zerschneiden während dem Schockfrieren zu bewahren.

Die Ergebnisse der CD-Spektroskopischen Untersuchungen sind in Abb. IV.1.6 aufgeführt. Die Spektren der Monomere und Trimere, die mit Pigmenttotalextrakt rekonstituiert wurden, entsprachen denen vollpigmentierter LHCII Mono- und Trimere. Bei den neoxanthinfreien Monomeren, war neben dem monomerspezifischen negativen Peak bei 493 nm ein weiteres Minimum bei 473 nm zu verzeichnen (Abb. IV.1.6 (a), (c), (e)). Bei Klon 96/143 und Klon 113/143 war hier ein distinkter Peak, bei Klon 102/143 jedoch nur eine Schulter des 493 nm Peaks zu beobachten. Dieses Minimum schien sich mit dem trimerspezifischen Signal bei 473 nm zu überlagern, so dass in neoxanthinfreien heterogenen Trimeren der negative Peak mit der größten Amplitude nicht mehr bei 493 nm sondern bei 473 nm lag. Bei den vollpigmentierten Trimeren lag hier der dominante Peak bei 493 nm (Abb. IV.1.6 (b), (d), (e)).

Auch in den Absorptionsspektren der Proben zeigten sich Unterschiede zwischen vollpigmentierten und neoxanthinfreien Komplexen. Da Neoxanthin ein dominantes Absorptionsmaximum bei 440 nm und ein etwas geringeren Peak bei 468 nm besitzt, verschob sich das Verhältnis zwischen den Maxima bei 440 und 468 nm Absorption in neoxanthinfreien Komplexen geringfügig zugunsten des 468 nm Peaks. Das Absorptionsspektrum des neoxanthinfreien Monomers von

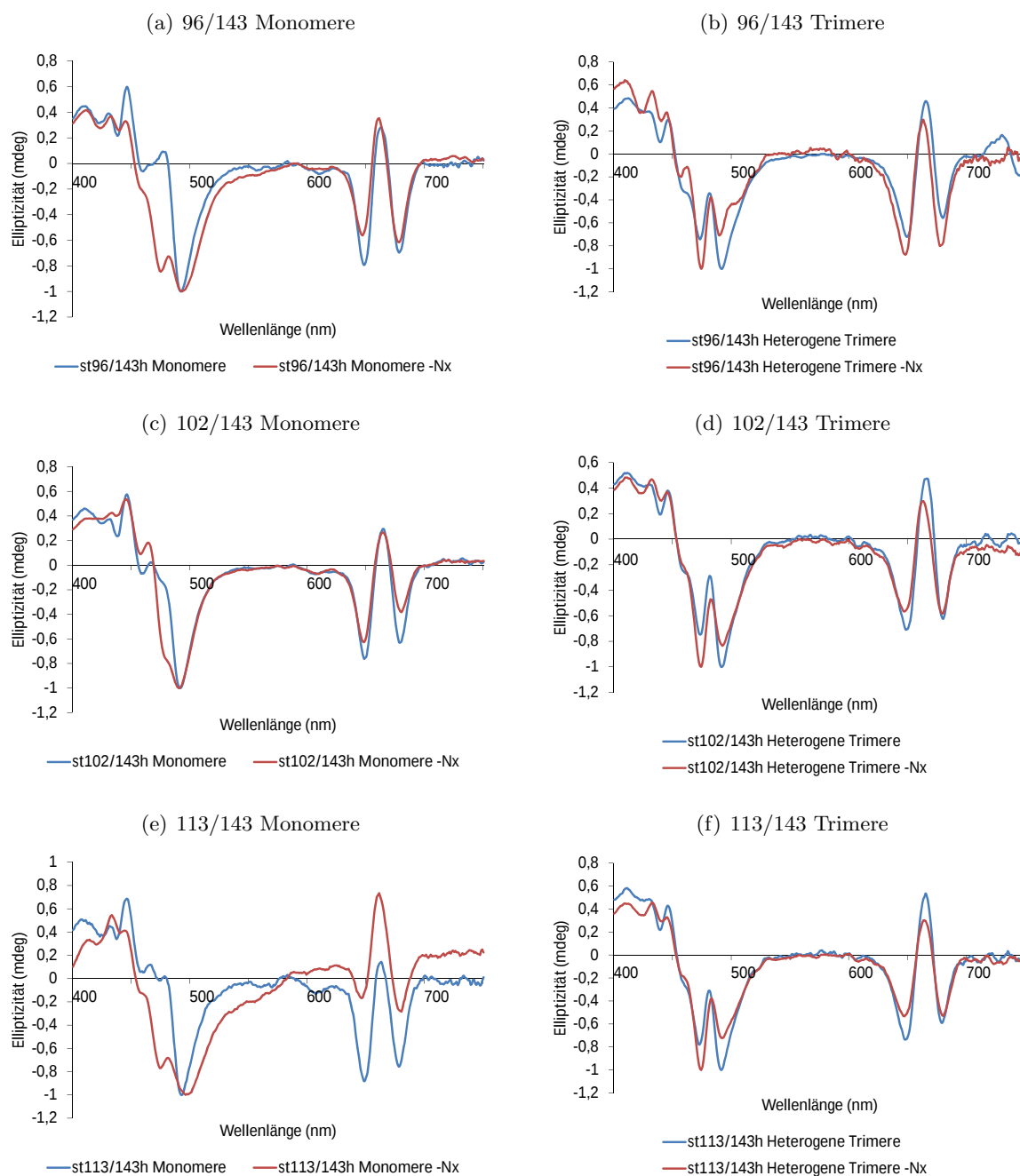


Abbildung IV.1.6.: CD-Spektren der LHCII-Klone der lumenalen Schleife. Alle klone rekonstituiert nach Standardprotokoll. Die CD-Spektren wurden in einer 2 mm OG Küvette bei 4°C aufgenommen.

Klon 102/143 zeigte eine Verschiebung der Maxima, die nicht allein durch das fehlende Neoxanthin zu erklären war. Hier war ein noch größerer Abfall der 440 nm-Absorption gegenüber der 468 nm-Absorption und eine geringere Absorption bei 670 nm zu beobachten (Abb. IV.1.7 (c)). Reines *chl a* weist Absorptionsmaxima bei 430 und 668 nm auf. Dies wies darauf hin, dass in diesen Komplexen eine oder mehrere *chl a*-Bindestellen von *chl b* besetzt waren oder unbesetzt blieben.

Die Fluoreszenzspektren der verschiedenen Klone sind in Abb. IV.1.8 dargestellt. Bei der neoxanthinfreien Probe des Klon 96/143 war eine erhöhte Fluoreszenz bei 650 nm zu verzeichnen, was auf eine Verunreinigung der Probe mit freiem *chl b* oder einem geringen Anteil an nicht intakten Komplexen schließen ließ (Abb. IV.1.8 (a), (b)). Die Fluoreszenzspektren der anderen Proben zeigten einen vollständigen Energietransfer von *chl b* auf *chl a*.

Die DEER-EPR-Spektren wurden wie unter Abschnitt 1.5.1 beschrieben gemessen und ausgewertet. Der Monomer des Klon 96/143 zeigte mit Neoxanthin eine deutlich schmalere Abstandsverteilung als in der Präparation ohne Neoxanthin Abb. IV.1.9 (a). Sie reichte von 3,5 nm bis 5,5 nm und zeigte ein einziges Maximum bei 4,2 nm. Die der neoxanthinfreien Probe wies ebenfalls ein Maximum bei 4,2 nm auf, die Breite erstreckte sich hingegen von 1,5-6,5 nm. Im Vergleich zeigt Abb. IV.1.9 (a) eine Abstandsverteilung, die aus einer auf der Röntgenkristallstruktur basierenden Rotamerdatabank simuliert wurde. Das Maximum liegt hier bei 3,4 nm und damit bei einem deutlich kürzeren Abstand als den im Monomer Gemessenen. Die Breite der simulierten Abstandsverteilung war vergleichbar mit der vollpigmentierten Probe und reichte von 3,1-4,6 nm.

Die heterogenen Trimere des selben Klon sind in Abb. IV.1.9 (b) gezeigt. Die vollpigmentierte Präparation wies ein Spektrum mit einem Hauptabstand bei 4 nm und einem weniger stark ausgeprägten Peak bei 5,5 nm auf. Die Lage der Peaks entsprach in etwa denen der Rotamersimulation, bei welcher die Peaks bei 3,9 nm und 5,2 nm lagen. Die Präparation ohne Neoxanthin zeigte eine geringfügig breitere Abstandsverteilung mit einem etwas geringeren Peak bei 3,9 nm. Auffällig war hier, dass der Peak bei 5,4 nm die höchste Amplitude in diesem Spektrum zeigte.

Die Abstandsverteilungen der Monomere des Klon 102/143 unterschieden sich nicht in ihrer Breite. Die vollpigmentierten Komplexe zeigten ein Maximum bei 3,8 nm, welches bei fehlendem Neoxanthin hin zu 3,6 nm verschoben war Abb. 1.8(c). Die Rotamersimulation zeigt ein zweites Maximum bei 3 nm welches in den gemessenen Proben nicht auftrat.

Die vollpigmentierte Trimerprobe wies eine mit der Rotamersimulation nahezu identische Abstandsverteilung auf. Die Maxima lagen hier bei 3,2 und 4,9 nm. Die neoxanthinfreie Präparation zeigte nur ein einzelnes Maximum bei 3,6 nm mit einer insgesamt geringfügig breiteren Verteilung Abb. IV.1.9 (d).

Die ausgeprägtesten Abweichungen von den Rotamersimulationen traten bei den Proben des

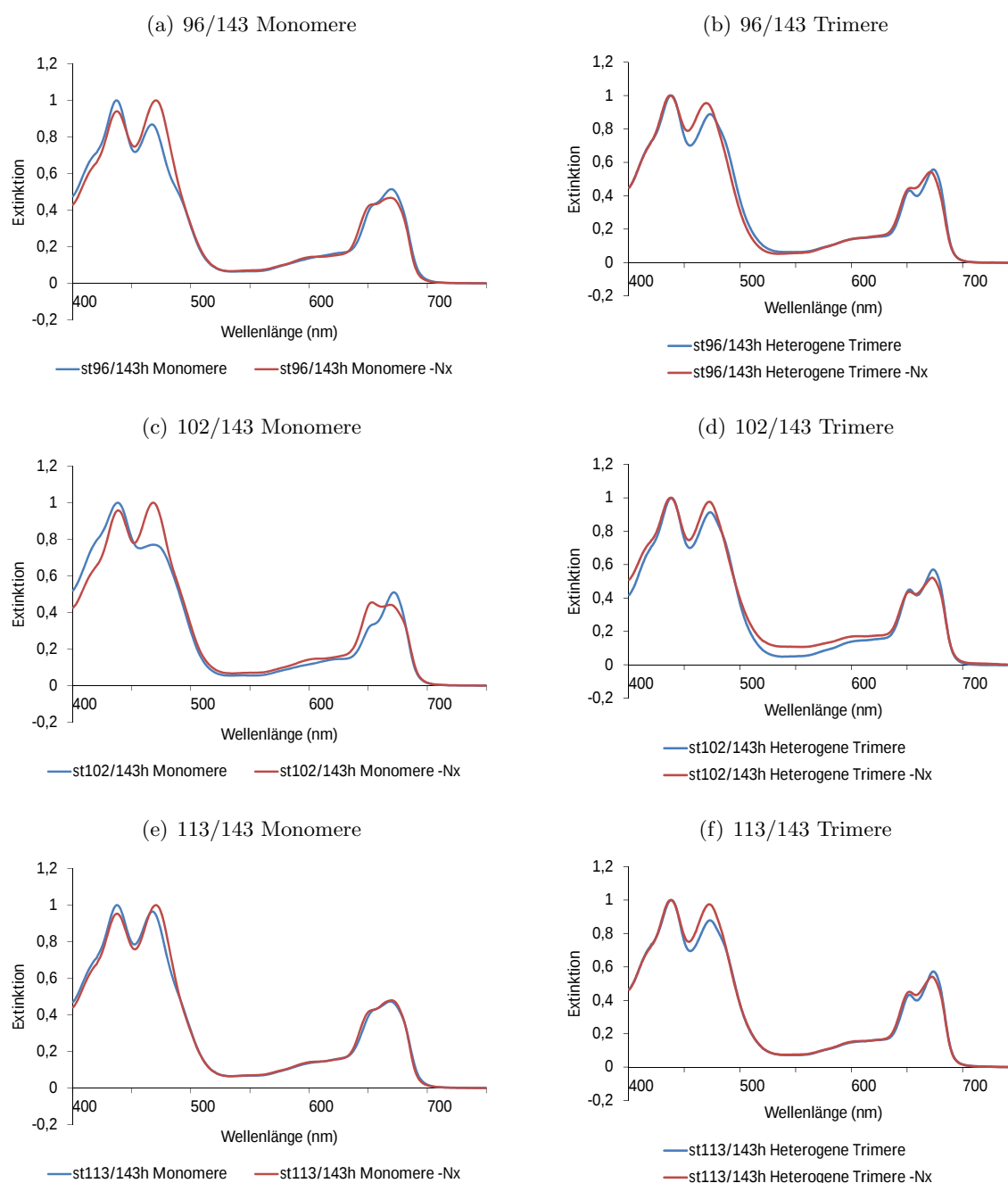


Abbildung IV.1.7.: Absorptionsspektren der LHCII-Klone der lumenalen Schleife. Alle Klone rekonstituiert nach Standardprotokoll. Gemessen in 2 mm OG-Küvette, RT. Normiert auf ein Maximalabsorption von 1.

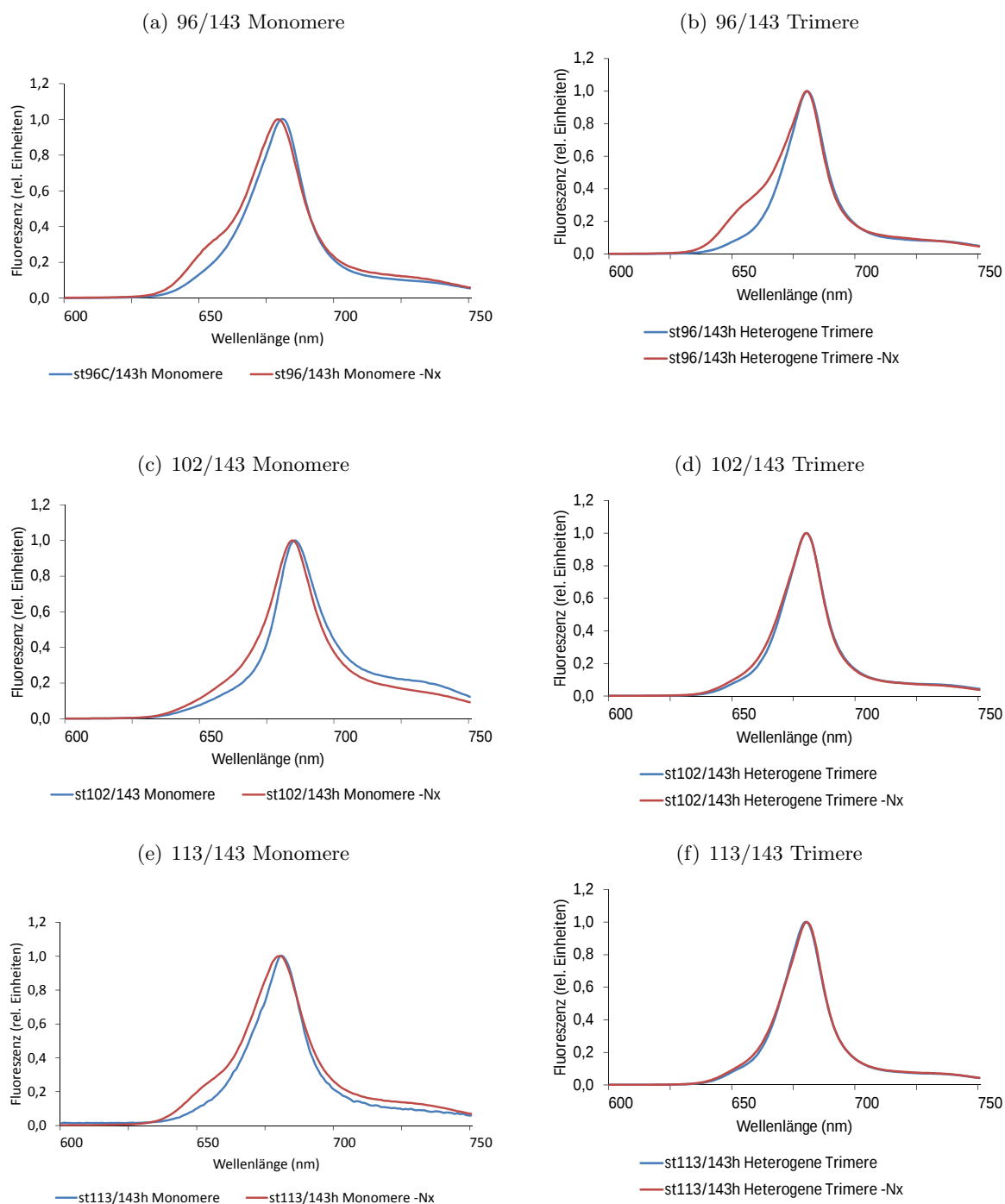


Abbildung IV.1.8.: [Fluoreszenzspektren der LHCII-Klone der lumenalen Schleife. Alle Klone rekonstituiert nach Standardprotokoll. Aufgenommen in OG Fluoreszenz-Küvette mit „Front-Face-setup“. Normiert auf Maximalfluoreszenz von 1.

Klones 113/143 auf. Die Maxima der Monomere lagen mit 4,3 nm (vollpigmentiert) und 4,6 nm (neoxanthinfrei) deutlich über dem simulierten Maximum (3,5 nm). Wie bei Klon 96/143 zeigte die neoxanthinfreie Präparation eine deutlich breitere Abstandsverteilung als die Probe mit Neoxanthin (Abb. IV.1.9 (e)).

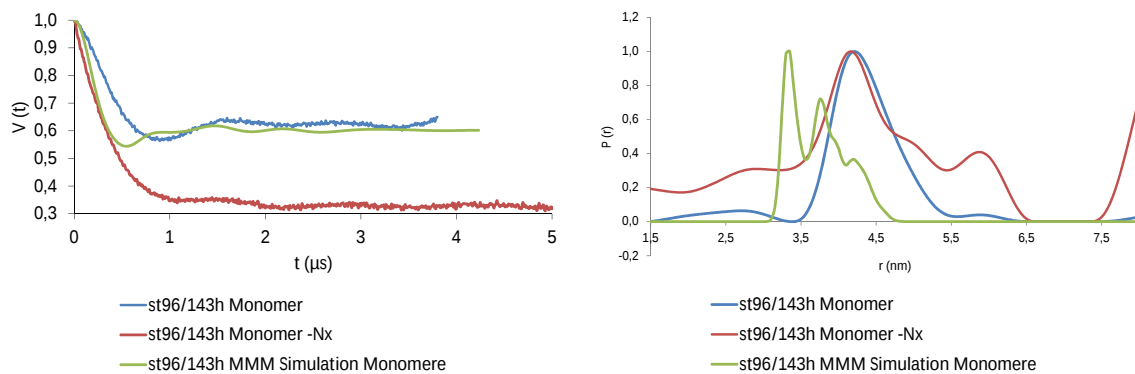
Bei den heterogenen Trimeren des gleichen Klons zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Hier zeigten beide gemessenen Präparationen eine identische Abstandsverteilung mit je einem Maximum bei 2 nm. Die Maxima der Rotamersimulation lagen hingegen bei 3,5 und 6,5 nm, und ließen einen deutlich größeren Abstand der Positionen 113 zu 143 erwarten (Abb. IV.1.9 (f)).

Tabelle IV.1.2.: Abstände der lumenalen Schleife zur stromalen Position 143 des LHCII. Angabe des Hauptpeaks, der Breite des Peaks sowie der Differenz zwischen Peakanfang und -ende der Abstandsverteilungen aus Abb. IV.1.9

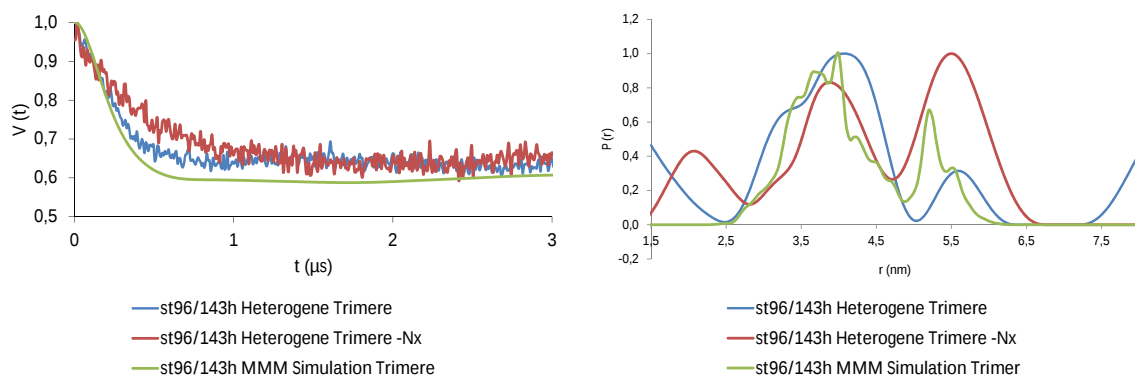
		Maximum	Breite	Differenz
st96/143h	Monomer	4,1 nm	3,8 - 5,1 nm	1,3 nm
	Monomer -Nx	4,1 nm	2 - 6,2 nm	4,2 nm
	MMM-Simulation Monomer	3,2 nm	3 - 4,8 nm	1,8 nm
	Trimer	4,1 nm	2,6 - 5 nm	2,6 nm
	Trimer -Nx	3,5 nm / 5,5 nm	2,7 - 6,5 nm	3,8 nm
	MMM-Simulation Trimer	3,8 nm	3 - 5 nm	2 nm
st102/143h	Monomer	4,1 nm	3,2 - 5 nm	1,8 nm
	Monomer -Nx	3,8 nm	3,2 - 5 nm	1,8 nm
	MMM-Simulation Monomer	3,9 nm	2,8 - 4,5 nm	1,7 nm
	Trimer	3,2 nm	2,5 - 4,5 nm	1,7 nm
	Trimer -Nx	3,7 nm	2,5 - 4,8 nm	2,3 nm
	MMM-Simulation Trimer	3,8 nm	3 - 5 nm	2 nm
st113/143h	Monomer	4,2 nm	2,8 - 5,4 nm	2,6 nm
	Monomer -Nx	4,8 nm	1,5 - 5,8 nm	4,3 nm
	MMM-Simulation Monomer	3,4 nm	2,5 - 4,5 nm	2 nm
	Trimer	2 nm	1,5 - 3,6 nm	2,1 nm
	Trimer -Nx	2 nm	1,5 - 3,6 nm	2,1 nm
	MMM-Simulation Trimer	3,4 nm	2,5 - 5 nm	2,5 nm

Die wichtigsten Daten der Abstandsmessungen sind in Tab. IV.1.2 zusammengefasst. Hier wird deutlich, dass die Flexibilität der neoxanthinfreien Proben im Monomer an den Positionen 96 und 113 gegenüber Proben mit Neoxanthin deutlich gesteigert war. Die Breite der Abstandsverteilungen betrug beim Klon 96/143 im vollpigmentierten Komplex nur 1,3 nm, während sie in der neoxanthinfreien Probe bei 4,2 nm lag. Im Trimer war der Unterschied geringer, die Peakbreiten lagen hier bei 2,6 nm (+Nx) und 3,8 nm (-Nx). Die Peakbreiten der Monomerproben des Klons 113/143 betrugen 2,6 (+Nx) und 4,3 nm (-Nx), im Trimer konnte kein Unterschied festgestellt werden. Auffällig war, dass die mittlere Position der lumenalen Schleife (102), wel-

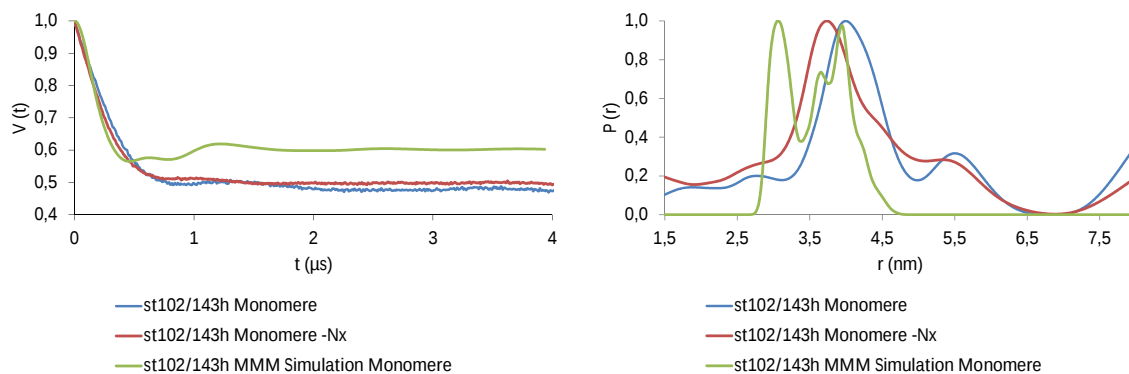
(a) 96/143 Monomere



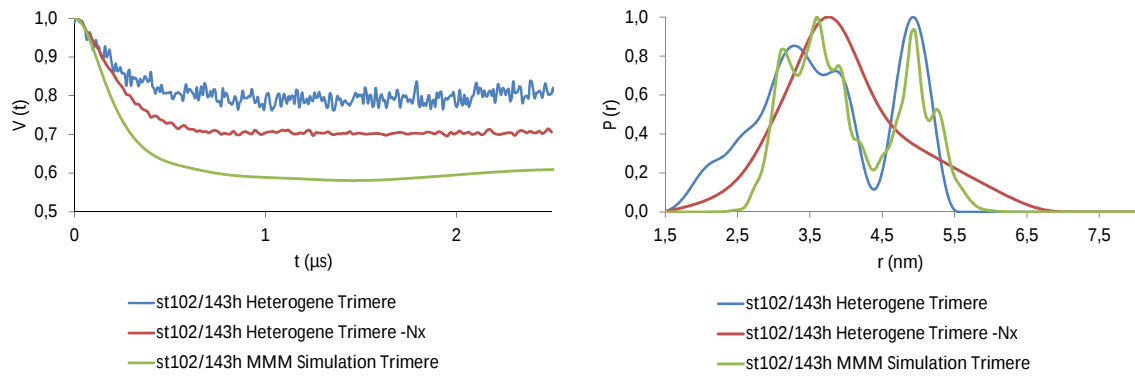
(b) 96/143 Trimere



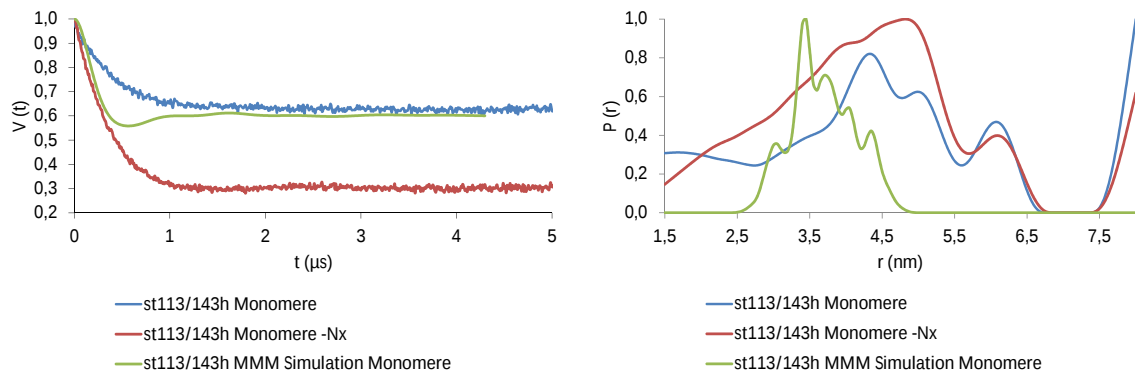
(c) 102/143 Monomere



(d) 102/143 Trimere



(e) 113/143 Monomere



(f) 113/143 Trimere

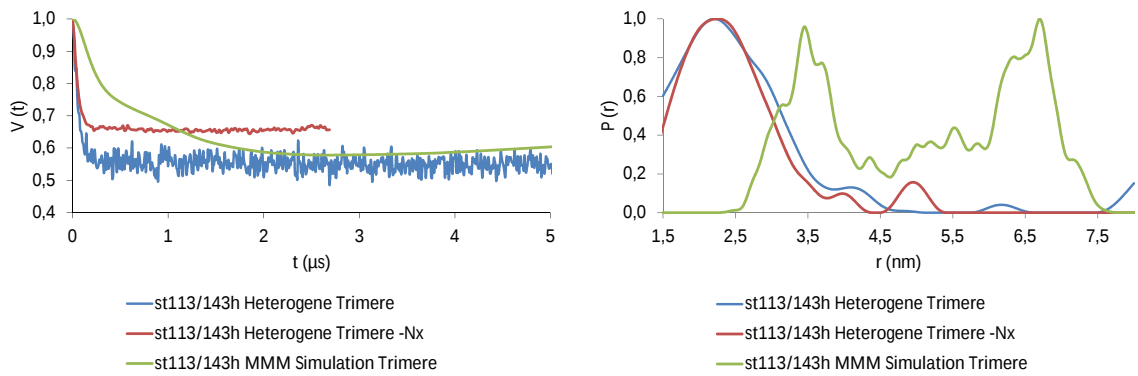


Abbildung IV.1.9.: EPR-Primärdaten und Abstandsverteilungen der Klone der lumenalen Schleife. Alle Proben rekonstituiert nach Standardprotokoll. Proben in 0,2% DM, 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 12,5% Saccharose in D₂O. links: Hintergrundbereinigte Primärdaten des 4-Puls-DEER-Experiments. rechts: Abstandsverteilungen normiert auf Maximalamplitude $P(r) = 1$. Abgeleitet aus DEER-Spektrum (nicht gezeigt) durch Tikhonov-Regularisierung mit berechneter L-Kurve. Parameter der DEER-EPR Messung:

	Klon	Probe	D2	CutOff	BckCorr	ØAbstand
(a)	96/143	Monomere	4500 ns	3800 ns	2000 ns	4,29 nm
		Monomere -Nx	6000 ns	5300 ns	2000 ns	4,44 nm
(b)		Trimere	5300 ns	3300 ns	2000 ns	4,08 nm
		Trimere -Nx	3800 ns	3300 ns	2000 ns	4,08 nm
(c)	102/143	Monomere	5000 ns	4300 ns	2000 ns	4,35 nm
		Monomere -Nx	5000 ns	4300 ns	2000 ns	4,07 nm
(d)		Trimere	3000 ns	2704 ns	288 ns	3,76 nm
		Trimere -Nx	3000	n/a	n/a	n/a
(e)	113/143	Monomere	6000 ns	5300 ns	2000 ns	4,52 nm
		Monomere -Nx	6000 ns	5300 ns	2000 ns	4,32 nm
(f)		Trimere	6000 ns	5300 ns	2000 ns	2,65 nm
		Trimere -Nx	5000 ns	n/a	n/a	n/a

che laut Kristallstruktur in einem kurzen helicalen Abschnitt liegt, weder im Monomer noch im Trimer signifikante Unterschiede in der Breite der Abstandsverteilung aufwies. Die großen Differenzen konnten nicht allein durch eine gesteigerte Rotationsfreiheit der Spinlabel bedingt sein, da diese nur eine Länge von 0,5 nm besitzen. Die Bindung von Neoxanthin hatte hier einen starken Einfluss auf die Flexibilität der Positionen 96 und 113, nicht jedoch auf Position 102.

1.1.3. Strukturuntersuchungen des N-Terminus

Die N-terminale Domäne des LHCII wurde in Dietz (2012) mithilfe heterogener Trimere und DEER-EPR Experimenten untersucht. Ergänzend dazu wurden in dieser Arbeit weitere Untersuchungen durchgeführt, mit der Absicht, ein Modell des in der Kristallstruktur nicht aufgelösten Bereiches erstellen zu können. Da Fortschritte in der Monomerpräparation die Herstellung aggregatfreier Proben ermöglicht (Abschnitt 1.1.1), wurden die Abstände der Positionen 3, 7 und 11 zu den Ankerpunkten 34 und 59 erneut vermessen. Der Klon 11/34 wurde zusätzlich im Trimer vermessen, da zu diesem bisher noch keine Daten vorhanden waren.

Um eine Beeinflussung der Flexibilität und der Struktur durch den Strep-tag zu vermeiden, trugen die verwendeten LHCP-Mutanten sowohl einen His₆- als auch einen Strep-tag am C-terminalen Ende. Die Präparation der EPR-Proben der Monomere entsprach dem Standardprotokoll, es wurden 1,5 mg LHCP des jeweiligen Klonen eingesetzt und diese nach Rekonstitution auf 3 SW 60 Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Die Herstellung der heterogenen Trimere erfolgte nach dem selben Verfahren, welches für die Untersuchung der lumenalen Schleife zum Einsatz kam, es wurde für alle Proben jedoch ausschließlich Pigmenttotalextrakt verwendet.

In Abb. IV.1.10 sind die CD-Spektren der N-terminalen Monomere sowie der heterogenen Trimere abgebildet. Diese zeigten insgesamt keine auffälligen Abweichungen von CD-Spektren des Wildtyps. In den Absorptionsspektren war eine Abweichung der Extinktion bei 468 nm und 670 nm zwischen den einzelnen Proben zu erkennen (Abb. IV.1.11). Da diese Unterschiede jedoch gering waren, wies dies eher auf einen gewissen Anteil an freien Pigmenten bzw. nicht intakten Komplexen als auf eine Verschiebung der Pigmentstöchiometrien im Komplex hin. Diese Annahme wurde durch das Auftreten geringer *chl b* Fluoreszenz bestätigt. (Abb. IV.1.12).

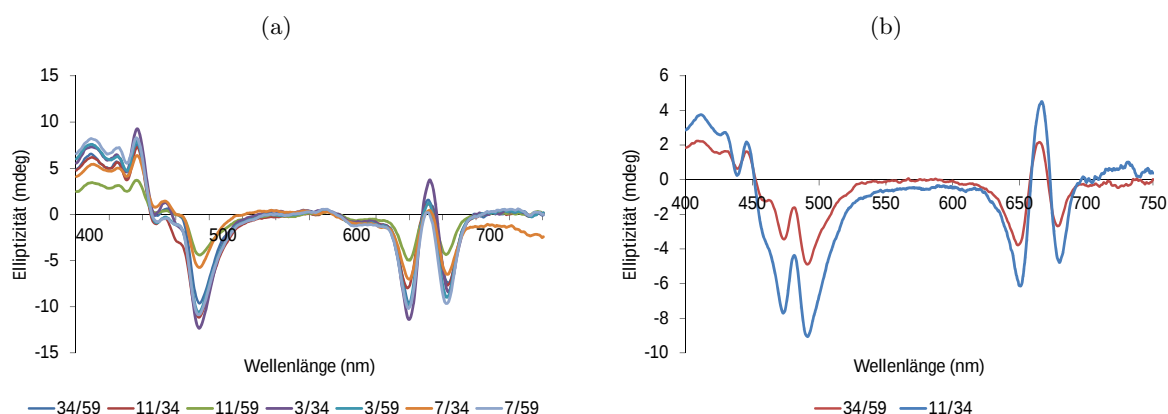


Abbildung IV.1.10.: CD-EPR Spektren der N-terminalen LHCII-Klone. Alle Klone rekonstituiert nach Standardprotokoll. Die CD-Spektren wurden in einer 2 mm OG-Küvette bei 4 °C aufgenommen. (a) CD-Spektren der Monomere. (b) CD-Spektren der heterogenen Trimere.

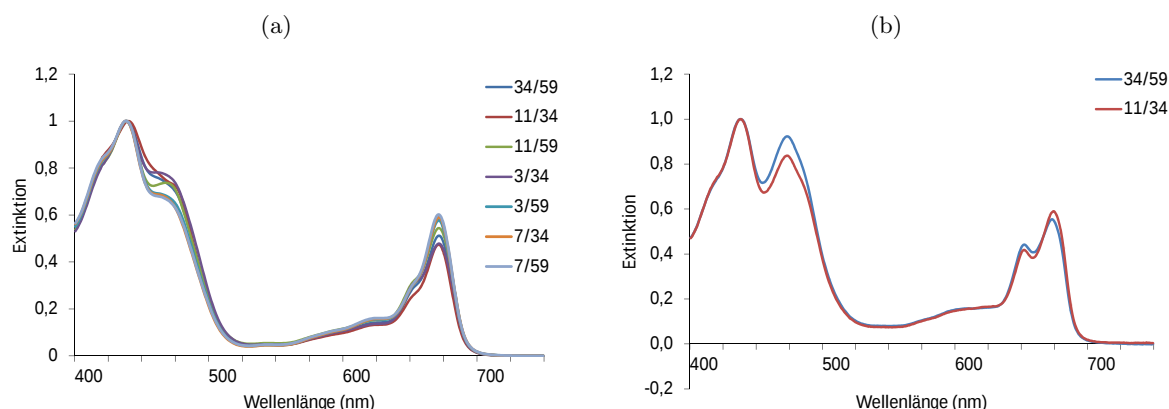


Abbildung IV.1.11.: Absorptionsspektren der N-terminalen LHCII-Klone. Alle Klone rekonstituiert nach Standardprotokoll. Gemessen in 2 mm OG Küvette bei RT. Normiert auf ein Maximalabsorption von 1. (a) Absorptionsspektren der Monomere. (b) Absorptionsspektren der heterogenen Trimere.

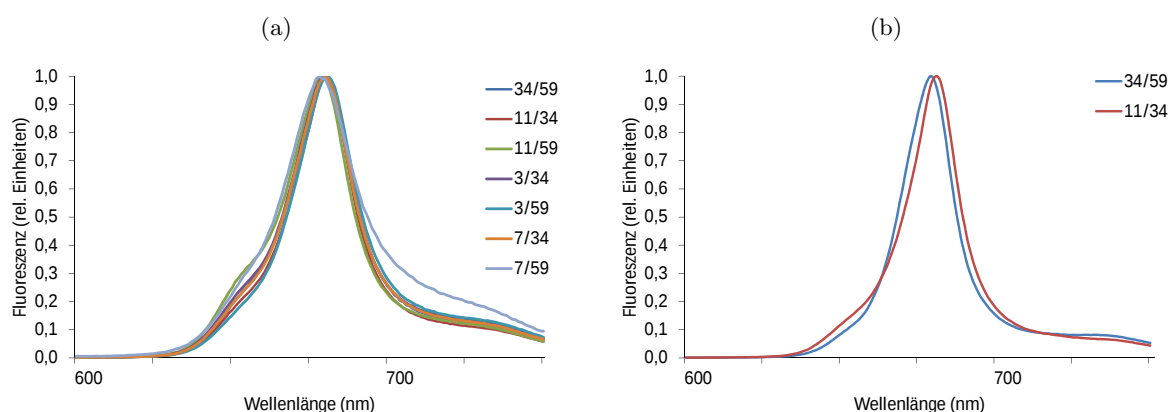


Abbildung IV.1.12.: Fluoreszenzspektren der N-terminalen LHCII Klone. Alle Klone rekonstituiert nach Standardprotokoll. Aufgenommen in OG-Fluoreszenz-Küvette mit „Front-Face-setup“. Normiert auf Maximalfluoreszenz von 1. (a) Fluoreszenzspektren der Monomere (b) Fluoreszenzspektren der heterogenen Trimere

Zur besseren Übersicht sind neben den Abstandsverteilungen der vermessenen Klone auch die Ergebnisse von C. Dietz gezeigt. Diese sind in Abb. IV.1.12 mit einem * gekennzeichnet. Da sich die MMM-Simulation der DEER-Spektren aus der Röntgenkristallstruktur ableitet, konnte diese für die unaufgelösten Bereiche nicht durchgeführt werden. Die DEER-Spektren der Positionen 3/34 und 3/59 ergaben im Monomer sehr breite Abstandsverteilungen. Im Trimer waren sie etwas weniger breit, jedoch war auch hier kein distinkter Peak zu beobachten. Da die Positionen 34 zu 59 sowohl im Monomer als auch im Trimer eine enge Abstandsverteilung zeigten, und die Abstände den Erwartungen aus der MMM-Simulation entsprachen, wiesen diese Ergebnisse

Tabelle IV.1.3.: Abstände des N-TerminusAngabe des Hauptpeaks, der Breite des Peaks sowie der Differenz zwischen Peakanfang und -ende der Abstandsverteilungen aus Abb. IV.1.12

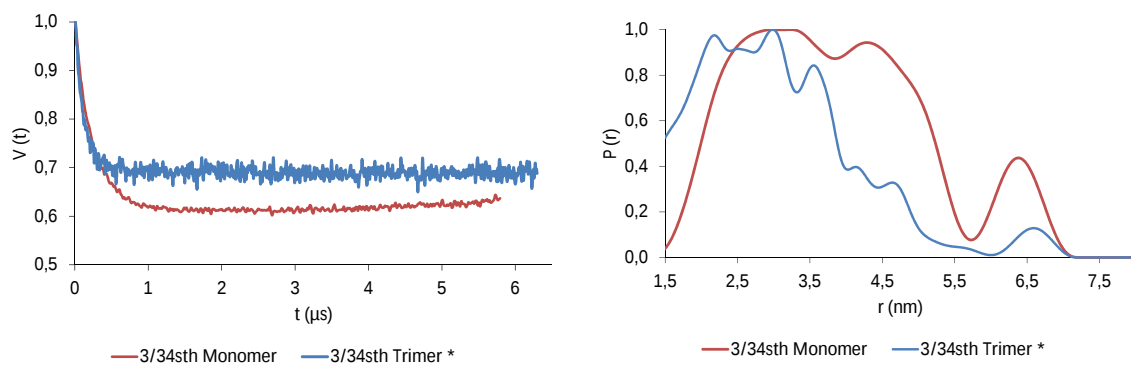
		Maximum	Breite	Differenz
34/59	Monomer	2 nm	1,5 - 5 nm	3,5 nm
	Trimer	1,8 nm	1,5 - 5 nm	3,5 nm
	MMM-Simulation Trimer	2,6 nm	1,5 - 3 nm	3,5 nm
3/34	Monomer	4,1 nm	2 - 6 nm	4 nm
	Trimer	2,8 nm	1,5 - 5 nm	3,5 nm
3/59	Monomer	2 nm	1,5 - 5,5 nm	4 nm
	Trimer	1,5 nm	1,5 - 5 nm	3,5 nm
7/34	Monomer	3,1 nm	1,5 - 5,5 nm	4 nm
	Trimer	2 nm	1,5 - 5 nm	3,5 nm
7/59	Monomer	2,9 nm	1,5 - 5,3 nm	3,8 nm
	Trimer	2,1 nm	1,5 - 5,6 nm	4,1 nm
11/34	Monomer	2,1 nm	1,5 - 6 nm	4,5 nm
	Trimer	2,3 nm	1,5 - 4,8 nm	3,3 nm
11/59	Monomer	2,3 nm	1,5 - 5,3 nm	3,8 nm
	Trimer	2,3 nm	1,5 nm - 4,8 nm	3,3 nm

auf eine hohe Flexibilität der Position 3 des N-Terminus hin. Im Trimer schien die Flexibilität geringfügig niedriger und die Maxima waren hin zu kürzeren Abständen verschoben. Während bei Klon 3/34 das Maximum des Monomers bei 4,2 nm lag, befand es sich im Trimer bei 2,8 nm. Bei Klon 3/59 war es von 2 nm (Monomer) zu 1,5 nm (Trimer) verschoben (Abb. IV.1.12 (a), (b)).

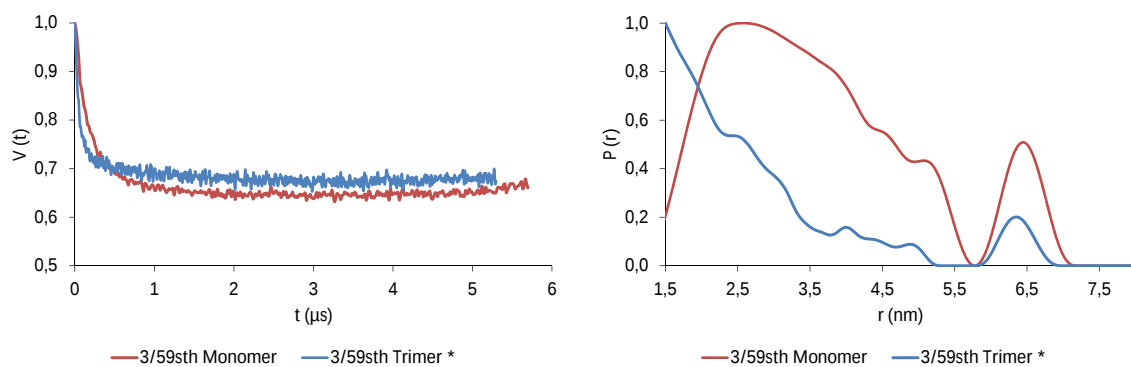
Auch an Position 7 waren breite Abstandsverteilungen zu beobachten, im Monomer wiederum etwas breiter als im Trimer. Während sich die Maxima des Klons 7/34 im Monomer und Trimer ähnelten, lagen sie bei Klon 7/59 im Monomer mit 2,9 nm gegenüber dem Trimer mit 2,1 nm bei einem längeren Abstand (Abb. IV.1.12 (c), (d)).

Die schmalsten Abstandsverteilungen zeigte Klon 11/34, jedoch war auch hier eine starke Verschiebung des Maximums zwischen Monomer und Trimer zu verzeichnen (2,1 nm / 5,5 nm). Bei Klon 11/59 hingegen glichen sich die Monomer und Trimerspektren, mit einer geringfügigen breiteren Verteilung im Monomer (Abb. IV.1.12 (e), (f)). Die Ergebnisse bestätigten bisherige Untersuchungen des N-Terminus, die eine hohe Flexibilität an den ersten Aminosäuren belegen, die in Richtung Kern des LHCII stetig abnimmt. Im Trimer wurde der N-Terminus stabilisiert und seine Lage verändert.

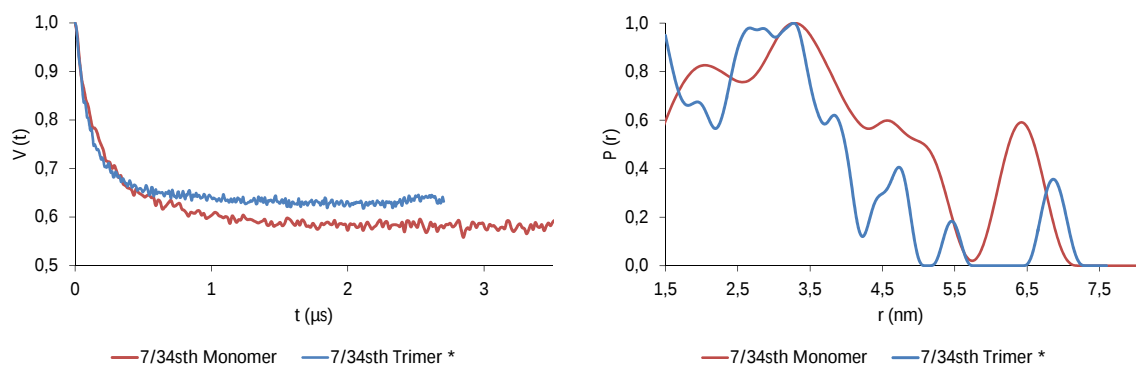
(a) 3/34



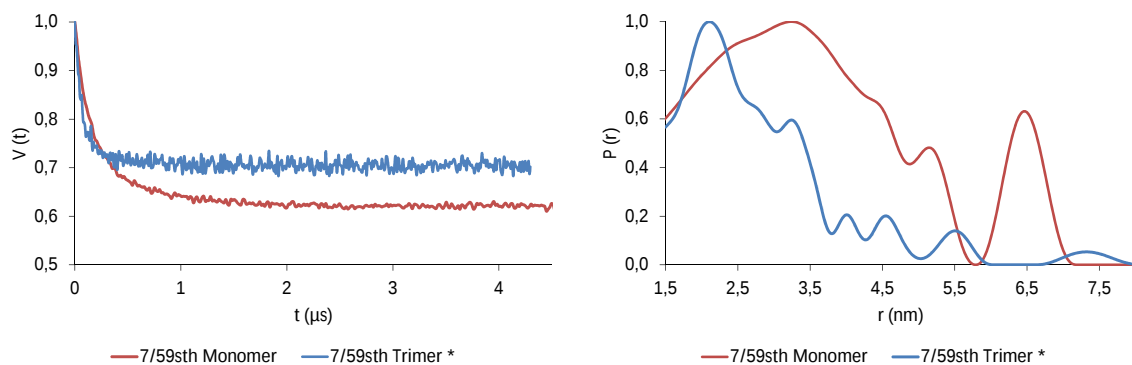
(b) 3/59



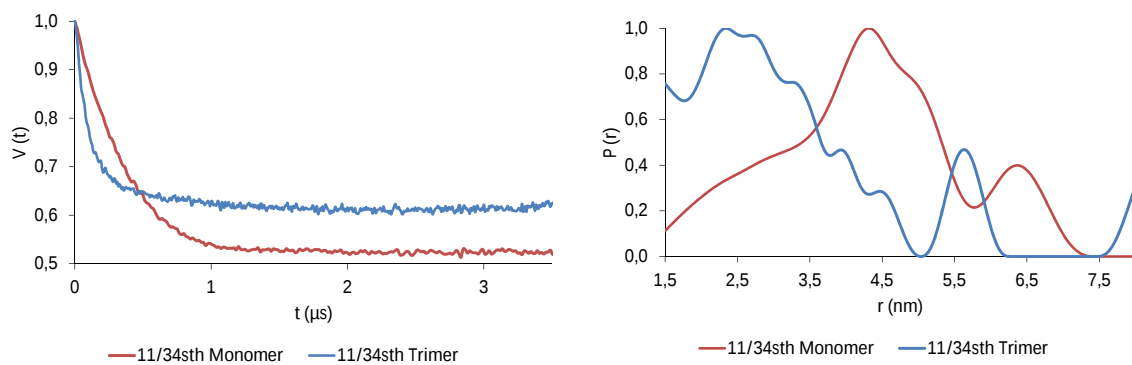
(c) 7/34



(d) 7/59



(e) 11/34



(f) 11/59

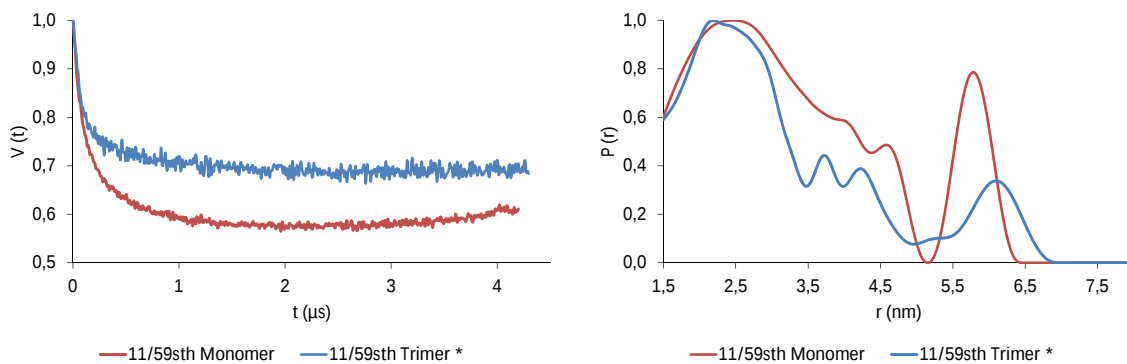


Abbildung IV.1.12.: EPR-Primärdaten und Abstandsverteilungen der LHCII-Klone des N-Terminus. Alle Proben rekonstituiert nach Standardprotokoll. Proben in 0,2% DM, 50 mM Tris-HCl pH 7,8, 12,5% Saccharose in D₂O. links: Hintergrundbereinigte Primärdaten des 4-Puls-DEER-Experiments. rechts: Abstandsverteilungen normiert auf Maximalamplitude $P(r) = 1$. Abgeleitet aus DEER-Spektrum (nicht gezeigt) durch Tikhonov-Regularisierung mit berechneter L-Kurve. Parameter der DEER-EPR Messung:

	Probe		D2	CutOff	BckCorr	ØAbstand
(a)	3/34	Monomer	6500 ns	5800 ns	592 ns	3,87 nm
		Trimer	7000 ns	6300 ns	2000 ns	3,19 nm
(b)	3/59	Monomer	6000 ns	5696 ns	768 ns	3,65 nm
		Trimer	6000 ns	5300 ns	1500 ns	2,95 nm
(c)	7/34	Monomer	6000 ns	5696 ns	768 ns	3,65 nm
		Trimer	6000 ns	5704 ns	1000 ns	3,74 nm
(d)	7/59	Monomer	6000 ns	5696 ns	768 ns	3,64 nm
		Trimer	5000 ns	4300 ns	1560 ns	2,88 nm
(e)	11/34	Monomer	5500 ns	4800 ns	1296 ns	4,4 nm
		Trimer	4000 ns	3704 ns	1000 ns	3,26 nm
(f)	11/59	Monomer	4500 ns	4200 ns	544 ns	3,385 nm
		Trimer	5000 ns	4300 ns	1500 ns	3,39 nm

2. Diskussion

Der LHCII der grünen Pflanzen erfüllt *in vivo* neben der eigentlichen Lichtsammlung weitere essentielle Aufgaben, wie z.B. beim Non-photochemical-Quenching, das bei „State Transitions“ vor Überanregung im Starklicht schützt, welche die Verteilung der Anregungsenergie zwischen den Photosystemen regulieren, oder der strukturellen Organisation der Thylakoidmembranen durch Granastapelung (Yamamoto et al. (2014), Wientjes et al. (2013), Garab (2014)). Es wird diskutiert, ob die Erfüllung dieser Aufgaben nur durch konformationelle Änderungen möglich ist, die der LHCII unter verschiedenen Umweltbedingungen erfährt (Sunku et al. (2013)). Mithilfe von DEER-EPR am vollgefalteten Komplex können Konformationseigenschaften des LHCII untersucht und daraus Informationen über diese Aufgaben in einzelnen Proteinbereichen gesammelt werden, wie in der Vergangenheit gezeigt werden konnte (Dokter et al. (2012)). In diesem Kapitel wurde basierend auf Studien von C. Dietz und C. Dokter die Herstellung von statischen EPR-Proben aus Detergenzwechsel-Rekonstitutionen optimiert sowie zwei flexible Bereiche des LHCII untersucht, die lumenale Schleife und der N-Terminus. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

2.1. Aggregationen in monomeren LHCII-Proben lassen sich minimieren

Die Vermeidung von Aggregationen ist eines der Hauptkriterien für die Probenqualität und Aussagekraft von DEER-EPR-Spektren. Aggregierter LHCP bzw. LHCII kann zum Auftreten von Nebenmaxima oder zur Verbreiterung der Abstandsverteilung von DEER-EPR-Proben führen, die die Aussagekraft einschränken. In den Abstandsverteilungen äußern sich ungeordnete Aggregate markierter Proteine meist in Peaks mit langen Abständen, da abhängig von der dipolaren Evolutionszeiten der DEER-Messung und der Art der Auswertung, große Abstände zu einem Peak „zusammengefasst“ werden (mündl. Mitteilung AG Jeschke, 2014). Mithilfe der in Abschnitt 1.1.1 durchgeführten Untersuchungen konnte die Aggregation von rekonstituiertem LHCII als Hauptquelle für diese störenden Effekte ausgeschlossen werden.

Wie in dieser Arbeit und von Dietz (2012) anhand von spektroskopischen Messungen gezeigt werden konnte, besteht auch keine Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation (Ab-

schnitt 1.1.1.1). Diese Beobachtung wird auch durch neueste EPR-Messungen bestätigt (Daten nicht gezeigt) und führt zu dem Schluss, dass die Nebenpeaks wahrscheinlich auf andere Komponenten zurückzuführen sind. Durch eine Anpassung der Extraktionsmethode für die LHCII-Monomerbande in Saccharosegradienten ließen sich Nebenpeaks in LHCII Monomerproben deutlich reduzieren, sie traten mit zunehmender Intensität auf, wenn der obere Bereich der Monomerbande aus den Saccharosedichtegradienten entnommen wurde. Der untere Bereich wies nur sehr geringe Nebenmaxima auf und die Abstandsverteilung des Klon 34/59 entsprach weitgehend der auf der Kristallstruktur des LHCII basierenden Rotamersimulation (Abb. IV.1.4), Standfuss et al. (2005), Polyhach et al. (2011)). Zieht man die Beobachtung in Betracht, dass in trimerisierten LHCII-Proben, die über Saccharosedichtegradienten aufgereinigt wurden, wesentlich weniger ungewünschte Nebenmaxima auftreten, scheint die Aggregation auf ungefalteten LHCP oder geringe Anteile an Fremdproteinen der IB-Extraktion aus *E. Coli*, die in ihrem Sedimentationsverhalten den LHCII-Monomeren ähneln, zurückzuführen zu sein. Die Beschränkung auf die Entnahme des unteren Teils der Proteinbande verbesserte die Probenqualität erheblich, eine weitere Optimierung der Probenqualität von LHCII-Monomeren ist jedoch wünschenswert. Geht man von einer Kontamination mit Fremdprotein aus, wäre eine Möglichkeit der Probenreinigung die Waschung der Monomere an einer Ni-Säule mit PG-freiem Puffer, dem ersten Schritt der Trimerisierung entsprechend. Ist die Kontamination auf unpigmentiertem LHCII bzw. ungefaltetes LHCP zurückzuführen, muss eine Optimierung der verwendeten Dichtegradienten in Betracht gezogen werden. Da für Monomer- und Trimerproben der gleiche Gradient verwendet wird, nutzt man bei Monomerauftrennungen einen großen Teil der Migrationsstrecke nicht aus, hier besteht das Potential, die Kontaminanten durch längere Zentrifugation oder niedriger konzentrierte Gradienten weiter von den Zielproteinen zu trennen.

2.2. Die strukturelle Integrität der lumenalen Schleife hängt von Neoxanthin ab

Bisherige strukturelle Untersuchungen der lumenalen Schleifenregion mithilfe von EPR-Spektroskopie beschränkten sich auf die Vermessung intermolekularer Abstände im Trimer, intramolekulare Abstände konnten nur im Monomer vermessen werden (Dockter et al. (2012), Dietz (2012)). Die Anwendung der von C. Dockter und C. Dietz entwickelte Technik der Einzelmarkierung von LHCII-Monomeren im Trimerverbund, ermöglichte es in dieser Arbeit, vergleichende Studien zwischen monomerem und trimerem LHCII durchzuführen. Die Rolle der lumenalen Schleife und insbesondere der im LHCII gebundenen Carotinoide wird in vielen Studien untersucht und es gibt Hinweise auf konformationelle Änderungen im Zusammenhang mit dem Übergang in

einen dissipativen Status unter Starklicht (Sunku et al. (2013), Belgio et al. (2013), Iliaia et al. (2011)). Die Rekonstitution des LHCII mit einem Pigmentgemisch ohne das Carotinoid Neoxanthin führt zu funktionalen Monomeren und Trimeren (Hobe et al. (2000)), was eine Analyse des Einflusses dieses Pigments auf die Konformation der lumenalen Schleife möglich macht.

Zur Untersuchung wurden Abstände der Positionen 96, 102 und 113 der lumenalen Schleife zur AS 143 im monomeren und trimeren Zustand mit und ohne gebundenem Neoxanthin vermessen. Da die Position 143 am Ende der Helix 3 im als starr angenommenen Kern des LHCII liegt (Docker et al. (2012)), sind Abstandsveränderungen auf eine konformationelle Änderung der Positionen in der lumenalen Schleife zurückzuführen.

Bereits die veränderten CD-Spektren in Komplexen ohne Neoxanthin im Vergleich zu solchen mit Neoxanthin sind ein Hinweis auf veränderte strukturelle Eigenschaften des LHCII. Die Spektren zeigen einen zusätzlichen Peak bei 473 nm, in einer Absorptionsregion, in der Veränderungen bereits von Ruban et al. (1997) mit konformationellen Änderungen in einem Carotinoid in Verbindung gebracht wurden. Auch die EPR-Spektren zeigten sowohl Unterschiede in ihren Abstandsverteilungen zwischen monomerer und trimerer Konfiguration als auch bedingt durch fehlendes Neoxanthin. Position 96, der durch Dietz (2012) bereits eine erhöhte Flexibilität zugeschrieben wurde, zeigt auch gegen Position 143 im Vergleich zur Rotamersimulation eine breitere Abstandsverteilung. Dieser Effekt nimmt in Monomeren bei fehlendem Neoxanthin stark zu, der Bereich gewinnt an Flexibilität in Abwesenheit des Carotinoids, im Trimer ist dies jedoch nicht zu beobachten. Im Monomer verschiebt sich der Abstand der Positionen von den in der Simulation vorhergesagten 3,6 nm zu 4,2 nm (Abb. IV.1.9 (a), (b)). Da diese Verschiebung des Maximums von Dietz (2012) bei Klon 96/124 nicht beobachtet wurde, spricht dies für eine Vergrößerung des Abstands entlang der vertikalen Achse des LHCII, so dass der Abstand zu Position 124 erhalten bleibt.

Der zweite vermessene Bereich lag in der Helix 2 des LHCII. Unterschiede in der Flexibilität der Position 102 durch gebundenes Neoxanthin sind weder im Monomer noch im Trimer festzustellen (Abb. IV.1.9 (c), (d)), die Messungen entsprachen in der Breite der Verteilung der Rotamersimulation. Auffällig ist hier jedoch die veränderte Form der Verteilung im Trimer. Die Zweigipfligkeit der Simulation und des Spektrums der Probe mit Neoxanthin lässt hier auf zwei bevorzugte Ausrichtungen des Spinlabels schließen, während bei fehlendem Neoxanthin im Trimer nur ein einzelner Peak vorhanden ist.

Die prägnantesten Beobachtungen konnten an Position 113 gemacht werden, die zwischen der kurzen amphiphilen Helix und dem lumenalen β -Faltblattbereich liegt. Eine erhöhte Flexibilität war auch hier im Monomer bei fehlendem Neoxanthin zu beobachten, im Trimer ist der Bereich wiederum stabilisiert. Jedoch ist der Abstand zu Position 143 im Monomer größer als in der Simulation (3,5 zu 4,5 nm) und im Trimer wesentlich geringer (3,4 zu 2 nm; Abb. IV.1.9 (e),

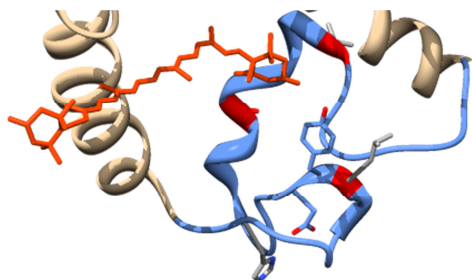


Abbildung IV.2.1.: Neoxanthinbindung der Lumenalen Schleife. Röntgenkristallstruktur aus Standfuss et al. (2005), verändert mit UCSF Chimera. PDB:2BHW. Die roten Markierungen zeigen die Aminosäuren, an denen die Spinlabel für DEER-EPR Messungen gebunden wurden.

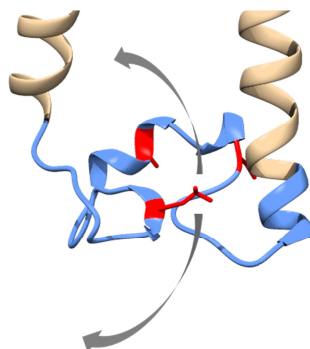


Abbildung IV.2.2.: Schematische Bewegungsfreiheit der Lumenalen Schleife. Röntgenkristallstruktur aus Standfuss et al. (2005), verändert mit UCSF Chimera. PDB:2BHW.

(f)). Diese Differenz ist zu groß, um sie mit einer unterschiedlichen Ausrichtung des Proxyl-Iodacetamid Spinlabels zu erklären. Vergleicht man diese Beobachtung mit Ergebnissen zur Position 106, die gesteigerte Flexibilität im Monomer und Trimer besitzt (Dockter et al. (2012)), und zieht die oben gemachten Überlegungen zur Verschiebung der Position 96 in Betracht, scheint es hier zu einer Drehung dieses Bereiches um die Helix 2 des Komplexes während der Trimerisierung zu kommen (Abb. IV.2.2).

Im vollpigmentierten Komplex steht Neoxanthin über eine Wasserstoffbrücke mit Tyrosin 112 in Kontakt. Ein Fehlen des Carotinoids scheint hier eine hohe Flexibilität dieses Bereichs im Monomer zu vermitteln, die im Trimer weitgehend kompensiert wird. Diese Beobachtung bestätigen Triangulationsdaten des Trimers 113 und Messungen an Klon 90/113 sowie 113/124 (Dietz (2012)). Die Abstände der beiden Doppelcysteinmutanten dieser Studie lagen am unteren Rand der Auflösungsgrenze des EPR-Spektroskops und konnten nicht eindeutig interpretiert werden, der im optimalen Bereich für DEER-EPR liegende Abstand der Spinlabel des Klons 113/143 (MMM-Simulation 3,4 nm) verschafft hier Klarheit und zeigt eine eindeutige Verschiebung der lumenalen Schleife abhängig vom Oligomerisierungsgrad des LHCII.

In der Kristallstruktur des LHCII liegen die Chlorophylle *b* 605, *b* 606 und *a* 604 in unmittelbarer Nähe zur Helix 2, und lassen so der Position 102 wahrscheinlich keinen Freiraum für flexible Ausrichtung. Die C₇-Formyl-Gruppe von *Chl b* 605 bildet eine Wasserstoffbrücke zu Serin 123 aus, das zentrale Mg²⁺ ist über ein Wassermolekül an Glycin 131 gebunden, *Chl b* 606 und *Chl a* 604 bindet ebenfalls über ein Wassermolekül an Glycin 78 der Helix 1 (Standfuss et al. (2005)), die diese Moleküle an ihrem Platz halten. Bei fehlendem Neoxanthin bzw. einer Konfor-

mationsänderung des Carotinoids wäre jedoch auch eine Verschiebung des *Chl a* 604 näher an die Helix 1 denkbar, da Neoxanthin hier eine Lücke hinterlassen würde. So wäre ein Einrücken der AS 113 hin zur Komplexmitte, wie es in den Trimmermessungen beobachtet werden konnte, erklärbar.

Eine konformationelle Änderung der Pigmentausrichtung ist anhand der Kristallstruktur des LHCII nicht nachweisbar (Standfuss et al. (2005)), jedoch wurde ein Neoxanthin-Twist sowie eine Änderung im Luteinmolekül indirekt mittels Raman-Spektroskopie nachgewiesen (Ruban et al. (2007), Iliaia et al. (2011)) und „magic-angle“ NMR gab kürzlich Hinweise auf eine Beteiligung der lumenalen und stromalen Schleifenregionen an einem strukturellen Übergang in einen Energiedissipativen Zustand des LHCII, während der Kern rigide bleibt (Sunku et al. (2013)). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese einer Konformationsänderung im Bereich der lumenalen Schleife unter Beteiligung von Lutein und Neoxanthin, da die durchgeführten Messungen auf eine erhöhte Flexibilität aller mit den Carotinoiden assoziierten Bereiche der lumenalen Schleife hinweisen und das Fehlen von Neoxanthin eine große Auswirkung auf die Stabilisierung im Monomer hatte. Diese Aussage kann jedoch nur für monomeren LHCII getroffen werden, im Trimerverbund war die Flexibilität der Bereiche weniger stark ausgeprägt und die Abwesenheit von Neoxanthin zeigte einen schwächeren Effekt. Die Verschiebung der Position 113 im Trimer ist jedoch eine Momentaufnahme eines von der Kristallstruktur des LHCII abweichenden Zustandes der Ausrichtung dieses Bereiches und so ein weiterer Hinweis auf mögliche Konformationsänderungen in der lumenalen Schleife.

2.3. Die Lage des N-Terminus kann im Trimer über DEER-EPR bestimmt werden

Der zweite flexible Bereich des LHCII, der in dieser Arbeit näher untersucht wurde, war die N-terminale Domäne der ersten elf Aminosäuren. Da diese in der Röntgenkristallstruktur nicht aufgelöst ist (Standfuss et al. (2005)), ist die genaue Lage dieses Bereiches bisher nicht bekannt. Bisherige EPR-spektroskopische Studien zeigten eine hohe Flexibilität, die hin zum Kern des LHCII abnimmt und wiesen eine unterschiedliche Lage des Terminus im Monomer und Trimer nach (Dockter et al. (2012), Dietz (2012)). Da die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen auf der zu diesem Thema durchgeführten EPR-Studie von C. Dietz basierten, sollen die dort erstellten Annahmen zum Verhalten des Abschnittes 1 (AS 1-14) der N-proximalen Sequenz anhand der Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert werden.

In der damaligen Arbeit wurde dem ersten Abschnitt eine hohe Flexibilität gepaart mit einer Verschiebung der Lage abhängig vom Oligomerisierungsgrad des LHCII zugeschrieben. Die

Monomerproben enthielten jedoch einen nicht quantifizierbaren Anteil an Aggregaten und zwei Abstände, die des Monomers 3/34 und die des Trimers 11/34 konnten nicht gemessen werden. Obwohl der Aggregateintrag durch die veränderte Extraktionsmethode der Monomerbande aus Saccharosedichtegradienten verringert werden konnte, war eine vollständig aggregatfreie Präparation aufgrund der unter Abschnitt 2.1 angesprochenen Gegebenheiten auch in dieser Arbeit nicht möglich, die gemessenen Abstandsverteilungen beider Arbeiten ähneln sich stark. Die bisher nicht gemessene Verteilung des Abstandes von Position 3 zu Position 34 im Monomer unterstreicht die These der hohen Flexibilität dieser Position, sie ist mit einer Peakbreite von 5 nm ähnlich breit wie die des Klon 3/59. Eine Abweichung der Monomerdaten konnte einzig bei Klon 11/34 detektiert werden, hier führte die veränderte Präparationsmethode zu einer starken Abnahme der kurzen Abstände im DEER-Spektrum, so dass hier ein Peak bei 4,2 nm dominant ist, im Gegensatz zu den 2,5 nm der damaligen Messung. Die Trimerprobe des Klon 11/34 zeigt einen Peak bei 2,5 nm und eine im Vergleich zu den anderen Klonen des N-terminus schmalere Verteilung.

Die durchgeführten Messungen dienten der Erstellung eines Lagemodells der Termini im Monomer und Trimer, mithilfe heterogen markierter Cysteinmutanten des N-terminalen Bereichs. Die erneute Messung von Dietz (2012) hergestellter Cysteinklone bestätigte die Beobachtungen und minimierten die Verunreinigung mit Aggregaten unpigmentierter bzw. ungefalteter LHCPs in Monomerproben. Die optimierte Probenproduktion half also, eindeutige Ergebnisse in DEER-Messungen für LHCII-Monomere zu erzielen, jedoch ist eine eindeutige Bestimmung der Flexibilität und Lage des N-Terminus im Monomer aufgrund der verbleibenden Restaggregate nicht möglich, da es durch die Aggregationen zu einer nicht quantifizierbaren Verbreiterung der Abstandsverteilung kommt. Im trimeren Zustand ist aufgrund der besseren Aufreinigung eine Bestimmung der Flexibilität und Lage des N-Terminus möglich, da es zu keinem störendem Einfluss auf die DEER-Spektren kommt.

Zieht man Daten aus früheren ESEEM-Messungen (unveröffentlichte Daten, Andre Müller) in Betracht, die für die Positionen des N-Terminus eine ähnliche Wasserzugänglichkeit bestätigen, ist eine flexible Positionierung des N-Terminus in der Peripherie der Detergenzhülle bzw. der Membran wahrscheinlich.

Dies lässt die Modellierung der Lage des Terminus im Trimer mithilfe der erhobenen Abstandsdaten zu (Abb. IV.2.3). Das Modell verdeutlicht, dass eine hohe Flexibilität des Terminus im Trimer gegeben ist, und viele Konformationen mit ähnlich hoher Wahrscheinlichkeit auftreten können. Die N-proximale Sequenz positioniert sich nahe der Membranoberfläche über dem Helixkreuz. Vergleicht man die erhobene Trimerdaten mit denen der Monomere, ist eine Lageverschiebung des Terminus hin zur Peripherie des Komplexes aufgrund der größeren Maxima der Abstandsverteilungen anzunehmen.

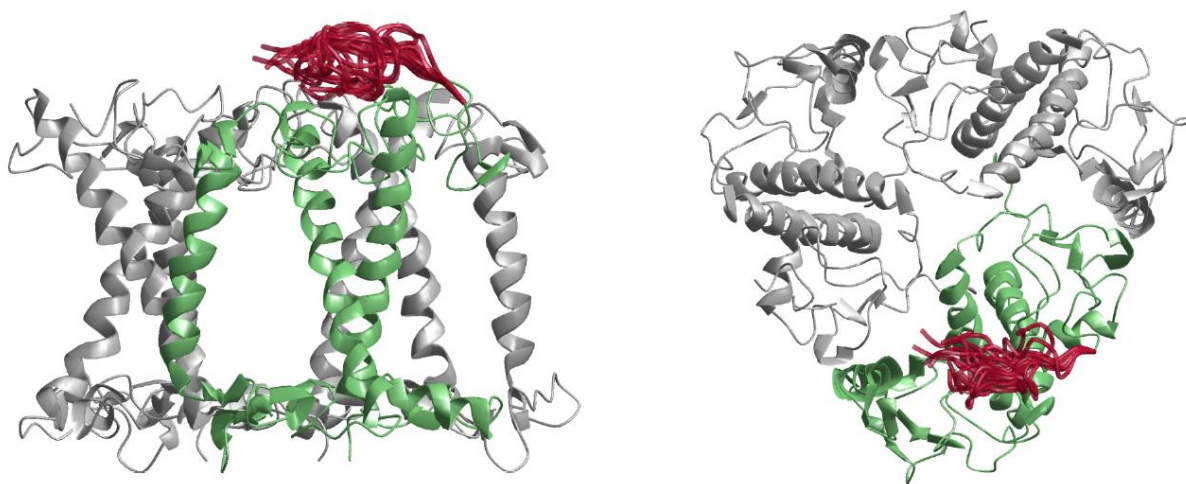


Abbildung IV.2.3.: Lagemodell des N-Terminus im Trimer. Erstellt von Prof. Dr. G. Jeschke, ETH Zürich, 2014. Lage der N-proximalen-Sequenz (rot) im LHCII-Trimer; Die Kristallstruktur (PDB: 2BHW) wurde so transformiert, das die C3-Symmetrieachse die z-Achse des Koordinatensystems ist und eine Lipiddoppelschicht unter Minimierung der freien Energie der Solvation der zugänglichen Aminosäurereste generiert. Grundlage des Modells sind die Abstandsverteilungsrestriktionen der heterogenen Trimere 3/34, 3/59, 7/34, 7/59, 11/34, 11/59 und 34/59 als Kontrolle sowie die Abstandsverteilungs- und Wasserzugänglichkeitsrestriktionen für Trimere mit einzelner Spinmarkierung (Andre Müller) an den Positionen 3, 4, 7, 9, 10, 11 & 12. Aus den Wasserzugänglichkeitsdaten wurde die obere und untere Grenze der c-Alpha-z-Koordinaten ermittelt, sie lagen bei 35 Å und 17,5-20,6 Å. Modelle wurden verworfen, wenn die c-Alpha Koordinate außerhalb der ermittelten Grenzen lag oder wenn Rückgratatome mit dem Protein oder innerhalb der Schleife selbst kollidierten. Für alle anderen Modelle wurde eine Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der sie mit den Abstandsrestriktionen der Messdaten übereinstimmen. Die Transparenz des jeweiligen Modells spiegelt seine Wahrscheinlichkeit wieder, Unterschiede sind in der Abbildung jedoch gering, da die Wahrscheinlichkeiten zwischen $p = 0,5$ und $p = 0,6682$ variiert (schriftl. Mitteilung Prof. G. Jeschke, ETH Zürich, 2014).

Die Aufgabe des N-Terminus ist nicht vollständig bekannt. Die Aminosäuren zwischen Position 16 und 21 vermitteln Trimerisierungsfähigkeit (Hobe et al. (1995)) und eine Rolle bei der Organisation der Granathylakoide ist wahrscheinlich, zieht man die flexible Ausrichtung ins Stroma der Thylakoide und den Raum zwischen Thylakoidmembranen in Betracht, der in Grana stapeln mit 3,2 nm sogar geringer als im Thylakoidlumen ist (Dekker and Boekema (2005), Garab (2014), Daum et al. (2010)). Die strukturelle Flexibilität anderer Bereiche des LHCII wird stets mit dem Übergang in einen „Quenched-State“ und der Induktion des Non-Photochemical-Quenching in Verbindung gebracht (Garab (2014)). Ein Zusammenhang der hohen Flexibilität mit der Langzeitadaptation der Chloroplasten an gegebene Lichtverhältnisse ist jedoch eher anzunehmen als eine Rolle im NPQ, da gezeigt wurde, dass die reversible Phosphorylierung von Komponenten des PSII-Superkomplexes, insbesondere des LHCII, zu Abwanderung eines mobilen Teil des LHCII-Pools hin zum hauptsächlich in den Stromathylakoiden angesiedelten PSI führt (Bellafore et al. (2005), Depège et al. (2003)). Für die Phosphorylierung ist die Serin-Threonin-Kinase *stt7* in *Chlamydomonas reinhardtii*, bzw. ihr Homolog in höheren Pflanzen, STN7 (*Arabidopsis thaliana*) verantwortlich (Madireddi et al. (2014)). Elektrostatische Interaktionen der stromalen Bereiche gegenüberliegender LHCII-Trimere tragen zur Organisation der Grana bei (Daum et al. (2010)). Der N-Terminus würde durch eine Phosphorylierung seine positive Gesamtladung verlieren und könnte so nicht mehr mit der negativ geladenen stromalen Oberfläche gegenüberliegender Trimere wechselwirken (Abb. IV.2.4). *In vitro* konnte die Phosphorylierung einer N-proximalen Konsensussequenz (RKTVA) des *lhcb1* aus *Arabidopsis thaliana* durch Fusion mit dem STN7 Homolog MsStt7d aus *Micromonas sp.* gezeigt werden (Guo et al. (2013)). Die hohe strukturelle Flexibilität der N-proximalen Aminosäuren würde auch im LHCII aus *Pisum sativum* die Bindung der STN7-Proteinkinase begünstigen und passt ins Bild der Beteiligung des äußeren N-Terminus an diesen regulatorischen Prozessen in Chloroplasten von Algen und höherer Pflanzen.

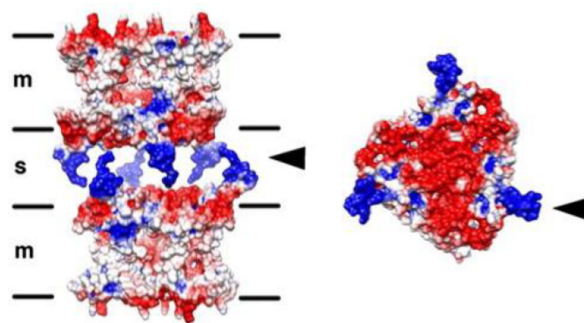


Abbildung IV.2.4.: Abbildung aus Daum et al. (2010). Modellerte elektrostatische Oberflächen der aus der Kristallstruktur (Standfuss et al. (2005)) bei pH 8,0. Die positiv geladenen N-Termini (blau, schwarze Pfeile) interagieren mit der negativ geladenen Oberfläche (rot) des gegenüberliegenden Trimers

Teil V.

Allgemeines

1. Zusammenfassung

Membranproteine haben einen Anteil von 30% an bisher sequenzierten Genomen und bieten Ansatzpunkte für mehr als 50% der bekannten Arzneimittel (Heyden et al. (2012)). Daher ist die Erforschung von Struktur, Funktion und Faltung wichtig für das Verständnis des Metabolismus von Tieren und Pflanzen. Aufgrund der Einbettung in biologischen Membranen mit stark hydrophobem Kern und amphiphilen peripheren Bereichen stellen Untersuchungen an integralen Membranproteinen bis heute ein experimentelles Problem dar. Der majore Lichtsammelkomplex II (LHCII) aus *Pisum sativum* ist ein ideales Modellobjekt für Analysen von Struktur und Faltung von Membranproteinen, da er nicht nur rekombinant exprimiert und *in vitro* in Detergenzmizellen rekonstituiert werden kann, sondern mit einer hohen Rückfaltungsdauer von fünf Minuten detaillierte Einblicke in die Assemblierung erlaubt. Während dem Faltungsprozess bindet er acht *Chl a*, sechs *Chl b* und vier Carotinoide, und kann daher auch Informationen über Ligandenbindungsprozesse liefern. In der vorliegenden Arbeit wurden mithilfe von zeitaufgelöster Paramagnetischer-Resonanzspektroskopie Strukturuntersuchungen und Faltungsanalysen am LHCII durchgeführt. Die Kombination eines kommerziellen „Stopped-Flow“-Systems mit einer an der ETH Zürich entworfenen „Freeze-Quench“-Einheit erlaubte es, doppelt spinmarkierte Komplexe in verschiedenen Faltungsstadien zu konservieren und im DEER-Verfahren die Abstandsentwicklung der markierten Domänen zu messen. Die Ergebnisse zeigten einen Faltungsverlauf, der dem „Three-Stage-Model“ von Engelman et al. (2003) entsprach, jedoch auf das separate Ablaufen dieser drei Phasen für einzelne Domänen des LHCII hinwies. Helikale Domänen bildeten sich sehr früh aus, während sich die Ausrichtung der lateralen Schleifendomänen über die gesamte Faltungsdauer hinzog. Abstandsmessungen von markierten Domänen des vollgefalteten Komplex wurden zur Analyse zweier flexibler Bereiche des LHCII herangezogen: Der lumenalen Schleife zwischen den Aminosäuren 96 und 113 und den in der Kristallstruktur nicht aufgelösten ersten zehn Aminosäuren der N-proximalen Sequenz. Für die lumenale Schleife konnte eine hohe Flexibilität abhängig von der Neoxanthinbindung im Monomer nachgewiesen werden, die im trimeren Zustand abnahm. Eine Reihe von Abständen zwischen Positionen nahe dem N-Terminus und Positionen im rigiden Bereich des Proteins wurden verwendet, um den Raum zu modellieren, in dem sich die N-proximale Sequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit aufhält. Dieser Unterschied sich zwischen trimerem und monomerem LHCII.

2. Summary

Membrane proteins account for more than 50 % of the known drug targets, while constituting about 30 % of the sequenced genomes (Heyden et al. (2012)). Therefore the investigation of structure, function and folding is crucial for the understanding of the metabolism of animals and plants. Since integral membrane proteins are embedded in biological membranes with a distinctly hydrophobic core and an amphiphilic periphery, experimental approaches for investigating these proteins are difficult. The major light harvesting complex II (LHCII) of *Pisum sativum* is an ideal model for studying the structure and folding pathway of membrane proteins, thanks to the possibility of recombinant expression, *in vitro* reconstitution and its relatively slow folding, which takes five minutes to arrive at a fully folded complex. During assembly, eight *Chl a*, six *Chl b*, and four carotenoids are bound; thus information of ligand binding processes can also be gathered. In this thesis, time resolved paramagnetic resonance was used to analyze the folding process and the structure of the LHCII. The combination of a commercial „stopped-flow“-system and a homebuilt „freeze-quench“-setup (ETH Zurich) allowed the conservation of doubly spin-labelled complexes in different assembly states and the measurement of distance evolutions in labelled domains. The results revealed a folding pathway in agreement with the „Three-Stage-Model“ by Engelman et al. (2003), though suggesting a differential timing of the three stages for different domains. Helical domains evolved early, while the positioning of the loop domains extended over entire duration of the folding process. Distance distributions of labelled domains in fully folded complexes were analysed to investigate two flexible sections of LHCII apoprotein, the luminal loop between residue 96 and 113, and the N-proximal sequence of the first ten amino acids, which are not resolved in the crystal structure. For the luminal loop, a medium or high flexibility could be shown depending on whether or not neoxanthin was bound, respectively, and dropping in the trimerised state. A number of distances between positions near the N terminus and positions elsewhere in the protein were used to model the space in which the N-terminal domain is most likely to reside. This was found to be different in LHCII trimers compared to monomers.

3. Literaturverzeichnis

- Abakumov, G. A. and Tikhonov, V. D. (1969). Interaction of the stable radical 2,2,6,6-tetramethylpiperidone-4-oxy-1 with acids. *Russ. Chem. Bull.*, 18(4):724–727.
- Agostiano, A., Della Monica, M., Palazzo, G., and Trotta, M. (1993). Chlorophyll a auto-aggregation in water rich region. *Biophys. Chem.*, 47(2):193–202.
- Allen, J. F. and Pfannschmidt, T. (2000). Balancing the two photosystems: photosynthetic electron transfer governs transcription of reaction centre genes in chloroplasts. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 355(1402):1351–1359.
- Amano, M., Hasegawa, J., Kobayashi, N., Kishi, N., Nakazawa, T., Uchiyama, S., and Fukui, K. (2011). Specific racemization of heavy-chain cysteine-220 in the hinge region of immunoglobulin gamma 1 as a possible cause of degradation during storage. *Anal. Chem.*, 83(10):3857–3864.
- Arolas, J. L., García-Castellanos, R., Goulas, T., Akiyama, Y., and Gomis-Rüth, F. X. (2014). Expression and purification of integral membrane metallopeptidase htpx. *Protein Expr. Purif.*, 99:113–118.
- Ballottari, M., Girardon, J., Dall’Osto, L., and Bassi, R. (2012). Evolution and functional properties of photosystem ii light harvesting complexes in eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1817(1):143–157.
- Belgio, E., Duffy, C. D. P., and Ruban, A. V. (2013). Switching light harvesting complex ii into photoprotective state involves the lumen-facing apoprotein loop. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15(29):12253–12261.
- Bellafore, S., Barneche, F., Peltier, G., and Rochaix, J.-D. (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase stn7. *Nature*, 433(7028):892–895.
- Booth, P. J. and Paulsen, H. (1996). Assembly of light-harvesting chlorophyll a/b complex in vitro . time-resolved fluorescence measurements. *Biochemistry*, 35(16):5103–5108.
- Bowie, J. U. (2005). Solving the membrane protein folding problem. *Nature*, 438(7068):581–589.

- Bray, R. C. (1961). Sudden freezing as a technique for the study of rapid reactions. *Biochem. J.*, 81:189–193.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I., Haeuptle, M. T., and Dobberstein, B. (1987). A t5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Meth. Enzymol.*, 155:416–433.
- Butler, P. J. and Kühlbrandt, W. (1988). Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex from chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85(11):3797–3801.
- Cammarata, K. V. and Schmidt, G. W. (1992). In vitro reconstitution of a light-harvesting gene product: deletion mutagenesis and analyses of pigment binding. *Biochemistry*, 31(10):2779–2789.
- Cashmore, A. R. (1984). Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a chlorophyll a/b-binding polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81(10):2960–2964.
- Cox, N., Pantazis, D. A., Neese, F., and Lubitz, W. (2013). Biological water oxidation. *Acc. Chem. Res.*, 46(7):1588–1596.
- Daum, B., Nicastro, D., Austin, J., McIntosh, J. R., and Kühlbrandt, W. (2010). Arrangement of photosystem ii and atp synthase in chloroplast membranes of spinach and pea. *Plant Cell*, 22(4):1299–1312.
- Dekker, J. P. and Boekema, E. J. (2005). Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1706(1-2):12–39.
- Depège, N., Bellaïf, S., and Rochaix, J.-D. (2003). Role of chloroplast protein kinase stt7 in lhci phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science*, 299(5612):1572–1575.
- Dietz, C. (2012). *Structural analysis of the major light-harvesting complex II by electron paramagnetic resonance (EPR): comparison between monomers and trimers. Dissertation zur Erlangung des Grades "Doktor der Naturwissenschaften" am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.* PhD thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, Mainz.
- Dockter, C. (2009). *Untersuchung der Struktur und Assemblierung des Lichtsammelkomplexes II höherer Pflanzen mittels elektronenparamagnetischer Resonanz (EPR): Dissertation zur Erlangung des Grades "Doktor der Naturwissenschaften" am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.* PhD thesis, Johannes Gutenberg Universität Mainz, Mainz.

- Dockter, C., Muller, A. H., Dietz, C., Volkov, A., Polyhach, Y., Jeschke, G., and Paulsen, H. (2012). Rigid core and flexible terminus: Structure of solubilized light-harvesting chlorophyll a/b complex (lhci) measured by epr. *J. Biol. Chem.*, 287(4):2915–2925.
- Dockter, C., Volkov, A., Bauer, C., Polyhach, Y., Joly-Lopez, Z., Jeschke, G., and Paulsen, H. (2009). Refolding of the integral membrane protein light-harvesting complex ii monitored by pulse epr. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(44):18485–18490.
- Dunschede, B., Bals, T., Funke, S., and Schunemann, D. (2011). Interaction studies between the chloroplast signal recognition particle subunit cpsrp43 and the full-length translocase alb3 reveal a membrane-embedded binding region in alb3 protein. *J. Biol. Chem.*, 286(40):35187–35195.
- Engelman, D. M., Chen, Y., Chin, C.-N., Curran, A. R., Dixon, A. M., Dupuy, A. D., Lee, A. S., Lehnert, U., Matthews, E. E., Reshetnyak, Y. K., Senes, A., and Popot, J.-L. (2003). Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett.*, 555(1):122–125.
- Garab, G. (2014). Hierarchical organization and structural flexibility of thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1837(4):481–494.
- Göbl, C., Madl, T., Simon, B., and Sattler, M. (2014). Nmr approaches for structural analysis of multidomain proteins and complexes in solution. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 80:26–63.
- Greenfield, N. J. (2007). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.*, 1(6):2876–2890.
- Guo, J., Wei, X., Li, M., Pan, X., Chang, W., and Liu, Z. (2013). Structure of the catalytic domain of a state transition kinase homolog from micromonas algae. *Protein Cell*, 4(8):607–619.
- Guo, X. H., Zhao, N. M., Chen, S. H., and Teixeira, J. (1990). Small-angle neutron scattering study of the structure of protein/detergent complexes. *Biopolymers*, 29(2):335–346.
- Hedin, L. E., Illergård, K., and Elofsson, A. (2011). An introduction to membrane proteins. *J. Proteome Res.*, 10(8):3324–3331.
- Heinemann, B. and Paulsen, H. (1999). Random mutations directed to transmembrane and loop domains of the light-harvesting chlorophyll a/b protein: impact on pigment binding. *Biochemistry*, 38(42):14088–14093.

- Heyden, M., Freites, J. A., Ulmschneider, M. B., White, S. H., and Tobias, D. J. (2012). Assembly and stability of α -helical membrane proteins. *Soft Matter*, 8(30):7742.
- Hobe, S., Fey, H., Rogl, H., and Paulsen, H. (2003). Determination of relative chlorophyll binding affinities in the major light-harvesting chlorophyll a/b complex. *J. Biol. Chem.*, 278(8):5912–5919.
- Hobe, S., Förster, R., Klingler, J., and 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(32):10224–10228.
- Hobe, S., Niemeier, H., Bender, A., and Paulsen, H. (2000). Carotenoid binding sites in lhciib. relative affinities towards major xanthophylls of higher plants. *Eur. J. Biochem.*, 267(2):616–624.
- Hobe, S., Prytulla, S., Kühlbrandt, W., and Paulsen, H. (1994). Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll a/b complex. *EMBO J.*, 13(15):3423–3429.
- Horn, R. (2004a). Early steps in the assembly of light-harvesting chlorophyll a/b complex: time resolved fluorescence measurements. *J. Biol. Chem.*, 279(43):44400–44406.
- Horn, R. (2004b). *Zeitaufgelöste Messung der Faltung und Pigmentbindung des Lichtsammelproteins LHCIIB anhand verschiedener spektroskopischer Monitore: Dissertation Zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften*. PhD thesis, Johannes Gutenberg Universität, Mainz and Germany.
- Horn, R., Grundmann, G., and Paulsen, H. (2007). Consecutive binding of chlorophylls a and b during the assembly in vitro of light-harvesting chlorophyll-a/b protein (lhciib). *J. Mol. Biol.*, 366(3):1045–1054.
- Horn, R. and Paulsen, H. (2002). Folding in vitro of light-harvesting chlorophyll a/b protein is coupled with pigment binding. *J. Mol. Biol.*, 318(2):547–556.
- Hu, K.-N., Yau, W.-M., and Tycko, R. (2010). Detection of a transient intermediate in a rapid protein folding process by solid-state nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(1):24–25.
- Hwang, J. (2000). A short fe-fe distance in peroxodiferric ferritin: Control of fe substrate versus cofactor decay? *Science*, 287(5450):122–125.

- Ikeuchi, M., Uebayashi, N., Sato, F., and Endo, T. (2014). Physiological functions of psbs-dependent and -independent npq under naturally fluctuating light conditions. *Plant Cell Physiol.*
- Ilioiaia, C., Johnson, M. P., Liao, P.-N., Pascal, A. A., van Grondelle, R., Walla, P. J., Ruban, A. V., and Robert, B. (2011). Photoprotection in plants involves a change in lutein 1 binding domain in the major light-harvesting complex of photosystem ii. *J. Biol. Chem.*, 286(31):27247–27254.
- Jansson, S. (1994). The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1184(1):1–19.
- Jarvis, P. (2008). Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol.*, 179(2):257–285.
- Jeschke, G. (1998). Einführung in die esr-spektroskopie: Ein vorlesungs-skript.
- Jeschke, G. (2012). Deer distance measurements on proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 63(1):419–446.
- Jeschke, G., Chechik, V., Ionita, P., Godt, A., Zimmermann, H., Banham, J., Timmel, C. R., Hilger, D., and Jung, H. (2006). Deeranalysis2006—a comprehensive software package for analyzing pulsed eldor data. *Appl. Magn. Reson.*, 30(3-4):473–498.
- Jeschke, G., Koch, A., Jonas, U., and Godt, A. (2002). Direct conversion of epr dipolar time evolution data to distance distributions. *J. Magn. Reson.*, 155(1):72–82.
- Jeschke, G., Panek, G., Godt, A., Bender, A., and Paulsen, H. (2004). Data analysis procedures for pulse eldor measurements of broad distance distributions. *Appl. Magn. Reson.*, 26(1-2):223–244.
- Jeschke, G. and Polyhach, Y. (2007). Distance measurements on spin-labelled biomacromolecules by pulsed electron paramagnetic resonance. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9(16):1895.
- Kell, A., Feng, X., Lin, C., Yang, Y., Li, J., Reus, M., Holzwarth, A. R., and Jankowiak, R. (2014). Charge-transfer character of the low-energy chl a qy absorption band in aggregated light harvesting complexes ii. *J. Phys. Chem. B.*
- Klare, J. P. (2013). Site-directed spin labeling epr spectroscopy in protein research. *Biol. Chem.*, 394(10):1281–1300.

- Kouřil, R., Dekker, J. P., and Boekema, E. J. (2012). Supramolecular organization of photosystem ii in green plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1817(1):2–12.
- Krishnamani, V. and Lanyi, J. K. (2011). Structural changes in bacteriorhodopsin during in vitro refolding from a partially denatured state. *Biophys. J.*, 100(6):1559–1567.
- Kühlbrandt, W., Wang, D. N., and Fujiyoshi, Y. (1994). Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, 367(6464):614–621.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685.
- Le Duff, C. S., Whittaker, S. B.-M., Radford, S. E., and Moore, G. R. (2006). Characterisation of the conformational properties of urea-unfolded im7: implications for the early stages of protein folding. *J. Mol. Biol.*, 364(4):824–835.
- Li, Y., Liu, C., Feng, X., Xu, Y., and Liu, B.-F. (2014). Ultrafast microfluidic mixer for tracking the early folding kinetics of human telomere g-quadruplex. *Anal. Chem.*, page 140422144652004.
- Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., and Chang, W. (2004). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, 428(6980):287–292.
- Lottspeich, F., editor (2012). *Bioanalytik*. Springer Spektrum, Berlin, 3 edition.
- Lyukmanova, E., Shenkarev, Z., Khabibullina, N., Kopeina, G., Shulepko, M., Paramonov, A., Mineev, K., Tikhonov, R., Shingarova, L., Petrovskaya, L., Dolgikh, D., Arseniev, A., and Kirpichnikov, M. (2012). Lipid–protein nanodiscs for cell-free production of integral membrane proteins in a soluble and folded state: Comparison with detergent micelles, bicelles and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1818(3):349–358.
- Madireddi, S. K., Nama, S., Devadasu, E. R., and Subramanyam, R. (2014). Photosynthetic membrane organization and role of state transition in cyt, cpII, stt7 and npq mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*
- Manzerova, J., Krymov, V., and Gerfen, G. J. (2011). Investigating the intermediates in the reaction of ribonucleoside triphosphate reductase from *Lactobacillus leichmannii*: An application of hf epr-rfq technology. *J. Magn. Reson.*, 213(1):32–45.

- Martinson, T. A. and Plumley, F. G. (1995). One-step extraction and concentration of pigments and acyl lipids by sec-butanol from in vitro and in vivo samples. *Anal. Biochem.*, 228(1):123–130.
- Miloslavina, Y., Lambrev, P. H., Jávorf, T., Várkonyi, Z., Karlický, V., Wall, J. S., Hind, G., and Garab, G. (2012). Anisotropic circular dichroism signatures of oriented thylakoid membranes and lamellar aggregates of lhci. *Photosynth. Res.*, 111(1-2):29–39.
- Minagawa, J. (2011). State transitions—the molecular remodeling of photosynthetic supercomplexes that controls energy flow in the chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta*, 1807(8):897–905.
- Moore, R. (1995). *Botany*. Wm. C. Brown, Dubuque and IA.
- Müller, M. G., Lambrev, P., Reus, M., Wientjes, E., Croce, R., and Holzwarth, A. R. (2010). Singlet energy dissipation in the photosystem ii light-harvesting complex does not involve energy transfer to carotenoids. *Chem. Eur. J. of Chem. Phys.*, 11(6):1289–1296.
- Nath, K., Jajoo, A., Poudyal, R. S., Timilsina, R., Park, Y. S., Aro, E.-M., Nam, H. G., and Lee, C.-H. (2013). Towards a critical understanding of the photosystem ii repair mechanism and its regulation during stress conditions. *FEBS Lett.*, 587(21):3372–3381.
- Neilson, J. A. D. and Durnford, D. G. (2010). Structural and functional diversification of the light-harvesting complexes in photosynthetic eukaryotes. *Photosynth. Res.*, 106(1-2):57–71.
- Nettels, D., Hoffmann, A., and Schuler, B. (2008). Unfolded protein and peptide dynamics investigated with single-molecule fret and correlation spectroscopy from picoseconds to seconds. *J. Phys. Chem. B.*, 112(19):6137–6146.
- Nussberger, S., Dörr, K., Wang, D. N., and Kühlbrandt, W. (1993). Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J. Mol. Biol.*, 234(2):347–356.
- Otzen, D. (2011). Protein-surfactant interactions: a tale of many states. *Biochim. Biophys. Acta*, 1814(5):562–591.
- Pan, Y., Brown, L., and Konermann, L. (2011). Kinetic folding mechanism of an integral membrane protein examined by pulsed oxidative labeling and mass spectrometry. *J. Mol. Biol.*, 410(1):146–158.
- Paulsen, H., Finkenzeller, B., and Kühlein, N. (1993). Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein. *Eur. J. Biochem.*, 215(3):809–816.

- Paulsen, H. and Hobe, S. (1992). Pigment-binding properties of mutant light-harvesting chlorophyll-a/b-binding protein. *Eur. J. Biochem.*, 205(1):71–76.
- Paulsen, H., Rümmler, U., and Rüdiger, W. (1990). Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta*, 181(2):204–211.
- Pesaresi, P., Hertle, A., Pribil, M., Schneider, A., Kleine, T., and Leister, D. (2010). Optimizing photosynthesis under fluctuating light: the role of the *Arabidopsis* stn7 kinase. *Plant Signal. Behav.*, 5(1):21–25.
- Peter, G. F. and Thornber, J. P. (1991). Biochemical composition and organization of higher plant photosystem ii light-harvesting pigment-proteins. *J. Biol. Chem.*, 266(25):16745–16754.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25(13):1605–1612.
- Phillip, D., Hobe, S., Paulsen, H., Molnar, P., Hashimoto, H., and Young, A. J. (2002). The binding of xanthophylls to the bulk light-harvesting complex of photosystem ii of higher plants. a specific requirement for carotenoids with a 3-hydroxy-beta-end group. *J. Biol. Chem.*, 277(28):25160–25169.
- Pievo, R., Angerstein, B., Fielding, A. J., Koch, C., Feussner, I., and Bennati, M. (2013). A rapid freeze-quench setup for multi-frequency EPR spectroscopy of enzymatic reactions. *Chem. Phys.*, 14(18):4094–4101.
- Polyhach, Y., Bordignon, E., and Jeschke, G. (2011). Rotamer libraries of spin labelled cysteines for protein studies. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13(6):2356–2366.
- Popot, J. L. and Engelman, D. M. (1990). Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry*, 29(17):4031–4037.
- Popot, J. L., Gerchman, S. E., and Engelman, D. M. (1987). Refolding of bacteriorhodopsin in lipid bilayers. a thermodynamically controlled two-stage process. *J. Mol. Biol.*, 198(4):655–676.
- Porra, R. and Thomson, W. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Elsevier (Elsevier)*, 1989:384–394.

- Potapov, A. and Goldfarb, D. (2010). A calibration reaction for rapid freeze-quench w-band epr. *Appl. Magn. Reson.*, 37(1-4):845–850.
- Qu, K., Vaughn, J. L., Sienkiewicz, A., Scholes, C. P., and Fetrow, J. S. (1997). Kinetics and motional dynamics of spin-labeled yeast iso-1-cytochrome c: 1. stopped-flow electron paramagnetic resonance as a probe for protein folding/unfolding of the c-terminal helix spin-labeled at cysteine 102. *Biochemistry*, 36(10):2884–2897.
- Ruban, A., Calkoen, F., Kwa, S., van Grondelle, R., Horton, P., and Dekker, J. (1997). Characterisation of lhci in the aggregated state by linear and circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1321(1):61–70.
- Ruban, A. V., Berera, R., Ilioaia, C., van Stokkum, I. H. M., Kennis, J. T. M., Pascal, A. A., van Amerongen, H., Robert, B., Horton, P., and van Grondelle, R. (2007). Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature*, 450(7169):575–578.
- Salvadori, E., Di Valentin, M., Kay, C. W. M., Pedone, A., Barone, V., and Carbonera, D. (2012). The electronic structure of the lutein triplet state in plant light-harvesting complex ii. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14(35):12238–12251.
- Schaller, S., Latowski, D., Jemioła-Rzemińska, M., Dawood, A., Wilhelm, C., Strzalka, K., and Goss, R. (2011). Regulation of lhci aggregation by different thylakoid membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1807(3):326–335.
- Seddon, A. M., Curnow, P., and Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta*, 1666(1-2):105–117.
- Shi, L.-X. and Theg, S. M. (2013). The chloroplast protein import system: from algae to trees. *Biochim. Biophys. Acta*, 1833(2):314–331.
- Standfuss, J., van Terwisscha Scheltinga, A. C., Lamborghini, M., and Kühlbrandt, W. (2005). Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 a resolution. *EMBO J.*, 24(5):919–928.
- Stengel, K. F., Holdermann, I., Cain, P., Robinson, C., Wild, K., and Sinning, I. (2008). Structural basis for specific substrate recognition by the chloroplast signal recognition particle protein cpsrp43. *Science*, 321(5886):253–256.
- Sunku, K., Groot, H. J. M. d., and Pandit, A. (2013). Insights into the photoprotective switch of the major light-harvesting complex ii (lhci): a preserved core of arginine-glutamate interlocked helices complemented by adjustable loops. *J. Biol. Chem.*, 288(27):19796–19804.

- Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Lee, J.-S., Kim, H. C., Lee, W. C., and Shin, K.-H. (2014). Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 104:51–71.
- Tamm, L. K. and Liang, B. (2006). Nmr of membrane proteins in solution. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 48(4):201–210.
- Vainstein, A., Ferreira, P., Peterson, C. C., Verbeke, J. A., and Thornber, J. P. (1989). Expression of the major light-harvesting chlorophyll a/b-protein and its import into thylakoids of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *Plant Physiol.*, 89(2):602–609.
- Volkov, A. (2008). *EPR Spectroscopic Investigation of Membrane Protein Structure and Folding on Light Harvesting Complex LHCIIb: Dissertation zur Erlangung des Grades “Doktor der Naturwissenschaften” in Promotionsfach Chemie*. PhD thesis, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Volkov, A., Dockter, C., Bund, T., Paulsen, H., and Jeschke, G. (2009). Pulsed epr determination of water accessibility to spin-labeled amino acid residues in lhciib. *Biophys. J.*, 96(3):1124–1141.
- Werwie, M., Xu, X., Haase, M., Basché, T., and Paulsen, H. (2012). Bio serves nano: Biological light-harvesting complex as energy donor for semiconductor quantum dots. *Langmuir*, 28(13):5810–5818.
- Wientjes, E., Drop, B., Kouřil, R., Boekema, E. J., and Croce, R. (2013). During state 1 to state 2 transition in arabidopsis thaliana, the photosystem ii supercomplex gets phosphorylated but does not disassemble. *J. Biol. Chem.*, 288(46):32821–32826.
- Xie, X., Wang, Z., Zhou, X., Wang, X., and Chen, X. (2011). Study on the interaction of phthalate esters to human serum albumin by steady-state and time-resolved fluorescence and circular dichroism spectroscopy. *J. Hazard. Mater.*, 192(3):1291–1298.
- Yamamoto, Y., Kai, S., Ohnishi, A., Tsumura, N., Ishikawa, T., Hori, H., Morita, N., and Ishikawa, Y. (2014). Quality control of psii: Behavior of psii in the highly crowded grana thylakoids under excessive light. *Plant Cell Physiol.*
- Yazdanparast, R. and Khodaghali, F. (2006). Kinetic aspects of alkaline phosphatase refolding in the presence of alpha-cyclodextrin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 446(1):11–19.
- Ye, C., Wang, Z., Lu, W., and Wei, Y. (2014). Unfolding study of a trimeric membrane protein acrb. *Protein Sci.*

- Zhang, L., Melø, T. B., Li, H., Naqvi, K. R., and Yang, C. (2014). The inter-monomer interface of the major light-harvesting chlorophyll a/b complexes of photosystem ii (lhci) influences the chlorophyll triplet distribution. *J. Plant Physiol.*, 171(5):42–48.
- Zhang, L., Zhang, Q., and Wang, C. (2013). Refolding of detergent-denatured lysozyme using β -cyclodextrin-assisted ion exchange chromatography. *Biomed. Chromatogr.*, 27(3):365–370.
- Zubik, M., Luchowski, R., Grudzinski, W., Gospodarek, M., Gryczynski, I., Gryczynski, Z., Dobrucki, J. W., and Gruszecki, W. I. (2011). Light-induced isomerization of the lhci-bound xanthophyll neoxanthin: Possible implications for photoprotection in plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1807(9):1237–1243.

4. Anhang

4.1. Abkürzungen

Abkürzung

β-ME

bp

BSA

CD

Chl

da

dNTP

DEER

DGDG

DM

DMF

DMSO

dNTP

DTT

EDTA

EPR

ESEEM

EtOH

his₆-tag

IB

IPTG

KCl

KDS

LB

LDS

LHCII

Bedeutung

β-Mercaptoethanol

Basenpaar

Bovine serum albumin

Circulardichroismus

Chlorophyll

Dalton

Didesoxynucleotidtriphosphat

Double electron electron resonance

Digalactosyldiacylglycerol

n-Dodecyl-β-D-Maltosid

Dimethylformamid

Dimethylsulfoxid

Desoxynucleotidtriphosphat

Dithiothreitol

Ethylendiamintetraacetat

Electronenparamagnetische-Resonanz

Electron spin echo envelope modulation

Ethanol

Hexahistidyl-tag

Inclusion-Bodies

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

Kaliumchlorid

kaliumdodecylsulfat

Luria Bertani

Lithiumdodecylsulfat

Light harvesting complex II

lut	Lutein
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
MMM	Multiscale modeling of macromolecular systems
N ₂	Nitrogen
NaOH	Natriumhydroxid
N _x	Neoxanthin
ng	Nanogramm
NiCl ₂	Nickelchlorid
Ni	Nickel
NPQ	Non photochemical quenching
OD	optische Dichte
OG	n-Octyl-β-D-glucopyranosid
p.a.	pro analysi
PAA	Polyacrylamide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Phosphatidylglycerol
PROXYL-IAA	3-(2-Iodacetamido)-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy, freies Radikal
PsbS	Untereinheit S des Photosystem II
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
qT, qI, qE	Formen des Non photochemical quenching
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat

SH	Sulphydryl
TCA	Trichloressigsäure
TCyEP	Tris-(2-cyanoethyl)phosphin
TCcEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin
Tx	Triton X-100
Vx	Violaxanthin
w/v	Gewicht / Volumen
w/w	Gewicht / Gewicht
Zx	Zeaxanthin

4.2. Sequenzen

Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten LHCP-Klone basierten auf dem Klon C79S, der dem nativen Lhcb1-Gen entspricht, bei dem jedoch das Cystein 79 gegen ein Serin getauscht wurde. Varianten, die für Trimerisierungen eingesetzt wurden, trugen einen C-terminalen his₆-tag. Im Folgenden ist die vollständige Basensequenz des Klons C79Sh im Vektor pDS12-RBS II abgebildet.

Klon C79Sh

Lhcb1-Gen Pribnow-Box his₆-tag

```

1  AAATCATAAAAAAT TTATTTGCTTTGTG AGCGGATAACAATT ATAATAGATTCAAT TGTGAGCGGATAAC
71  AATTTCACACAGAA TTCATTAAAGAGGA GAAATTAAGCATGC GTAAATCTGCTACC ACCAAGAAAGTAGC
141 GAGCTCTGGAAGCC CATGGTACGGACCA GACCGTGTTAAGTA CTTAGGCCCCATTCT CCGGTGAGTCTCCA
211 TCCTACTTGACTGG AGAGTTCCCCGGTG ACTACGGTTGGGAC ACTGCCGGACTCTC TGCTGACCCAGAGA
281 CATTCTCCAAGAAC CGTGAGCTTGAAGT CATCCACTCCAGAT GGGCTATGTTGGGT GCTTTGGGATCTGT
351 CTTCCCAGAGCTTT TGTCTCGCAACGGT GTTAAATTCCGCCA AGCTGTGTGGTTCA AGGCAGGATCTCAA
421 ATCTTTAGTGAGGG TGGACTTGATTACT TGGGCAACCCAAGC TTGGTCCATGCTCA AAGCATCCTTGCCA
491 TATGGGGCACTCAG GTTATCTTGATGGG AGCTGTCCAAGGTT ACCGTATTGCCGGT GGGCCTCTCGGTGA
561 GGTGGTTGATCCAC TTTACCCAGGTGGA AGCTTTGATCCATT GGGCTTAGCTGATC ATCCAGAAGCATTG
631 GCAGAAATGAAGGT GAAGGAACCTCAAGA ACGGTAGATTAGCC ATGTTCTCAATGT TGGATTCTTCGTTG
701 AAGCTATTGTAACT GGAAAGGGTCCTTT GGAGAACCTTGCTG ATCATCTTGCAGAC CCAGTCAACAACAA
771 TGCATGGTCATATG CCACCAACTTTTGT CCCGGAAAACACCA TCACCATCACCATT AACCCGGGAAATAA
841 AACTCTTATATTT ATATGTTTTTGTGA TAGTAATCTTCTTC CCAATTCAATGTGA ATTATTATCATTAT
911 CATTATCATGTGGG TATGCATAGGTTCA CTAATACAAGATGA TGGATGCTTTTTTTT TTACCAAATTTTGG
981 GCTGCAGCCAAGCT TAATTAGCTGAGCT TGGACTCCTGTTGA TAGATCCAGTAATG ACCTCAGAACTCCA

```

1051	TCTGGATTTGTTCA	GAACGCTCGGTTGC	CGCCGGGCGTTTTT	TATTGGTGAGAATC	CAAGCTAGCTTGGC
1121	GAGATTTTCAGGAG	CTAAGGAAGCTAAA	ATGGAGAAAAAAAT	CACTGGATATACCA	CCGTTGATATATCC
1191	CAATGGCATCGTAA	AGAACATTTTGAGG	CATTTTCAGTCAGTT	GCTCAATGTACCTA	TAACCAGACCGTTC
1261	AGCTGGATATTACG	GCCTTTTTTAAAGAC	CGTAAAGAAAAATA	AGCACAAGTTTTAT	CCGGCCTTTATTCA
1331	CATTCTTGCCCGCC	TGATGAATGCTCAT	CCGGAATTTCTGTAT	GGCAATGAAAGACG	GTGAGCTTGTGATA
1401	TGGGATAGTGTTCA	CCCTTGTTACACCG	TTTCCATGAGCAA	ACTGAAACGTTTTT	ATCGCTCTGGAGTG
1471	AATACCACGACGAT	TTCCGGCAGTTTCT	ACACATATATTCGC	AAGATGTGGCGTGT	TACGGTGAAAAACCT
1541	GGCCTATTTCCCTA	AAGGGTTTATTGAG	AATATGTTTTTTCGT	CTCAGCCAATCCCT	GGGTGAGTTTCACC
1611	AGTTTTGATTTAAA	CGTGGCCAATATGG	ACAACTTCTTCGCC	CCCGTTTTTCACCAT	GGGCAAATATTATA
1681	CGCAAGGCGACAAG	GTGCTGATGCCGCT	GGCGATTTCAGGTTT	ATCATGCCGTCTGT	GATGGCTTCCATGT
1751	CGGCAGAATGCTTA	ATGAATTACAACAG	TACTGCGATGAGTG	GCAGGGCGGGGCGT	AATTTTTTTAAGGC
1821	AGTTATTGGTGCCC	TTAAACGCCTGGGG	TAATGACTCTCTGA	CTTGAGGCATCAAA	TAAAACGAAAGGCT
1891	CAGTCGAAAGACTG	GGCCTTTTCGTTTTA	TCTGTTGTTTGTCTG	GTGAACGCTCTCCT	GAGTAGGACAAATC
1961	CGCCGCTCTAGAGC	TGCCTCGCGCGTTT	CGGTGATGACGGTG	AAAACCTCTGACAC	ATGCAGCTCCCGGA
2031	GACGGTCACAGCTT	GTCTGTAAGCGGAT	GCCGGGAGCAGACA	AGCCCGTCAGGGCG	CGTCAGCGGGTGTT
2101	GGCGGGTGTGCGGG	CGCAGCCATGACCC	AGTCACGTAGCGAT	AGCGGAGTGTATAC	TGGCTTAACTATGC
2171	GGCATCAGAGCAGA	TTGTACTGAGAGTG	CACCATATGCGGTG	TGAAATACCGCACA	GATGCGTAAGGAGA
2241	AAATACCGCATCAG	GCGCTCTTCCGCTT	CCTCGCTCACTGAC	TCGCTGCGCTCGGT	CTGTGCGCTGCGGC
2311	GAGCGGTATCAGCT	CACTCAAAGGCGGT	AATACGGTTATCCA	CAGAATCAGGGGAT	AACGCAGGAAAGAA
2381	CATGTGAGCAAAAAG	GCCAGCAAAAGGCC	AGGAACCGTAAAAA	GGCCGCGTTGCTGG	CGTTTTTCCATAGG
2451	CTCCGCCCCCCTGA	CGAGCATCACAAAA	ATCGACGCTCAAGT	CAGAGGTGGCGAAA	CCCGACAGGACTAT
2521	AAAGATAACCAGGCG	TTTCCCCCTGGAAG	CTCCCTCGTGCGCT	CTCCTGTTCCGACC	CTGCCGCTTACCGG
2591	ATACCTGTCCGCCT	TTCTCCCTTCGGGA	AGCGTGGCGCTTTC	TCAATGCTCACGCT	GTAGGTATCTCAGT
2661	TCGGTGTATGTCTG	TCGCTCCAAGCTGG	GCTGTGTGCACGAA	CCCCCGTTTCAGCC	CGACCGCTGCGCCT
2731	TATCCGGTAACTAT	CGTCTTGAGTCCAA	CCCGGTAAGACACG	ACTTATCGCCACTG	GCAGCAGCCACTGG
2801	TAACAGGATTAGCA	GAGCGAGGTATGTA	GGCGGTGCTACAGA	GTTCTTGAAGTGGT	GGCCTAACTACGGC
2871	TACACTAGAAGGAC	AGTATTTGGTATCT	GCGCTCTGCTGAAG	CCAGTTACCTTCGG	AAAAAGAGTTGGTA
2941	GCTCTTGATCCGGC	AAACAAACCACCGC	TGGTAGCGGTGGTT	TTTTTGTGTTGCAAG	CAGCAGATTACGCG
3011	CAGAAAAAAAGGAT	CTCAAGAAGATCCT	TTGATCTTTTCTAC	GGGGTCTGACGCTC	AGTGGAACGAAAAC
3081	TCACGTAAAGGGAT	TTTGGTCATGAGAT	TATCAAAAAGGATC	TTCACCTAGATCCT	TTTAAATTAATAAT
3151	GAAGTTTTAAATCA	ATCTAAAGTATATA	TGAGTAAACTTGGT	CTGACAGTTACCAA	TGCTTAATCAGTGA
3221	GGCACCTATCTCAG	CGATCTGTCTATTT	CGTTCATCCATAGC	TGCCTGACTCCCCG	TCGTGTAGATAACT
3291	ACGATACGGGAGGG	CTTACCATCTGGCC	CCAGTGCTGCAATG	ATACCGCGAGACCC	ACGCTCACCGGCTC
3361	CAGATTTATCAGCA	ATAAACAGCCAGC	CGGAAGGGCCGAGC	GCAGAAGTGGTCCT	GCAACTTTATCCGC
3431	CTCCATCCAGTCTA	TTAATTGTTGCCGG	GAAGCTAGAGTAAG	TAGTTCGCCAGTTA	ATAGTTTGCGCAAC
3501	GTTGTTGCCATTGC	TACAGGCATCGTGG	TGTCACGCTCGTCTG	TTTGGTATGGCTTC	ATTCAGCTCCGGTT

3571 CCCAACGATCAAGG CGAGTTACATGATC CCCCATGTTGTGCA AAAAAGCGGTTAGC TCCTTCGGTCCTCC
3641 GATCGTTGTCAGAA GTAAGTTGGCCGCA GTGTTATCACTCAT GGTTATGGCAGCAC TGCATAATTCTCTT
3711 ACTGTCATGCCATC CGTAAGATGCTTTT CTGTGACTGGTGAG TACTCAACCAAGTC ATTCTGAGAATAGT
3781 GTATGCGGCGACCG AGTTGCTCTTGCCC GCGTCAATACGGG ATAATACCGCGCCA CATAGCAGAACTTT
3851 AAAAGTGCTCATCA TTGGAACGTTCT TCGGGCGAAAACT CTCAAGGATCTTAC CGCTGTTGAGATCC
3921 AGTTCGATGTAACC CACTCGTGCACCCA ACTGATCTTCAGCA TCTTTTACTTTTAC CAGCGTTTCTGGGT
3991 GAGCAAAAACAGGA AGGCAAAATGCCGC AAAAAAGGGAATAA GGGCGACACGAAA TGTGAATACTCAT
4061 ACTCTTCCTTTTTT AATATTATTGAAGC ATTTATCAGGGTTA TTGTCTCATGAGCG GATACATATTTGAA
4131 TGTATTTAGAAAAA TAAACAAATAGGGG TTCCGCGCACATTT CCCCAGAAAGTGCC ACCTGACGTCTAAG
4201 AAACCATTATTATC ATGACATTAACCTA TAAAAATAGGCGTA TCACGAGGCCCTT CGTCTTCACCTCGA
4271 G

5. Danksagung

6. Lebenslauf



Niklas Fehr

Adresse: Heinrich-Müller-Netscher Str. 21
65343 Eltville

Telefon: (0179) 4 55 89 78

E-Mail: niklasfehr@gmx.de

Geboren am: 04. März 1984

Ort: Wiesbaden-Dotzheim

Familienstand: Ledig

Nationalität: Deutsch

Schule & Studium

2000 – 2003	Abitur in Wiesbaden Martin-Niemöller Schule
2004 – 2010	Studium der Biologie Johannes Gutenberg-Universität Mainz
2010	Diplomarbeit zum Thema: „Untersuchung der Bindungseigenschaften zwischen „Light Harvesting Complex II“ und Halbleiter-Nanokristallen (Quantum Dots)“
2011 – 2014	Promotion zum Thema: „Struktur- und Faltungsuntersuchungen am majoren Lichtsammelkomplex II mittels Elektronen-Paramagnetischer-Resonanz“

Berufspraxis

2011 – 2014	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fachbereich Allgemeine Botanik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
seit 2012	Freier Mitarbeiter des Springer-Verlags im Bereich Fernstudium Biologie

Fremdsprachen

Sehr gute Englisch-Kenntnisse in Wort und Schrift.

EDV Kenntnisse

erweiterte Kenntnisse in:

MS Windows

MS Office-Paket

USCF Chimera

Adobe Photoshop

Adobe Dreamweaver

Adobe Illustrator

L^AT_EX

Fachspezifische Software

7. Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Mainz, den 25. September 2014

Niklas Fehr