

**Membran-inserterter  
pflanzlicher Lichtsammelkomplex LHCIi:  
strukturelle Untersuchungen**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Dennis Seiwert**

geb. am 03.02.1986 in Wiesbaden-Dotzheim

Mainz, 2017





# Inhaltsverzeichnis

<b>Erklärung</b> .....	<b>i</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>ii</b>
<b>Summary</b> .....	<b>iii</b>
<b>Kapitel I: Allgemeine Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1. Struktur und Zusammensetzung der Thylakoidmembran von Chloroplasten .....	1
1.1. Die Bedeutung der Granastruktur für Diffusionsprozesse .....	2
1.2. Die Thylakoidlipide .....	3
1.2.1. Das nicht-lamellare Phasenverhalten von MGDG .....	4
1.3. Der majore Lichtsammelkomplex (LHCII) .....	6
2. Die Bedeutung von physikochemischen Eigenschaften der Thylakoidlipide für die Struktur des LHCII .....	7
2.1. Mechanische Entfaltung des LHCII in Abhängigkeit der Lipidumgebung: Einzelmolekülkraftspektroskopie (SMFS).....	8
3. Nachweis von LHCII-Lipid-Interaktionen und Bestimmung des Einflusses von Thylakoidlipiden auf die Membranfluidität durch Diffusionsmessungen.....	10
3.1. Bestimmung der Mobilität in Membranen mithilfe von "Fluorescence Recovery After Photobleaching" (FRAP) .....	11
4. Untersuchungen des LHCII in „Supported Lipid Bilayers“ (SLBs) unter dem Einfluss der Thylakoidlipide.....	13
4.1. Mögliche Ausbildung von Grana ähnlichen Strukturen durch den LHCII .....	14
5. Zielsetzung der Arbeit .....	16
6. Quellenangaben .....	17
<b>Kapitel II: The non-bilayer lipid MGDG stabilizes the major light-harvesting complex (LHCII) against unfolding</b> .....	<b>21</b>
Abstract .....	21
Introduction.....	22
Results .....	24
Mechanical unfolding of LHCII .....	24
Impact of LHCII trimerization.....	26
Effect of lipid matrix .....	28
Discussion .....	29
Unfolding monomers and trimers reveals a connection between structure and stability of LHCII, despite the structural intricacy of the pigment-protein complex .....	29
Lateral pressure by MGDG greatly stabilizes trimeric LHCII due to its hourglass shape.....	30
Methods.....	32
Preparation of recombinant LHCII.....	32

Reconstitution of LHCII into liposomes .....	33
SMFS experiments.....	33
SMFS data analysis .....	34
Structure representation.....	35
Data availability .....	35
References .....	35
Author contributions .....	38
Competing financial interests .....	38
Supplementary information .....	39
<b>Kapitel III: Grana-like membrane stacking in supported lipid bilayers is driven by non-bilayer lipid MGDG and major light-harvesting complex (LHCII): the role of membrane curvature and electrostatic protein interactions .....</b>	<b>41</b>
Abstract .....	41
Introduction.....	42
Materials and Methods .....	43
Isolation of native LHCII complexes .....	43
Preparation of small unilamellar vesicles (SUVs).....	43
Reconstitution of LHCII into SUVs .....	44
Surface preparation and functionalization .....	44
Formation of supported lipid bilayers (SLBs) .....	44
Confocal laser scanning microscopy and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) ...	45
Atomic force microscopy (AFM) .....	45
Results .....	45
Spreading of LHCII-liposomes on charged glass coverslips .....	45
Bilayer stacking on mica: impact of POPG/DGDG/MGDG composition and of LHCII .....	48
Influence of divalent and monovalent cations on <i>in vitro</i> membrane stacking .....	52
Discussion .....	53
The quality of SLB-formation is crucial for mimicking grana-like membrane structures <i>in vitro</i> ....	53
LHCII drives membrane stacking at low salt conditions .....	54
MGDG stabilizes the highly curved margins of a membrane stack.....	56
Author contributions .....	57
Competing financial interests .....	57
Funding sources.....	57
Acknowledgement.....	57
Abbreviations.....	57
References .....	58
Supplementary information .....	62

<b>Kapitel IV: Diffusionsmessungen des LHCII und Bestimmung der Membranfluidität in Abhängigkeit der Thylakoidlipide</b> .....	<b>63</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>63</b>
1.1. Nachweis einer Assoziation von MGDG mit LHCII-Trimeren durch Diffusionsmessungen 63	
1.1.1. Physikalische Einflussgrößen bei der Diffusion von Membranproteinen.....	64
1.2. Membransysteme zur Messung der Mobilität von LHCII <i>in vitro</i> .....	65
1.2.1. „Supported Lipid Bilayers“ (SLBs) hergestellt aus (Proteo-) Liposomen .....	66
1.2.1.1. Verwendete Oberflächen zur Spreitung der Lipidvesikel .....	67
1.2.2. „Tethered Bilayer Lipid Membranes“ (tBLMs).....	68
1.2.3. „Giant Unilamellar Vesicles“ (GUVs) .....	69
1.2.3.1. Integration von Membranproteinen in GUVs .....	70
1.3. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten 71	
1.4. Zielsetzung dieses Kapitels .....	72
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>73</b>
2.1. Präparation und Funktionalisierung von Oberflächen .....	73
2.1.1. Beschichtung von Glasoberflächen mit Polyethylenglykol-Palmitylsäure (PEG-PA).73	
2.2. Herstellung von Liposomen und Proteoliposomen .....	74
2.3. Bildung von SLBs .....	74
2.4. Elektroformation von GUVs .....	75
2.4.1. Fusion von GUVs mit Proteoliposomen.....	76
2.4.2. Elektroformation von Proteo-GUVs aus Proteoliposomen .....	76
2.4.3. Präparation der (Proteo-)GUVs für die Fluoreszenzmikroskopie .....	77
2.5. Überprüfung von Lipidstöchiometrien mittels Dünnschichtchromatographie .....	77
2.5.1. Dünnschichtchromatographie von GUV-Lösungen .....	78
2.5.2. Densitometrische Auswertung.....	78
2.6. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie.....	78
2.6.1. FRAP-Messungen .....	79
2.6.2. FCS-Messungen.....	80
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>82</b>
3.1. Vorversuche: FRAP-Messungen des LHCII in SLBs auf APTES-beschichteten Glasoberflächen .....	82
3.1.1. Abhängigkeit der mobilen Fraktion und „Half-time Recovery“ von dem Verhältnis aus POPG und DGDG .....	82
3.1.2. Diffusionsmessungen bei konstantem Anteil an POPG in Abhängigkeit von DGDG und MGDG .....	83
3.1.3. Diffusionsmessungen als Funktion der Phenylethanolkonzentration in POPG- Membranen zur Validierung der FRAP-Methodik.....	85

3.2.	FRAP-Messungen in Glykolipid-SLBs nach Spreitung mit Kalzium auf Micaoberflächen	86
3.2.1.	Diffusionsmessungen des LHCII in Membranen bestehend aus 100% POPG, 100% DGDG und DGDG/MGDG im Verhältnis 2:1	87
3.2.1.1.	Validierung des MGDG-Anteils in DGDG (Proteo-) Liposomen	87
3.2.1.2.	Gemittelte „Half-time Recoveries“ und mobile Fraktionen	88
3.2.1.3.	Verteilung der $t_{1/2}$ -Werte nach Lipidzusammensetzung	90
3.2.2.	Diffusionsmessungen mit TopFluor-GC zur Bestimmung der Viskosität in Membranen bestehend aus 100% POPG, 100% DGDG und DGDG/MGDG im Verhältnis 2:191	
3.2.2.1.	Gemittelte „Half-time Recoveries“ und mobile Fraktionen	91
3.2.2.2.	Verteilung der $t_{1/2}$ -Werte nach Lipidzusammensetzung	92
3.3.	Versuche zur kalziumfreien Spreitung von (Proteo-) Glykolipidliposomen auf Mica- und Polymeroberflächen	93
3.3.1.	Bildung von SLBs mit veränderter Temperatur, Inkubationszeit, Vesikelgröße und Ionenstärke	94
3.3.2.	Versuche zur Formierung von tBLMs	94
3.3.2.1.	Spreitung von Proteoliposomen aus Lipiden mit Polymer-„Spacer“	94
3.3.2.2.	Spreitung von Liposomen auf Polymerkissen mit Membrananker	95
3.4.	Versuche zur Rekonstitution des LHCII in GUVs	96
3.4.1.	Elektroformation von GUVs ausgehend von DGDG und MGDG	97
3.4.1.1.	Validierung des MGDG-Anteils in GUVs	97
3.4.1.2.	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der GUVs	98
3.4.2.	Fusion von GUVs mit Proteoliposomen	99
3.4.3.	Direkte Herstellung von LHCII-GUVs aus Glykolipid-Proteoliposomen	99
3.5.	FCS in Glykolipid-SLBs nach Spreitung mit Kalzium auf Micaoberflächen	100
3.5.1.	Diffusionsmessungen mit TopFluor-GC in Membranen bestehend aus 100% DGDG und DGDG/MGDG im Verhältnis 2:1 zur Validierung der FCS-Methodik	101
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>104</b>
4.1.	Ein lückenloses Membransystem ist essentiell für valide FRAP-Messungen	104
4.1.1.	Die speziellen Eigenschaften des LHCII und der Glykolipide erschweren eine vollständige Oberflächenbenetzung der SLBs	105
4.1.2.	GUVs sind bei Etablierung eines geeigneten Rekonstitutionsprotokolls für den LHCII ein valides Glykolipid-Modellmembransystem	106
4.2.	In Membranstapeln kann die Mobilität von LHCII-Komplexen sowohl erhöht als auch verringert sein	107
4.3.	Zu veränderten Membraneigenschaften in Abhängigkeit der Thylakoidlipide kann keine eindeutige Aussage getroffen werden	108
4.3.1.	POPG gegenüber DGDG	109
4.3.2.	DGDG gegenüber DGDG/MGDG im Verhältnis 2:1	109
4.3.3.	FRAP gegenüber FCS	110

4.4.	Die Genauigkeit von FRAP und FCS reicht vermutlich nicht für den Nachweis einer Assoziation von MGDG und trimerem LHCII aus.....	112
4.5.	Ausblick: Nachweis einer möglichen Assoziation von MGDG mit trimerem LHCII .....	115
4.5.1.	Alternative oder verbesserte Diffusionsmessungen des LHCII sind nicht vielversprechend .....	115
4.5.1.1.	Eine veränderte Mobilität von MGDG könnte signifikant bestimmt werden .....	116
4.5.2.	Andere Methoden zur Bestimmung von Lipid-Protein Interaktionen .....	116
<b>5.</b>	<b>Quellenangaben .....</b>	<b>118</b>
	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>124</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>127</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>129</b>
	Fluoreszenzemissionsspektrum von TopFluor-GC und DiR in Liposomen.....	129
	Sequenzen der rekombinanten LHCII-Varianten aus Kapitel II .....	130



## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit verwendet habe. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten.

Die in dieser Dissertation enthaltenen Daten zur atomaren Kraftmikroskopie (AFM) wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Universität Göttingen (Hannes Witt, Prof. Dr. Andreas Janshoff; Institut für Physikalische Chemie) gemeinsam erarbeitet. Die Daten aus dieser Zusammenarbeit wurden für eine Veröffentlichung verwendet (Kapitel II); weitere Daten dieses Projektes sind Teil eines zweiten Publikationsmanuskriptes (AFM-Bildaufnahmen in Kapitel III). Bei den Manuskripten sind die individuellen Beiträge der beteiligten Autoren in Form der „Author contributions“ aufgelistet sind. Kapitel II ist in abgewandelter Form auch Teil der Dissertation von Hannes Witt. Die Abbildungen „Figure 2, Supplementary Figure 1 und Supplementary Figure 2“ in Kapitel II wurden von Hannes Witt erstellt, alle übrigen Abbildungen dieser Arbeit wurden eigenhändig erstellt. Die Datenanalyse in Kapitel II erfolgte mithilfe von Skripten in „MatLab“, die von Hannes Witt geschrieben wurden.

Alle präparativen, biochemischen und molekularbiologischen Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation wurden eigenständig durchgeführt.

Die Daten zur konfokalen Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel III und IV) wurden eigenständig am Institut für Molekulare Biologie Mainz (Core Facility Microscopy) erhoben und ausgewertet. Im Falle der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (Kapitel IV) wurden die Messungen mit Unterstützung von Dr. Mária Hanulová aufgezeichnet und ausgewertet.

Mainz, den \_\_\_\_\_ (Dennis Seiwert)

## Zusammenfassung

Biologische Membranen bestehen in der Regel hauptsächlich aus Phospholipiden. Die pflanzliche Thylakoidmembran ist dagegen zu ~80% aus Lipiden mit ungeladenen Zuckerkopfgruppen (Galaktolipide) zusammengesetzt; den übrigen Teil machen negativ geladene Lipide aus. Der Großteil der Galaktolipide besteht aus MGDG, das aufgrund seiner kegelförmigen Gestalt selbst keine lamellaren Membranstrukturen bilden, jedoch durch Interaktionen mit LHCII-Proteinen in die Thylakoidmembran integriert werden kann. Um die Bedeutung dieser Wechselwirkung für die Struktur des LHCII zu verstehen, wurde in dieser Arbeit zunächst eine Methode entwickelt, das Protein in oberflächengestützte Membranen (SLBs) zu integrieren. Anschließend konnten mithilfe der atomaren Kraftmikroskopie (AFM) einzelne Komplexe aus den SLBs herausgezogen und damit die LHCII-Polypeptidstruktur schrittweise mechanisch denaturiert werden. Der LHCII wies dabei kein klar strukturiertes Entfaltungsmuster auf, da jede der zahlreichen Pigmentbindestellen vermutlich einen eigenen Beitrag zur Gesamtstabilität der Proteinstruktur leistet. Die Entfaltung in Abhängigkeit verschiedener Thylakoidlipidumgebungen zeigte keinen signifikanten Einfluss von negativer Ladung (Phospholipid PG) oder möglichen Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Galaktolipid DGDG auf die Stabilität der LHCII-Struktur. Dagegen erhöhte die Anwesenheit von MGDG deutlich die mechanische Stabilität des LHCII sowohl in Transmembrandomänen wie auch in einigen Schleifendomenen. Somit erfolgt diese Stabilisierung eher durch die Strukturkomplementarität zwischen kegelförmigem MGDG und uhrglasförmigem LHCII als durch ortsspezifische Wechselwirkungen.

Fluoreszenzbasierte Diffusionsmessungen (FRAP und FCS) in den SLBs sollten ermöglichen, die Art der LHCII-MGDG-Wechselwirkung zu verstehen. Eine „Raft“-Bildung mit MGDG-Lipiden (direkte Lipid-Protein-Assoziation) sollte zu einer Verlangsamung der LHCII-Diffusion führen. Die Komplexe konnten in SLBs zwar frei diffundieren, jedoch sind keine quantitativen Beurteilungen zur Mobilität des Proteins gelungen, da die Formierung von SLBs aus Galaktolipidvesikeln zu großen Lücken im Membransystem führte und damit die Streuung von Messwerten erhöhte. Eine zusätzliche Varianz der Messungen kam aufgrund von Ausstülpungen der flachen Membranoberfläche zu gestapelten Bereichen, jedoch nur in Anwesenheit von LHCII-Proteinen, zustande. Dieses Phänomen konnte genutzt werden, um mittels topographischer (AFM) und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen Erkenntnisse zur Bedeutung der physikochemischen Eigenschaften von Thylakoidlipiden für die Granastruktur in Chloroplasten zu gewinnen. Bei der Membranadhäsion spielten offenbar nur Wechselwirkungen zwischen LHCII-Trimeren in gegenüberliegenden Membranschichten eine entscheidende Rolle (Velcro-Modell), die durch Salzbrücken zusätzlich verstärkt wurden. Zusätzlich begünstigte MGDG das Ausstülpfen der Membran. Dies ist vermutlich damit zu erklären, dass die konvexe Geometrie von MGDG-Lipiden eine Krümmung der Lipiddoppelschicht erleichtert. Dank der Etablierung von AFM konnte mit dieser Arbeit der Weg für weiterführende Untersuchungen zur Faltung und Strukturstabilisierung des LHCII, z.B. in Abhängigkeit der Bindung bestimmter Pigmente, geebnet werden.

## Summary

Biological membranes are predominantly composed of phospholipids. However, the thylakoid membrane of plants contains ~80% uncharged lipids with sugar head groups (galactolipids); the remainder consists of negatively charged lipids. The major galactolipid is MGDG, which is not able to form a lamellar membrane structure due to its cone shape. However, MGDG can be incorporated into the thylakoid membrane thanks to interactions with LHCII proteins. In this work, a method was developed for reconstituting LHCII into lipid bilayers on solid surfaces (SLBs) in order to investigate the impact of LHCII-MGDG interactions on the structure of LHCII. In the next step, the LHCII polypeptide was unfolded stepwise by mechanical denaturation, as individual proteins were pulled out of the SLBs via atomic force microscopy (AFM). The LHCII protein showed no distinct unfolding pattern, presumably because each of its numerous pigment binding sites contributes to the overall stability of the protein structure. Unfolding from membranes containing different thylakoid lipids revealed no significant effect on the structural stability of LHCII of negative charge (phospholipid PG) or potential hydrogen bonds with galactolipid DGDG. By contrast, the presence of MGDG substantially enhanced the mechanical stability in transmembrane domains as well as several loop domains of LHCII. Hence, the stabilization is provided by the complementary structures of conical MGDG and hourglass-shaped LHCII rather than by site specific interactions.

Fluorescence-based diffusion measurements (FRAP and FCS) within the SLBs should allow for deciphering the nature of LHCII-MGDG interactions. Presumably, a raft-like assembly of MGDG molecules (direct association between protein and lipid) would slow down the diffusion of LHCII proteins. Even though the complexes exhibited free diffusion in SLBs, quantitative estimations regarding the mobility of LHCII could not be achieved since SLB formation starting out from galactolipid vesicles produced huge gaps within the membrane system; this in turn increased scattering of the measured data. An additional variance of the data was caused by stacked regions protruding from the flat membrane surface, which only appeared in the presence of LHCII proteins. The latter phenomenon could be used to gain insights into the impact of physicochemical properties of the thylakoid lipids on the grana structure in chloroplasts, while applying topographical (AFM) and fluorescence microscopy imaging. Apparently, membrane adhesion was mainly established by interactions between LHCII trimers of opposing membrane sheets (Velcro model) which were further enhanced by salt bridges. Moreover, MGDG facilitated the formation of membrane protrusions. This feature may be assigned to the convex geometry of MGDG lipids easing curvature stress of the lipid bilayer. As part of this work, establishing AFM has paved the way for further studies, e.g. in dependence of binding certain pigments, on the folding and structural stabilization of LHCII.



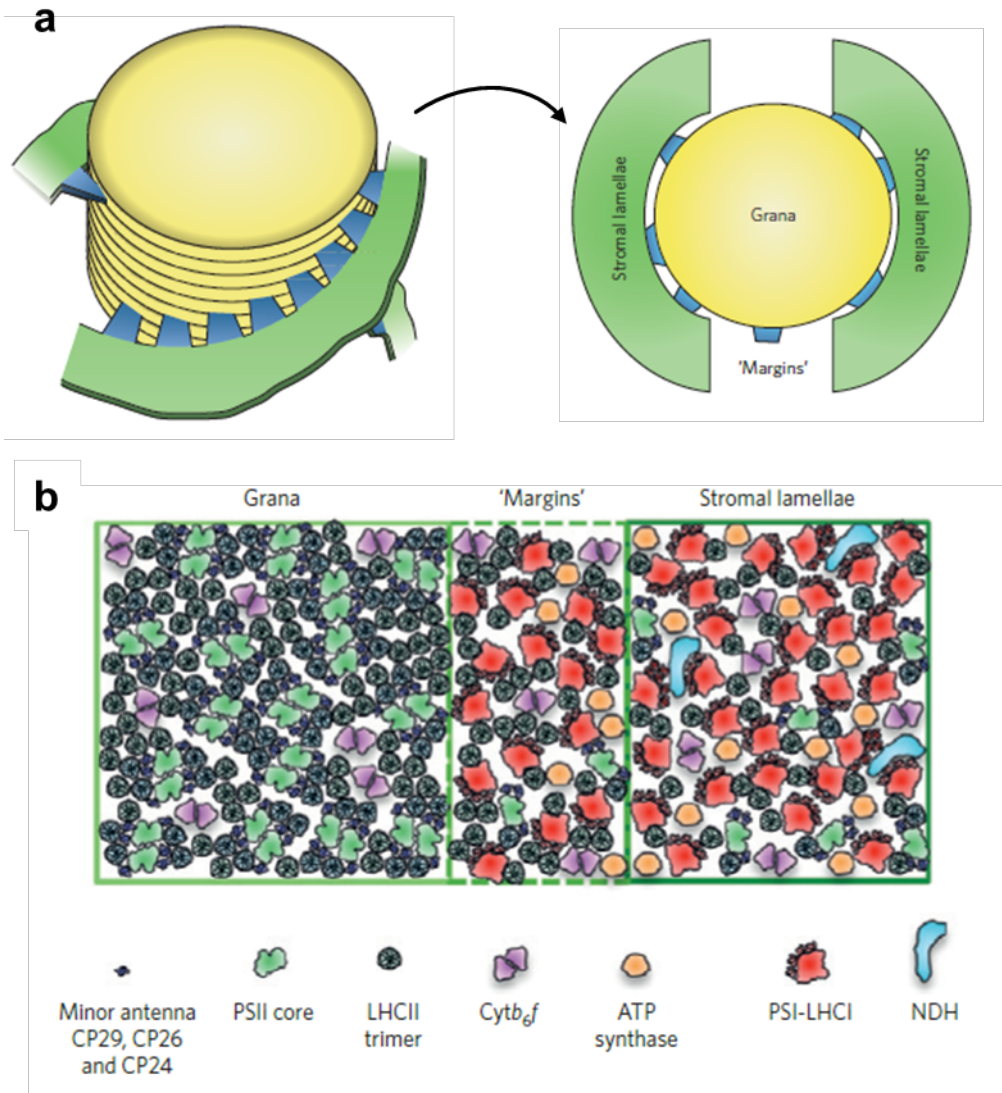
# Kapitel I: Allgemeine Einleitung

## 1. Struktur und Zusammensetzung der Thylakoidmembran von Chloroplasten

In allen Organismen der Erde, welche oxygene Fotosynthese betreiben, findet die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie in der Thylakoidmembran (TM) bzw. um die TM herum statt <sup>1</sup>. Zu diesen Organismen zählen sowohl die prokaryotischen Cyanobakterien als auch in der Evolution nachfolgende Eukaryoten wie Algen, Moose und höhere Pflanzen. Die endosymbiontische Entwicklung von Cyanobakterien zu den Chloroplasten der Pflanzen brachte drastische strukturelle Änderungen der TM mit sich: die den Thylakoiden aufsitzenden wasserlöslichen Antennenkomplexe, sog. Phycobilisomen, wurden durch pigmenttragende Membranproteine, die „Light-harvesting Complexes“ (Lhcs), ersetzt <sup>2</sup>. Während die riesigen Phycobilisomen eine enge Assoziation von einzelnen Membranen verhindern, erlauben die kleinen membranständigen Lhcs die Ausbildung einer komplexen, gefalteten Membranstruktur in den Chloroplasten <sup>2</sup>. Durch diese Stapelung der TM in Form sog. Granathylakoide wird wiederum die Dichte an Lhcs und folglich die Dichte an Antennenpigmenten erhöht; man kann Grana somit auch als hocheffiziente Superantennen (ähnlich der Phycobilisomen in Cyanobakterien) betrachten <sup>2</sup>.

Die Granastruktur lässt sich dank moderner kryo-elektronenmikroskopischer Aufnahmen am besten mit dem helikalen Modell beschreiben <sup>3</sup>. Demnach sind Grana als zylindrische Stapel von flachen Membranscheiben zu verstehen, die an ihrer Oberfläche – der stromalen Seite – eng zusammengepresst sind (**Abb. 1a**). Die Granathylakoide sind durch ungestapelte TM-Bereiche, sog. stromale Lamellen (Stromathylakoide), miteinander verbunden. Diese Membranen winden sich dabei helikal um die einzelnen Grana herum, wodurch jede Scheibe eines Stapels mit dem kontinuierlichen TM-System verbunden ist. Die Randbereiche der einzelnen Membranschichten zusammen mit den Verbindungsstücken zwischen Grana- und Stromathylakoiden werden „Margins“ genannt <sup>3</sup>.

Die Kompartimentierung der TM beinhaltet auch eine klare Aufteilung innerhalb der Proteinzusammensetzung (laterale Heterogenität): während Fotosystem I (PSI; assoziiert mit Lichtsammelkomplex I, LHCI) und die ATP Synthase ausschließlich in den Stromathylakoiden (und „Margins“) angesiedelt sind, ist Fotosystem II (PSII; assoziiert mit seinen minoren Lichtsammelantennen CP29, CP26 und CP24) überwiegend in den Granathylakoiden lokalisiert (**Abb. 1b**) <sup>3</sup>. Der majore Lichtsammelkomplex (LHCII) als prominentester Vertreter der Lhcs und der Cytochrom-*b<sub>6</sub>f*-Komplex (Cyt<sub>b<sub>6</sub>f</sub>) sind in allen Kompartimenten zu finden <sup>3</sup>, wobei der LHCII mehr als 70% der Proteine in Grana repräsentiert <sup>4</sup>. Neben einigen anderen Vorteilen, welche die laterale Heterogenität mit sich bringt, ist die hohe Dichte an Antennenpigmenten (s.o.) – vor allem gebunden an den LHCII – in Hinblick auf eine effektive Lichtsammlung unter Schwachlichtbedingungen besonders wichtig <sup>5</sup>. Aus diesem Grund weisen Grana mit Werten zwischen 70% und 80% sehr hohe Proteindichten auf <sup>4</sup>, wodurch für die Lichtreaktion der Fotosynthese wichtige Diffusionsprozesse allerdings erschwert werden.



**Abb. 1 Struktur und Proteinverteilung bei der Thylakoidmembran von Chloroplasten.** (a) Die gestapelten Granathylakoide sind in den Randbereichen („Margins“) mit nicht gestapelten Stromathylakoide (stromale Lamellen) verbunden. (b) Mit dieser Architektur geht eine asymmetrische Verteilung der Fotosyntheseproteine einher (laterale Heterogenität). In den dicht gepackten Granamembranen macht der LHCII den größten Anteil aus. Abbildung entnommen aus Ref. (3).

### 1.1. Die Bedeutung der Granastruktur für Diffusionsprozesse

Zur Aufrechterhaltung der Fotosyntheseleistung müssen Diffusionsprozesse in der TM sowohl über kurze Distanzen, z.B. Elektronentransport von PSII zum Cytb<sub>6</sub>f mittels Plastochinon (PQ) in Grana, als auch über größere Strecken ablaufen können. Letztere umfassen beispielsweise die Reparatur von Untereinheiten der Fotosysteme oder LHCII „State Transitions“, bei denen LHCII-Komplexe zwischen Grana- zu Stromathylakoide hin und her wandern, was eine Balancierung der Anregungsenergie zwischen PSII und PSI ermöglicht<sup>3</sup>. In fluoreszenzbasierten Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch die hohe Proteindichte in Grana (siehe 1.) nicht nur prinzipiell die Diffusion verlangsamt wird, sondern auch ~75% der enthaltenen Proteine komplett immobilisiert vorliegen<sup>6</sup>. Dennoch kann

die Mobilität von kleineren Molekülen wie PQ erhöht werden, indem die Membranproteine zu größeren Partikeln, z.B. in Form von LHCII-PSII Superkomplexen, assemblieren<sup>7</sup> oder es gar zur Ausbildung semikristalliner Anordnungen („Liquid Ordered Phases“) durch PSII kommt<sup>3</sup>. In dem Zusammenhang wird vermutet, dass erst die Ausbildung von „Liquid Ordered Phases“ die Diffusion von PQ aus Granathylakoiden in die „Margin“-Bereiche erlaubt<sup>3</sup>. Welche Rolle die einzelnen Thylakoidlipide für Diffusionsprozesse in der TM – vor allem in Hinblick auf die Beweglichkeit der Proteine – spielen, ist allerdings nicht bekannt.

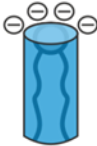
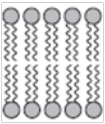
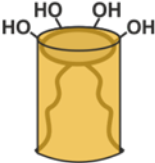
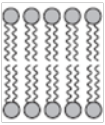
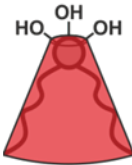
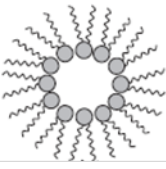
## 1.2. Die Thylakoidlipide

Während im Allgemeinen biologische Membranen hauptsächlich aus Phospholipiden bestehen, stellt die Thylakoidmembran (ebenso wie die innere Hüllmembran von Chloroplasten) eine Ausnahme dar: einen Großteil der TM machen Lipide mit Zuckerkopfgruppen (Galaktolipide) aus, deren Fettsäuren im Alkylkettenbereich noch dazu hochgradig ungesättigt sind. Dabei ist jedoch die Lipidzusammensetzung, im Gegensatz zur Struktur der TM (s.o.), von Cyanobakterien bis zu den höheren Pflanzen weitestgehend konserviert. Genauer gesagt besteht die Lipidmatrix zu ~50% aus Monogalaktosyldiacylglycerol (MGDG), zu ~30% (Pflanzen) bzw. ~20% (Cyanobakterien) aus Digalaktosyldiacylglycerol (DGDG) und zu ~20% (Pflanzen) bzw. ~30% (Cyanobakterien) aus negativ geladenen Lipiden<sup>8</sup>. Letztere setzen sich dabei jeweils zur Hälfte aus Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) und Phosphatidylglycerol (PG) zusammen<sup>8</sup>.

Da Thylakoidlipide die Lipiddoppelschichtmatrix der TM bilden, sind sie während der Biogenese der Chloroplasten für die Ausbildung der TM-Struktur (siehe 1.) von großer Bedeutung. Es ist daher nicht überraschend, dass „Knockout“-Mutationen im Syntheseweg einzelner Thylakoidlipide zu einer defekten oder unterentwickelten Thylakoidarchitektur führen, wobei in diesem Zusammenhang SQDG nur eine untergeordnete Funktion zugesprochen wird<sup>8</sup>. Auch in der Fotosynthese hat SQDG offenbar eine geringere Bedeutung als beispielsweise PG, da SQDG-Mangel meist nur in Kombination mit einem Mangel an PG die Fotosyntheseleistung in „Knockout“-Pflanzen beeinträchtigt<sup>8</sup>. Allgemein sind die Thylakoidlipide in unterschiedlichem Ausmaß am Elektronentransport sowie der Fotoprotektion beteiligt und spielen bei der Funktion wie auch Stabilisierung der Fotosynthesekomplexe eine wichtige Rolle. Darüber hinaus sind sie nicht nur als Teil der Kristallstruktur von PSII und PSI, sondern auch als strukturelle Einheiten von Lhcs (siehe 1.3 am Beispiel von LHCII) identifiziert worden<sup>8</sup>.

Bei den physikochemischen Eigenschaften ergeben sich zwischen den einzelnen Lipidspezies teilweise drastische Unterschiede. Da sich SQDG und PG in diesem Zusammenhang jedoch grundsätzlich ähneln und SQDG bei der Struktur sowie Funktionalität der TM ein geringerer Einfluss zugeschrieben wird (s.o.), wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit in Bezug auf Lipide mit negativer Ladung nur noch auf die repräsentativen Eigenschaften von PG eingegangen. PG und DGDG weisen eine zylindrische Form auf und sind daher fähig in wässriger Umgebung eine Lipiddoppelschichtmembran (lamellares Phasenverhalten) zu formen (**Abb. 2**)<sup>9</sup>. Sie unterscheiden sich dafür in der Chemie der Lipidkopfgruppen: während PG wegen des Phosphatrestes negativ

geladen ist, weist DGDG keine ionische Ladung auf. Aufgrund der beiden Galaktoseringe trägt die Kopfgruppe von DGDG einige Hydroxyreste, was unter anderem zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen befähigt <sup>10</sup>. Dies ist auch bei MGDG der Fall, jedoch ist in der Kopfgruppenregion nur 1 Galaktoserest vorhanden, weshalb die Kopfgruppe wesentlich kleiner ist. Da die Fettsäuren im Alkylkettenbereich des Lipids wie bei DGDG hochgradig ungesättigt sind und daher ebenso viel Raum beanspruchen, verändert sich die räumliche Gestalt von MGDG im Vergleich zu DGDG: sie wird kegelförmig (konisch) <sup>9</sup>. Folglich hat MGDG die Tendenz statt einer Lipiddoppelschicht invertierte Mizellen zu bilden, man spricht von hexagonalem Phasenverhalten <sup>9</sup>.

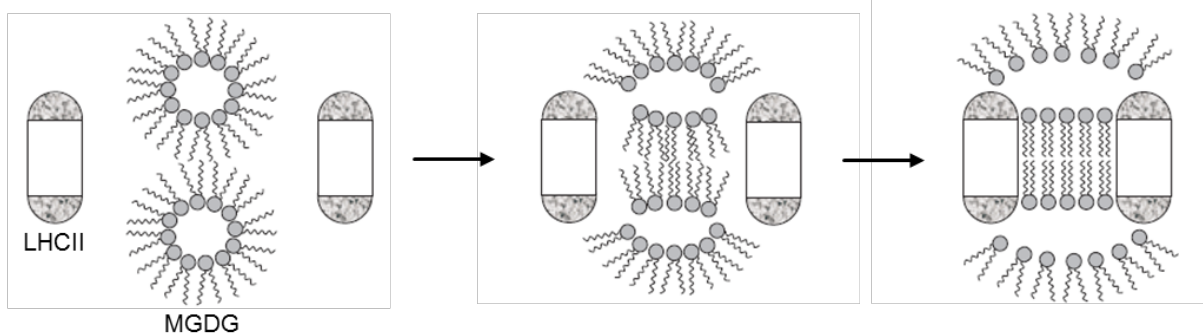
Lipid	Anteil in TM	Gestalt / Eigenschaften	Phase
Phosphatidylglycerol (PG)	~10%		 lamellar
Digalaktosyldiacylglycerol (DGDG)	~30%		 lamellar
Monogalaktosyldiacylglycerol (MGDG)	~50%		 hexagonal

**Abb. 2 Physikochemische Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Thylakoidlipide.** Angegeben ist jeweils der native Anteil an der Lipidmatrix der Thylakoidmembran (TM) von Chloroplasten. Die Chemie der Lipidkopfgruppen befähigt entweder zu ionischen Wechselwirkungen (negative Ladung) oder zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (Hydroxyreste). Eine zylindrische Form ermöglicht die Ausbildung lamellarer Membranstrukturen, während eine kegelförmige Gestalt hingegen zu hexagonalem Phasenverhalten führt.

### 1.2.1. Das nicht-lamellare Phasenverhalten von MGDG

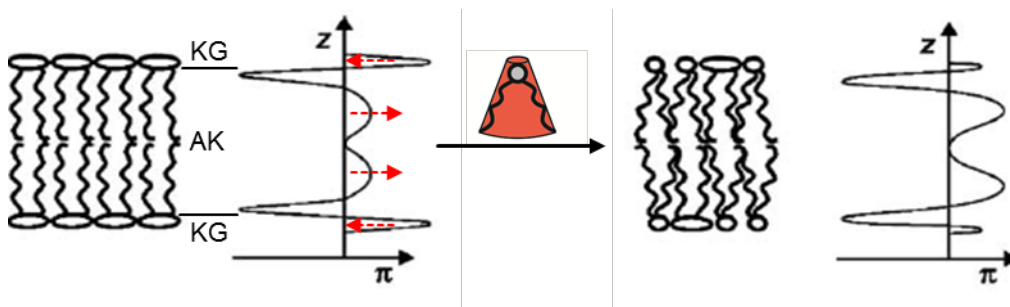
Zwar führt die Hydratisierung von MGDG alleine zur Ausbildung von röhrenförmigen (HII Phase) oder würfelförmigen (kubische Phase) Körpern, nichtsdestotrotz kann das Lipid in lamellare Membranstrukturen integriert werden <sup>11</sup>. Der hohe Anteil von MGDG an der Lipidmatrix der lamellaren Thylakoidmembran (~50%) wird allerdings nur durch die enorme Proteindichte ermöglicht (siehe 1.). Für den LHCII konnte experimentell nachgewiesen werden, dass das Protein in der Lage ist MGDG aus der hexagonalen in eine lamellare Phase hinein zu „zwingen“ (**Abb. 3**), was der großen Präsenz des LHCII in der Thylakoidmembran eine zusätzliche Bedeutung verleiht <sup>12,13</sup>. Es ist immer noch

Gegenstand aktueller Debatten, ob es durch das hohe Aufkommen an MGDG zur Koexistenz einer hexagonalen Phase in der TM kommt, welche durch das DGDG- zu MGDG-Verhältnis reguliert werden könnte<sup>14</sup>. Dies würde der Flexibilität der Thylakoidstruktur dienen, um beispielsweise besser auf osmotischen oder hitzebedingten Stress reagieren zu können<sup>14</sup>.



**Abb. 3 Ausbildung lamellarer MGDG-Membranstrukturen durch den LHCII.** Die Anwesenheit von LHCII-Proteinen in der Thylakoidmembran zwingt MGDG-Lipide aus der hexagonalen in eine lamellare Membranphase hinein. Abbildung entnommen aus Ref. (13).

Auf der anderen Seite existiert ein Modell, wonach sich durch die Aufnahme von nicht-lamellaren Lipiden wie MGDG die globalen physikalischen Eigenschaften einer lamellaren Membran in Form des sog. Lateraldruckprofils verändern<sup>15-17</sup>. Genauer gesagt würde demnach die Präsenz von MGDG den lateralen Druck, der durch intermolekulare Abstoßungskräfte und räumliche Beanspruchung der Lipide bedingt ist, im Lipidkopfbereich reduzieren und dafür den Druck im Alkylkettenbereich der Thylakoidmembran erhöhen (**Abb. 4**). Die lokalen Druckänderungen entlang der Transmembranachse können dabei einige hundert atm betragen, was Proteine beispielsweise in andere Konformationen zwingen und damit deren Funktion steuern kann<sup>18-20</sup>. Ob der Lateraldruck auch einen Einfluss auf die Struktur von TM-Proteinen wie den LHCII ausübt, konnte bislang nicht geklärt werden.

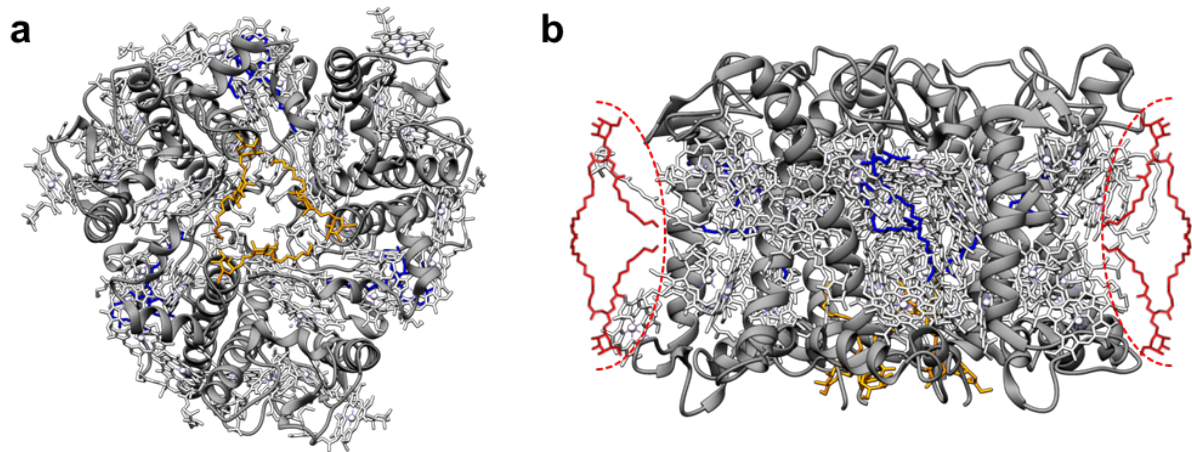


**Abb. 4 Veränderung des Lateraldruckprofils einer lamellarer Membran durch MGDG.** Aufgrund räumlicher Beanspruchung der Lipide und intermolekularer Abstoßungskräfte herrscht innerhalb von Membranen ein lateraler Druck  $\pi$ , der entlang der vertikalen Achse  $z$  unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Mit der Aufnahme von nicht-lamellaren Lipiden wie MGDG (rot) verringert sich der Druck im Kopfbereich (KG) der Membran, während der Lateraldruck im Alkylkettenbereich (AK) zunimmt. Abbildung entnommen und modifiziert aus Ref. (15).

### 1.3. Der majore Lichtsammelkomplex (LHCII)

Der LHCII ist nicht nur anteilmäßig der größte Vertreter der Lhcs (siehe 1.), sondern auch das häufigste Membranprotein der Erde. Dies liegt vor allem an seiner Schlüsselrolle in der oxygenen Fotosynthese von Chloroplasten, indem er Sonnenlicht absorbiert und die Anregungsenergie zu den beiden Reaktionszentren der TM weiterleitet (hauptsächlich PSII, aber auch PSI im Zuge der „State Transitions“; siehe 1.1.). Auf der anderen Seite hat der LHCII auch eine Schutzfunktion, da er bei Überanregung des PSII in der Lage ist, Anregungsenergie als Wärme wieder abzustrahlen („Non-photochemical Quenching“) <sup>21</sup>. Darüber hinaus ist das Protein ein wichtiger Faktor für die Granastruktur (siehe **Abb. 1a**), denn elektrostatische LHCII-LHCII-Interaktionen zwischen den Membranschichten unterstützen das Stapeln von Thylakoiden <sup>22,23</sup>.

Die Hauptfunktion des LHCII ist eng mit seiner Struktur verknüpft: an die 3 Transmembranhelices und 2 amphiphilen Helices des Polypeptidgerüsts sind insgesamt 14 Chlorophylle und 4 Carotinoide in so hoher Dichte angeordnet, dass eine effektive Energieübertragung zwischen den Pigmenten gewährleistet ist <sup>23,24</sup>. In der Thylakoidmembran liegt der LHCII als trimerer Komplex vor, an dem als weitere Cofaktoren 1 DGDG- und 1 PG-Molekül pro Monomer gebunden sind (**Abb. 5a** und **b**). Die beiden Thylakoidlipide spielen bei der Struktur des Pigment-Proteinkomplexes eine wichtige Rolle: PG ist für die Trimerisierung der einzelnen Untereinheiten essentiell <sup>21,25,26</sup>, während DGDG vermutlich höhere Anordnungen von LHCII-Komplexen in der TM durch laterale Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Trimeren vermittelt (auch wenn DGDG bei der in dieser Arbeit verwendeten LHCII-Kristallstruktur aus *Pisum sativum*, der Erbse, nur in der zentralen hydrophoben Furche des Komplexes bindet; siehe **Abb. 5a**) <sup>21,26,27</sup>. MGDG, hier dargestellt aus der Kristallstruktur des PSII (**Abb. 5b**), konnte nicht als Teil der LHCII-Kristallstruktur identifiziert werden <sup>23,24</sup>. Da die Geometrie von möglichen MGDG-Dimeren konvex und damit komplementär zur konkaven Gestalt der LHCII-Trimere ist (siehe **Abb. 5b**), und weil eine Einflussnahme des LHCII auf das Phasenverhalten von MGDG nachgewiesen wurde (siehe 1.2.1. und **Abb. 3**), ist jedoch eine strukturelle Interaktion zwischen Lipid und Protein naheliegend.



**Abb. 5 Kristallstruktur des LHCII und MGDG.** Gezeigt ist ein LHCII-Trimer aus *Pisum sativum* (Erbse) zum einen in der lumenalen Aufsicht (**a**) und zum anderen in seitlicher Ansicht (**b**). Das Polypeptidgerüst ist grau, die gebundenen Pigmente sind weiß dargestellt. Die Lipide PG (blau) und DGDG (orange) sind Teil der LHCII-Kristallstruktur, MGDG (rot) dagegen nicht. Die konkave Gestalt des LHCII-Trimers (illustriert durch gestrichelte Linien) deutet auf eine strukturelle Assoziation mit konvexförmigen MGDG-Dimeren hin. Abbildung erstellt mit Chimera und PDB ID Code 2BHW (LHCII) bzw. 2AXT (MGDG).

## 2. Die Bedeutung von physikochemischen Eigenschaften der Thylakoidlipide für die Struktur des LHCII

Während die Rolle der Thylakoidlipide bei der Struktur und Funktion von Fotosynthesepoteinen, in denen manche von ihnen als eine Art Kofaktoren fungieren, gut untersucht worden ist (siehe **1.2.** und **1.3.**), ist über die Art der Wechselwirkungen zwischen Lipid und Protein wenig bekannt. Der LHCII ist womöglich dank bestimmter Aminosäuren in den polaren Schleifendomänen in der Lage, intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen <sup>28</sup>. Des Weiteren hat man herausgefunden, dass die Ladung der Membran das Aggregationsverhalten der Komplexe steuert <sup>27</sup>, folglich spielen ionische Lipid-Protein-Interaktionen zwischen dem LHCII und der Lipidmatrix eine bedeutsame Rolle. Es wäre somit interessant zu erfahren, ob eine DGDG- (kann mehrere Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, siehe **Abb. 2**) oder PG-haltige (trägt eine negative Ladung, siehe **Abb. 2**) Membranumgebung die Struktur von LHCII-Trimeren im Sinne einer Stabilisierung bzw. Destabilisierung beeinflusst. Da die übergeordnete Struktur der MGDG-Lipide, d.h. deren Phasenverhalten (siehe **1.2.1.**), von der Präsenz des LHCII abhängig ist (siehe **Abb. 3**), ist im Umkehrschluss ein Einfluss von MGDG – möglicherweise durch seine komplementäre Form (siehe **Abb. 5b**) auf die Stabilität der LHCII-Struktur sehr wahrscheinlich. Um dieser Frage nachzugehen, soll der LHCII in dieser Arbeit mit einer speziellen Anwendung der atomaren Kraftmikroskopie (AFM), der Einzelmolekülkraftspektroskopie, untersucht werden (siehe **2.1.**).

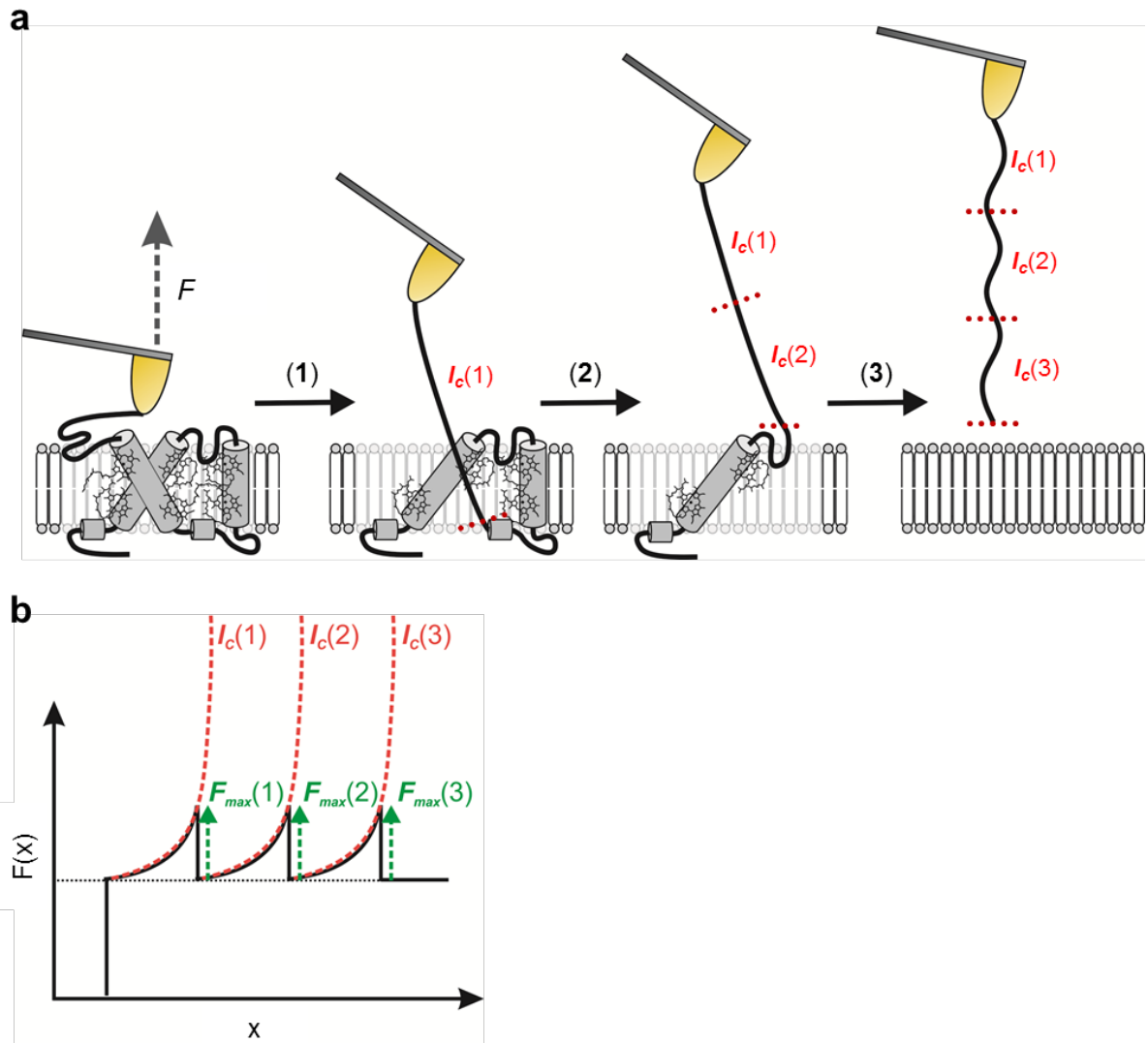
## 2.1. Mechanische Entfaltung des LHCII in Abhängigkeit der Lipidumgebung: Einzelmolekülkraftspektroskopie (SMFS)

Mit SMFS soll in dieser Arbeit der Einfluss der Thylakoidlipide auf die Struktur des LHCII untersucht werden (siehe 2.). Diese Technik widmet sich der Stabilität einzelner Domänen eines Transmembranproteins, indem die Kräfte gemessen werden, welche zum mechanischem Entfalten der strukturellen Einheiten aufgewendet werden müssen, während das Protein aus der Membran herausgezogen wird<sup>29–31</sup>. Während wasserlösliche Proteine meist in nur einem einzigen Schritt entfaltet werden, weisen Membranproteine mehrere Entfaltungsbarrieren auf, die nacheinander entlang der Polypeptidkette bis zur vollständigen Denaturierung überwunden werden müssen<sup>32</sup>.

Beim LHCII könnte das wie folgt aussehen: nachdem die AFM-Spitze auf der Membranoberfläche an die N-terminale Domäne eines Komplexes angeheftet wurde, wird die Spitze mit konstanter Geschwindigkeit wieder hochgefahren (im senkrechten Winkel zur Oberfläche), was eine Zugkraft  $F$  auf die Polypeptidkette ausübt (**Abb. 6a**). Dadurch wird diese, vom Ende der Kette aus beginnend, soweit auseinandergezogen bis die ersten Domänen, hier N-Terminus und Transmembranhelix 1, gemeinsam entfaltet werden (Ereignis (1) in **Abb. 6a**). Danach folgen beispielsweise die amphiphile Helix 2 sowie der Loop auf der lumenalen Seite zusammen mit Transmembranhelix 3 als gemeinsames Ereignis (2). Als letzter Schritt würde daraufhin der stromale Loop zusammen mit Helix 4 und 5 entfaltet werden (Ereignis (3)). In diesem Beispiel müssten also insgesamt 3 Entfaltungsbarrieren überwunden werden.

Da die AFM-Spitze im Prinzip nichts anderes ist als eine mikroskopisch feine Feder, die durch den mechanischen Widerstand der Peptidkette verbogen wird, können während den Entfaltungsereignissen die Auslenkungen der Spitze in Kraftbeträge übersetzt werden. Jedes Ereignis (1-3 in **Abb. 6a**) ergibt entlang der Kraft-Weg-Kurve ( $F(x)$  bzw.  $x$  in **Abb. 6b**) einen charakteristischen Entfaltungspeak, der mithilfe des sog. „Worm-like Chain“ Modells analysiert werden kann<sup>33,34</sup>. Dabei liefert die Konturlänge  $l_c$  eines Peaks Informationen darüber, welcher Abschnitt jeweils entlang der Aminosäuresequenz des Proteins betroffen ist (**Abb. 6a** und **b**). Unter Berücksichtigung der Kristallstruktur des LHCII<sup>23,24</sup> ließe sich daraus ableiten, welche Sekundär- und Tertiärstrukturen für das Protein stabilitätsgebend sind. Durch die Maxima der Peaks  $F_{max}$  können wiederum die Stabilitäten von einzelnen Entfaltungsbarrieren im Verhältnis zueinander ermittelt werden (**Abb. 6b**).

Mit der Etablierung von SMFS beim LHCII könnte darüber hinaus auch neues Wissen zu dessen Biogenese erhalten werden. Zwar wurde über die Faltung des Proteins mittels Elektronenspinresonanzspektroskopie bereits einiges herausgefunden, jedoch befanden sich Apoprotein und Pigmente dabei in Detergensmizellen gelöst<sup>35,36</sup>. Eine Rekonstitution des LHCII unter annähernd nativen Bedingungen, d.h. eine Faltung des Apoproteins in Membranen hinein, ist *in vitro* bisher nicht gelungen. Mit SMFS ist es beispielsweise möglich Membranproteine, die als vollständig denaturierte Polypeptidketten an die AMF-Spitze gebunden sind, unter Zugabe von Chaperonen in eine Membran zu inserieren und damit zu falten<sup>37,38</sup>. Falls dies beim LHCII nicht gelänge, könnte man



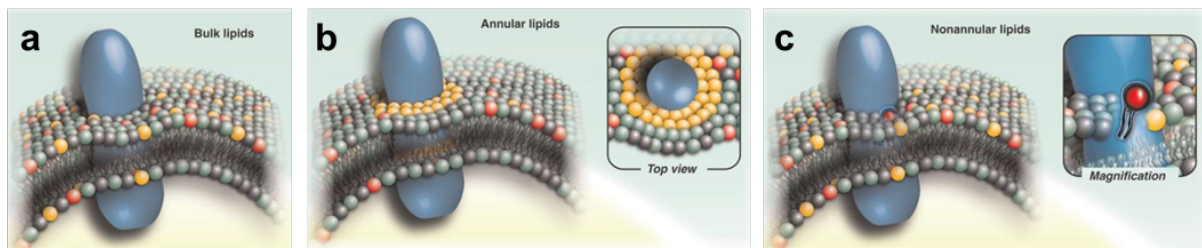
**Abb. 6 Mechanische Entfaltung des LHCII mittels Einzelmolekülkraftspektroskopie.** (a) Die AFM-Spitze wird auf der Membranoberfläche an eine exponierte Domäne des LHCII-Proteins (hier: N-Terminus) angeheftet und danach wieder hochgefahren. Dabei wird fortlaufend eine Zugkraft  $F$  auf die Polypeptidkette ausgeübt, wodurch die komplexe Proteinstruktur schrittweise denaturiert wird. Die einzelnen Proteindomänen werden nacheinander mechanisch entfaltet, was zu den distinkten Entfaltungsereignissen (1), (2) und (3) führt; die betroffenen Abschnitte entlang der Polypeptidkette werden als Konturlängen  $I_c$  bezeichnet. (b) Jedes Entfaltungsereignis ergibt im Verlauf der Kraft-Weg-Kurve der AFM-Spitze ( $F(x)$ ,  $x$ ) einen Peak, welcher durch Berechnung von  $I_c$  mithilfe des WLC-Modells einer Aminosäuresequenz innerhalb der Proteinstruktur zugeordnet werden kann. Die Höhe eines Peaks  $F_{max}$  gibt Aufschluss darüber, wieviel Kraft zur Überwindung der Entfaltungsbarriere aufgewendet werden muss.

stattdessen das bereits inserierte Protein nur bis zu einem gewissen Grad mechanisch entfalten, sodass ein Teil des LHCII-Polypeptides in der Membran verankert bliebe. Anschließend könnte die Relaxation der AFM-Spitze eine Rückfaltung des denaturierten Proteinteils erlauben und dieser Abschnitt daraufhin erneut herausgezogen werden, um die vorangegangene Rückfaltung durch wiederkehrende Entfaltungspeaks nachzuweisen<sup>39,40</sup>. Auf diesem Weg ließe sich durch Verwendung von pigmentfreien gegenüber pigmentbeladenen Membranen möglicherweise herausfinden, ob eine

vollständige Faltung der einzelnen Transmembranhelices in einer Membrenumgebung (im Gegensatz zur Detergensumgebung<sup>36</sup>) auch ohne Anbindung von Pigmenten erreicht werden kann.

### 3. Nachweis von LHCII-Lipid-Interaktionen und Bestimmung des Einflusses von Thylakoidlipiden auf die Membranfluidität durch Diffusionsmessungen

Sofern mittels SMFS (siehe 2.1.) ein Einfluss auf die Stabilität der LHCII-Struktur durch die komplementäre Form von MGDG nachgewiesen werden kann (siehe 1.3. und 2.), wäre es wichtig zu untersuchen, ob es sich dabei entweder um direkte Lipid-Protein-Interaktionen oder Auswirkungen von Änderungen des Lateraldruckprofils handelt (siehe 1.2.1. und Abb. 4). Bei Letzteren wären die Membraneigenschaften im Ganzen betroffen, MGDG würde also als „Bulk Lipid“ in der Lipidmatrix fungieren<sup>41</sup> (Abb. 7a). Erstere würden eine enge Assoziation von LHCII mit MGDG in der Thylakoidmembran bedeuten, d.h. die MGDG-Moleküle würden sich als „Annular Lipids“ um jedes LHCII-Protein herum anreichern – ähnlich wie bei „Lipid Rafts“<sup>41</sup> (Abb. 7b). Eine Funktionsweise als „Nonannular Lipid“ im Sinne einer koordinierten Bindung von MGDG an bestimmte Motive des LHCII (Abb. 7c)<sup>41</sup> ist unwahrscheinlich, da die zueinander komplementären Strukturen eher unspezifische Wechselwirkungen nahelegen (siehe 1.3. und Abb. 5b).



**Abb. 7 Mögliche Arten von Lipid-Protein-Interaktionen in biologischen Membranen.** (a) „Bulk Lipids“ präferieren keine direkte Interaktion mit dem jeweiligen Membranprotein. (b) „Annular Lipids“ binden bevorzugt an die Oberfläche eines Membranproteins und ordnen sich dabei in einem bzw. mehreren Ring/-en um das Protein an. (c) „Nonannular Lipids“ interagieren sehr spezifisch mit einem Membranprotein, indem sie an bestimmte Motive des Proteins binden und daher oft Teil von dessen Kristallstruktur sind. Abbildung entnommen aus Ref. (41).

Eine „Raft“-Bildung mit MGDG könnte möglicherweise in Form einer verringerten Mobilität von LHCII-Trimeren in MGDG-haltigen Membranen nachgewiesen werden (größere Partikel diffundieren langsamer). Zudem könnten Diffusionsmessungen des LHCII weitere Hinweise für Interaktionen mit PG und DGDG liefern (siehe 2.), da Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen mit TM-Lipiden vermutlich beschleunigende oder bremsende Auswirkungen auf die Beweglichkeit des Proteins hätten. Für den LHCII ist bislang nur bekannt, dass die Phosphorylierung des Proteinkomplexes im Zuge von „State Transitions“ (siehe 1.1.) zu einer Erhöhung der Diffusionsgeschwindigkeit führt<sup>42</sup>.

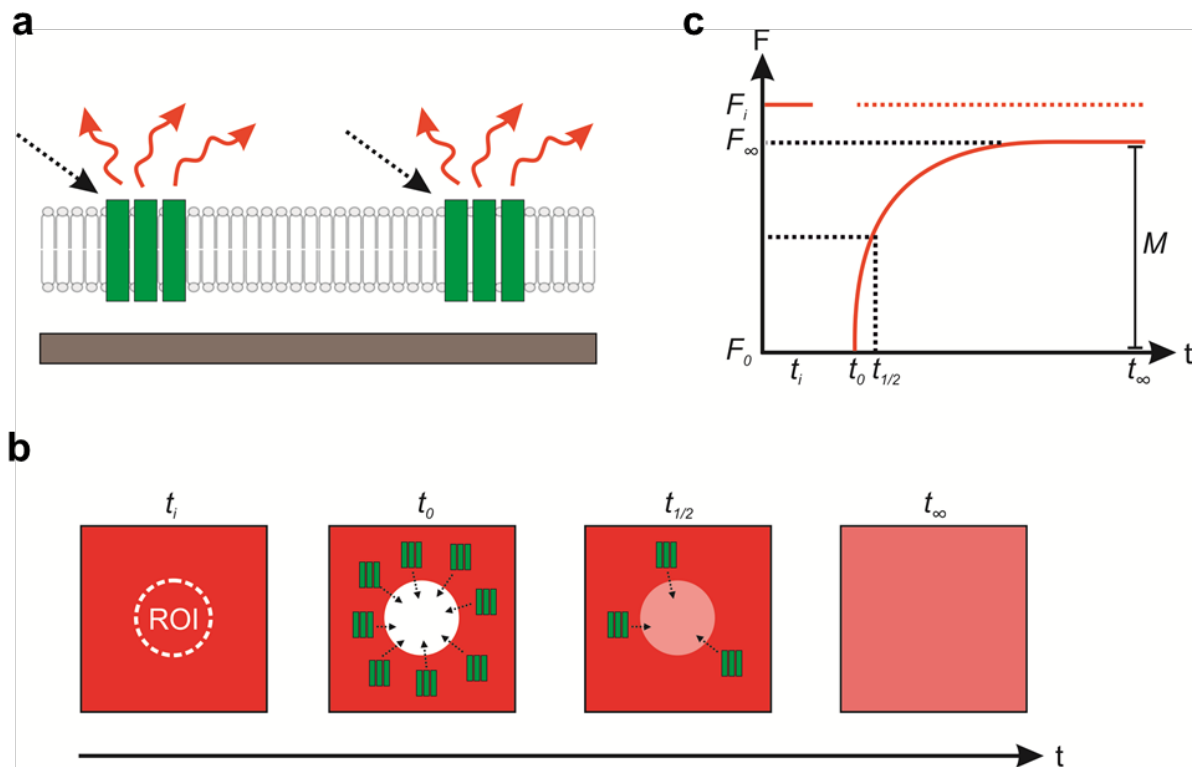
In Bezug auf die Gewährleistung von Diffusionsprozessen in den dichtgepackten Granathylakoiden (siehe 1.1.) gibt es Hinweise, wonach der niedrige Sättigungsgrad der Thylakoidlipide für eine Erhöhung der lateralen Mobilität sorgt<sup>43,44</sup>. Dies sagt jedoch nichts über mögliche, verschiedene Einflüsse durch die einzelnen Lipidspezies aus, zumal sich die Lipide vor allem in der Größe und Art der Kopfgruppen unterscheiden (siehe **Abb. 2**) – was sich merklich auf die Fluidität von Membranen und damit die Diffusionsgeschwindigkeit enthaltener Proteine auswirken kann<sup>45,46</sup>. Neben spezifischen Effekten in Bezug auf den LHCII wäre es also lohnenswert auch den Einfluss der einzelnen Thylakoidlipide auf die Beweglichkeit von Lipiden *in vitro* zu bestimmen. Für die Diffusionsmessungen in dieser Arbeit bietet sich eine fluoreszenzbasierte Methode an (siehe 3.1.).

### 3.1. Bestimmung der Mobilität in Membranen mithilfe von "Fluorescence Recovery After Photobleaching" (FRAP)

FRAP kann zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten der in einer Membran befindlichen Lipide und Proteine eingesetzt werden<sup>47-51</sup>; die Methodik eignet sich also, um den Einfluss der verschiedenen Thylakoidlipide auf die Membranfluidität (Beweglichkeit von Lipiden) sowie im Speziellen auf die Mobilität des LHCII zu untersuchen (siehe 3.). In der Regel müssen für FRAP-Messungen die gewünschten Lipide oder Membranproteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Der LHCII hingegen ist auch ohne eine solche Modifikation unter dem Fluoreszenzmikroskop detektierbar<sup>52</sup>, da in dem Proteinkomplex zahlreiche Chlorophyllmoleküle gebunden sind<sup>23,24</sup> (siehe 1.3.), die unter Lasereinstrahlung rotes Licht aus der Membran heraus emittieren (**Abb. 8a**). Eine Membran würde also durch eine Vielzahl an eingeschlossenen LHCII-Komplexen unter dem Mikroskop als eine homogen fluoreszierende Oberfläche erscheinen (Zeitpunkt  $t_i$  in **Abb. 8b**).

Bei einem FRAP-Experiment wird nun in der Membran eine „Region Of Interest“ (ROI), meist eine zirkuläre Fläche, mit einem starken Laserpuls bestrahlt, sodass die darin enthaltenen Fluorophore (hier: die LHCII-Chlorophylle) durch eine Überanregung irreversibel ausgebleicht werden. Dies hat zur Folge, dass sich unmittelbar nach dem Bleichvorgang ein neues Gleichgewicht an LHCII-Proteinen einstellt: aufgrund der Brownschen Molekularbewegung diffundieren beschädigte Proteinkomplexe aus der ROI heraus, während intakte Proteine von allen Seiten aus der Peripherie in die ROI hinein strömen, um die „Fluoreszenzlücke“ wieder aufzufüllen (Zeitpunkt  $t_0$  in **Abb. 8b**). Da Diffusionsprozesse einer exponentiellen Kinetik folgen, wandern im weiteren Verlauf pro Zeiteinheit immer weniger Komplexe in die ROI hinein; vor allem dann, wenn bereits die Hälfte des ursprünglichen Fluoreszenzsignals wieder erreicht ist (Zeitpunkt  $t_{1/2}$  in **Abb. 8b**). Nach einer gewissen Zeit ist schließlich der neue Gleichgewichtszustand erreicht, d.h. das Fluoreszenzsignal der ROI ist von der Umgebungsfluoreszenz nicht mehr zu unterscheiden (Zeitpunkt  $t_\infty$  in **Abb. 8b**). Bei einem FRAP-Experiment wird auch immer ein Teil der Gesamtfluoreszenz eines kontinuierlichen Membransystems gelöscht, wodurch das ursprüngliche Fluoreszenzsignal der ROI oftmals nicht mehr erreicht werden kann (vergleiche Farbstärke bei  $t_i$  und  $t_\infty$  in **Abb. 8b**); in dem Fall muss zu jedem

Zeitpunkt das Fluoreszenzsignal der ROI durch das Signal einer (möglichst weit entfernten) Referenzfläche normiert werden<sup>48,50</sup>.



**Abb. 8 Vereinfachte Darstellung eines FRAP-Experimentes mit LHCII-Proteinen in künstlichen Membranen.** (a) Seitliche Ansicht einer Membran: LHCII-Komplexe (grün) emittieren bei Absorption von Laserstrahlen (schwarze Pfeile) längerwelliges Licht (rote Pfeile) aus der Membran heraus. (b) Aufsicht auf eine Membran: bei einem FRAP-Experiment wird ein Teil der LHCII-Fluoreszenz innerhalb einer gewählten Fläche, der sog. „Region of Interest“ (ROI), durch einen starken Laserimpuls irreversibel gelöscht und die betroffenen Komplexe dadurch beschädigt. Aus der Umgebung diffundieren nun intakte Proteine solange in die ROI hinein, bis die „Fluoreszenzlücke“ wieder aufgefüllt ist. (c) Währenddessen wird in der ROI der Verlauf der Fluoreszenzintensität  $F$  über die Zeit  $t$  aufgezeichnet (rot). Je früher der Zeitpunkt  $t_{1/2}$ , bei dem sich die Fluoreszenz zur Hälfte erholt hat, erreicht ist desto schneller ist die Diffusion der LHCII-Proteine. Die mobile Fraktion  $M$  gibt an, wieviel Prozent der in der Membran befindlichen Proteinkomplexe überhaupt diffundieren können. Weitere Erläuterungen zu Indizes der Variablen sind im Text zu finden.

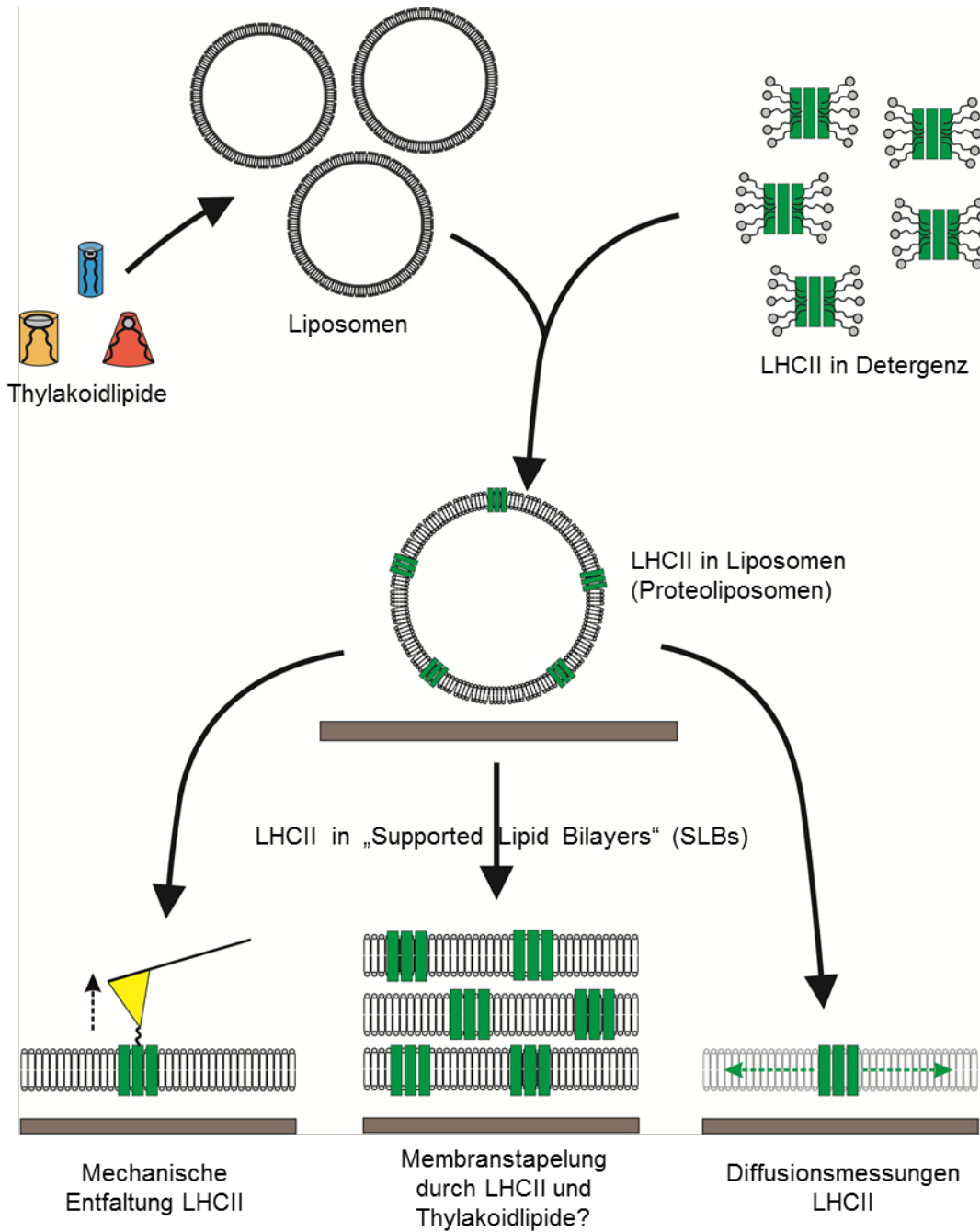
Während des gesamten Experiments wird die Fluoreszenzintensität  $F$  als Funktion der Zeit  $t$  aufgezeichnet (**Abb. 8c**). Wie bereits eingangs erwähnt, stellt  $t_{1/2}$  den Zeitpunkt dar, bei dem die Fluoreszenzintensität kurz nach dem Bleichen  $F_0$  auf die Hälfte der Intensität im Gleichgewichtszustand  $F_\infty$  angestiegen ist;  $t_{1/2}$  wird als Bestimmtheitsmaß für die Geschwindigkeit diffundierender Objekte zurate gezogen und kann bei bekannter Geometrie der ROI direkt in den Diffusionskoeffizienten umgerechnet werden<sup>47</sup>. Das Verhältnis von  $F_\infty$  zur Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen  $F_i$  gibt an, wieviel Prozent der in der Membran enthaltenen Fluorophore überhaupt diffundieren können; man spricht von der mobilen Fraktion  $M$ . Ein geringer Wert für  $M$  weist bei Proteinen z.B. auf Aggregate bzw. Kristalle in der Membran oder auf immobilisierende Effekte durch

Interaktionen des Membranproteins mit der Substratoberfläche hin. Ergeben sich darüber hinaus auch beim Messen der Lipiddiffusion niedrige  $M$ -Werte, kann FRAP damit Membrandefekte wie Lücken im Membransystem aufzeigen<sup>53-55</sup>.

#### 4. Untersuchungen des LHCII in „Supported Lipid Bilayers“ (SLBs) unter dem Einfluss der Thylakoidlipide

Eine einfache Methode, um mögliche Einflüsse der verschiedenen Thylakoidlipide auf den LHCII zu untersuchen, wurde in Zusammenhang mit spektroskopischen Untersuchungen bereits etabliert<sup>56,57</sup>. Dabei werden aus Thylakoidlipiden Lipidvesikel, sog. Liposomen, hergestellt und anschließend Detergens-solubilisierete LHCII-Proteine in diese artifiziellen Membranstrukturen integriert, woraus Proteoliposomen entstehen (**Abb. 9 oben**). Ein großer Vorteil ist, dass die Lipidzusammensetzung der Vesikel beliebig variiert werden kann. Wenn man Informationen zur Dynamik des Proteins und einen tieferen Einblick in die Stabilität der LHCII-Struktur gewinnen möchte (siehe **2.** und **3.**), empfiehlt es sich jedoch, die künstlichen Membranen auf einer Oberfläche zu immobilisieren. Dazu kann man (Proteo-) Liposomen auf einem Material wie beispielweise Glas inkubieren, wodurch sie nach einer gewissen Zeit aufplatzen und die einzelnen Membranabschnitte zu großflächigen, planaren Lipiddoppelschichten, sog. „Supported Lipid Bilayers“, fusionieren<sup>58-60</sup> (**Abb. 9 unten**).

In einem Teil dieser Arbeit sollen einzelne LHCII-Proteine mit einer AFM-Spitze aus solchen SLBs herausgezogen werden (**Abb. 9 links**). Damit kann die komplexe Polypeptidstruktur mechanisch entfaltet werden, wodurch Informationen zur Stabilität der LHCII-Struktur in Abhängigkeit der Thylakoidlipide gewonnen werden sollen (SMFS; siehe **2.1.**). Sofern der LHCII in den SLBs nicht immobilisiert vorliegt (beispielsweise durch Wechselwirkungen des Substrats mit Proteindomänen, die außerhalb der Membranebene liegen), kann in diesem artifiziellen Membransystem auch die Diffusion des Proteins mittels FRAP (siehe **3.1.**) gemessen werden (**Abb. 9 rechts**). Neben möglichen spezifischen Effekten in Bezug auf den LHCII soll in einem weiteren Teil dieser Arbeit auch die Membranfluidität, also die Mobilität von Lipiden, unter dem Einfluss der verschiedenen TM-Lipide in SLBs bestimmt werden (siehe **3.**).



**Abb. 9** Schematische Darstellung zu Untersuchungen des LHCII in SLBs unter dem Einfluss verschiedener Thylakoidlipide. Detaillierte Erläuterungen sind im Text zu finden.

#### 4.1. Mögliche Ausbildung von Grana ähnlichen Strukturen durch den LHCII

Die Bedeutung der einzelnen Lipide für die komplexe Granaarchitektur (siehe 1.) ist überwiegend aus mutagenen *in vivo*-Studien abgeleitet worden (siehe 1.2.), womit jedoch keine direkten Informationen zum Einfluss der speziellen physikochemischen Eigenschaften von Thylakoidlipiden gewonnen werden können (siehe **Abb. 2**). Neben Lipid-Protein-Interaktionen gilt es also auch das Zusammenwirken der Lipide im Sinne globaler physikalischer Membraneigenschaften, d.h. Ladung

und Phasenverhalten, für die Organisation der Lipidmatrix zu verstehen. Es ist nicht verwunderlich, dass für die Stapelung der Thylakoidmembran in Grana (siehe **Abb. 1a**) hohe Konzentrationen an Kationen benötigt werden, welche die sich gegenseitig abstoßenden Ladungen der PG- (und SQDG-) Kopfgruppen abschirmen<sup>3,61,62</sup>. Dementgegen soll DGDG den Zusammenhalt zwischen den einzelnen Membranschichten durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen fördern<sup>63</sup>. Für MGDG wird schon lange aufgrund seiner räumlichen Gestalt (siehe **Abb. 2**) eine wichtige Funktion bei der gebogenen Membranstruktur im Randbereich der Granascheiben vermutet<sup>43,64</sup>, was jedoch bislang nicht bewiesen werden konnte.

Es wäre also vielversprechend ein *in vitro*-System zu entwickeln, welches erlaubt, den Einfluss der physikochemischen Eigenschaften von Thylakoidlipiden getrennt und unter Berücksichtigung der beiden strukturellen Aspekte von Grana (Stapelung und Krümmung der TM) zu untersuchen. Vor kurzem wurde gezeigt, dass Thylakoidlipide unter bestimmten Bedingungen (in dem Fall durch Zugabe von Silaffinen) in der Lage sind in den flachen SLBs Membranstapel zu erzeugen<sup>65</sup>. Da u.a. der LHCII als Triebkraft für die Stapelung der TM gilt<sup>22,23</sup>, ist es vorstellbar, dass sich diese Strukturen auch in SLBs ausbilden, in denen LHCII-Komplexe integriert sind (**Abb. 9 Mitte**). FRAP-Experimente (siehe **3.1.**) könnten dabei Hinweise liefern, ob die untersuchten Regionen Teil eines fluiden bzw. kontinuierlichen Membransystems sind oder nicht (indem es nach dem Bleichen entweder zu keiner oder zur deutlichen Wiederauffüllung der Fluoreszenz kommt; siehe **Abb. 8c** in Form von „M“). Dies könnte helfen zu beurteilen, ob die gestapelten Membranbereiche aus Umstrukturierungen der oberflächennahen Lipiddoppelschicht oder durch Auflagerung mehrerer Lipidvesikel hervorgegangen sind<sup>65,66</sup>. Fluoreszenzspektroskopische und topographische Bildaufnahmen könnten Informationen zum Ausmaß der Stapel liefern, wodurch sich unter Variation der SLB-Lipidzusammensetzung Rückschlüsse zur Bedeutung der einzelnen Thylakoidlipide für die Granastruktur ziehen ließen.

## 5. Zielsetzung der Arbeit

Die Motivation für diese Arbeit lag darin die Bedeutung der speziellen physikochemischen Eigenschaften von Thylakoidlipiden in ihrer Rolle als Lipidmatrix in den Thylakoiden von Chloroplasten zu verstehen. Dabei wurde der Einfluss auf die Struktur und Diffusion des prominentesten Proteinvertreters, der pflanzliche Hauptlichtsammelkomplex LHCII, wie auch auf die komplexe Architektur von Granathylakoiden untersucht. Zu diesem Zweck wurde der LHCII zunächst nach bereits etabliertem Protokoll in künstliche Lipidvesikel (Liposomen) inseriert, deren Zusammensetzung mit den verschiedenen Thylakoidlipiden variiert wurde. Darauf aufbauend sollte unter Berücksichtigung der Lipideigenschaften eine geeignete Methode gefunden werden, um die LHCII-haltigen Vesikel auf einer Oberfläche zu immobilisieren, sodass sich daraus planare und möglichst lückenlose Lipiddoppelschichten (SLBs) bilden.

Aus diesen oberflächengestützten Membranen sollten mithilfe einer speziellen Anwendung der atomaren Kraftmikroskopie einzelne Proteine herausgezogen werden, womit die verschiedenen Domänen eines LHCII-Komplexes nacheinander entfaltet werden (SMFS). Dabei kann der mechanische Widerstand jeder einzelnen Entfaltungsbarriere in Form einer Zugkraft bestimmt werden. Durch eine Vielzahl an SMFS-Experimenten sollten die Hauptentfaltungsbarrieren und damit die stabilitätsgebenden Einheiten der LHCII-Polypeptidstruktur statistisch ermittelt werden. Auf dieser Basis sollte untersucht werden, ob durch Modifikation der Membraneigenschaften (in Umgebung verschiedener Thylakoidlipide) das Entfaltungsprofil des LHCII beeinflusst wird, d.h. ob sich dabei Art und/oder Stabilität der Barrieren durch mögliche Lipid-Protein-Interaktionen verändern.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte das SLB-System genutzt werden, um Diffusionsmessungen des LHCII in Abhängigkeit der Thylakoidlipide durchzuführen. Mit der hierfür verwendeten fluoreszenzbasierten Methode, FRAP, sollte zunächst qualitativ ermittelt werden, ob die Komplexe auf der Oberfläche mobil sind oder nicht. Quantitativ gesehen sollten valide Messungen erlauben, signifikante Änderungen des LHCII-Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Um dabei den Einfluss spezifischer Effekte im Sinne von Lipid-Protein-Wechselwirkungen beurteilen zu können, sollte gleichzeitig die Veränderung der Membranfluidität in Form der Lipiddiffusion gemessen und berücksichtigt werden.

Da der LHCII ein wichtiger Faktor bei Struktur von Granathylakoiden ist, könnten sich in SLBs mit inserierten LHCII-Proteinen ähnliche Membranstrukturen ausbilden. In dem Fall sollte mithilfe von fluoreszenzmikroskopischen und topographischen Aufnahmen das Ausmaß der Membranstapel (Häufigkeit, Ausdehnung und Höhe) beurteilt und mittels FRAP Rückschlüsse auf deren Entstehung gezogen werden (aus einer einzelnen oder mehreren Membranen). Damit sollten Informationen darüber gewonnen werden, welche Art von Lipid-Lipid-Interaktionen und/oder welche geometrischen Lipideigenschaften das Aufeinanderstapeln und Verformen der Thylakoidmembran begünstigen.

## 6. Quellenangaben

1. Croce, R. & van Amerongen, H. Natural strategies for photosynthetic light harvesting. *Nat Chem Biol* **10**, 492–501 (2014).
2. Büchel, C. Evolution and function of light harvesting proteins. *J Plant Physiol* **172**, 62–75 (2015).
3. Ruban, A. V. & Johnson, M. P. Visualizing the dynamic structure of the plant photosynthetic membrane. *Nat Plants* **1**, 15161 (2015).
4. Kirchhoff, H., Tremmel, I.G., Haase, W. & Kubitscheck, U. Supramolecular photosystem II organization in grana thylakoid membranes: evidence for a structured arrangement. *Biochemistry* **43**, 9204–9213 (2004).
5. Pribil, M., Labs, M. & Leister, D. Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *J Exp Bot* **65**, 1955–1972 (2014).
6. Kirchhoff, H., Haferkamp, S., Allen, J. F., Epstein, D. B.A. & Mullineaux, C. W. Protein diffusion and macromolecular crowding in thylakoid membranes. *Plant Physiol* **146**, 1571–1578 (2008).
7. Kirchhoff, H. Diffusion of molecules and macromolecules in thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1837**, 495–502 (2014).
8. Kobayashi, K. Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J Plant Res* (2016).
9. Jouhet, J. Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Front Plant Sci* **4**, 494 (2013).
10. Hoyo, J., Gaus, E. & Torrent-Burgués, J. Monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol role, physical states, applications and biomimetic monolayer films. *Eur Phys J E* **39** (2016).
11. Sprague, S. G. & Staehelin, A. Effects of reconstitution method on the structural organization of isolated chloroplast membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* **777**, 306–322 (1984).
12. Simidjiev, I. *et al.* Self-assembly of large, ordered lamellae from non-bilayer lipids and integral membrane proteins *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1473–1476 (2000).
13. Garab, G., Lohner, K. & Laggner, P. Self-regulation of the lipid content of membranes by non-bilayer lipids: a hypothesis. *Trends Plant Sci* **5**, 489–494 (2000).
14. Garab, G. Self-assembly and structural–functional flexibility of oxygenic photosynthetic machineries: personal perspectives. *Photosynth Res* **127**, 131–150 (2016).
15. van den Brink-van der Laan, Els, Antoinette Killian, J. & Kruijff, B. de. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim Biophys Acta* **1666**, 275–288 (2004).
16. Baczynski, K., Markiewicz, M. & Pasenkiewicz-Gierula, M. A computer model of a polyunsaturated monogalactolipid bilayer. *Biochimie* **118**, 129–140 (2015).
17. Ding, W., Palaikostas, M., Wang, W. & Orsi, M. Effects of lipid composition on bilayer membranes quantified by all-atom molecular dynamics. *J Phys Chem B* **119**, 15263–15274 (2015).
18. Cantor, R. S. Lateral pressures in cell membranes: a mechanism for modulation of protein function. *J Phys Chem B*, 1723–1725 (1997).
19. Kruijff, B. de. Lipids beyond the bilayer. *Nature* **386**, 129–130 (1997).
20. Anishkin, A., Loukin, S. H., Teng, J. & Kung, C. Feeling the hidden mechanical forces in lipid bilayer is an original sense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 7898–7905 (2014).

21. Barros, T. & Kühlbrandt, W. Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting complex II. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 753–772 (2009).
22. McDonnell, A. & Staehelin, A. Adhesion between liposomes mediated by the chlorophyll *a/b* light-harvesting complex isolated from chloroplast membranes. *J Cell Biol*, 40–56 (1980).
23. Standfuss, J., van Scheltinga, A. C. T., Lamborghini, M. & Kühlbrandt, W. Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J* **24**, 919–928 (2005).
24. Liu, Z. *et al.* Crystal structure of spinach major light harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428**, 287–292 (2004).
25. Trémolières, A., Dubacq, J.-P., Ambard-Bretteville, F. & Rémy, R. Lipid composition of chlorophyll-protein complexes. Specific enrichment in trans-hexadecenoic acid of an oligomeric form of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. *FEBS Lett* **130**, 27–31 (1981).
26. Nußberger, S., Dörr, K., Wang, D. N. & Kühlbrandt, W. Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J Mol Biol* **234**, 347–356 (1993).
27. Schaller, S. *et al.* Regulation of LHCII aggregation by different thylakoid membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* **1807**, 326–335 (2011).
28. Janik, E. *et al.* Molecular architecture of plant thylakoids under physiological and light stress conditions: a study of lipid-light-harvesting complex II model membranes. *Plant Cell* **25**, 2155–2170 (2013).
29. Kedrov, A., Janovjak, H., Sapra, K. T. & Müller, D. J. Deciphering molecular interactions of native membrane proteins by single-molecule force spectroscopy. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**, 233–260 (2007).
30. Engel, A. & Gaub, H. E. Structure and mechanics of membrane proteins. *Annu Rev Biochem* **77**, 127–148 (2008).
31. Bippes, C. A. & Müller, D. J. High-resolution atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins. *Rep Prog Phys* **74**, 86601 (2011).
32. Hensen, U. & Müller, D. J. Mechanistic explanation of different unfolding behaviors observed for transmembrane and soluble beta-barrel proteins. *Structure* **21**, 1317–1324 (2013).
33. Bustamante, C., Marko, J. F., Siggia, E. D. & Smith, S. Entropic elasticity of λ-phage DNA. *Science* **265**, 1599–1600 (1994).
34. Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J. M. & Gaub, H. E. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* **276**, 1109–1112 (1997).
35. Dockter, C. *et al.* Refolding of the integral membrane protein light-harvesting complex II monitored by pulse EPR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18485–18490 (2009).
36. Fehr, N., García-Rubio, I., Jeschke, G. & Paulsen, H. Early folding events during light harvesting complex II assembly in vitro monitored by pulsed electron paramagnetic resonance. *Biochim Biophys Acta* (2016).
37. Serdiuk, T. *et al.* YidC assists the stepwise and stochastic folding of membrane proteins. *Nat Chem Biol* **12**, 911–917 (2016).
38. Serdiuk, T., Mari, S. A. & Müller, D. J. Pull-and-paste of single transmembrane proteins. *Nano Lett.* **17**, 4478–4488 (2017).
39. Kessler, M., Gottschalk, K. E., Janovjak, H., Müller, D. J. & Gaub, H. E. Bacteriorhodopsin folds into the membrane against an external force. *J. Mol. Biol.* **357**, 644–654 (2006).

40. Kedrov, A., Janovjak, H., Ziegler, C., Kuhlbrandt, W. & Muller, D. J. Observing folding pathways and kinetics of a single sodium-proton antiporter from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **355**, 2–8 (2006).
41. Contreras, F.-X., Ernst, A. M., Wieland, F. & Brügger, B. Specificity of intramembrane protein-lipid interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, 1–18 (2011).
42. Goral, T. K. *et al.* Visualizing the mobility and distribution of chlorophyll proteins in higher plant thylakoid membranes: effects of photoinhibition and protein phosphorylation. *Plant J* (2010).
43. Boudiere, L. *et al.* Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis and trafficking. *Biochim Biophys Acta* **1837**, 470–480 (2014).
44. Sarcina, M., Murata, N., Tobin, M. J. & Mullineaux, C. W. Lipid diffusion in the thylakoid membranes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp.: effect of fatty acid desaturation. *FEBS Lett* **553**, 295–298 (2003).
45. Ramadurai, S., Durkens, R., Krasnikov, V. V. & Poolman, B. Lateral diffusion of membrane proteins: consequences of hydrophobic mismatch and lipid composition. *Biophys J* **99**, 1482–1489 (2010).
46. Seu, K. J., Cambrea, L. R., Everly, R. M. & Hovis, J. S. Influence of lipid chemistry on membrane fluidity: tail and headgroup interactions. *Biophys J* **91**, 3727–3735 (2006).
47. Axelrod, D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson & W.W. Webb. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* **16**, 1055–1069 (1976).
48. Day, C. A., Kraft, L. J., Kang, M. & Kenworthy, A. K. Analysis of protein and lipid dynamics using confocal fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Curr Protoc Cytom* **2** (2012).
49. Lorén, N. *et al.* Fluorescence recovery after photobleaching in material and life sciences: putting theory into practice. *Q Rev Biophys* **48**, 323–387 (2015).
50. Pincet, F. *et al.* FRAP to characterize molecular diffusion and interaction in various membrane environments. *PLoS ONE* **11**, 1–19 (2016).
51. Rayan, G., Guet, J.-E., Taulier, N., Pincet, F. & Urbach, W. Recent applications of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to membrane bio-macromolecules. *Sensors* **10**, 5927–5948 (2010).
52. Kibrom, A. *et al.* Hydrogel-supported protein-tethered bilayer lipid membranes: a new approach toward polymer-supported lipid membranes. *Soft Matter* **237**, 237–246 (2011).
53. Kobayashi, T., Kono, A., Futagawa, M., Sawada, K. & Tero, R. Formation and fluidity measurement of supported lipid bilayer on polyvinyl chloride membrane. *AIP Conf Proc* **1585**, 145–152 (2014).
54. Figueira, T. N. *et al.* Quantitative analysis of molecular partition towards lipid membranes using surface plasmon resonance. *Sci Rep* **7**, 1–10 (2017).
55. Kim, M. C., Gunnarsson, A., Tabaei, S. R., Höök, F. & Cho, N.-J. Supported lipid bilayer repair mediated by AH peptide. *Phys Chem Chem Phys* **18**, 3040–3047 (2016).
56. Yang, C., Boggasch, S., Haase, W. & Paulsen, H. Thermal stability of trimeric light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHCIIb) in liposomes of thylakoid lipids. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1642–1648 (2006).
57. Zhou, F. *et al.* Effect of monogalactosyldiacylglycerol on the interaction between photosystem II core complex and its antenna complexes in liposomes of thylakoid lipids. *Photosynth Res* **99**, 185–193 (2009).
58. Anderson, T. H. *et al.* Formation of supported bilayers on silica substrates. *Langmuir* **25**, 6997–7005 (2009).

59. Hardy, G. J., Nayak, R. & Zauscher, S. Model cell membranes: techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **18**, 448–458 (2013).
60. Richter, R. P., Berat, R. & Brisson, A. R. Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view. *Langmuir* **22**, 3497–3505 (2006).
61. Chow, W. S., Kim, E.-H., Horton, P. & Anderson, J. M. Granal stacking of thylakoid membranes in higher plant chloroplasts: the physicochemical forces at work and the functional consequences that ensue. *Photochem Photobiol Sci* **4**, 1081–1090 (2005).
62. Puthiyaveetil, S., van Oort, B. & Kirchhoff, H. Surface charge dynamics in photosynthetic membranes and the structural consequences. *Nat Plants* **3**, 1–9 (2017).
63. Deme, B., Cataye, C., Block, M. A., Marechal, E. & Jouhet, J. Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *FASEB J* **28**, 3373–3383 (2014).
64. Murphy, D. J. The importance of non-planar bilayer regions in photosynthetic membranes and their stabilisation by galactolipids. *FEBS Lett* **150**, 19–26 (1982).
65. Gräß, O., Abacilar, M., Daus, F., Geyer, A. & Steinem, C. 3D-membrane stacks on supported membranes composed of diatom lipids induced by long-chain polyamines. *Langmuir* **32**, 10144–10152 (2016).
66. Heath, G. R. *et al.* Layer-by-layer assembly of supported lipid bilayer poly-L-lysine multilayers. *Biomacromolecules* **17**, 324–335 (2016).

# Kapitel II: The non-bilayer lipid MGDG stabilizes the major light-harvesting complex (LHCII) against unfolding

Dennis Seiwert<sup>a,1</sup>, Hannes Witt<sup>b,1</sup>, Andreas Janshoff<sup>b,\*</sup>, Harald Paulsen<sup>a,2\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Molecular Physiology, Johannes Gutenberg University Mainz, 55128 Mainz, Germany;

<sup>b</sup> Institute of Physical Chemistry, University of Göttingen, 37077 Göttingen, Germany

<sup>1</sup> Co-first author

<sup>\*</sup> Co-corresponding author:

Andreas Janshoff: ajansho@gwdg.de

Harald Paulsen: paulsen@uni-mainz.de

This manuscript was published in “Scientific Reports” with the reference:

Seiwert, D.; Witt, H.; Janshoff, A.; Paulsen, H.

*Scientific Reports* **7**, 1 – 10 (2017)

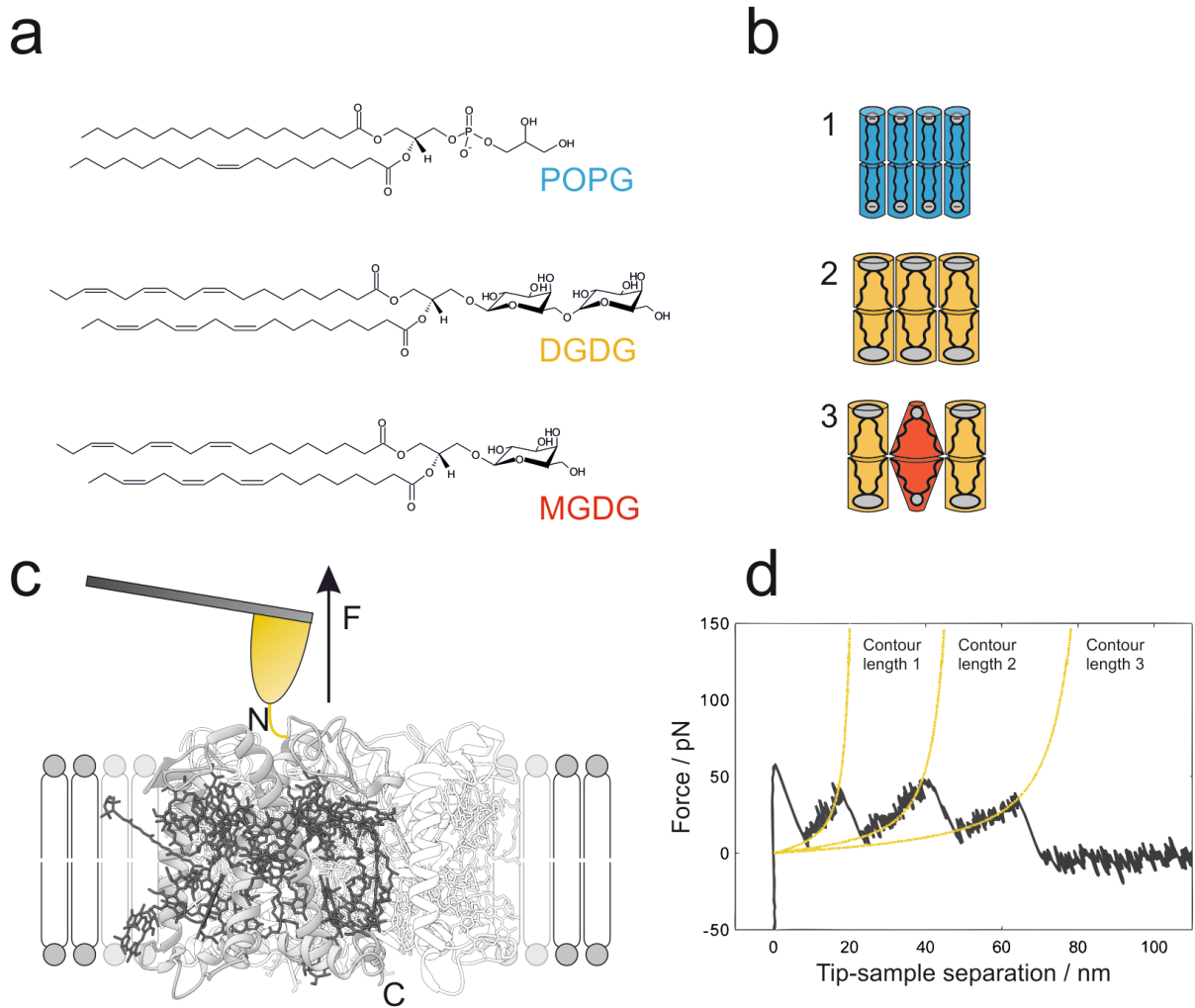
## Abstract

In the photosynthetic apparatus of plants a high proportion of LHCII protein is needed to integrate 50% non-bilayer lipid MGDG into the lamellar thylakoid membrane, but whether and how the stability of the protein is also affected is not known. Here we use single-molecule force spectroscopy to map the stability of LHCII against mechanical unfolding along the polypeptide chain as a function of oligomerization state and lipid composition. Comparing unfolding forces between monomeric and trimeric LHCII demonstrates that the stability does not increase significantly upon trimerization but can mainly be correlated with specific contact sites between adjacent monomers. In contrast, unfolding of trimeric complexes in membranes composed of different thylakoid lipids reveals that the non-bilayer lipid MGDG substantially increases the mechanical stability of LHCII in many segments of the protein compared to other lipids such as DGDG or POPG. We attribute these findings to steric matching of conically formed MGDG and the hourglass shape of trimeric LHCII, thereby extending the role of non-bilayer lipids to the structural stabilization of membrane proteins in addition to the modulation of their folding, conformation and function.

## Introduction

The major light-harvesting complex (LHCII) found in the chloroplasts of green plants contains more than half of the chlorophylls (Chl) and is the most abundant membrane protein on earth. LHCII plays a key role in photosynthesis by collecting sunlight and efficiently transferring excitation energy to the reaction centers. At the same time, LHCII serves to protect the photosynthetic apparatus from damage of excessive light and to organize the grana structures of the thylakoid membrane<sup>1</sup>. The 25 kDa LHCII apoprotein contains three transmembrane and two amphiphilic helices, non-covalently binding 8 Chl *a*, 6 Chl *b*, 4 carotenoid and 2 lipid molecules in a densely packed arrangement as revealed by crystal structure analysis at 2.5 Å resolution<sup>2,3</sup>. LHCII monomers are assembled into trimeric complexes by the end of the greening process of the thylakoid membrane<sup>4</sup>, although trimerization has been proposed to be reversible upon illumination<sup>5</sup>. Trimerization prevents LHCII from proteolysis under high light conditions<sup>6</sup> and increases its thermal stability<sup>7</sup>. Inspection of the LHCII crystal structure allowed to localize the contact sites between the monomers<sup>2</sup>, in part confirming earlier biochemical data<sup>8,9</sup>. However, these findings alone provide little information about how much individual structural features contribute to the stability of the LHCII trimer or monomer.

LHCII is embedded in the thylakoid membrane, a membrane with an unusual architecture and composition. The thylakoid membrane contains 80% uncharged glycolipids (30% digalactosyl diacylglycerol (DGDG) and 50% monogalactosyl diacylglycerol (MGDG)), and 20% negatively charged lipids (10 % each of phosphatidyl diacylglycerol (PG) and sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG))<sup>10</sup>. Although the alkyl chains of DGDG are highly unsaturated (mainly 18:3, 18:3), DGDG still has a cylindrical shape due to sterical compensation by its bulky head group containing 2 galactose rings. By contrast, MGDG comprises only 1 galactose moiety and therefore adopts a conical shape with a tendency to form a hexagonal phase<sup>11</sup>. On the one hand, DGDG as well as the fraction of negatively charged thylakoid lipids, modelled here by 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG), form a lamellar phase (**Figure 1 a,b**). On the other hand, MGDG is a non-bilayer lipid, and even the thylakoid membrane with a MGDG fraction of 50 % is unable to adopt a lamellar structure unless proteins are inserted into the membrane<sup>12</sup>. The role of the high content of MGDG in the thylakoid is still unclear. Proposed contributions of MGDG include structural aspects like the mediation of spontaneous curvature, the balance of excess membrane area, and specific tasks in protein functionality<sup>13,14,15,16,17</sup>. The lipid composition of chloroplasts, especially the balance of non-bilayer and bilayer lipids, is very sensitive to various kinds of external stress and a main pathway for plants to deal with changing environmental cues<sup>18,19,20,21</sup>.



**Figure 1 Mechanical unfolding of LHCII in membranes assembled from thylakoid lipids.** (a) Chemical structures of model phospholipid POPG and thylakoid glycolipids DGDG and MGDG. (b) Lipid geometries corresponding to **a** and lipid compositions of the membranes applied for unfolding experiments (1-3). The degree of saturation in the alkyl chain region and the size of the head group determine the shape of lipids. Hence, POPG (blue) and DGDG (orange) adopt a cylindrical shape, forming lamellar membranes (1,2). Due to its conical shape the non-bilayer lipid MGDG<sup>23,24</sup> causes alterations in the lateral pressure profile upon incorporation into lamellar membranes; here: lipid ratio of DGDG / MGDG = 2:1 (3). (c) Schematic representation of SMFS with LHCII embedded in lipid bilayers with compositions according to (b). Site-directed unfolding of LHCII is achieved by covalently attaching a gold-coated AFM tip to a cysteine motif (yellow) at the amino-terminus N of the polypeptide. Retraction of the tip applies a pulling force  $F$  to LHCII monomers, which get extracted from the membrane out of their trimeric assembly (transparent presentation), thereby inducing stepwise unfolding of the protein; gray: polypeptide, dark grey: pigments (obtained with Chimera and PDB ID code 2BHW). (d) Exemplary force-distance curve recorded during the unfolding process described in **c**. Each force peak, representing an unfolding event of LHCII, is fitted with the WLC model (yellow) which provides information about the positions of the stabilized domains (contour lengths) and the forces needed to overcome these barriers along the LHCII polypeptide.

Another intriguing feature of the thylakoid membrane is its high protein density. 70 – 80% of the membrane area is occupied by proteins, with LHCII comprising more than 70% of the proteins in the grana structures<sup>22</sup>. LHCII in particular was found to be essential for the integration of the non-bilayer lipid MGDG in high quantities into the lamellar thylakoid membrane<sup>12</sup>. Conversely, the presence of

non-bilayer lipids in lamellar membranes is known to cause alterations in the lateral pressure profile<sup>23,24</sup>, which in turn can influence the structure and function of transmembrane proteins like LHCII<sup>25,26,27</sup>. Based on energy transfer experiments in liposomes it has been hypothesized that lateral pressure exerted by MGDG facilitates the structural association of LHCII and photosystem II<sup>28</sup>. Spectroscopic measurements revealed that the structure of LHCII is sensitive to the molecular environment surrounding the protein<sup>29,30</sup>, thus one might expect MGDG to have a notable impact on the structure and stability of LHCII. However, the presence of MGDG in liposomes has not been found to influence the thermal stability of LHCII trimers significantly<sup>31</sup>. In this context, new methodical approaches are required to shed light on a potential effect of lateral pressure stabilizing LHCII.

Single-molecule force spectroscopy (SMFS) is an excellent technique to study the stability of individual domains of a transmembrane protein by measuring the force needed to unfold them, while pulling them out of the membrane<sup>32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42</sup>. Whereas thermal denaturation experiments address the overall protein structure, SMFS provides information about subdomains by sequentially unfolding them. SMFS has also been demonstrated to be a suitable technique to characterize lipid-protein interactions<sup>36,37</sup>. Recently, Scheuring and coworkers were able to apply SMFS to bacterial LH2 elucidating the free energy of oligomerization<sup>38</sup>. In the present work, SMFS has been used to study the mechanical stability of LHCII inserted in supported membranes as a function of lipid composition and oligomerization state. This allowed us to analyze the relationship between the structural stability of the protein and the physicochemical properties of its membrane environment, with particular emphasis on lateral pressure caused by MGDG (**Figure 1 b,c**). Furthermore, we investigated both trimeric and monomeric LHCII in order to localize the regions specifically contributing to trimer stability. Our findings indicate that MGDG matches the hourglass shape of LHCII thereby providing stability against unfolding.

## Results

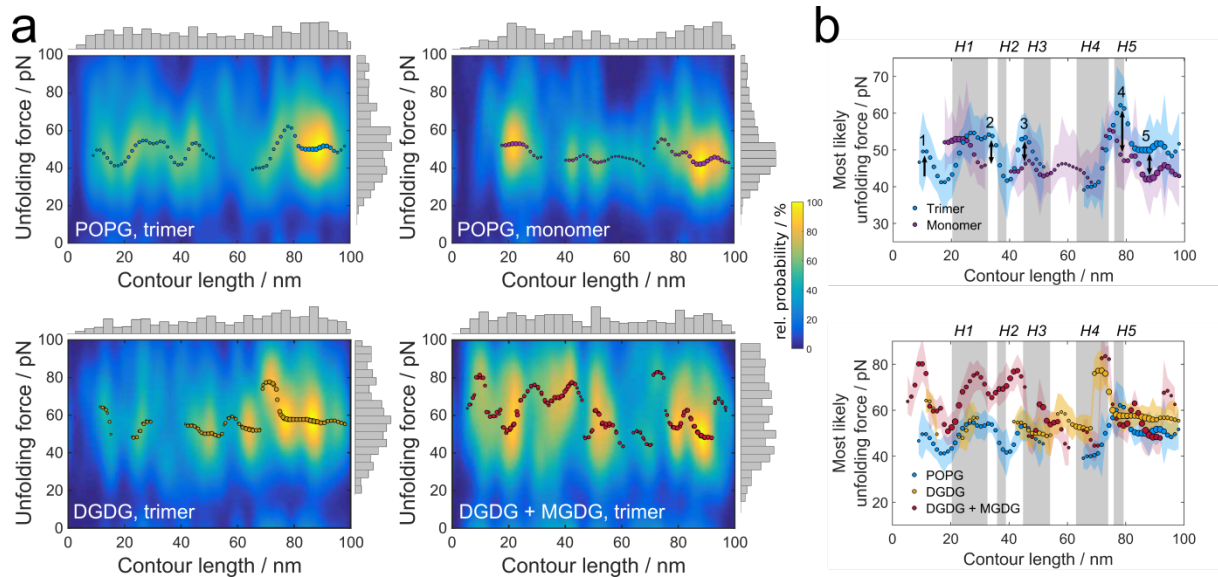
### Mechanical unfolding of LHCII

For atomic force microscopy (AFM) based unfolding experiments, recombinant LHCII was reconstituted into preformed liposomes, which were spread on a flat mica surface. Topographical AFM images of the supported lipid bilayers revealed connected bilayer patches (**Supplementary Figure 1**). The glycolipids (pure DGDG or DGDG/MGDG mixtures) showed a surface coverage of approximately 30%, while POPG had an increased surface coverage of 60%. Proteins were visible as elevated objects either ~1 nm or ~1.5 nm higher than the bilayer, approximately corresponding to luminal and stromal protrusions of LHCII, respectively<sup>3</sup>, and diameters in the order of 10 to 100 nm. Apparent differences in protein organization between the lipids were not observed. A Cys<sub>3</sub> cluster near the N-terminus of the LHCII apoprotein allowed stable and selective attachment to gold-coated AFM cantilever tips suitable for SMFS experiments (**Figure 1c**). Insertion of recombinant LHCII in artificial membranes presumably results in random up-down orientation; however, the N-proximal Cys<sub>3</sub>

attachment site permits to select those complexes for unfolding that expose their stromal surface<sup>32</sup>. The cantilever tip was brought into contact with the membrane surface and was then retracted to unfold the peptide chain as indicated by the saw tooth signature, characteristic for protein unfolding (**Figure 1d**), with each force peak representing unfolding of an individual segment of the polypeptide chain<sup>34,35</sup>. Only force-distance curves showing unfolding of the complete peptide chain were taken into account for further analysis as indicated by a force peak in a 10 nm interval around the contour length of the LHCII monomer estimated to be 88 nm. Each individual unfolding peak was fitted using the worm-like chain (WLC) model assuming a persistence length of 0.4 nm<sup>43,44</sup> to assess the contour length  $l_c$  of the unfolded segment and the corresponding unfolding forces (**Figure 1d**).

Frequent observation of a particular unfolding peak is usually linked to stable structural elements of the mechanically challenged protein that need not necessarily be identical with secondary-structure components<sup>33</sup>. Interestingly, the histogram of all contour lengths obtained by the WLC fits (**Figure 2a**, shown as histograms on the x-axes) revealed a very broad distribution with unfolding events almost evenly spread over the full length of the peptide chain. In contrast to unfolding experiments on numerous other proteins distinct peaks were absent (as illustrated in **Supplementary Figure 2**)<sup>32,36,37,39,40,41,42</sup>. The broad distribution might be attributed to the complex structure of LHCII forming a superhelix in combination with a high number of bound auxiliary pigments (see **Figure 1c**)<sup>2,3,45</sup>. In contrast to the contour length histograms, the corresponding unfolding force histograms are less broad and show a clear preference for unfolding forces around 50 pN dependent on the lipid matrix and the oligomerization state (**Figure 2a**, shown as histograms on the y-axes).

The common procedure for analysis of unfolding force curves is to map recurring unfolding peaks to stable elements and categorize every detected unfolding event accordingly. Due to the broad distribution of detected contour lengths such an analysis would be very unreliable and prone to false assignment of peaks to structural elements. Therefore, in order to circumvent categorization of unfolding events to structural elements, we estimated the probability to find a certain unfolding force at a given contour length as obtained from the WLC fits by using a multivariate kernel density estimate (**Figure 2a**). Analysis of this “stability map” then allowed us to relate the mechanical response of the polypeptide to the stabilization of structural elements depending on different intrinsic and environmental conditions (see below). In order to compare unfolding forces between different experiments we considered the most likely unfolding force as a function of the contour length (colored dots in **Figure 2a**, **Figure 2b**). To find the most prominent contributions to protein stability, only unfolding events with a likelihood of at least 40% of the most probable unfolding event were selected. This also sorts out unfolding events with unfolding forces above 100 pN, which we attribute to simultaneous unfolding of more than one monomer attached to the cantilever in parallel.



**Figure 2 Unfolding forces of LHCII depend on trimerization and the lipid matrix.** (a) Multivariate kernel density estimate of the unfolding force as a function of the contour length for LHCII monomers in POPG (top right) and LHCII trimers in POPG (top left), pure DGDG (bottom left) and a mixture of DGDG and MGDG (bottom right). The dots mark the most likely unfolding forces for a given contour length, while the diameter of the dots represents their relative probability of at least 40% in relation to the most probable unfolding event. The histograms (grey) at the axes show the individual underlying distributions of unfolding forces and contour lengths. (b) Most likely unfolding force as a function of the contour length (obtained from the dots in (a)) as a function of oligomerization state (top) and lipid mixture (bottom). Helices (H1-5) are indicated as shaded gray areas. The color shaded areas indicate the standard error of the most likely unfolding force. The trimer shows enhanced stabilization compared to the monomer in distinct domains of the protein, indicated by numbers 1 to 5. Both glycolipids provide additional stability for trimeric LHCII at helix 4, while the addition of MGDG strongly increases the unfolding forces in many segments along the LHCII polypeptide.

### Impact of LHCII trimerization

LHCII monomers inserted in PG-containing membranes tend to trimerize spontaneously<sup>46</sup>; therefore, in order to address the impact of trimerization on the mechanical stability of LHCII, a LHCII variant was used with two point mutations in its trimerization motif (positions 16 and 17) that render the protein incapable of trimerization, as described earlier<sup>8</sup>. For comparing LHCII monomers and trimers, the complexes were inserted into membranes consisting of POPG exclusively. The distribution of unfolding forces (Figure 2a, shown as histograms on the y-axes) reveals that the most frequent unfolding force is increased by around 10 pN from monomers to trimers, demonstrating a slightly stabilizing effect of trimerization on LHCII. This is in agreement with previous thermal denaturation experiments revealing an increased stability of the trimer<sup>7</sup>.

Comparing the most likely unfolding force at each contour length (colored dots in Figure 2a top left, top right) for monomeric LHCII and a single LHCII polypeptide unfolded out of the trimer reveals selective stabilization in the trimer. In some contour length intervals unfolding forces in the trimer are similar to those in the monomer, whereas in other parts of the polypeptide -although most of the disparities are not significant unless stated otherwise- the forces are higher for trimers than for

monomers (**Figure 2b top**). While the N-terminal hydrophilic domain at contour lengths of  $l_C \approx 10$  nm shows no detectable unfolding events for the monomer, there is a high probability to observe unfolding events for trimeric LHCII (**Figure 2b top**, indicated by 1). Along those lines, unfolding forces of the trimer were generally higher from  $l_C \approx 27$  nm to  $l_C \approx 34$  nm ( $\Delta F \approx 8$  pN), at  $l_C \approx 47$  nm ( $\Delta F \approx 7$  pN),  $l_C \approx 77$  nm ( $\Delta F \approx 12$  pN), and for the C-terminus at  $l_C > 82$  nm ( $\Delta F \approx 8$  pN, same figure, indicated by 2, 3, 4 and 5, respectively). Interestingly, in two segments of the protein, unfolding forces were slightly higher for the monomer than for the trimer (from  $l_C \approx 15$  nm to  $l_C \approx 25$  nm and from  $l_C \approx 65$  nm to  $l_C \approx 70$  nm).

Stabilization of the trimer compared to the monomer, as indicated by higher unfolding forces, can be linked to interactions in distinct protein domains facilitating LHCII trimerization. Both the N-terminus and the C-terminus have previously been described to be important for trimerization based on mutation analysis<sup>8,9</sup> and structural data<sup>2</sup>, which is mirrored here in the significant stabilization at  $l_C \approx 10$  nm (peak 1) and the stabilization at  $l_C > 82$  nm (peak 5). The key trimerization motif has been identified as WYGPDR at aa17 - aa22 ( $l_C = 6-8$  nm)<sup>8</sup>. However, detaching the cantilever tip from the membrane surface causes adhesion peaks at the beginning of each force-distance curve that may obscure unfolding events in the very proximal segment of the N-terminus. Hence, the precision in determining contour lengths in this domain is not sufficient to be sure that the peak at  $l_C \approx 10$  nm is in fact due to the trimerization motif.

A critical factor for trimerization is the binding of pigments and lipids. Liu *et al.* pointed out an important role of helix 3 by coordinating several Chl *b* molecules, mediating hydrophobic interactions between adjacent monomers<sup>2</sup>. Here, we may observe a contribution to trimer stability by one chlorophyll in particular: Chl8 (nomenclature according to Standfuß *et al.*<sup>3</sup>) is bound to two different monomers via coordination of the central  $Mg^{2+}$  by His212 ( $l_C = 77$  nm, corresponding to peak 4 within helix 5) of one monomer and hydrophobic interaction of the phytol tail with Trp128 ( $l_C = 47$  nm, corresponding to peak 3 at the beginning of helix 3) of the other monomer (**Supplementary Figure 3**). In addition, Trp222 ( $l_C = 81$  nm) has been described to be a sensitive site for trimer formation and stability<sup>9,45</sup>, which may explain an enhanced stabilizing effect at peak 4 compared to the other regions.

Liu *et al.* identified Chl4 and Chl5 bound via Glu65 ( $l_C = 24$  nm) and His68 ( $l_C = 25$  nm), respectively, to be crucial for the trimer structure<sup>2</sup>. However, unfolding forces of trimeric and monomeric LHCII show little differences at these contour lengths. Strong intramolecular interactions, like the salt bridge at the helix cross between helix 1 at Arg70 ( $l_C = 25$  nm) and helix 3<sup>45</sup>, may be dominating in this segment, obscuring the effect of neighboring monomers as discussed by Sapra *et al.* for bacteriorhodopsin assemblies<sup>47</sup>.

There is no straightforward assignment of the significant stabilization between  $l_C \approx 27$  nm and  $l_C \approx 34$  nm (region 2) to the structure of LHCII. This contour length interval corresponds to the luminal end of the transmembrane helix 1 and the amphiphilic helix 2. However, Liu *et al.* found a highly reduced degree of trimerization after an exchange of W97 to alanine ( $l_C = 35$  nm) at the beginning of helix 2<sup>48</sup>, representing a binding site for lutein 2<sup>45</sup>. This pigment has been suggested to assume a

trimer specific conformation<sup>7</sup>, indicating that lutein 2 and hence W97 might contribute to the stability of trimeric LHCII to a certain extent as reflected by our data.

It seems surprising that we observed one position at the N-terminal domain close to helix 1 and one at the beginning of helix 4 with higher unfolding forces for the monomer than for the trimer. The PG molecule bound to LHCII via Tyr44 ( $l_C = 16$  nm) and Lys182 ( $l_C = 66$  nm)<sup>3</sup> has been identified to be a major factor in trimerization<sup>49,50</sup>. Moreover, there are indications that the monomeric complex alone is not able to bind PG<sup>50</sup>. While PG facilitates trimer formation, electrostatic repulsion between the negatively charged head groups of the bound lipid and the membrane lipids is energetically unfavorable and might destabilize the trimeric protein at these positions in a POPG matrix.

### Effect of lipid matrix

To assess the impact of the lipid matrix on the mechanical stability of LHCII we performed unfolding experiments with trimeric LHCII in three different lipid matrices: pure POPG, pure DGDG and a mixture of DGDG and MGDG (2:1). Lipid mixtures containing more than roughly 30 % MGDG no longer form lipid vesicles<sup>51</sup>, therefore we abstained from using higher percentages of MGDG, expecting that if the lateral membrane pressure has an effect on LHCII, this is seen at 30 % MGDG. Since neither of the bilayer lipids POPG and DGDG affects the lateral pressure profile of a lamellar membrane, differences in unfolding forces between these lipid environments can primarily be attributed to the charge of the lipid head groups (**Figure 1 a,b**). Alterations in protein stability upon addition of 30% non-bilayer lipid MGDG to DGDG membranes provide information about the impact of the modified lateral pressure profile<sup>24</sup>, while the charge of the membrane and the chemical properties of the head groups remain unaffected.

The distribution of unfolding forces varies only little between the two cylindrical lipids POPG and DGDG (**Figure 2a top left, bottom left**; shown on the y-axes). When considering the most likely unfolding force for every contour length, the N-terminus around  $l_C \approx 10$  nm and the region from the end of the stromal loop to the beginning of helix 4 around  $l_C \approx 60$  nm are slightly more stable ( $\Delta F \approx 10$  pN) in DGDG compared to POPG (**Figure 2b bottom**). The luminal side of helix 4 from  $l_C \approx 70$  nm to  $l_C \approx 75$  nm is greatly stabilized ( $\Delta F \approx 25$  pN) in both glycolipid matrices (DGDG and DGDG+MGDG). This narrow peak points to a protein domain interacting with lipid head groups on the luminal side of helix 4.

Adding MGDG to the DGDG membrane significantly raises the overall occurrence of unfolding forces above 70 pN (**Figure 2a bottom left, bottom right**; shown on the y-axes) and strongly enhances the unfolding forces in several segments of the protein (**Figure 2b bottom**). Unfolding forces are increased by up to 20 pN from  $l_C \approx 6$  nm to  $l_C \approx 12$  nm close to the N-terminus, from  $l_C \approx 24$  nm to  $l_C \approx 32$  nm within helix 1, from  $l_C \approx 34$  nm to  $l_C \approx 46$  nm comprising helix 2, the luminal loop and part of helix 3, and from  $l_C \approx 50$  nm to  $l_C \approx 54$  nm at the stromal side of helix 3. In contrast to the protein stabilization due to trimer formation, the stabilized regions along the peptide chain due to the

surrounding lipids are rather broad extending over up to 30 amino acids, indicating a regional stabilization rather than local interactions between individual amino acids.

## Discussion

### **Unfolding monomers and trimers reveals a connection between structure and stability of LHCII, despite the structural intricacy of the pigment-protein complex**

Site-directed and complete unfolding of recombinant LHCII by SMFS was facilitated by linking the cantilever to an N-proximally introduced Cys<sub>3</sub> cluster<sup>32</sup>. In contrast to other transmembrane proteins studied by SMFS<sup>32,36,37,39,40,41,42</sup>, unfolding of different LHCII peptides does not always follow the same unfolding trajectory as indicated by the notable absence of clear peaks in the unfolding contour length histograms (**Figure 2a**; see also **Supplementary Figure 2**). Since the broad distribution of contour lengths could in principle also arise from careless data evaluation or experimental errors, a number of quality control measures were taken to minimize the impact of those effects. To this end, the protein was site-specifically linked to the cantilever at the amino-terminus, with the aim to reduce the impact of nonspecific adhesion and random pulling from the stromal or the luminal side during the unfolding experiments. Notably we do not observe any symmetry in the most frequent unfolding forces along the LHCII polypeptide, which would indicate stochastic pulling from either the N- or the C-terminus (**Figure 2b**). Nonspecific attachment of the cantilever to the stromal or luminal loop leads to force-distance curves with unfolding events at tip-sample separations much shorter than 78 nm, which were excluded from analysis. Similarly, force-distance curves lacking the characteristic WLC shape of protein unfolding were not analyzed. Additionally, the AFM setup used here has low instrumental noise with a standard deviation of 4 pN due to rigorous screening against external acoustic sources.

Therefore, we ascribe our findings to the intricate structure of the protein. The two tilted helices 1 and 4 are interlocked by two salt bridges, forming a super-secondary structure<sup>3,45</sup> (see **Figure 1c**). In addition, the high number of pigments coordinated by LHCII (18 per monomer) leads to added links between different segments of the polypeptide, each capable to stabilize the protein structure. Considering more than 20 known pigment binding sites<sup>45</sup> and the contour length of the LHCII monomer of 88 nm, the average distance along the peptide chain between two pigment binding sites is around 4 nm. Assuming an experimental error for the determination of the contour length of an unfolded segment of 2 nm (as a lower bound), it becomes clear that adjacent pigment binding sites cannot be resolved with the current experimental capabilities according to this simple calculation.

By analyzing the most likely unfolding force at every position along the polypeptide chain we avoided to focus on selected structural elements in the protein originating from the frequency of contour lengths only. We used this approach to analyze unfolding curves of the LHCII trimer and an LHCII point mutant incapable of trimerization, revealing localized differences in unfolding forces between monomeric and trimeric LHCII which can be directly linked to the protein structure. Although not at all

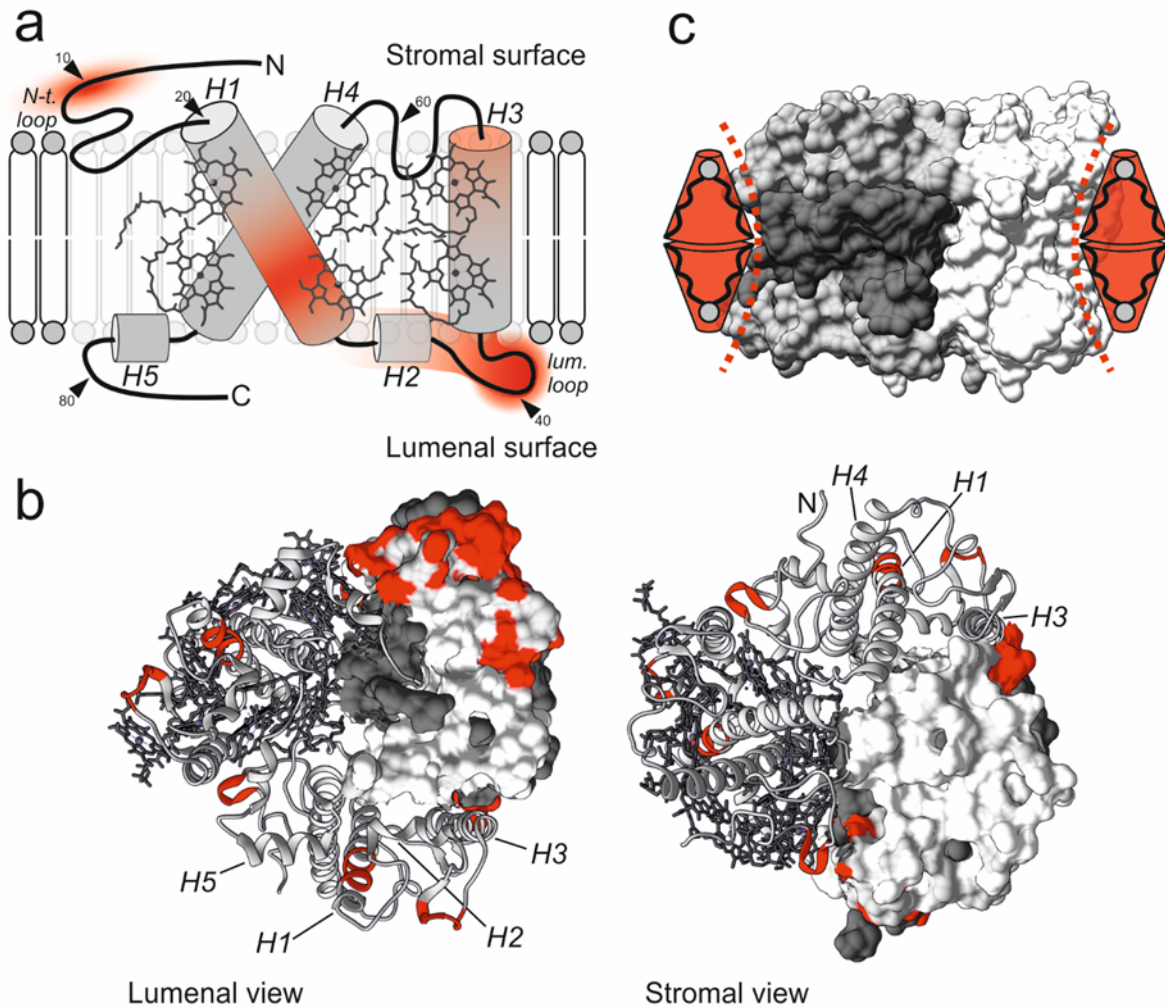
positions along the contour of the protein statistically secured, we find this approach for data analysis reasonable as the disparities in unfolding forces due to trimerization can be largely correlated with previously published structural and biochemical data. We therefore relied on the method to further explore how the stability of LHCII is modulated by the lipid matrix surrounding the protein. In contrast to the rather subtle impact of oligomerization on the unfolding forces of LHCII we found that the lipid matrix has a substantial influence on protein stability as discussed below.

### Lateral pressure by MGDG greatly stabilizes trimeric LHCII due to its hourglass shape

The regions of the LHCII trimer that are stabilized in DGDG compared to POPG membranes are mainly located in the extra-membrane domains of the protein in plane with the lipid head groups, suggesting a destabilizing impact of the negatively charged phosphate group and/or stabilizing effects by the galactose moieties (**Figure 2b bottom**). The N-terminal region from  $l_C \approx 11$  nm to  $l_C \approx 13$  nm is rich in polar amino acids (Ser29, Ser32, Ser34, Tyr35 and Thr37) capable of forming hydrogen bonds with the sugar residues, which may lead to an increased stability by both glycolipids (MGDG and DGDG) in this segment of the polypeptide. Negatively charged amino acids (Asp162, Asp168, Asp169 and Glu171) in the stromal loop from  $l_C \approx 59$  nm to  $l_C \approx 62$  nm may generate repulsive ionic interactions with phosphate head groups and thus destabilize the protein at the end of the stromal hydrophilic domain in a POPG matrix. In addition, repulsive forces due to the bound PG-molecule at  $l_C \approx 66$  nm may extend the destabilization of this segment to the stromal side of helix 4, similar to the statement made above for the comparison of the monomer and the trimer<sup>3</sup>. The greatly enhanced stabilization of LHCII against unfolding by both glycolipid mixtures at the luminal side of helix 4 around  $l_C \approx 75$  nm probably arises from hydrogen bonds between the corresponding polar amino acids (Gln197, Thr201 and Lys203) and the galactose rings of either DGDG or MGDG, as the presence of positively charged Lys203 renders a repulsive ionic interaction with the POPG head group highly unlikely. However, besides the vast chemical differences between POPG and DGDG, especially considering the different charges, disparities in unfolding force are minuscule.

By contrast, large differences are seen in unfolding forces between the DGDG/MGDG mixture and pure DGDG, despite the similarities between DGDG and MGDG with regard to charge and functional groups. This rules out specific or electrostatic interactions as a reason for the mechanical stabilization. The stabilizing effect of MGDG is not restricted across the membrane plane since it includes transmembrane as well as extra-membrane domains of LHCII (shown as schematic representation in **Figure 3a**). A view on the stromal and luminal faces of LHCII reveals that the stabilization is confined to the periphery of the trimer where it is in direct contact with the lipid matrix (**Figure 3b**). We therefore attribute the stabilization to steric interactions between the hourglass shape of trimeric LHCII and the conical shape of MGDG (**Figure 3c**), pointing to bulk physical properties of the lipid since it is not part of the LHCII structure<sup>2</sup>. Our results are in accordance with recent simulations demonstrating that concavely formed proteins are energetically favored in membrane domains exhibiting negative curvature stress<sup>52</sup>, which is a measure for alterations in the lateral membrane pressure profile induced

by non-bilayer lipids such as MGDG<sup>26,24</sup>. Yang *et al.* monitored the dissociation of LHCII trimers into monomers as a function of thylakoid lipid composition, showing only a slight effect of MGDG<sup>31</sup>. This is in agreement with our data as the impact of MGDG is particularly intense in the periphery of LHCII (**Figure 3b**), whereas trimerization is mainly based on pigment mediated interactions in the hydrophobic core<sup>2</sup>.



**Figure 3 Lateral pressure by MGDG stabilizes LHCII in a structure dependent manner.** (a) Schematic presentation of the LHCII monomer structure with degree of stabilization by MGDG (red color gradient) derived from **Figure 2b**. Stabilization comprises domains in the transmembrane (helices H1 and H3) and extra-membrane domains (N-terminus, H2 and luminal loop) of the protein; small arrows indicate contour length positions along the LHCII polypeptide. (b) Hotspots of MGDG mediated stabilization (red) in the crystal structure of LHCII from luminal and stromal view corresponding to the highest intensities in (a) and  $I_c \pm 1\text{nm}$  of the peak centers in **Figure 2b** respectively. The effect of MGDG is the strongest in the periphery of the protein. Within a trimer, the monomers are represented by the surface structure, the tertiary structure (helices H1-H5 indicated) with and without pigments; gray or white: polypeptide, dark gray: pigments. (c) Steric interplay between trimeric LHCII and MGDG. Stabilization of LHCII is accomplished as the concave-like surface structure of trimeric LHCII (emphasized with dashed lines) matches the conical shape of MGDG (red); colors (gray: polypeptide, dark gray: pigments) highlight one LHCII monomer within the trimeric assembly. Structures obtained with Chimera and PDB ID code 2BHW.

A lot of attention has been paid to how non-bilayer lipids, particularly phosphatidylethanolamine (PE) representing up to 38% of the inner mitochondrial membrane lipids<sup>53</sup>, modulate the folding, conformation and functionality of integral membrane proteins<sup>26,27</sup> (see also references therein). However, only little is known about their impact on the stability of transmembrane proteins, even though complementary shapes of transmembrane proteins and lipids appear to be a widespread phenomenon. The concavely formed ion channel gramicidin and the non-bilayer lipid lysophosphatidylcholine as well as the potassium channel KcsA and PE are prominent examples for the proposed steric interplay<sup>54,55</sup>. Unfolding of LHCII via SMFS allowed us to observe a stabilizing effect of complementary lipid and protein shapes (as illustrated in **Figure 3c**), thereby displaying the impact of the lateral pressure profile over the whole membrane cross section (**Figure 3a**). While LHCII is needed to stabilize MGDG in a lamellar phase, our data clearly show that vice versa MGDG increases the mechanical stability of LHCII. Our results will contribute to the ongoing discussion of the role on non-bilayer lipids in many biological membranes.

## Methods

### Preparation of recombinant LHCII

The LHCII variants used in this study were derivatives of Lhcb1\*2 (AB80) gene from pea (*Pisum sativum*)<sup>56</sup> containing a C-terminal hexahistidine (His<sub>6</sub>) tag and having the native cysteine at position 79 replaced with serine. In order to achieve site-specific unfolding a cysteine motif (Cys-Cys-Cys) was added at the N-terminus of the protein by using the Phusion site-directed mutagenesis kit (Thermo Scientific). This version also served as a template to construct the LHCII variant WY16,17AV<sup>8</sup> by using the QuikChange Lightning site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies), which was applied for the monomer studies. The genes were inserted in the pDS12-RBSII vector and overexpressed overnight in *Escherichia coli* strain JM101, followed by isolation of the apoprotein according to established protocols<sup>57</sup>. The apoprotein was reconstituted to monomeric LHCII with total pigment extract from pea thylakoids<sup>58</sup> by the detergent exchange method<sup>59</sup>. His<sub>6</sub> tag mediated trimerization of the monomers was performed on Ni<sup>2+</sup>-sepharose columns<sup>60</sup>, followed by purification via ultracentrifugation through a sucrose density gradient as described earlier<sup>61</sup>, but using a different buffer (500 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM TCEP, 0.05% (w/v) Triton X-100). In case of the variant WY16,17AV the trimerization step was omitted and the reconstitution mix was directly loaded on the sucrose gradient containing a higher concentration of Triton X-100 (0.1%). The bands corresponding to LHCII trimers or monomers (in case of WY16,17AV) respectively were collected and checked for correct assembly via CD spectroscopy on a J-810 spectropolarimeter (Jasco) in the visible range, with trimeric LHCII exhibiting a characteristic negative peak at 474 nm<sup>61</sup>. For insertion into preformed liposomes the buffer was exchanged to AFM buffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM TCEP) using Amicon 30-kDa centrifugal filters, while the suspension still contained Triton X-100.

## Reconstitution of LHCII into liposomes

Lipid aliquots of pure POPG (purchased from Avanti Polar Lipids), pure DGDG or a mixture of DGDG and MGDG (each lipid purchased from Lipid Products) at a molar ratio of 2:1 were dissolved in chloroform. The chloroform was slowly removed in a rotary evaporator by which a thin lipid film was formed on the inner wall of a glass flask. After complete removal of the solvent under high vacuum at 40 °C for 1 h, the lipid film was hydrated by rigorous mixing (3 x 30 s at 60 °C, MS2 minishaker, IKA) in AFM buffer at a total lipid concentration of 1.5 mM to produce preformed liposomes. For MGDG containing samples the mixing step was repeated several times until no more lipid traces could be detected by eye on the bottom of the flask. Sonication in a tip sonicator (Vibra cell, Sonics & Materials) for 4 min, followed by 3 freeze-thaw cycles, yielded large unilamellar vesicles. The vesicle suspension was then extruded 21 times (LipoFast-Basic, Avestin) through a polycarbonate membrane (pore diameter 100 nm) and mixed with Triton X-100 to a final concentration of 0.05% (w/v). Reconstitution of recombinant LHCII into preformed liposomes was performed according to established protocols<sup>31</sup>, but with some modifications: the protein suspension was added dropwise under continuous mixing at 4 °C in the dark to a molar lipid/protein ratio of 500–1000, and subsequently polystyrene beads (Bio-Beads SM-2; Bio-RAD) at 30 mg/ml were added. In order to remove Triton X-100 the mixture was incubated overnight under constant rotating at 4 °C in the dark, and the supernatant was removed to a new tube containing fresh Bio-Beads, followed by incubation for 1 h. The last step was repeated, and finally the supernatant was collected. The inserted LHCII trimers or monomers were checked for integrity on a FluoroMax-2 spectrometer (Horiba Scientific) as described earlier<sup>60</sup>.

## SMFS experiments

Prior to the SMFS experiments, proteoliposomes were extruded 21 times (LipoFast-Basic, Avestin) through a polycarbonate membrane (pore diameter 100 nm). CaCl<sub>2</sub> solution (100 mM) was added to a final concentration of 5 mM and the suspension (60 µl) was incubated for 10 min on freshly cleaved mica, leading to surface supported bilayers containing LHCII proteins (**Supplementary Figure 1**). Nonadsorbed vesicles were removed by intensive rinsing (4 x 1 ml) with AFM buffer. SMFS measurements were conducted in AFM buffer at room temperature using a commercial atomic force microscope (MFP-3D Infinity, Oxford Instruments Asylum Research) and gold-coated silicon nitride cantilevers (Biolever, Olympus). Each cantilever was calibrated with the thermal noise method yielding spring constants around 6 pN/nm. The cantilever was moved toward the surface at 500 nm/s until a load force of 100 pN was reached. The tip was kept in contact with the membrane for 1 s to allow for binding of the Cys<sub>3</sub>-motif at the N-terminus of LHCII to the gold-coated cantilever tip. The cantilever was then retracted at 1000 nm/s to unfold the peptide, giving rise to a force-distance curve. For each sample only a single force-distance curve was collected within an area of 1 µm<sup>2</sup> and each area of the supported bilayer was only scanned once. Roughly 10% of the curves showed force peaks corresponding to unfolding events of the protein, of which ~7% exhibited a force peak corresponding to a contour length of 88 ± 10 nm indicating full unfolding of the LHCII polypeptide. Only the latter were

selected for further analysis, thus more than 25,000 force-distance curves were recorded for each experimental condition to obtain a sufficient number of curves showing full unfolding (monomer in POPG:  $n = 193$  out of  $\sim 30,000$  curves; trimer in POPG:  $n = 328$  out of  $\sim 50,000$  curves; trimer in DGDG:  $n = 262$  out of  $\sim 50,000$  curves; trimer in DGDG/MGDG:  $n = 195$  out of  $\sim 25,000$  curves). The SMFS measurements were repeated at least 3 times for each experimental condition.

### SMFS data analysis

Only force-distance curves showing the saw tooth signature characteristic for protein unfolding with an unfolding peak corresponding to a contour length of  $88 \pm 10$  nm were selected for further analysis. Each individual unfolding peak was fitted using a WLC model<sup>43,44</sup>:

$$F(x) = \frac{k_B T}{b} \left( \frac{1}{4} \left( 1 - \frac{x}{l_C} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{x}{l_C} \right)$$

with the force  $F(x)$  at tip-sample separation  $x$ , the Boltzmann constant  $k_B$ , the persistence length  $b = 4 \text{ \AA}$ , the contour length of the unfolded peptide  $l_C$  and the temperature  $T = 298 \text{ K}$ . Additionally, the peak force  $F_{max}$  of each unfolding peak was recorded. To estimate the distribution of the value pairs of  $l_C$  and  $F_{max}$  for all recorded unfolding events, we calculated a multivariate kernel density estimate using the approximated experimental uncertainty  $\sigma(l_C) = 2 \text{ nm}$  and  $\sigma(F) = 12 \text{ pN}$  as kernel bandwidths, as estimated from the standard deviation of the measured force during the baseline of the force-distance curve, i.e. recorded far away from the surface. The uncertainty of the contour length was calculated from the uncertainty of the measured force and the spring constant. This gives us an unfolding force distribution at any given contour length. The maxima of these distributions give us the most likely unfolding force  $F^*$  as a function of the contour length. The most likely unfolding force was evaluated at discrete contour lengths with a fixed distance between two points  $\Delta l_C = 1.25 \text{ nm}$ . As an estimate of the uncertainty of the most likely unfolding force we calculated the standard error of the most likely unfolding force  $\sigma(F^*)$  for each contour length  $l_C$  as

$\sigma(F^*) = \sqrt{\frac{\text{Var}(F_{max})}{N}}$ , using the variance  $\text{Var}(F_{max})$  of all measured unfolding forces  $F_{max}$  in the interval  $l_C \pm \frac{1}{2} \Delta l_C$  and the number of data points in that interval  $N$ .

## Structure representation

The LHCII structure (PDB ID 2BHW)<sup>3</sup> representation was created using the UCSF chimera package<sup>62</sup>.

## Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## References

1. Horton, P., Wentworth, M. & Ruban, A. V. Control of the light harvesting function of chloroplast membranes: the LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *FEBS Lett* **579**, 4201–4206 (2005).
2. Liu, Z. *et al.* Crystal structure of spinach major light harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428**, 287–292 (2004).
3. Standfuss, J., van Scheltinga, A. C. T., Lamborghini, M. & Kühlbrandt, W. Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J* **24**, 919–928 (2005).
4. Dreyfuss, B. W. & Thornber, J. P. Assembly of the light-harvesting complexes (LHCs) of Photosystem II. *Plant Physiol* **106**, 829–839 (1994).
5. Garab, G. *et al.* Light-induced trimer to monomer transition in the main light-harvesting antenna complex of plants: thermo-optic mechanism. *Biochemistry* **41**, 15121–15129 (2002).
6. Yang, D.-H., Paulsen, H. & Andersson, B. The N-terminal domain of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein complex (LHCII) is essential for its acclimative proteolysis. *FEBS Lett* **466**, 385–388 (2000).
7. Wentworth, M., Ruban, A. V. & Horton, P. The functional significance of the monomeric and trimeric States of the photosystem II light harvesting complexes. *Biochemistry* **43**, 501–509 (2004).
8. Hobe, S., Förster, S., Klingler, J. & Paulsen, H. N-proximal sequence motif in light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *Biochemistry* **34**, 10224–10228 (1995).
9. Kuttkat, A., Hartmann, A., Hobe, S. & Paulsen, H. The C-terminal domain of light-harvesting chlorophyll-*a/b*-binding protein is involved in the stabilisation of trimeric light-harvesting complex. *Eur J Biochem* **242**, 288–292 (1996).
10. Douce, R. & Joyard, J. Biochemistry and function of the plastid envelope. *Annu Rev Cell Biol* **6**, 173–216 (1990).
11. Hoyo, J., Gaus, E. & Torrent-Burgués, J. Monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol role, physical states, applications and biomimetic monolayer films. *Eur Phys J E* **39** (2016).
12. Simidjiev, I. *et al.* Self-assembly of large, ordered lamellae from non-bilayer lipids and integral membrane proteins *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1473–1476 (2000).

13. Jarvis, P. *et al.* Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the Arabidopsis MGD synthase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8175–8179 (2000).
14. Pali, T., Garab, G., Horvath, L. I. & Kota, Z. Functional significance of the lipid-protein interface in photosynthetic membranes. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1591–1606 (2003).
15. Deme, B., Cataye, C., Block, M. A., Marechal, E. & Jouhet, J. Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *FASEB J* **28**, 3373–3383 (2014).
16. Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A. & Biesiadka, J. Lipids in photosystem II: interactions with protein and cofactors. *Biochim Biophys Acta* **1767**, 509–519 (2007).
17. Jones, M. R. Lipids in photosynthetic reaction centres: structural roles and functional holes. *Prog Lipid Res* **46**, 56–87 (2007).
18. Laval-Martin, D. & Troton, D. Chilling-resistance of photosynthetic performances in diuron-adapted *Euglena gracilis*. *Plant Sci* **72**, 213–222 (1990).
19. Harwood, J. L. Involvement of chloroplast lipids in the reaction of plants submitted to stress. *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands)*, 290–300 (1998).
20. Gigon, A., Matos, A.-R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y. & Pham-Thi, A.-T. Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Columbia). *Ann Bot* **94**, 345–351 (2004).
21. Dankov, K. G. *et al.* LHCII organization and thylakoid lipids affect the sensitivity of the photosynthetic apparatus to high-light treatment. *Plant Physiol Bioch* **49**, 629–635 (2011).
22. Kirchhoff, H., Tremmel, I.G., Haase, W. & Kubitscheck, U. Supramolecular photosystem II organization in grana thylakoid membranes: evidence for a structured arrangement. *Biochemistry* **43**, 9204–9213 (2004).
23. Ding, W., Palaikostas, M., Wang, W. & Orsi, M. Effects of lipid composition on bilayer membranes quantified by all-atom molecular dynamics. *J Phys Chem B* **119**, 15263–15274 (2015).
24. Baczynski, K., Markiewicz, M. & Pasenkiewicz-Gierula, M. A computer model of a polyunsaturated monogalactolipid bilayer. *Biochimie* **118**, 129–140 (2015).
25. Kruijff, B. de. Lipids beyond the bilayer. *Nature* **386**, 129–130 (1997).
26. van den Brink-van der Laan, Els, Antoinette Killian, J. & Kruijff, B. de. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim Biophys Acta* **1666**, 275–288 (2004).
27. Brown, M. F. Curvature forces in membrane lipid–protein interactions. *Biochemistry* **51**, 9782–9795 (2012).
28. Zhou, F. *et al.* Effect of monogalactosyldiacylglycerol on the interaction between photosystem II core complex and its antenna complexes in liposomes of thylakoid lipids. *Photosynth Res* **99**, 185–193 (2009).
29. Pandit, A. *et al.* Assembly of the major light-harvesting complex II in lipid nanodiscs. *Biophys J* **101**, 2507–2515 (2011).
30. Akhtar, P. *et al.* Pigment interactions in light-harvesting complex II in different molecular environments. *J Biol Chem* **290**, 4877–4886 (2015).
31. Yang, C., Boggasch, S., Haase, W. & Paulsen, H. Thermal stability of trimeric light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHCIIb) in liposomes of thylakoid lipids. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1642–1648 (2006).

32. Oesterhelt, F. *et al.* Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins. *Science* **288**, 143–146 (2000).
33. Kedrov, A., Janovjak, H., Sapra, K. T. & Müller, D. J. Deciphering molecular interactions of native membrane proteins by single-molecule force spectroscopy. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**, 233–260 (2007).
34. Engel, A. & Gaub, H. E. Structure and mechanics of membrane proteins. *Annu Rev Biochem* **77**, 127–148 (2008).
35. Bippes, C. A. & Müller, D. J. High-resolution atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins. *Rep Prog Phys* **74**, 86601 (2011).
36. Zocher, M., Zhang, C., Rasmussen, S. G. F., Kobilka, B. K. & Müller, D. J. Cholesterol increases kinetic, energetic, and mechanical stability of the human 2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E3463–E3472 (2012).
37. Serdiuk, T., Sugihara, J., Mari, S. A., Kaback, H. R. & Müller, D. J. Observing a lipid-dependent alteration in single lactose permeases. *Structure* **23**, 754–761 (2015).
38. Liu, L.-N., Duquesne, K., Oesterhelt, F., Sturgis, J. N. & Scheuring, S. Forces guiding assembly of light-harvesting complex 2 in native membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9455–9459 (2011).
39. Ge, L. *et al.* Molecular plasticity of the human voltage-dependent anion channel embedded into a membrane. *Structure* **24**, 585–594 (2016).
40. Maity, S. *et al.* Conformational rearrangements in the transmembrane domain of CNGA1 channels revealed by single-molecule force spectroscopy. *Nat Commun* **6**, 1–15 (2015).
41. Damaghi, M. *et al.* Dual energy landscape: the functional state of the  $\beta$ -barrel outer membrane protein G molds its unfolding energy landscape. *Proteomics* **10**, 4151–4162 (2010).
42. Bippes, C. A. *et al.* Peptide transporter DtpA has two alternate conformations, one of which is promoted by inhibitor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E3978–E3986 (2013).
43. Bustamante, C., Marko, J. F., Siggia, E. D. & Smith, S. Entropic elasticity of  $\lambda$ -phage DNA. *Science* **265**, 1599–1600 (1994).
44. Rief, M., Gautel, M., Oesterhelt, F., Fernandez, J. M. & Gaub, H. E. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* **276**, 1109–1112 (1997).
45. Barros, T. & Kühlbrandt, W. Crystallisation, structure and function of plant light-harvesting complex II. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 753–772 (2009).
46. Werwie, M., Xu, X., Haase, M., Basché, T. & Paulsen, H. Bio serves nano: biological light-harvesting complex as energy donor for semiconductor quantum dots. *Langmuir* **28**, 5810–5818 (2012).
47. Sapra, K. T., Besir, H., Oesterhelt, D. & Müller, D. J. Characterizing molecular interactions in different characterizing molecular interactions in different bacteriorhodopsin assemblies by single-molecule force spectroscopy. *J Mol Biol* **355**, 640–650 (2006).
48. Liu, C., Rao, Y., Zhang, L. & Yang, C. Identification of the roles of individual amino acid residues of the helix E of the major antenna of photosystem II (LHCII) by alanine scanning mutagenesis. *J Biochem* **156**, 203–210 (2014).
49. Trémolières, A., Dubacq, J.-P., Ambard-Bretteville, F. & Rémy, R. Lipid composition of chlorophyll-protein complexes. Specific enrichment in trans-hexadecenoic acid of an oligomeric form of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. *FEBS Lett* **130**, 27–31 (1981).
50. Nußberger, S., Dörr, K., Wang, D. N. & Kühlbrandt, W. Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex. *J Mol Biol* **234**, 347–356 (1993).

51. Sprague, S. G. & Staehelin, A. Effects of reconstitution method on the structural organization of isolated chloroplast membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* **777**, 306–322 (1984).
52. Frewein, M., Kollmitzer, B., Heftberger, P. & Pabst, G. Lateral pressure-mediated protein partitioning into liquid-ordered/liquid-disordered domains. *Soft Matter* **12**, 3189–3195 (2016).
53. Daum, G. & Vace, J. E. Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res* **36**, 103–130 (1997).
54. Kelkar, D. A. & Chattopadhyay, A. The gramicidin ion channel: a model membrane protein. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 2011–2025 (2007).
55. van den Brink-van der Laan, Els, Chupin, V., Killian, J. A. & Kruijff, B. de. Stability of KcsA tetramer depends on membrane lateral pressure. *Biochemistry* **43**, 4240–4250 (2004).
56. Cashmore, A. R. Structure and expression of a pea nuclear gene encoding chlorophyll *a/b*-binding polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2960–2964 (1984).
57. Paulsen, H., Rümmler, U. & Rüdiger, W. Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* **181**, 204–211 (1990).
58. Booth, P. J. & Paulsen, H. Assembly of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex *in vitro*. Time-resolved fluorescence measurements. *Biochemistry* **35**, 5103–5108 (1996).
59. Paulsen, H., Finkenzeller, B. & Kühlein, N. Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein. *Eur J Biochem* **215**, 809–816 (1993).
60. Yang, C., Horn, R. & Paulsen, H. The light-Harvesting chlorophyll *a/b* complex can be reconstituted *in vitro* from its completely unfolded apoprotein. *Biochemistry* **42**, 4527–4533 (2003).
61. Hobe, S., Prytulla, S., Kühlbrandt, W. & Paulsen, H. Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *EMBO J* **13**, 3423–3429 (1994).
62. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605–1612 (2004).

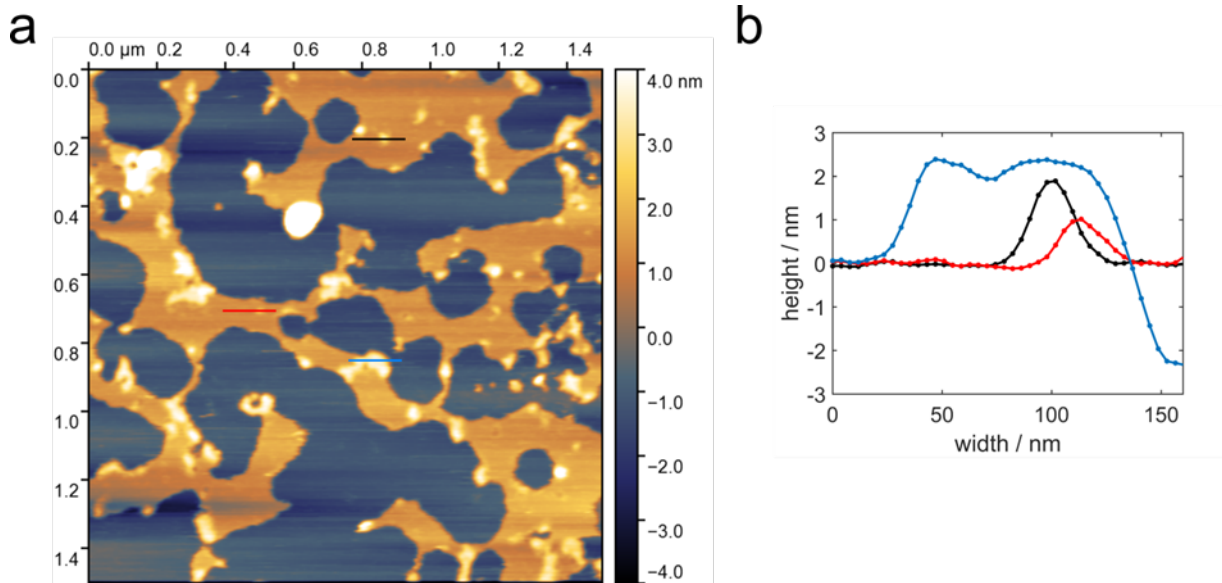
## Author contributions

D.S., H.W., A.J. and H.P. conceived the experiments. D.S. and H.W. performed and analyzed the experiments. D.S. and H.W. wrote the manuscript. A.J. and H.P. edited the manuscript.

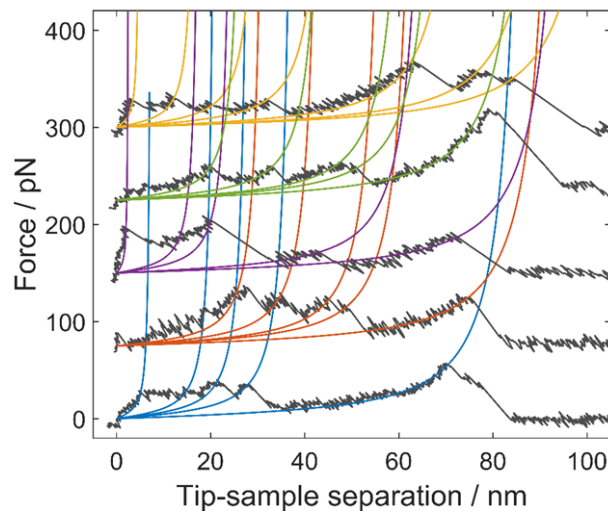
## Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

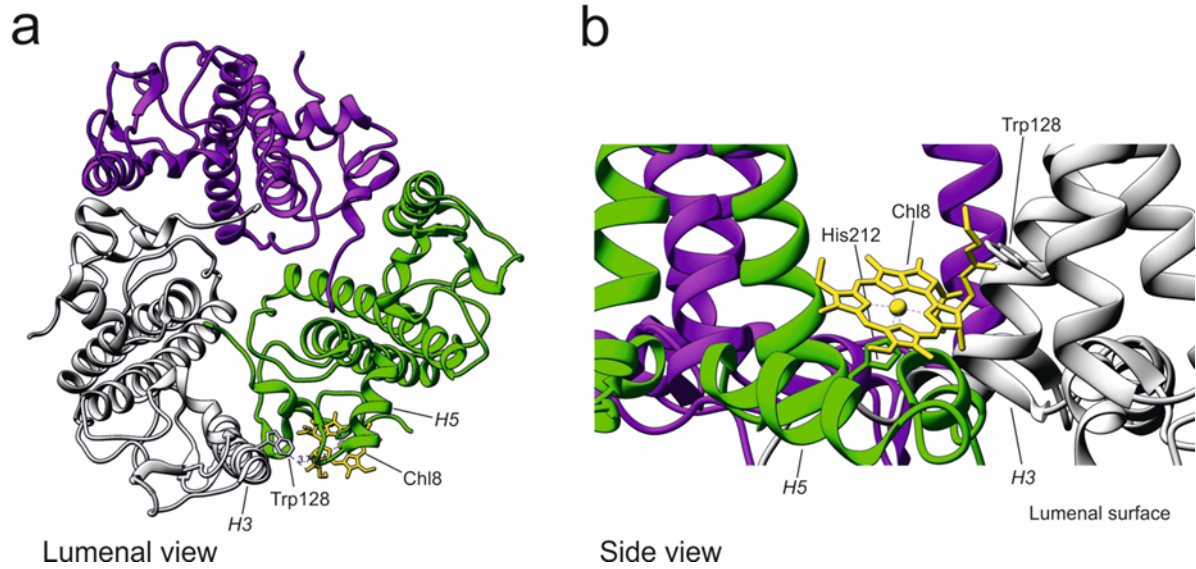
Supplementary information



**Supplementary Figure 1 Topography of trimeric LHCII reconstituted into DGDG membranes as obtained from AFM imaging.** (a) Incubation of LHCII containing liposomes on mica leads to the formation of connected bilayer patches, appearing as protrusions from the mica surface (dark, bluish color) between 2 and 3 nm in height (bright, yellowish color). The deviation from the expected bilayer thickness of 3 to 4 nm can be explained by compression of the soft bilayer due to the force applied by the AFM during imaging. (b) Height profile analysis of selected features within the supported bilayers. Deposited membrane patches, around 2 nm in height (black, blue), can be distinguished from smaller patches corresponding to proteins protruding 1 to 1.5 nm from the bilayer surface (red). Imaging was performed in intermittent contact mode.



**Supplementary Figure 2 Exemplary force-distance curves showing mechanical unfolding of LHCII polypeptides extracted from the trimeric LHCII in POPG.** Each force peak is fitted with the WLC model shown as colored lines. Curves are offset for better visibility. Notably each curve shows a different saw tooth pattern indicating that unfolding of the protein follows different trajectories.



**Supplementary Figure 3 Chl8 mediated stabilization of trimeric LHCII between Trp128 and His212 of adjacent monomers.** (a) Luminal view and (b) side view of the LHCII trimer with each monomer represented by a different color. Stabilization upon trimerization at peak 3 and 4 from **Figure 2b (top)** is facilitated as the central Mg<sup>2+</sup> of Chl8 (yellow) is coordinated at His212 (*lc* = 77 nm) of one monomer (green), while the hydrophobic phytol tail of Chl8 interacts with Trp128 (*lc* = 47 nm) of an adjacent monomer (gray); structure obtained with Chimera and PDB ID code 2BHW.

# **Kapitel III: Grana-like membrane stacking in supported lipid bilayers is driven by non-bilayer lipid MGDG and major light-harvesting complex (LHCII): the role of membrane curvature and electrostatic protein interactions**

Dennis Seiwert<sup>a</sup>, Hannes Witt<sup>b</sup>, Sandra Ritz<sup>c</sup>, Andreas Janshoff<sup>b</sup>, Harald Paulsen<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Molecular Physiology, Johannes Gutenberg University Mainz, Johannes-von-Müller-Weg 6, 55128 Mainz, Germany

<sup>b</sup> Institute of Physical Chemistry, University of Göttingen, Tammannstrasse 6, 37077 Göttingen, Germany

<sup>c</sup> Microscopy Core Facility, Institute of Molecular Biology, Ackermannweg 4, 55128 Mainz, Germany

\* Corresponding author; Telephone: 49-6131-3924633; E-mail: paulsen@uni-mainz.de

This chapter is a publication manuscript in preparation.

## **Abstract**

The thylakoid membrane of algae and land plants is characterized by its intricate architecture, comprising tightly appressed membrane stacks termed grana. The contributions of individual components to grana stack formation are not fully elucidated yet. As an *in vitro* model we use supported lipid bilayers made of thylakoid lipid mixtures to study the formation of grana-like structures, as the flat membrane surface spontaneously self-organizes into multilamellar stacks in the presence of LHCII. These structures were characterized by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and atomic force microscopy (AFM). Unlike earlier studies reported in the literature, no cation mediated charge screening at high-salt conditions was necessary for LHCII to induce stacking in negatively charged membranes. This observation provides experimental evidence for the Velcro model [Standfuss, J., van Scheltinga, A. C. T., Lamborghini, M., and Kühlbrandt, W. (2005) *EMBO J* 24, 919–928], which describes alternating surface charge interactions between opposing LHCII trimers as the driving force for membrane stacking. Applying *in vivo*-like salt conditions to uncharged glycolipid membranes drastically increased stack formation due to enforced LHCII-LHCII interactions, which is in line with recent crystallographic data [Wan, T., Li, M., Zhao, X., Zhang, J., Liu, Z., and Chang, W. (2014) *Mol Plant* 7, 916–919]. Further, we observed the non-bilayer lipid MGDG to strongly promote membrane stacking, pointing to the long-term proposed function of MGDG in stabilizing the inner membrane leaflet of highly curved margins in the periphery of each grana disc [Murphy, D. J. (1982) *FEBS Lett* 150, 19–26].

## Introduction

In cyanobacteria, algae and higher plants the light-reaction of photosynthesis takes place in the thylakoid, making it the most abundant biological membrane system on earth <sup>1</sup>. The thylakoid membrane of chloroplasts exhibits a very complex three-dimensional architecture: cylindrical stacks of flattened membrane discs with a diameter of 300 - 600 nm, the so called grana structures, are interconnected by non-stacked membrane sections termed "stroma lamellae". Stacking is accompanied by highly curved margins at the periphery of each grana disc <sup>2-4</sup>.

While the lipid composition, that is 50% non-bilayer lipid monogalactosyl diacylglycerol (MGDG), 30% digalactosyl diacylglycerol (DGDG) and 20% negatively charged lipids (10% each of phosphatidyl diacylglycerol (PG) and sulfoquinovosyl diacylglycerol (SQDG)), is more or less uniform across the continuous membrane system <sup>5,6</sup>, the distribution of proteins is not. Photosystem II (PSII) and the major light-harvesting complex (LHCII) are concentrated in grana, whereas photosystem I (PSI) and ATP synthase reside in the stroma-facing regions <sup>2-4,7</sup>. This so-called lateral heterogeneity is associated with the primary grana functions: the prevention of spillover of excitation energy via spatial separation of PSI and PSII, fine-tuning of photosynthesis, facilitation of state transitions of LHCII, balance between linear and cyclic electron flow, and, most importantly, enhancement of light-harvesting efficiency under low light conditions through the formation of large arrays of PSII-LHCII supercomplexes <sup>2-4,7</sup>.

Grana stacking is established by the interplay of various interactions between adjacent membrane layers comprising electrostatic attraction and repulsion, attractive van der Waals forces, entropy-driven attraction as well as hydration repulsion <sup>8-10</sup>. High concentrations of cations are needed to screen the net negative charges on the membrane surface originating from the fraction of negatively charged lipids and acidic extra-membranous domains of PSII and LHCII <sup>8-16</sup>. Disclosure of highly resolved LHCII crystal structures around 10 years ago has given rise to the Velcro model, describing electrostatic interactions between the stromal surfaces of opposing LHCII trimers to be essential for grana formation <sup>17</sup>. Moreover, destacking of grana membranes was suggested to be accompanied with phosphorylation of LHCII, by which trimeric complexes end up in stromal lamellae where LHCII can associate with PSI <sup>2,3,18</sup>.

Although the glycolipids DGDG and MGDG together account for 80% of the lipid matrix and thereby provide the framework of the grana structure, their exact contribution to grana stacking cannot be examined *in vivo* since mutational studies always target the thylakoid architecture as a whole (for detailed review, see ref. (19)). *In vitro* studies of membrane stacking have included either the adhesion of preformed bilayers (liposomes) or the formation of multilamellar membrane structures upon hydration of lipids or their integration into protein aggregates <sup>20-26</sup>. These approaches did not specifically address the membrane structure present in the non-appressed grana margins, pointing to the need for an *in vitro*-system that also takes into account the relevance of membrane curvature. The

latter has recently been revealed to be induced by CURVATURE THYLAKOID1 (CURT1) proteins<sup>27</sup>; however, little or nothing is known about an involvement of the different thylakoid lipids in this context.

A promising way to mimic grana-related membrane stacking *in vitro* is the formation of multilamellar structures out of a flat continuous membrane system deposited on a surface<sup>28</sup>. Spreading of small unilamellar vesicles (SUVs) is a straightforward method to obtain such supported lipid bilayers (SLBs)<sup>29–34</sup> since it allows for easy variation of the lipid composition in either the absence or presence of proteins like LHCII reconstituted into the SUVs<sup>35,36</sup>. In order to investigate the impact of LHCII, salt conditions and different thylakoid lipid mixtures on the degree of membrane stacking, we established the formation of a flat SLB-system starting out from SUVs consisting of uncharged glycolipids only and expanded the system accordingly. This enabled us to study the effects of the individual components in one predefined system, monitored via atomic force microscopy (AFM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). Our results indicate that LHCII and MGDG provide major contributions to stabilization of the grana structure.

## Materials and Methods

### Isolation of native LHCII complexes

LHCII was prepared from 2-week old pea seedlings according to ref. (37) with the modifications described in ref. (35). The final purification step by ultracentrifugation through a sucrose density gradient was omitted. Instead, aliquots containing precipitated LHCII were frozen in distilled H<sub>2</sub>O and stored at -20 °C until further use.

### Preparation of small unilamellar vesicles (SUVs)

Lipid aliquots of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (POPG; purchased from Avanti Polar Lipids), digalactosyl diacylglycerol (DGDG) and monogalactosyl diacylglycerol (MGDG; each purchased from Lipid Products) dissolved in chloroform were mixed at the desired molar ratios. In case of supported bilayer formation without LHCII protein, C11TopFluor galactosyl ceramide (TopFluor-GC; Avanti Polar Lipids) was added at molar ratios between 1:100 and 1:1000. A thin lipid film was formed on the inner wall of a glass flask by slowly removing the chloroform in a rotary evaporator. After complete removal of the solvent at 40 °C under high vacuum for 1 h, the lipid film was hydrated by rigorous mixing (3 x 30 s at 60 °C; MS2 minishaker, IKA) in ultrapure H<sub>2</sub>O (resistance  $R > 18 \text{ M}\Omega$ ) or 50 mM NaCl (for supported bilayer formation on mica with POPG liposomes) at a total lipid concentration of 1.5 mM. For MGDG containing samples the mixing step was repeated several times until no more lipid traces were detected by eye on the bottom of the flask. Sonication in a tip

sonicator (Vibra cell, Sonics & Materials) for 4 min, followed by 3 freeze-thaw cycles, yielded large unilamellar vesicles. The vesicle suspension was then extruded 21x (LipoFast-Basic, Avestin) through a polycarbonate membrane (pore diameter: 100 nm) to obtain SUVs.

### **Reconstitution of LHCII into SUVs**

For reconstitution into liposomes, aliquots containing precipitated LHCII were thawed and dissolved in 0.05% (w/v) Triton X-100 / 10 mM TRIS-HCl pH 7.5. Preformed SUVs were mixed with Triton X-100 and TRIS-HCl pH 7.5 to final concentrations of 0.05% (w/v) and 10 mM, respectively. The reconstitution step was performed according to established protocols<sup>35</sup>, but with some modifications: the protein suspension was added dropwise under continuous mixing at 4 °C in the dark to a molar lipid/protein ratio of 500 – 1000, and subsequently polystyrene beads (Bio-Beads SM-2, Bio-RAD) at 30 mg/ml were added. In order to remove Triton X-100, the mixture was incubated overnight under constant rotating at 4 °C in the dark, and the supernatant was removed to a new tube containing fresh polystyrene beads, followed by incubation for 1 h. The last step was repeated, and finally the supernatant was collected. For bilayer formation on glass coverslips, all buffers additionally contained 0.1 mM EDTA.

### **Surface preparation and functionalization**

Glass coverslips (22 x 22 mm<sup>2</sup> 1.5H, Marienfeld) were chemically cleaned via Piranha treatment (immersion in a stirred solution of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33%) at a ratio of 7:3 (v/v)) for 5 min, thoroughly rinsed with ultrapure H<sub>2</sub>O (10x), dried at 100 °C for 15 min and then kept in a desiccator under vacuum until further use. For bilayer formation on glass, the coverslips were treated with 1% (v/v) (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES; Sigma-Aldrich) in dry toluene for 4 h at 80 °C, rinsed with methanol and chloroform (3x each) and dried in a stream of nitrogen<sup>38</sup>. For bilayer formation on mica, thin mica slices (14 x 10 mm<sup>2</sup>; Glimmer "V5", Plano) were fixed onto cleaned coverslips with UV curing glue<sup>28</sup>. Before adding SUV suspension, the upper mica layers were freshly cleaved (at least 3x) with adhesive film.

### **Formation of supported lipid bilayers (SLBs)**

Preformed SUVs or SUVs containing reconstituted LHCII were freshly extruded (21x; LipoFast-Basic, Avestin) through a polycarbonate membrane (pore diameter: 100 nm). For SLB-formation on APTES coated glass, the vesicle suspension (20 µl) was incubated for 5 min on the functionalized coverslips and then rinsed with 0.1 mM EDTA / 10 mM TRIS-HCl pH 7.5 (4 x 1 ml). Prior to SLB-formation on mica, CaCl<sub>2</sub> solution (100 mM) was added to the vesicle suspension to a final concentration of 5 mM

and the suspension (60  $\mu$ l) was incubated for 10 min on the freshly cleaved surface, followed by intense rinsing with 10 mM TRIS-HCl pH 7.5 (4 x 1 ml, including 50 mM NaCl in case of SLB-formation with POPG).

### **Confocal laser scanning microscopy and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)**

Confocal laser scanning microscopy and FRAP experiments were performed at room temperature on a TCS SP5 laser scanning microscope (Leica) with an 63x oil objective (NA = 1.4; HCX PL APO CS, Leica). A 488 nm argon laser was used to excite LHCII (detection range of photomultiplier: 600 – 700 nm) and TopFluor-GC (detection range: 520 – 600 nm). FRAP measurements were conducted in a circular region of interest (ROI) at constant framerate (1.037 s / frame) with 5 (**Supplementary Figure 1**) or 10 frames of pre-bleaching, 2 (**Supplementary Figure 1**) or 3 (**Figure 1**) or 10 frames (**Figure 2**) of bleaching and 100 frames of post-bleaching. The radius  $r$  of the ROI varied between 0.75 and 1.5  $\mu$ m but was kept constant for each series of experiments (for a given figure). In order to compensate for photobleaching through imaging, the actual fluorescence intensity  $F_{frap}$  was normalized by the intensity  $F_{ref}$  of an unbleached area for every time point as follows:

$$F(t) = F_{frap}(t) / F_{ref}(t).$$

The mobile fractions  $M$  given by

$$M = F_{\infty} / F_0,$$

with  $F_{\infty}$  the fluorescence intensity after recovery and  $F_0$  the average fluorescence intensity before bleaching, were directly estimated from the plots.

### **Atomic force microscopy (AFM)**

Topographic imaging was performed at room temperature in intermitted contact mode using a commercial AFM (MFP-3D Infinity, Oxford Instruments Asylum Research) with MSCT-F cantilevers (nominal resonant frequency (air): 90 – 160 kHz, nominal spring constant: 0.3 – 1.2 N/m; Bruker).

## **Results**

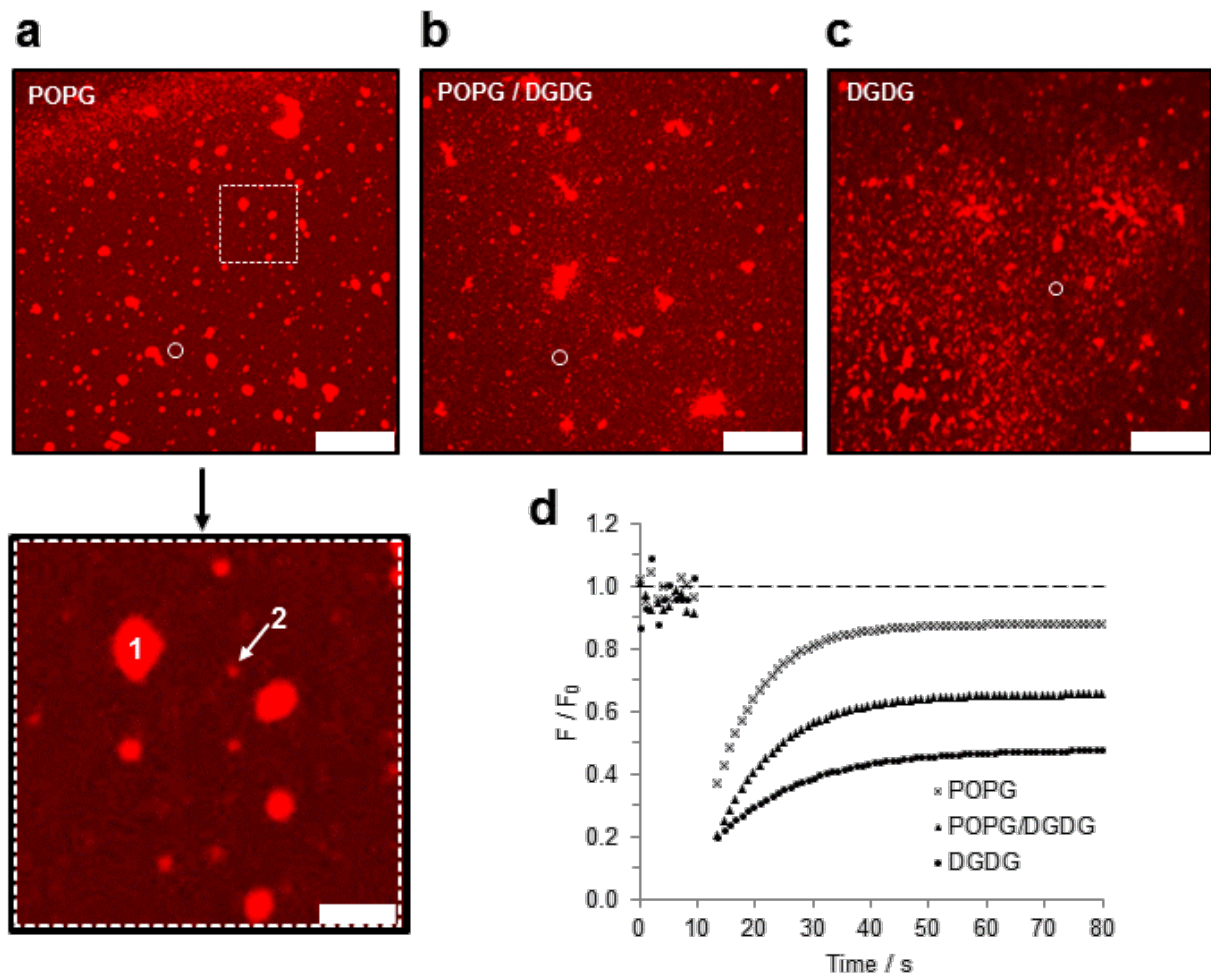
### **Spreading of LHCII-liposomes on charged glass coverslips**

The formation of SLBs comprises adsorption at the surface followed by crowding, potentially fusion and rupture of the SUVs, a process that is predominantly governed by electrostatic interactions<sup>29–34</sup>.

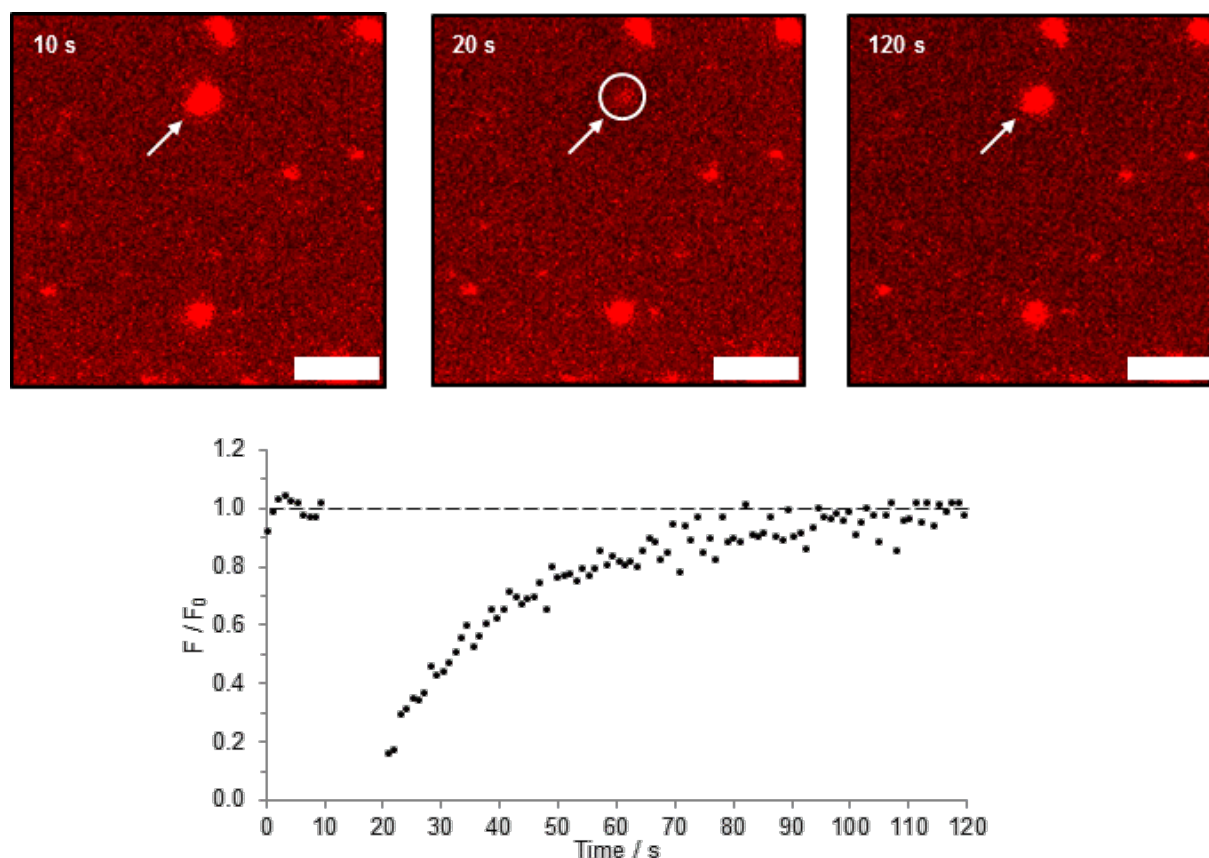
Therefore, glass coverslips, the most commonly used substrate for fluorescence microscopy, were coated with (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) to generate positive charges at the surface attracting the negatively charged phosphate head groups of the SUVs (diameter: 100 – 150 nm)<sup>33,38,39</sup>. The molar lipid-to-protein ratio (500 with respect to LHCII monomers) used here corresponds to a protein density one order of magnitude lower than in the grana<sup>40</sup> in order to avoid crystallization or aggregation of trimeric LHCII within the SUVs, which might hamper the spreading process. However, the fluorescence intensity of the chlorophyll molecules bound to LHCII was still sufficient to record CLSM images.

To investigate the effects of lipid head group charge on spreading of LHCII-SUVs under low salt conditions (buffer containing 10 mM TRIS only), we used three different thylakoid lipid mixtures: pure 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) representing negatively charged PG, POPG/DGDG = 1:1 (50% charged), and pure DGDG (uncharged). For pure POPG, a homogeneously distributed fluorescent signal was obtained on the surface support (**Figure 1a**), indicating an extended SLB and a homogeneous distribution of LHCII in the lipid bilayer on the length scale of microscope resolution. In addition, bright fluorescent domains (diameter  $\geq \sim 1 \mu\text{m}$ ) point to multilamellar structures or protein crowding, while smaller dots (diameter  $< \sim 1 \mu\text{m}$ ) presumably represent non-ruptured vesicles (“1, 2” in **Figure 1a**, respectively). Appearance of the latter dramatically increases when the POPG-SUVs contain 50% DGDG (**Figure 1b**). Pure DGDG-SUVs lead to a coarse fluorescent image with a high density of multilayer-structures (or crowded proteins) and intact vesicles almost completely covering the surface (**Figure 1c**).

FRAP measurements in between the bright spots (circles in **Figure 1a-c**) demonstrate POPG membranes to be fluid as the fluorescence intensity recovers by  $\sim 90\%$  after bleaching (**Figure 1d**); this concomitantly reveals that LHCII is fully mobile in solid supported membranes and no protein crystallization occurs within the membranes. The recovery is lowered by  $\sim 25\%$  in lipid mixtures of POPG and DGDG (1:1) and by  $\sim 45\%$  in pure DGDG, which indicates increasing amounts of isolated membrane patches (meaning lower membrane surface coverage) and/or non-ruptured vesicles getting irreversibly bleached during the FRAP experiments. In order to inspect whether the bright areas mentioned above (“1” in **Figure 1**) represent stacked membranes or protein accumulation, bleaching experiments were conducted on entire domains (**Figure 2**). The FRAP measurements show full recovery of the high fluorescence intensities after bleaching, revealing that these areas are not isolated membrane sheets adhering to the SLB, but rather correspond to membrane stacks which are i) connected with the surrounding SLB and ii) hence shaped as protrusions out of the planar bilayer after SLB-formation<sup>28</sup>.



**Figure 1** Fluorescence micrographs and FRAP curves of SLBs formed by spreading of LHCII containing SUVs at different thylakoid lipid compositions on APTES-coated coverglass. (a) POPG vesicles (negatively charged) form a homogenous bilayer system with multilamellar membrane patches, characterized by high fluorescence intensities, and a few lipid vesicles on the membrane surface. The latter are indicated as “1” and “2”, respectively, in the magnification of the dotted section (bottom). (b) The proportion of 50% DGDG (uncharged) in POPG vesicles counteracts the formation of a continuous bilayer system as can be seen by a high density of non-ruptured lipid vesicles. (c) Spreading of DGDG liposomes substantially increases the appearance of multilayer structures and intact vesicles. (d) Time-resolved relative fluorescence intensities  $F/F_0$  within the regions of interests (circles in a-c) of representative FRAP experiments depending on the lipid composition. POPG-SLBs show almost full recovery (~90%), SLBs made of POPG/DGDG = 1:1 ~65%, and DGDG-SLBs ~45% recovery, indicating that more unfused membrane vesicles get irreversibly bleached upon increased proportions of DGDG. Scale bars: top = 10  $\mu\text{m}$ ; bottom = 1.5  $\mu\text{m}$ .



**Figure 2** FRAP experiment on a multilayer patch (see “1” in Figure 1) formed by spreading of LHCII containing SUVs at POPG/DGDG = 1:1 on APTES-coated coverglass. A series of fluorescence micrographs (top) before (10 s), right after (20 s), and 2 min after bleaching (120 s) shows bleaching of a whole multilamellar domain (arrow). Full recovery within the region of interest (white circle) as monitored by the time-resolved relative fluorescence intensity  $F/F_0$  (bottom) reveals that the layers of the membrane stack are connected with the surrounding bilayer. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ .

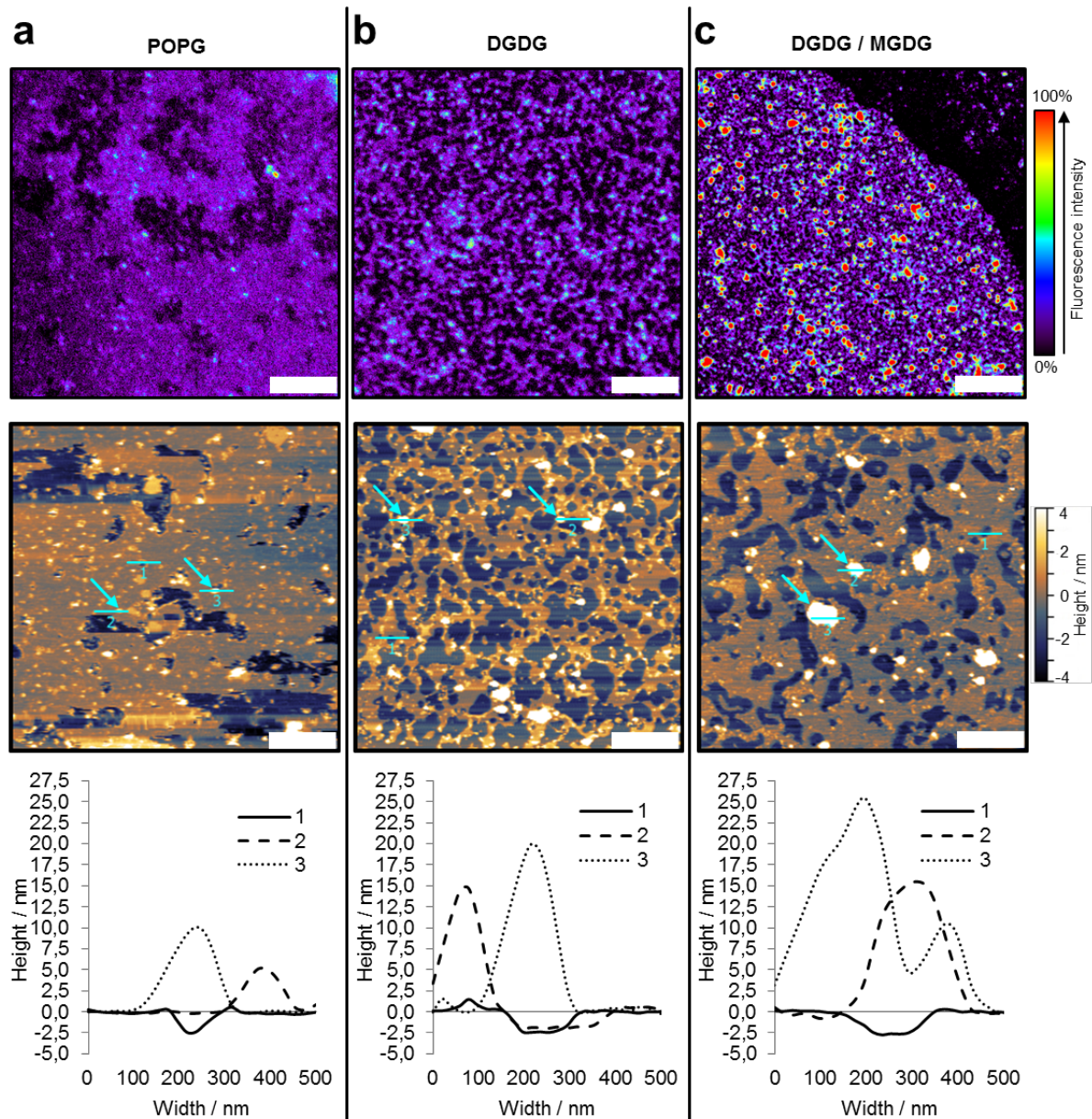
### Bilayer stacking on mica: impact of POPG/DGDG/MGDG composition and of LHCII

In order to assess the impact of negative charges in the lipid head groups (present in POPG but absent in DGDG and MGDG) and of the tendency to promote spontaneous membrane curvature (present in MGDG/DGDG mixtures but absent in DGDG membranes<sup>41</sup>) on stack formation, we used three different thylakoid lipid mixtures: pure POPG, pure DGDG and DGDG/MGDG = 2:1. Higher proportions of MGDG were not examined as they prevent the formation of lamellar vesicles due to the hexagonal phase behavior of the lipid<sup>42</sup>. Spreading of LHCII-SUVs containing these lipid compositions was performed on mica, driven by calcium ions, since high amounts of lipid vesicles were observed to remain intact on glass supports after SLB-formation, particularly in the presence of DGDG (see above). Mica has been shown to enable vesicle spreading for various lipid compositions in combination with calcium<sup>32–34,43–46</sup> and may thus facilitate rupture of the uncharged DGDG-liposomes, thereby shifting the equilibrium towards a higher number of membrane stacks and SLBs for

investigation. Compared to the rough surface structure of glass, the flat mica surface allows for discriminating between the base bilayer and elevated membrane stacks.

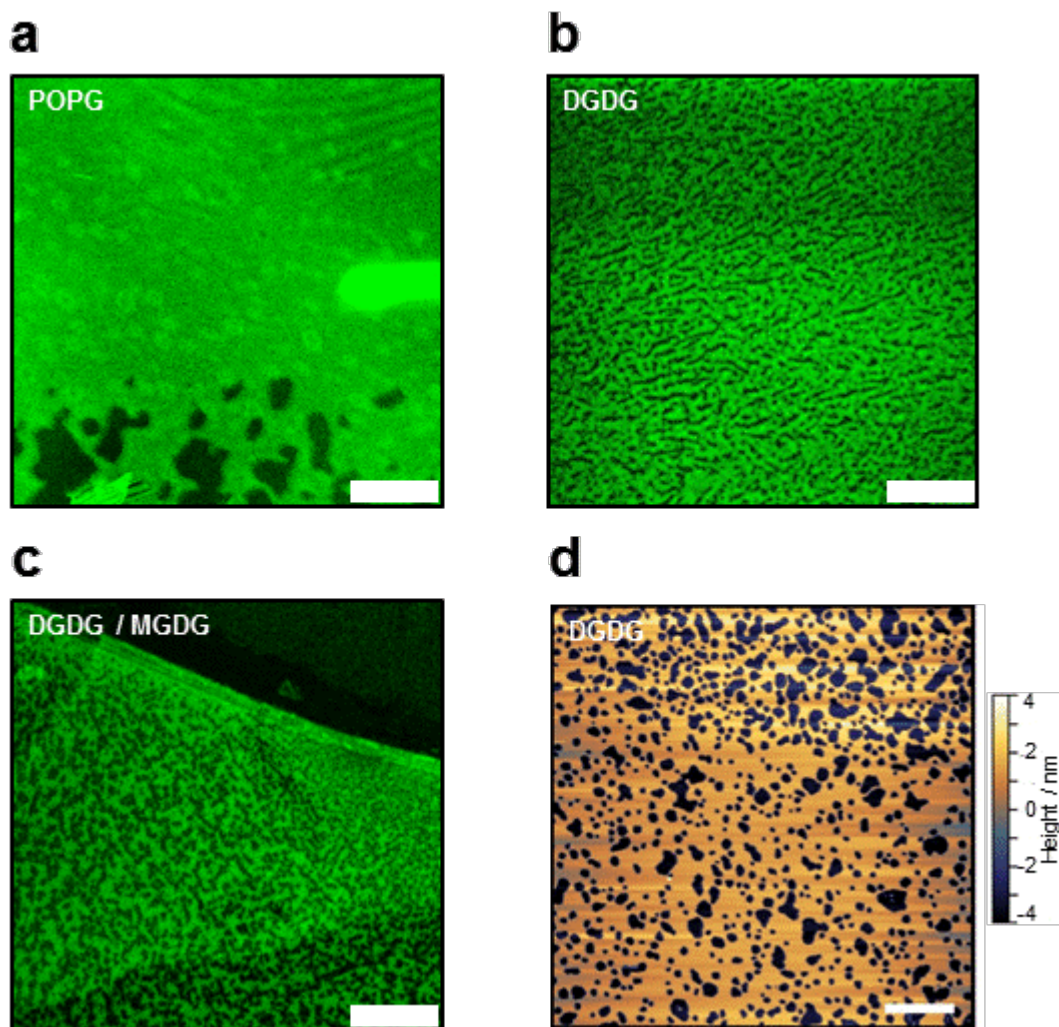
**Figure 3** displays the fluorescence and atomic force microscopy images of the LHCII-SLBs and membrane stacks formed on mica as a function of thylakoid lipid composition. In order to better assess the heights of elevated membrane structures the fluorescence micrographs are presented in an intensity based color code (**Figure 3, top**). The images demonstrate that the fluorescent bilayer (purple intensity) can clearly be distinguished from the dark mica surface. AFM-topographs (**Figure 3, middle**) show a bilayer thickness of ~2.5 nm (line 1 in **Figure 3, bottom**), which is somewhat reduced compared to the typical values reported in the literature ranging from 3.5 to 4 nm; we attribute the disparities to compression of soft material such as membranes that can occur during AFM imaging via tapping mode <sup>47</sup>. POPG-SLBs possess a high surface coverage (**Figure 3a**), while the membrane density for DGDG- and DGDG/MGDG-SLBs is reduced by ~50% revealing partially connected bilayer patches (**Figure 3b and c**, respectively). In contrast to spreading of DGDG-SUVs on glass, non-ruptured vesicles are only barely detected (compare **Figure 1c** and **Figure 3b**).

In line with the results obtained for SLBs on glass supports, representative FRAP-experiments on mica likewise confirmed the existence of membrane stacks (blue to red fluorescence intensity level in **Figure 3 top**): these correspond to protrusions of the flat membrane surface since the stacks are connected with the surrounding bilayer as shown by fluorescence recovery (**Supplementary Figure 1**) <sup>28</sup>. Topographical analysis reveals that the height of the stacks corresponds to multiples of the height of 2 bilayers (each repeat corresponding to ~5 nm in height) protruding from the planar membrane (height level: 0 nm; see **Figure 3, bottom**): e.g. peaks of 5 nm indicate one, 10 nm two and 15 nm three repeats, respectively (line 2 and 3 in **Figure 3, bottom**). This estimation does not take into account the space in between the bilayers; however, the stacks can get compressed during AFM-imaging. Differences between the thylakoid lipid mixtures with regard to the maximal amount of layers are difficult to assess in detail since peaks of  $\geq 30$  nm may also refer to intact lipid vesicles being flattened during AFM-imaging. However, fluorescence micrographs show that for the DGDG/MGDG mixture density, extension and height (as assessed from the increased fluorescence intensity level raised from blue to red) of the membrane stacks are substantially increased compared to both POPG and pure DGDG (**Figure 3c, top**).



**Figure 3** Fluorescence micrographs (top), AFM topographs (middle) and height profiles (bottom) of SLBs formed by spreading of LHCII containing SUVs with  $\text{Ca}^{2+}$  at different thylakoid lipid compositions on mica. (a) POPG vesicles form a continuous bilayer membrane system indicated by a homogenous fluorescence signal (purple intensity) with a few membrane stacks on top of the surface, appearing as bright dots (blue intensity). However, in some areas the bilayer contains bigger gaps (up to a view  $\mu\text{m}$ ) visible as dark spots shown by fluorescent and topographic imaging (10x magnification), respectively. (b) DGDG vesicles lead to the formation of partially connected bilayer patches (purple fluorescence intensity) due to a leaky surface coverage. The density of membrane stacks (blue fluorescence intensity) is only slightly increased. (c) The proportion of 30% MGDG in DGDG membranes substantially enhances density, size and height (fluorescence intensity level raised to red) of the membrane stacks, whereas the bilayer structure (purple intensity) is only barely altered. Height profile analysis of the elevated structures (arrows in (a-c middle)) reveals that the stacks consist of multiple repeats of 2 bilayers (bilayer thickness:  $\sim 2.5$  nm; line 1 in (a-c bottom) on top of the planar membrane plane (height level: 0 nm), giving rise to peaks of  $\sim 5$ ,  $\sim 10$ ,  $\sim 15$ ,  $\sim 20$  and  $\geq 25$  nm (line 2 and 3 in (a-c bottom)). Scale bars: top = 10  $\mu\text{m}$ ; middle = 1  $\mu\text{m}$ .

To look into the questions whether LHCII affects the formation of supported bilayers and to which extent the embedded protein may drive membrane stacking, spreading of liposomes lacking LHCII was performed under identical conditions. With respect to bilayer formation, the membrane surface coverage is only slightly higher than in the presence of LHCII as can be seen from membrane staining with the fluorescent labeled lipid C11TopFluor galactosyl ceramide (TopFluor-GC) at the corresponding thylakoid lipid compositions (**Figure 4a-c**). Notably, all lipid compositions generate SLBs lacking highly fluorescent domains (**Figure 4a-c**) or elevated structures (AFM-image: **Figure 4d**), meaning that no membrane stacking takes place in the absence of LHCII under the selected conditions for SUV-spreading.

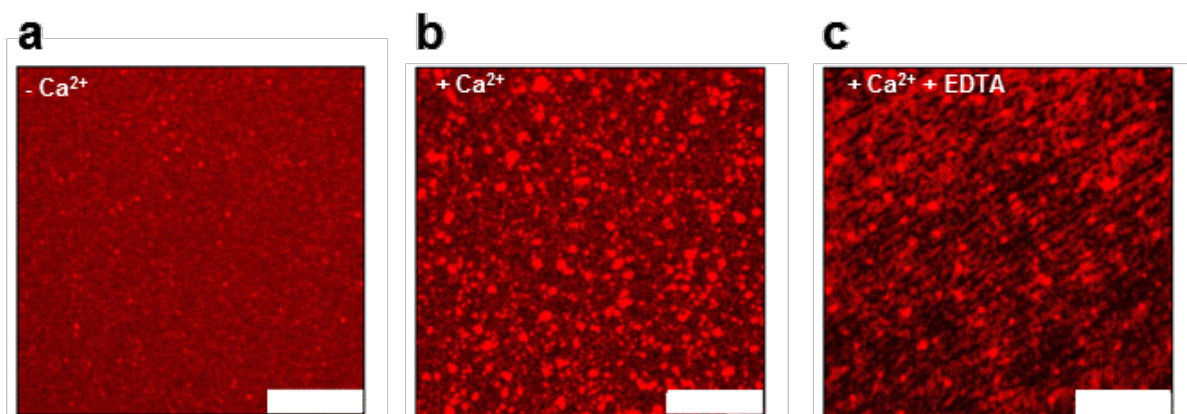


**Figure 4** Fluorescence micrographs (a-c) and AFM topograph (d) of SLBs formed by spreading of SUVs containing TopFluor-GC with  $\text{Ca}^{2+}$  at different thylakoid lipid compositions on mica. (a) POPG vesicles form bilayer areas of complete surface coverage that can be interrupted by gaps of a view  $\mu\text{m}$ . DGDG (b) and DGDG/MGDG = 2:1 vesicles (c) form partially connected bilayer patches as confirmed by topographic imaging at 5x magnification for DGDG (d). Note that in (a-e) there are no membrane stacks detectable on top of the bilayer. Scale bars: (a-c) = 10  $\mu\text{m}$ ; (d) = 1,5  $\mu\text{m}$ .

### Influence of divalent and monovalent cations on *in vitro* membrane stacking

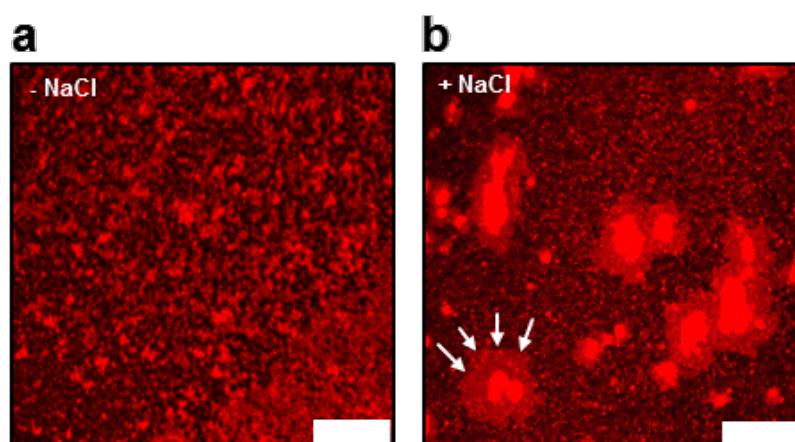
The relevance of cations for grana stacking has been studied intensely in intact chloroplasts or by isolation of thylakoids under low salt conditions. It was demonstrated that low concentrations of divalent cations ( $\text{MgCl}_2$  in a range of 1 to 5 mM) are sufficient to induce restacking of unstacked grana membranes<sup>8,11–14</sup>. This approach cannot be used in the SLB-system established here since 5 mM  $\text{CaCl}_2$  is used to facilitate spreading of the lipid vesicles on mica. Therefore, it is unclear whether subsequent stack formation in the presence of LHCII (see last section) is also dependent on divalent cations. Since we wished to focus only on membrane stacking due to LHCII related interactions, vesicle spreading was performed with uncharged SUVs containing no POPG which rules out effects originating from lipid charge screening by cations.

In order to check whether the presence of  $\text{CaCl}_2$  is mandatory for SLB-formation under the experimental conditions used here, vesicles containing DGDG and MGDG (2:1 ratio) and LHCII were exposed to mica in the absence of calcium ions (**Figure 5a**). Bleaching experiments (0% recovery, data not shown) demonstrated that no SLB had formed, demonstrating that divalent cations are necessary for its formation. Hence, SLB-formation was conducted at 5 mM  $\text{CaCl}_2$  as described previously (**Figure 5b**; see also **Figure 3c**), and the membrane stacks formed were exposed to 500 mM EDTA, followed by intensive rinsing to remove  $\text{Ca}^{2+}$  ions from the bilayer surface. More than ~50% of the multilamellar structures disappeared during this treatment (**Figure 5c**), suggesting that as soon as calcium ions stabilizing membrane multilayers are bound by EDTA, destacking occurs.



**Figure 5** Fluorescence micrographs of SLBs formed by spreading of LHCII containing SUVs at DGDG/MGDG = 2:1 on mica depending on  $\text{Ca}^{2+}$ . (a) Without  $\text{Ca}^{2+}$  the mica surface is covered with vesicles, but no connected bilayer network is formed as determined by FRAP (0% mobile fraction). (b) Spreading with  $\text{Ca}^{2+}$  leads to the formation of leaky SLBs in combination with a high density of stacked membranes (bright spots, see also **Figure 3c**). (c) By incubation with 500 mM EDTA for 5 min followed by 4x rinsing, many stacks from (b) are removed. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ .

The definite concentration of monovalent cations present in grana is unclear; however, several studies emphasize a strong dependency of the grana structure on high KCl or NaCl concentrations (100 – 200 mM) <sup>8,9,11,14–16</sup>. In order to examine if the latter also affect generation of the grana-like membrane structures presented in this work, SLBs were formed with SUVs containing DGDG and LHCII. Compared to the standard conditions (**Figure 6a**; see also **Figure 3b**), adding 200 mM NaCl prior to vesicle spreading drastically provokes the formation of membrane stacks leading to sizes up to 10  $\mu\text{m}$  in diameter (increased by a factor of  $\sim 10$ ; **Figure 6b**). Even though bleaching experiments cannot be conducted here since the stacks originate from unconnected membrane patches, the CLSM images suggest that those structures still represent continuous membranes.



**Figure 6** Fluorescence micrographs of SLBs formed by spreading of LHCII containing DGDG-SUVs with  $\text{Ca}^{2+}$  on mica affected by NaCl. (a) At 0 mM NaCl partially connected bilayer patches and small membrane stacks (bright spots) are formed (see also **Figure 3b**). (b) Spreading at 200 mM NaCl provokes the formation of stacks with rigorously increased size (up to 10  $\mu\text{m}$ ) in the center of the bilayer patches (white arrows). Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ .

## Discussion

### The quality of SLB-formation is crucial for mimicking grana-like membrane structures *in vitro*

In the current work, we studied the formation of membrane stacks starting out from flat lipid bilayers deposited on a surface support. Since the SLBs were obtained by spreading of lipid vesicles, incomplete spreading can thus reduce the amount of membrane stacks formed and yields non-ruptured vesicles that complicate topographical analysis of those structures. Hence, we first had to establish proper SLB-formation considering the physicochemical properties of the different thylakoid lipids.

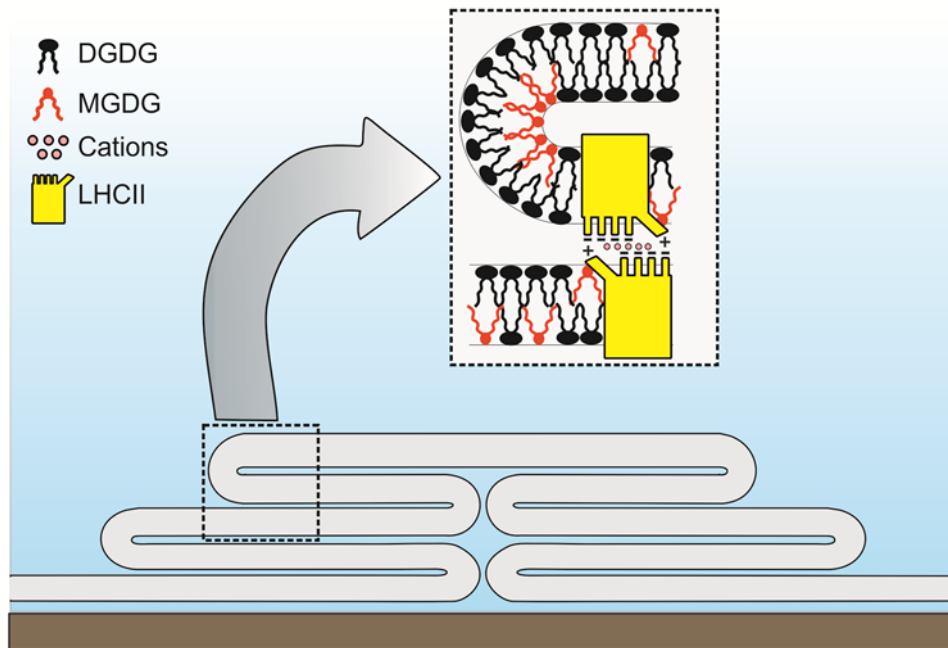
On glass, at low salt conditions, we observed a tendency of DGDG-vesicles to stay intact during SLB-formation (**Figure 1**). This issue can be resolved by SLB-formation on mica triggered by  $\text{Ca}^{2+}$ . However, the surface coverage of DGDG and DGDG/MGDG = 2:1 bilayers is noticeably reduced both

on glass and mica surfaces compared to POPG (**Figure 3, Figure 4**). Presumably this is due to the galactose moieties of DGDG and MGDG lacking ionic charges, whereas the negatively charged phosphate group of POPG undergoes electrostatic interactions with the surface support (APTES coated glass or mica bridged by  $\text{Ca}^{2+}$ ), thereby facilitating adsorption and/or rupture of the lipid vesicles<sup>29-33</sup>. Our observations are in line with a study showing the presence of glycolipids in phosphatidylcholine liposomes to slow down the kinetics of planar bilayer membrane formation on mica<sup>45</sup>. However, vesicle spreading on mica enables quantitative stack formation in glycolipid-SLBs as can be seen for DGDG/MGDG = 2:1 in particular (**Figure 3c**).

### **LHCII drives membrane stacking at low salt conditions**

Grana stacking predominantly relies on LHCII protein providing attractive forces for membrane appression in terms of van der Waals interactions between the complexes<sup>8,9,48</sup>, and specific interactions of the positively charged N-termini (stromal surface) of one membrane with negatively charged surface patches on the stromal side of LHCII trimers in the opposing membrane. The latter phenomenon has been described by the Kühlbrandt group as the Velcro model<sup>17,49</sup>. Additionally, monovalent and divalent cations are thought to generate salt bridges between the negatively charged stromal surface areas of opposing LHCII trimers as derived from new crystallographic data, thereby enhancing attractive forces between the complexes<sup>13,50</sup>. In addition, hydrogen bonds between the polar loops of opposing LHCII polypeptides have recently been proposed to contribute to the stability of grana structures<sup>18</sup>.

The results presented in this work confirm LHCII to be a major driving force towards grana-like membrane stacking as no stacks could be detected in the absence of the protein (compare **Figure 3** and **4**). Moreover, we obtained membrane stacks even at low salt conditions (buffer: 10 mM TRIS-HCl pH 7.5) (**Figure 1**). This was observed not only for the glycolipid but also for POPG membranes (**Figure 1a**). Since repulsive electrostatic interactions by the head groups of phospholipids make lipid mediated membrane adhesion quite unlikely, we conclude that LHCII-LHCII interactions according to the Velcro model are responsible for membrane stacking in SLBs (illustrated in **Figure 7**)<sup>17,49</sup>. The formation of salt bridges between opposing LHCII trimers in the presence of cations<sup>50</sup>; see above) is also reflected in our experiments (also illustrated in **Figure 7**): when  $\text{Ca}^{2+}$  is removed by the addition of EDTA the density of membrane stacks is reduced, whereas addition of 200 mM  $\text{Na}^+$  drastically enhances stacking within SLBs consisting of glycolipids only, which rules out a possible impact of lipid charge screening by cations (see **Figure 5** and **Figure 6**, respectively)<sup>3,8,9,23</sup>.  $\text{Na}^+$  may additionally contribute to the apposition of DGDG membranes due to disruption of structured water, i.e. oriented water molecules associated with the sugar head groups of DGDG<sup>8,9,22,23</sup>.



**Figure 7 LHCII and MGDG make the major contribution towards grana-like membrane stacking in supported lipid bilayers.** The stacks are formed as protrusions out of a continuous planar membrane system (see **Figure 2** and **Supplementary Figure 1**) in the shape of multiple repeats, with each repeat consisting of 2 bilayers (see **Figure 3**). Electrostatic interactions by opposing LHCII trimers between the positively charged N-termini (+) and negatively charged surface areas (-) on the stromal side of the complexes are sufficient to establish membrane appression, which is described by the Velcro model. In addition, charge screening by mono- ( $\text{Na}^+$ ) and divalent ( $\text{Ca}^{2+}$ ) cations creates salt bridges between the negative surfaces which strongly enhances the LHCII-LHCII interactions and further promotes membrane stacking. The margins connecting adjacent bilayers are characterized by rigorous bending of the membrane, which exerts local curvature stress on the bilayer. Thanks to its negative intrinsic curvature, the non-bilayer lipid MGDG provides stabilization for the inner leaflet of the margins, thereby facilitating stacking of the lamellar DGDG membrane.

Several *in vitro* studies reported in the literature demonstrate LHCII to induce membrane appression in terms of vesicle-aggregation<sup>24–26</sup>. To the best of our knowledge, there is only one publication by McDonnell and Staehelin (1980) in which the authors actually captured the formation of stacks originating from a single continuous membrane<sup>48</sup>. They observed stacking to occur only in the presence of LHCII at high-salt conditions ( $\geq 4\text{mM MgCl}_2$  or  $\geq 100\text{ mM NaCl}$ ) and concluded that divalent cations in particular were needed to screen the negatively charged surface of LHCII. In the current study, however, we show that glycolipid and phospholipid membranes containing LHCII spontaneously can form stacks even at low-salt conditions. This supports the Velcro model mentioned above.

### MGDG stabilizes the highly curved margins of a membrane stack

With regard to the impact of thylakoid lipids on grana stacking, much attention has been paid so far to the chemistry of the lipid head groups. PG, represented by POPG, has been shown to induce lateral disaggregation of LHCII trimers within lamellar membranes due to repulsive interactions between the phosphate moiety of the lipid and negatively charged domains of the protein. By contrast, both glycolipids DGDG and MGDG tend to facilitate lateral aggregation of the trimers, presumably representing a beneficial condition for stack formation in thylakoids<sup>51</sup>. Moreover, a direct contribution to grana stacking by MGDG and in particular DGDG has been attributed to the galactose rings in the head group region, capable of forming intermolecular hydrogen bonds between adjacent membranes<sup>20,21,23,52</sup>.

In this work, no significant differences were observed between uncharged glycolipid DGDG and negatively charged phospholipid POPG with regard to stack formation (compare **Figure 3a** and **b**). By contrast, the proportion of 30% non-bilayer lipid MGDG in DGDG membranes substantially enhanced density, size and height of the membrane stacks (compare **Figure 3b** and **c, top**). Since one galactose moiety compared to the lamellar lipid DGDG is missing in MGDG, the latter adopts a conical shape and hence prefers to form a hexagonal phase<sup>41</sup>. Therefore, MGDG tends to induce negative intrinsic curvature within lamellar membranes<sup>53</sup>, which appears to be beneficial for stack formation in SLBs.

Unlike the aforementioned studies addressing membrane stacks composed of separate bilayer sheets<sup>20–26</sup>, we obtained stacks being part of a continuous membrane system (as proven by FRAP, see **Figure 2** and **Supplementary Figure 1**)<sup>28</sup>. Hence, stacking is accompanied by rigorous bending of the lipid bilayer: the margin regions bridging adjacent sheets are characterized by high curvature stress being exerted on the membrane, i.e. positive curvature pressure in the outer and negative curvature pressure in the inner leaflet of the bilayer. This effect presumably renders strong bending of the membrane energetically unfavorable unless the curvature stress is eased by the shape of lipids present in these domains. Our results show that MGDG can fulfil such a function, as stack formation is strongly enhanced in SLBs containing this lipid. We propose that MGDG is enriched in the inner leaflet of the bending domains (**Figure 7**) where it is able to reduce the stress by its negative intrinsic curvature<sup>41,53</sup>. Since the high content of MGDG is constant in all lateral sections of the thylakoid membrane<sup>5,6</sup>, enrichment of MGDG in the inner leaflet of the grana margins would mean less MGDG in the positively curved outer leaflet, further reducing the bending stress.

MGDG has been proposed to be involved in the coexistence of a hexagonal phase<sup>54,55</sup>, membrane fusion events<sup>56</sup> and edge formation (grana margins) in thylakoids<sup>57,58</sup>; however, experimental support for the latter hypothesis has not yet been provided. The supported bilayer system presented here is well suited to model grana-like membrane stacking *in vitro* since membrane bending is a prerequisite for the stack formation. We propose that one of the functions of MGDG, contributing some 50% of the total lipid content of thylakoids, is to promote membrane stacking by easing the membrane curvature

stress in the margin domains. This effect may be enhanced by CURT1 proteins specifically binding to thylakoid margins <sup>27</sup>.

## **Author contributions**

D.S., H.W., S.R., A.J. and H.P. conceived the experiments. D.S. performed and analyzed the CLSM experiments. H.W. and D.S. performed and analyzed the AFM experiments. D.S. wrote the manuscript. H.W., S.R., A.J. and H.P. edited the manuscript.

## **Competing financial interests**

The authors declare no competing financial interests.

## **Funding sources**

The project was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft through the Goettingen Graduate School for Neurosciences, Biophysics, and Molecular Biosciences Grants GSC 226/2 (to H.W.) and SFB 803 B08 (to A.J.).

## **Acknowledgement**

We thank Mária Hanulová for encouraging and constructive comments during the CLSM experiments. Support by the IMB Microscopy Core Facility is gratefully acknowledged.

## **Abbreviations**

AFM, atomic force microscopy; APTES, (3-aminopropyl)triethoxysilane; CLSM, confocal laser scanning microscopy; CURT, CURVATURE THYLAKOID1; DGDG, digalactosyl diacylglycerol; LHCII, major light-harvesting complex; MGDG, monogalactosyl diacylglycerol; POPG, 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol; SLBs, supported lipid bilayers; SUVs, small unilamellar vesicles.

## References

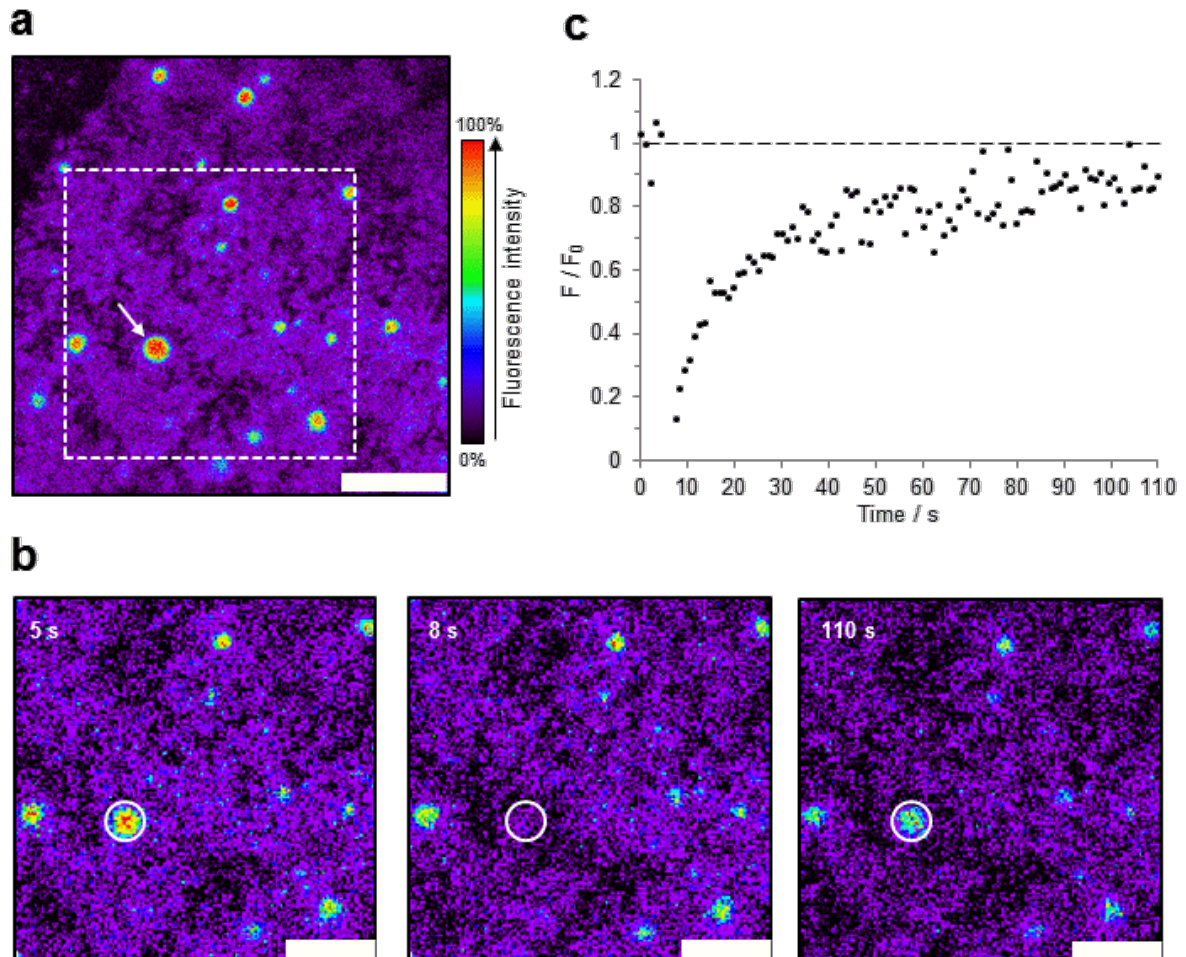
1. Gounaris, K. & Barber, J. Monogalactosyldiacylglycerol: the most abundant polar lipid in nature. *Trends Biochem Sci* **8**, 378–381 (1983).
2. Pribil, M., Labs, M. & Leister, D. Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *J Exp Bot* **65**, 1955–1972 (2014).
3. Ruban, A. V. & Johnson, M. P. Visualizing the dynamic structure of the plant photosynthetic membrane. *Nat Plants* **1**, 15161 (2015).
4. Kirchhoff, H. Architectural switches in plant thylakoid membranes. *Photosynth Res* **116**, 481–487 (2013).
5. Douce, R. & Joyard, J. Biochemistry and function of the plastid envelope. *Annu Rev Cell Biol* **6**, 173–216 (1990).
6. Duchêne, S. & Siegenthaler, P.-A. Do glycerolipids display lateral heterogeneity in the thylakoid membrane? *Lipids*, 739–744 (2000).
7. Dekker, J. P. & Boekema, E. J. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta* **1706**, 12–39 (2005).
8. Chow, W. S., Kim, E.-H., Horton, P. & Anderson, J. M. Granal stacking of thylakoid membranes in higher plant chloroplasts: the physicochemical forces at work and the functional consequences that ensue. *Photochem Photobiol Sci* **4**, 1081–1090 (2005).
9. Puthiyaveetil, S., van Oort, B. & Kirchhoff, H. Surface charge dynamics in photosynthetic membranes and the structural consequences. *Nat Plants* **3**, 1–9 (2017).
10. Jia, H., Liggins, J. R. & Chow, W. S. Entropy and biological systems: Experimentally-investigated entropy-driven stacking of plant photosynthetic membranes. *Sci Rep* **4** (2014).
11. Izawa, S. & Good, N. E. Effect of salts and electron transport on the conformation of isolated chloroplasts. *Plant Physiol* **41**, 544–552 (1966).
12. Rumak, I. *et al.* 3-D modelling of chloroplast structure under ( $Mg^{2+}$ ) magnesium ion treatment. Relationship between thylakoid membrane arrangement and stacking. *Biochim Biophys Acta* **1797**, 1736–1748 (2010).
13. Carter, D. P. & Staehelin, A. Proteolysis of chloroplast thylakoid membranes. II. Evidence for the involvement of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein complex in thylakoid stacking and for effects of magnesium ions on photosystem II-light-harvesting complex aggregates in the absence of membrane stacking. *Arch Biochem Biophys* **200**, 374–386 (1980).
14. Rubin, B. T., Chow, W. S. & Barber, J. Experimental and theoretical considerations of mechanisms controlling cation effects on thylakoid membrane stacking and chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* **634**, 174–190 (1981).
15. Murakami, S. & Packer, L. The role of cations in the organization of chloroplast membranes. *Arch Biochem Biophys* **146**, 337–347 (1971).
16. Staehelin, A. Reversible particle movements associated with unstacking and restacking of chloroplast membranes *in vitro*. *J Cell Biol* **71**, 136–158 (1976).
17. Standfuss, J., van Scheltinga, A. C. T., Lamborghini, M. & Kühlbrandt, W. Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J* **24**, 919–928 (2005).

18. Janik, E. *et al.* Molecular architecture of plant thylakoids under physiological and light stress conditions: a study of lipid-light-harvesting complex II model membranes. *Plant Cell* **25**, 2155–2170 (2013).
19. Kobayashi, K. Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development. *J Plant Res* (2016).
20. Deme, B., Cataye, C., Block, M. A., Marechal, E. & Jouhet, J. Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *FASEB J* **28**, 3373–3383 (2014).
21. Simidjiev, I., Barzda, V., Mustárdy, L. & Garab, G. Role of thylakoid lipids in the structural flexibility of lamellar aggregates of the isolated light-harvesting chlorophyll *a/b* complex of photosystem II. *Biochemistry* **37**, 4169–4173 (1998).
22. Webb, M. S., Tilcock, C. P. S. & Green, B. R. Salt-mediated interactions between vesicles of the thylakoid lipid digalactosyldiacylglycerol. *Biochim Biophys Acta* **938**, 323–333 (1988).
23. Webb, M. S. & Green, B. R. Effects of neutral and anionic lipids on digalactosyldiacylglycerol vesicle aggregation. *Biochim Biophys Acta* **1030**, 231–237 (1990).
24. Ryrie, I., Anderson, J. M. & Goodchild, D. J. The role of the light-harvesting chlorophyll *a/b* -protein complex in chloroplast membrane stacking. Cation-induced aggregation of reconstituted proteoliposomes. *Eur J Biochem* **107**, 345–354 (1980).
25. Sprague, S. G., Camm, E. L., Green, B. R. & Staehelin, A. Reconstitution of light-harvesting complexes and photosystem II cores into galactolipid and phospholipid liposomes. *J Cell Biol* **100**, 552–557 (1985).
26. Mullet, J. E. & Arntzen, C. J. Simulation of grana stacking in a model membrane system. Mediation by a purified light-harvesting pigment-protein complex from chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **589**, 100–117 (1980).
27. Armbruster, U. *et al.* Arabidopsis CURVATURE THYLAKOID1 proteins modify thylakoid architecture by inducing membrane curvature. *Plant Cell* **25**, 2661–2678 (2013).
28. Gräb, O., Abacilar, M., Daus, F., Geyer, A. & Steinem, C. 3D-membrane stacks on supported membranes composed of diatom lipids induced by long-chain polyamines. *Langmuir* **32**, 10144–10152 (2016).
29. Goksu, E. I., Vanegas, J. M., Blanchette, C. D., Lin, W.-C. & Longo, M. L. AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 254–266 (2009).
30. Anderson, T. H. *et al.* Formation of supported bilayers on silica substrates. *Langmuir* **25**, 6997–7005 (2009).
31. Hardy, G. J., Nayak, R. & Zauscher, S. Model cell membranes: techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **18**, 448–458 (2013).
32. Richter, R. P., Berat, R. & Brisson, A. R. Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view. *Langmuir* **22**, 3497–3505 (2006).
33. Kim, Y.-H. *et al.* Supported lipid bilayer formation by the giant vesicle fusion induced by vesicle–surface electrostatic attractive interaction. *Chem Phys Lett* **420**, 569–573 (2006).
34. Seantier, B. & Kasemo, B. Influence of mono- and divalent ions on the formation of supported phospholipid bilayers via vesicle adsorption. *Langmuir* **25**, 5767–5772 (2009).
35. Yang, C., Boggasch, S., Haase, W. & Paulsen, H. Thermal stability of trimeric light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHCIIb) in liposomes of thylakoid lipids. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1642–1648 (2006).

36. Zhou, F. *et al.* Effect of monogalactosyldiacylglycerol on the interaction between photosystem II core complex and its antenna complexes in liposomes of thylakoid lipids. *Photosynth Res* **99**, 185–193 (2009).
37. Krupa, Z., Huner, N. P. A., Williams, J. P., Maissan, E. & James, D. R. Development at cold-hardening temperatures. The structure and composition of purified rye light harvesting complex II. *Plant Physiol* **84**, 19–24 (1987).
38. Dewa, T. *et al.* Lateral organization of a membrane protein in a supported binary lipid domain: direct observation of the organization of bacterial light-harvesting complex 2 by total internal reflection fluorescence microscopy. *Langmuir* **22**, 5412–5418 (2006).
39. Sumino, A. *et al.* Selective assembly of photosynthetic antenna proteins into a domain-structured lipid bilayer for the construction of artificial photosynthetic antenna systems: structural analysis of the assembly using surface plasmon resonance and atomic force microscopy. *Langmuir* **27**, 1092–1099 (2011).
40. Kirchhoff, H., Haferkamp, S., Allen, J. F., Epstein, D. B.A. & Mullineaux, C. W. Protein diffusion and macromolecular crowding in thylakoid membranes. *Plant Physiol* **146**, 1571–1578 (2008).
41. van den Brink-van der Laan, Els, Antoinette Killian, J. & Kruijff, B. de. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim Biophys Acta* **1666**, 275–288 (2004).
42. Sprague, S. G. & Staehelin, A. Effects of reconstitution method on the structural organization of isolated chloroplast membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* **777**, 306–322 (1984).
43. Reviakine, I. & Brisson, A. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* **16**, 1806–1815 (2000).
44. Richter, R. P. & Brisson, A. R. Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophys J* **88**, 3422–3433 (2005).
45. Jass, J., Tjærnhage, T. & Puu, G. From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys J*, 3153–3163 (2000).
46. Benes, M. *et al.* Surface-dependent transitions during self-assembly of phospholipid membranes on mica, silica, and glass. *Langmuir* **20**, 10129–10137 (2004).
47. Rädler, J., Radmacher, M. & Gaub, H. E. Velocity-dependent forces in AFM imaging of lipid films. *Langmuir* **10**, 3111–3115 (1994).
48. McDonnell, A. & Staehelin, A. Adhesion between liposomes mediated by the chlorophyll *a/b* light-harvesting complex isolated from chloroplast membranes. *J Cell Biol*, 40–56 (1980).
49. Fehr, N. *et al.* Modelling of the N-terminal section and the luminal loop of trimeric light harvesting complex II. *J Biol Chem* **43**, 26007–26020 (2015).
50. Wan, T. *et al.* Crystal structure of a multilayer packed major light-harvesting complex: implications for grana stacking in higher plants. *Mol Plant* **7**, 916–919 (2014).
51. Schaller, S. *et al.* Regulation of LHCII aggregation by different thylakoid membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* **1807**, 326–335 (2011).
52. Lee, A. G. Membrane lipids: it's only a phase. *Curr Biol* **10**, R377-R380 (2000).
53. Kollmitzer, B., Heftberger, P., Rappolt, M. & Pabst, G. Monolayer spontaneous curvature of raft-forming membrane lipids. *Soft Matter* **9**, 10877–10884 (2013).

54. Garab, G., Lohner, K. & Laggner, P. Self-regulation of the lipid content of membranes by non-bilayer lipids: a hypothesis. *Trends Plant Sci* **5**, 489–494 (2000).
55. Garab, G. Self-assembly and structural–functional flexibility of oxygenic photosynthetic machineries: personal perspectives. *Photosynth Res* **127**, 131–150 (2016).
56. Heidrich, J., Thurotte, A. & Schneider, D. Specific interaction of IM30/Vipp1 with cyanobacterial and chloroplast membranes results in membrane remodeling and eventually in membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* **1859**, 537–549 (2017).
57. Murphy, D. J. The importance of non-planar bilayer regions in photosynthetic membranes and their stabilisation by galactolipids. *FEBS Lett* **150**, 19–26 (1982).
58. Boudiere, L. *et al.* Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis and trafficking. *Biochim Biophys Acta* **1837**, 470–480 (2014).

## Supplementary information



**Supplementary Figure 1 FRAP experiment on a membrane stack formed by spreading of LHCII containing SUVs at DGDG/MGDG = 2:1 with  $\text{Ca}^{2+}$  on mica. (a)** The presence of MGDG in DGDG-SLBs induces the formation of membrane stacks with enormous height (red intensity) out of the flat bilayer (purple intensity); see also **Figure 3c**. **(b)** A series of fluorescence micrographs within the dotted section in **(a)** before (5 s), right after (8 s), and 110 s after bleaching shows complete bleaching of a single membrane stack (arrow in **(a)**). **(c)** Almost full recovery (~90%) within the region of interest (white circle) as monitored by the time-resolved relative fluorescence intensity  $F/F_0$  demonstrates that stacks correspond to protrusions of the flat membrane surface since they are connected with the surrounding bilayer. Scale bars: **(a)** 5  $\mu\text{m}$ , **(b)** 3  $\mu\text{m}$ .

# Kapitel IV: Diffusionsmessungen des LHCII und Bestimmung der Membranfluidität in Abhängigkeit der Thylakoidlipide

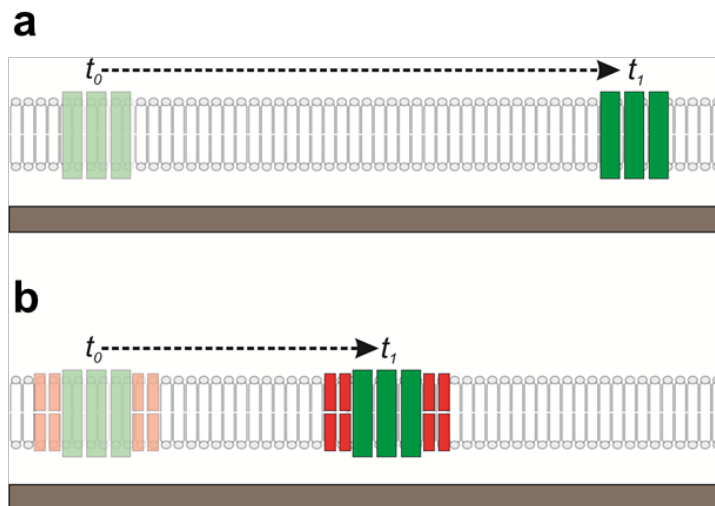
## 1. Einleitung

### 1.1. Nachweis einer Assoziation von MGDG mit LHCII-Trimeren durch Diffusionsmessungen

Aus dem vorteilhaften Zusammenspiel zwischen dem majoren Lichtsammelkomplex (LHCII) und Monogalaktosyldiacylglycerol (MGDG) – d.h. die Ermöglichung einer lamellaren Membranphase für MGDG und die Stabilisierung der LHCII-Struktur – ist ersichtlich, dass es zwischen diesen beiden Komponenten strukturelle Interaktionen geben muss (siehe **Kapitel I 1.2.1.** und **Kapitel II Fig. 3c**). Ob es sich dabei um direkte Lipid-Protein-Interaktionen, d.h. LHCII und MGDG stehen in unmittelbarem Kontakt zueinander, oder indirekte Wechselwirkungen – bedingt durch globale physikalische Membraneigenschaften (Lateraldruck) – handelt, ist allerdings nicht bekannt (siehe **Kapitel I 3.**). Mithilfe von Diffusionsmessungen sollte in diesem Kapitel herausgefunden werden, ob MGDG möglicherweise als annulares Lipid des LHCII fungiert (siehe **Kapitel I Abb. 7b**). In diesem Fall wäre zu erwarten, dass MGDG in lamellaren Membranen einen oder mehrere feste Lipidgürtel um die trimeren Komplexe herum ausbildet. Dadurch würde sich der hydrodynamische Radius des LHCII-Partikels vergrößern (siehe **1.1.1.**), wodurch die Diffusion des Proteins verlangsamt wäre im Vergleich zu Membranen, in denen kein MGDG enthalten ist (**Abb. 1**).

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob und inwiefern die Ladung der Thylakoidmembran bzw. die Chemie der Lipidkopfgruppen einen Einfluss auf die Mobilität des LHCII ausüben (siehe **Kapitel I 3.**). Dazu wurden Diffusionsmessungen mit LHCII-Komplexen in Membranen zum einen bestehend aus POPG und zum anderen bestehend aus Digalaktosyldiacylglycerol (DGDG) durchgeführt. In dem Zusammenhang sind Bremseffekte z.B. durch Wechselwirkungen des positiv geladenen N-Terminus mit den negativ geladenen Kopfgruppen von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) vorstellbar. Auf der anderen Seite könnten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen bestimmten Aminosäuren und den Zuckerkopfgruppen von DGDG und MGDG (siehe **Kapitel II Diskussion** in Zusammenhang mit der mechanischen Stabilisierung des LHCII) die Diffusion des Proteins verlangsamen.

Um das Ausmaß solch spezifischer Effekte beurteilen zu können, ist es essentiell unabhängig vom LHCII-Protein zu bestimmen, wie die physikalischen Eigenschaften der Membran, d.h. das Produkt aus  $\mu$  und  $h$  (siehe **1.1.1.**), von den verschiedenen Thylakoidlipiden verändert werden. Als Referenz zum Protein wurden deshalb auch Diffusionsmessungen eines fluoreszierenden Lipids bei identischen Lipidzusammensetzungen durchgeführt.



**Abb. 1** Veränderung der lateralen Mobilität von LHCII bei einer Assoziation mit MGDG. Im Vergleich zur Diffusion ohne einen festen Lipidgürtel. (a) kann ein LHCII-Trimer (grün) im Verbund mit assoziierten MGDG-Molekülen (rot) in einem bestimmten Zeitintervall  $t_1$  nur eine kürzere Strecke zurücklegen (b). Dies liegt daran, weil die Diffusionsgeschwindigkeit in Membranen mit Vergrößerung des Partikelradius abnimmt (siehe **Abb. 2**).

### 1.1.1. Physikalische Einflussgrößen bei der Diffusion von Membranproteinen

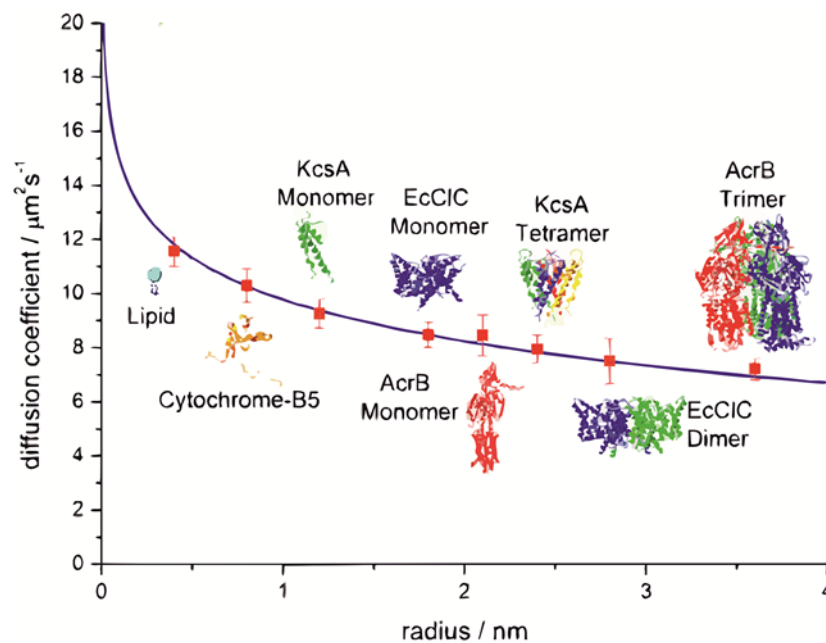
Die laterale Mobilität in Membranen wird durch den Diffusionskoeffizienten  $D$  beschrieben. Versteht man Lipide und Membranproteine als zylindrische Körper, so ist  $D$  unter anderem vom hydrodynamischen Radius  $R$ , also von der Größe des Partikels, abhängig. Zur Beschreibung der Relation von  $D$  und  $R$  gibt es in der Theorie unterschiedliche Modelle; in der Praxis deuten die meisten systematischen Untersuchungen jedoch auf eine antiproportional-logarithmische Beziehung hin<sup>1,2</sup> (**Abb. 2**). Sie findet mathematisch gesehen im sogenannten Saffman-Delbrück-Modell Ausdruck<sup>3</sup>, welches den Diffusionskoeffizienten in Membranen wie folgt beschreibt:

$$D = \frac{k_B T}{4\pi\mu h} \left( \ln \left( \frac{\mu h}{\mu' R} \right) - \gamma \right)$$

mit der Boltzmann-Konstanten  $k_B$ , der Temperatur  $T$ , der Membranviskosität  $\mu$ , der Viskosität des Umgebungsmediums  $\mu'$ , der Membrandicke  $h$  und der Euler-Konstanten  $\gamma$ .

Die Viskosität des wässrigen Umgebungsmediums kann in den meisten Fällen als konstant betrachtet werden. In der Membran wird  $\gamma$  durch die Packungsdichte der Lipidmatrix bestimmt, welche sich wiederum aus den physikochemischen Eigenschaften und der Geometrie der Lipide ergibt. Es gilt: je höher die Packungsdichte desto starrer und damit viskoser die Membran. Die Packungsdichte wird im Kopfgruppenbereich beispielweise durch intermolekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen oder ionische Anziehungs- bzw. Abstoßungskräfte (je nach Art der

funktionellen Gruppen) dirigiert<sup>4,5</sup>. Bezüglich des Alkylkettenbereichs sinkt die Packungsdichte (sofern die Kopfgruppe konserviert ist) mit steigendem Anteil an C=C-Doppelbindungen aufgrund höherer räumlicher Beanspruchung, d.h. die Viskosität nimmt mit sinkendem Sättigungsgrad der Fettsäuren ab<sup>6,7</sup>. Die Membrandicke wird überwiegend durch Länge und Verzweigung der Fettsäureketten bestimmt. Hier gilt grundsätzlich für die Diffusion: je größer  $h$  desto mehr van der Waals-Wechselwirkungen können zwischen der Lipidmatrix und dem Protein stattfinden, wodurch das Membranprotein letztlich ausgebremst wird und die Mobilität sinkt<sup>4</sup>.



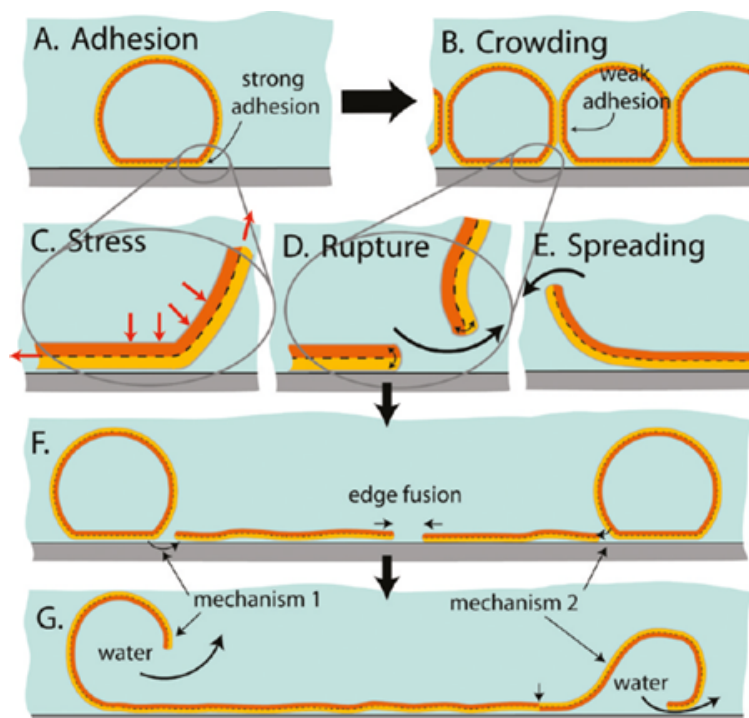
**Abb. 2 Zusammenhang zwischen Größe und Mobilität von Membranproteinen.** In Membranen verhält sich der Diffusionskoeffizient eines beweglichen Partikels reziprok zum Logarithmus seines Radius, wie anhand dieser Beispielpoteine graphisch dargestellt. Abbildung entnommen und modifiziert aus Ref. (1).

## 1.2. Membransysteme zur Messung der Mobilität von LHCII *in vitro*

In diesem Kapitel wurde „Fluorescence Recovery After Photobleaching“ (FRAP) als primäre Methodik zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten verwendet. Dabei wird der Verlauf eines Fluoreszenzsignals in einer sogenannten „Region of Interest“ (ROI) – üblicherweise zirkulär mit einem Radius  $r$  von einigen Mikrometern – über die Zeit aufgezeichnet (siehe **Kapitel I 3.1.**). Somit stellt ein großflächiges kontinuierliches Membransystem, unabhängig von der jeweiligen Lipidumgebung oder der Art des Systems, die Grundvoraussetzung für FRAP-Experimente mit Membranproteinen oder Lipiden dar. Nachfolgend sind verschiedene Modellmembransysteme vorgestellt, die prinzipiell für FRAP-Messungen geeignet sind und deshalb in dieser Arbeit verwendet wurden.

### 1.2.1. „Supported Lipid Bilayers“ (SLBs) hergestellt aus (Proteo-) Liposomen

Als Messsystem zur Diffusion des LHCII wurden hauptsächlich SLBs verwendet, da diese mit vergleichsweise einfachen Mitteln zu präparieren sind (siehe **Kapitel I 4.**). Dazu werden Liposomen bzw. Proteoliposomen auf einer gewünschten Oberfläche für eine bestimmte Zeit inkubiert. Dabei erfolgt nach Adsorption der Vesikel auf der Oberfläche (**Abb. 3A**) anschließend durch Vesikel-Vesikel-Interaktionen gegebenenfalls ein Fusionieren der Vesikel (**Abb. 3B**), in jedem Fall platzen die Liposomen bei ausreichendem Deformationsstress schließlich zu einzelnen „Membranpatches“ auf (Spreitung; **Abb. 3C - E**). Die Regionen von isolierten Membranabschnitten mit starker Krümmung sind sehr reaktiv und fusionieren entweder miteinander oder induzieren das Aufplatzen weiterer Vesikel, was letztlich in der Ausbildung einer flachen Lipiddoppelschicht auf der Oberfläche resultiert (**Abb. 3F,G**)<sup>8-11</sup>. Die Schritte **A** und **B** können überwiegend durch die Präsenz bivalenter Kationen, die Ionenstärke des Puffers und die Vesikelkonzentration beeinflusst werden; der restliche Prozess wird vor allem von der Temperatur, osmotischem Stress und der Vesikelgröße dirigiert<sup>9,10,12-14</sup>.



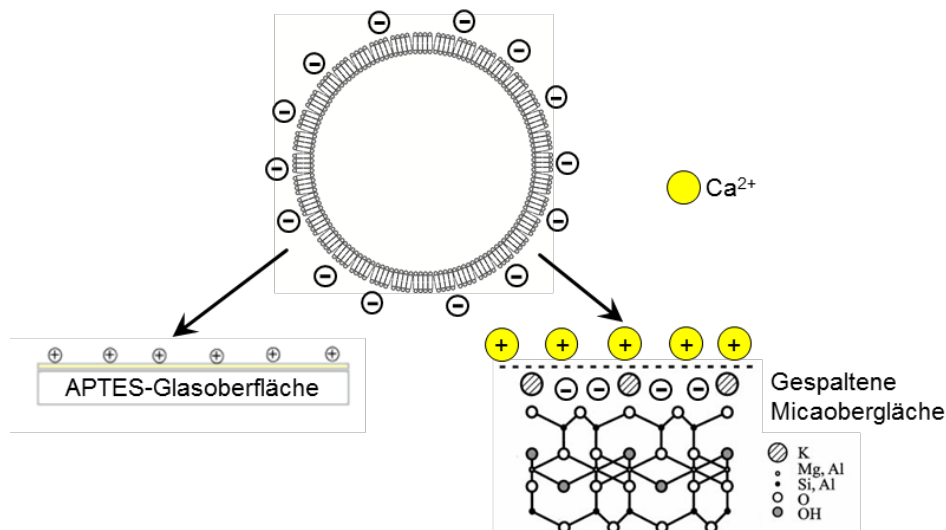
**Abb. 3 Mechanismus der Bildung von SLBs aus Lipidvesikeln.** Einzelne Vesikel heften sich an die Substratoberfläche an (**A**) und wechselwirken mit zunehmender Benetzung der Oberfläche vermehrt untereinander (**B**). Nach Erreichen einer kritischen Vesikelkonzentration beginnen die Vesikel aufzuplatzen und die einzelnen Lipiddoppelschichten breiten sich auf der Oberfläche aus (**C - E**). Die Ecken so entstandener „Membranpatches“ sind energetisch ungünstig und fusionieren deshalb miteinander oder mit intakten Vesikeln, wodurch diese wiederum aufplatzen (**F, G**). Abbildung entnommen aus Ref. (8).

In Hinblick auf valide FRAP-Messungen ist es wichtig, dass ein möglichst lückenloses Membransystem entsteht (erkennbar durch eine hohe mobile Fraktion; siehe **Kapitel I 3.1.**). Deshalb müssen während der SLB-Herstellung genügend Liposomen an die Oberfläche anbinden können, und anschließend muss die Vesikelspreitung so vollständig wie möglich ablaufen. Weil hierbei den elektrostatischen Wechselwirkungen eine besondere Bedeutung zugeschrieben wird<sup>15,16</sup>, wurden die (Proteo-) Liposomen auf geladenen Oberflächen inkubiert (siehe **1.2.1.1.**).

### 1.2.1.1. Verwendete Oberflächen zur Spreitung der Lipidvesikel

Zum einen wurden Glasoberflächen chemisch so modifiziert, dass sie im Anschluss positive Ladungen in Form von exponierten  $\text{NH}_3^+$ -Gruppen tragen (**Abb. 4a**). Hierdurch sollten zwischen der Oberfläche und den Liposomen entweder elektrostatische Interaktionen mit negativ geladenen Phosphatresten (im Fall von POPG) oder polare Wechselwirkungen mit der negativen Partialladung von OH-Gruppen der Galaktosylreste (im Fall von DGDG und MGDG) ermöglicht werden<sup>15,17,18</sup>.

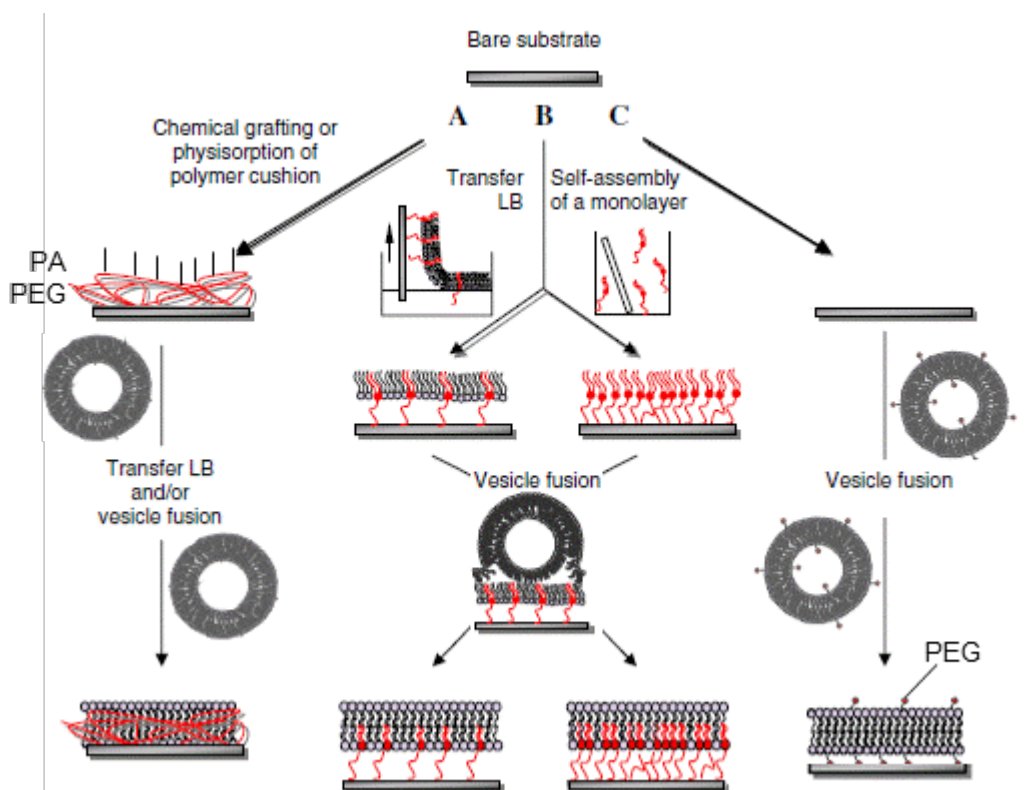
Zum anderen wurde Mica (Glimmer) als Substrat eingesetzt, das im Gegensatz zu Glas eine atomar flache Oberflächenstruktur aufweist (**Abb. 4b**). Hierdurch sind stärkere Adsorptionskräfte möglich, die eine Spreitung von Lipidvesikeln weiter begünstigen könnten. Die Micaoberfläche ist negativ geladen, weshalb sie von Kaliumionen bedeckt ist<sup>19</sup>. Durch Zugabe zweiwertiger Kationen wie Kalzium kann deshalb eine Ladungsbrücke zwischen negativ geladenen Oberfläche und den Liposomen geschaffen werden<sup>11,14-16,20-22</sup>.



**Abb. 4 Strategien zur Spreitung von Lipidvesikeln durch elektrostatische Interaktionen.** Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Liposomen und einer positiv geladenen Substratoberfläche erleichtern die Adhäsion von Vesikeln (**A** in **Abb. 3**) und können den Deformationsstress auf angeheftete Vesikel erhöhen (**C** in **Abb. 3**). Hierfür können zum einen Glasoberflächen durch Modifikation mit APTES positiv aufgeladen werden (**a**). Zum anderen kann auf Mica durch Zugabe zweiwertiger Kationen (Kalzium) eine Ladungsbrücke zwischen der negativ geladenen Oberfläche und den Vesikeln geschaffen werden (**b**). Abbildung zusammengesetzt aus Ref. (17) und (19).

### 1.2.2. „Tethered Bilayer Lipid Membranes“ (tBLMs)

Bei tBLMs handelt es sich um oberflächengestützte Membranen, die aufgrund einer Platzhaltergruppe am Lipid einen größeren Abstand zum Substrat haben. Dies hat u.a. den Vorteil, dass die Mobilität enthaltener Proteine nicht durch Wechselwirkungen mit dem Substrat eingeschränkt wird, was eine realistischere Bestimmung von Diffusionskoeffizienten erlaubt oder die Diffusion von Membranproteinen mit großen Extramembrandomänen erst ermöglicht<sup>23,24</sup>. Prinzipiell können tBLMs auf drei unterschiedliche Arten hergestellt werden: mittels Spreitung von Lipidvesikeln auf einer Polymer benetzten Oberfläche (**Abb. 5A**), durch Fusion von Liposomen mit einer Lipideinzelschicht, die mithilfe von Polymerankern auf der Substratoberfläche assembliert wurde (**Abb. 5B**), oder durch Spreitung von Lipidvesikeln, die selbst Polymeranker tragen (**Abb. 5C**). Mit der Verwendung von LHCII-Liposomen sollte es daher prinzipiell möglich sein, den LHCII direkt in tBLMs zu integrieren.

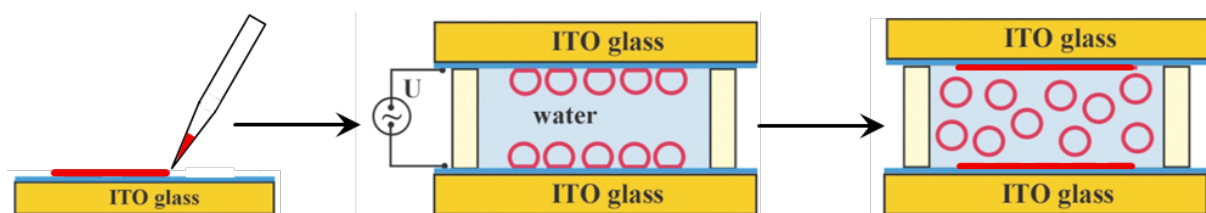


**Abb. 5 Verschiedene Wege zur Herstellung von tBLMs.** (A) Das Substrat wird mit einem Polymerkissen (PEG) chemisch modifiziert, dem zusätzlich exponierte Fettsäurereste (PA) als Membrananker angefügt werden können. Anschließend erfolgt eine Fusion von Lipidvesikeln auf der Polymeroberfläche. (B) Mittels Langmuir Blodgett (LB) Transfer oder Selbstassemblierung wird die Substratoberfläche mit einer Lipideinzelschicht benetzt, bei der zwischen Lipid und Substrat Polymerplatzhalter positioniert sind. Durch Fusion mit Liposomen wird eine zweite Lipidschicht eingefügt. (C) Werden Liposomen, die zusätzlich Lipide mit exponierten PEG-Platzhaltern enthalten, direkt auf dem Substrat gespreitet, entstehen daraus ebenso tBLMs. Abbildung entnommen und modifiziert aus Rossi und Chopineau (2007).

### 1.2.3. „Giant Unilamellar Vesicles“ (GUVs)

GUVs sind prinzipiell als Liposomen, d.h. runde Vesikel, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht, zu verstehen, deren Durchmesser jedoch um ein hundertfaches größer ist (beispielsweise 10  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu 100 nm). Aufgrund dieser Ausmaße werden GUVs häufig als Mikroreaktoren oder gar als Modelle für ganze Zellen eingesetzt und sind sehr gut für die optische Mikroskopie geeignet. Häufig finden GUVs bei Studien zu Membranfusion, Membrankurvatur/-deformation, Lipiddomänen (laterale Heterogenität), Membranpermeabilität und Diffusionsmessungen von Lipiden und Membranproteinen Anwendung<sup>25</sup>. Jeder GUV bildet ein eigenes abgeschlossenes Membransystem, das genug Fläche für FRAP-Messungen bietet<sup>26–29</sup>. Darüber hinaus können Diffusionsmessungen – sofern die GUVs intakt bleiben - nicht nur in der substratgebundenen Membranebene (direkt an der Oberfläche) sondern auch in der darauf aufgelagerten freischwimmenden Membranebene durchgeführt werden<sup>26,30</sup>. Dadurch kann die Mobilität von Membranproteinen im Vergleich zu SLBs deutlich erhöht werden<sup>31</sup>.

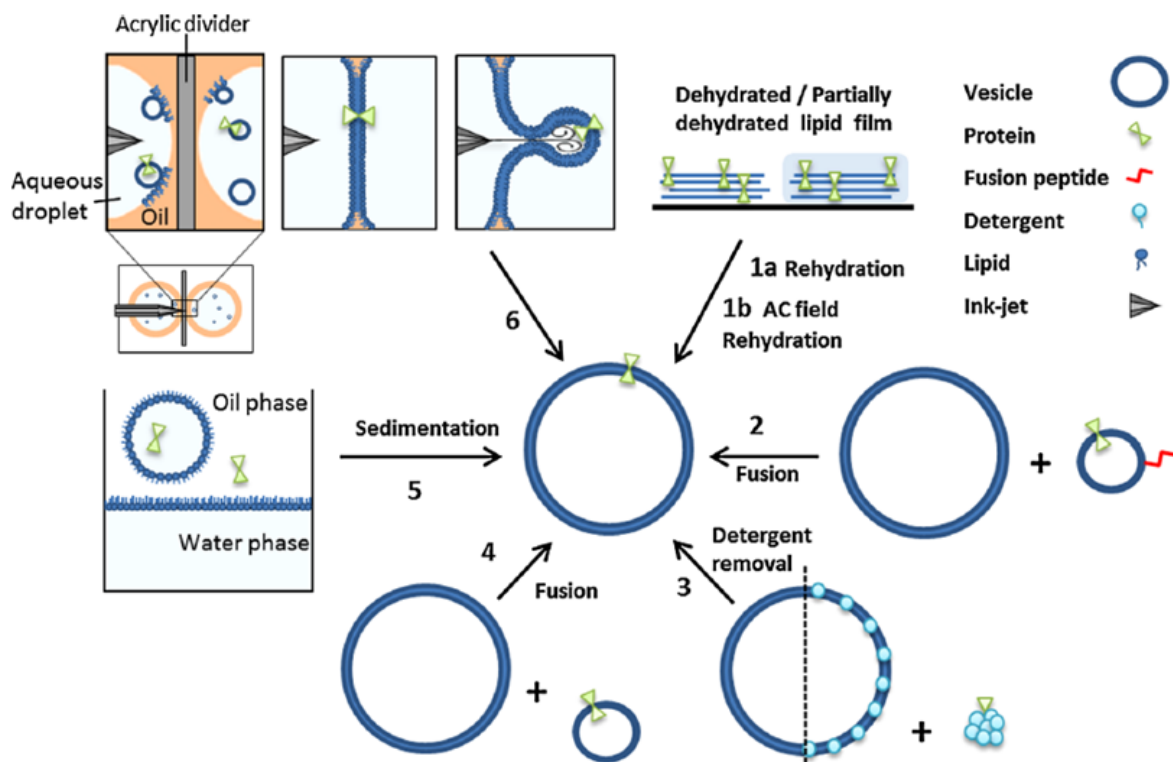
Die meist verwendete Methode zur Herstellung von GUVs ist die Hydratisierung von Lipidfilmen auf Oberflächen durch spontanes Anschwellen oder Elektroformation (**Abb. 6**). Letztere Variante ist eher für Vesikel mit einem geringen Anteil geladener Lipide in Kombination mit Puffern niedriger Ionenstärke geeignet – zwei Bedingungen, die bei der Verwendung von DGDG und MGDG erfüllt sind. Der Vorteil bei der Elektroformation ist, dass sich der Hydratisierungsprozess besser kontrollieren lässt und deshalb homogenere GUVs entstehen<sup>25</sup>. In dieser Arbeit sollte zum einen die Elektroformation von Glykolipid-GUVs als Grundlage für Diffusionsversuche etabliert werden. Zum anderen sollte eine geeignete Möglichkeit gefunden werden, den LHCII in diese Vesikel zu rekonstituieren (s.u.).



**Abb. 6 Prinzip der Elektroformation von GUVs.** Zunächst wird auf Indium-Zinnoxid (ITO) beschichtete Objektträger ein Lipidfilm (rot) pipettiert und dieser anschließend getrocknet. Daraufhin werden zwei präparierte Objektträger gegenüberliegend zu einer Kammer zusammengebaut. Die Kammer wird mit osmotischem Medium (Saccharoselösung) befüllt und zwischen den leitenden Oberflächen wird ein elektrisches Feld in Form einer Sinusspannung  $U$  angelegt. Dadurch stülpen sich aus den Lipidfilmen Vesikel aus, die zu enormer Größe anschwellen und sich anschließend in das Umgebungsmedium hinein abschnüren. Abbildung entnommen und modifiziert aus Taylor *et al.* (2003).

### 1.2.3.1. Integration von Membranproteinen in GUVs

Zur Herstellung von GUVs mit inserierten Membranproteinen, sog. Proteo-GUVs, gibt es verschiedene Ansätze (zusammengefasst in **Abb. 7**)<sup>32</sup>. In dieser Arbeit wurde allerdings nur auf leicht durchführbare Methoden zurückgegriffen (d.h. ohne „Microfluidic Jetting“, siehe „6“ in **Abb. 7**), bei denen der LHCII in Form von Proteoliposomen bereits in Lipiddoppelschichten gebunden vorlag. Der Vorteil dabei ist, dass die Herstellung von LHCII-Liposomen bereits etabliert ist und das Lipid-Protein-Verhältnis (LPV) deshalb gut kontrolliert werden kann. Bei der ersten getesteten Methode sollten GUVs mittels Elektroformation hergestellt werden (siehe **Abb. 6**) und anschließend durch Inkubation mit Proteoliposomen spontan zu Proteo-GUVs fusionieren („4“ in **Abb. 7**)<sup>32,33</sup>. Bei der zweiten verwendeten Methodik sollten Proteoliposomen in Gegenwart einer gesättigten NaCl-Lösung auf der Elektrodenoberfläche zu Lipid-Protein-Filmen partiell eingetrocknet werden. Aus den Schichten sollten mithilfe der Elektroformation (analog zu **Abb. 6**) GUVs hydratisiert werden, in denen die LHCII-Komplexe bereits enthalten sind („1“ in **Abb. 7**)<sup>32,34</sup>. Das Lipid-zu-Protein-Verhältnis der so entstandenen Proteo-GUVs müsste dabei ungefähr dem der Proteoliposomen entsprechen.

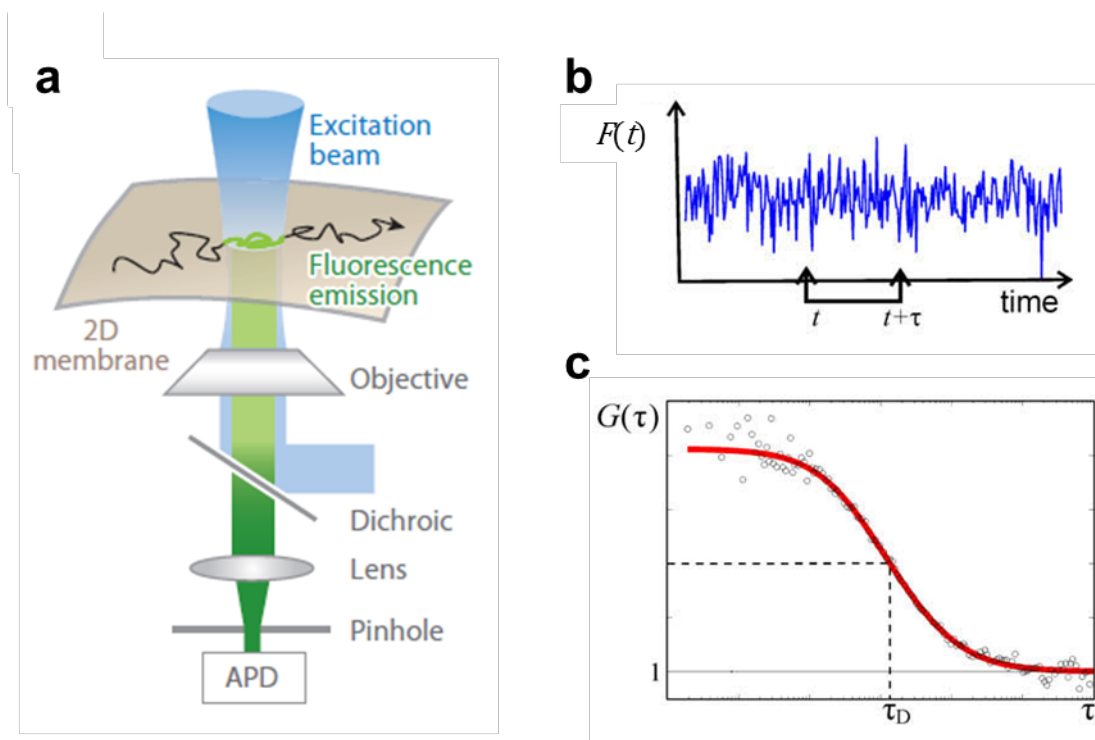


**Abb. 7 Möglichkeiten zur Herstellung von Proteo-GUVs.** (1) Elektroformation eines Lipid-Protein-Films (analog zu **Abb. 6**) nach (partieller) Dehydratisierung von Proteoliposomen. (2) Peptid induzierte Fusion von GUVs mit Proteoliposomen. (3) Direkte Rekonstitution von gelösten Membranproteinen in GUVs durch Detergenzentzug. (4) Spontane Fusion von GUVs mit Proteoliposomen. (5) „Droplet Transfer Method“: Sedimentation von wasserhaltigen Lipidtröpfchen durch eine Ölphase hindurch in eine lipidbeschichtete Wasserphase hinein - in Anwesenheit von Proteinen. (6) „Microfluidic Jetting“: in einer Ölphase wird aus zwei gegenüberliegenden Wassertropfen, die Proteoliposomen enthalten, eine freischwimmende (Proteo-) Lipiddoppelschicht gebildet. Aus dieser werden unter Einspritzung von Umgebungsmedium Proteo-GUVs geformt. Abbildung entnommen aus Ref. (32).

### 1.3. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten

Diffusionsmessungen mittels (FCS) basieren auf der Bewegung weniger Fluorophore in eine ROI hinein und wieder heraus. Die daraus resultierende Schwankung des Fluoreszenzsignals wird über die Zeit aufgezeichnet und das Signal anschließend mit sich selbst korreliert (Autokorrelation) (**Abb. 8**). Dies gibt Aufschluss darüber, wie schnell sich das Intensitätsprofil verändert ( $\tau_D$ ), und somit mit welcher Geschwindigkeit die Moleküle diffundieren. Weiterhin können mit FCS Konzentrationen bestimmt und molekulare Interaktionen wie Bindungs- und Dissoziationsvorgänge untersucht werden

35–38



**Abb. 8 Funktionsweise von FCS.** (a) Der Laserstrahl eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops wird auf ein sehr kleines Detektionsvolumen in der Membranebene fokussiert. Die darin emittierten Photonen werden vom Objektiv gesammelt und von einer Fotodiode (APD) detektiert. (b) Fluoreszierende Moleküle, die durch das Detektionsvolumen hindurch diffundieren (siehe (a)), erzeugen Fluktuationen im Fluoreszenzsignal  $F(t)$ . Innerhalb der Zeitspur wird das Signal zu einem bestimmten Zeitpunkt  $t$  entlang verschiedener „Lagtimes“  $\tau$  verschoben und dabei jeweils mit sich selbst korreliert (Autokorrelation  $G(\tau)$ ). (c) Anschließend wird  $G(\tau)$  gegen  $\tau$  aufgetragen und der Verlauf der Daten gefittet. Je größer  $G(\tau)$  desto mehr stimmt das Fluoreszenzprofil nach einer gewissen „Lagtime“ noch mit sich selbst überein, beim Minimum ( $G(\tau) = 1$ ) hat sich das Profil vollständig verändert. Der Zeitpunkt, bei dem 50% des Profils noch übereinstimmen, wird als mittlere Verweildauer  $\tau_D$  der Fluorophore im Detektionsbereich bezeichnet;  $\tau_D$  verhält sich reziprok zum Diffusionskoeffizienten. Abbildung zusammengesetzt aus Ref. (38) und (46).

Mithilfe dieser Technik ist im Gegensatz zur FRAP auch die Ermittlung sehr großer Diffusionskoeffizienten möglich ( $D > 100 \mu\text{m}^2/\text{s}$  z.B. bei Fluorophoren in Lösung), jedoch ist der Detektionsbereich bei niedrigen Diffusionswerten limitiert ( $D \geq 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$  im Vergleich zu FRAP mit  $D \geq 0,01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ )<sup>39</sup>. Für Diffusionsmessungen mit Membranproteinen wie den LHCII ist FCS aber dennoch geeignet, da in Zusammenhang mit Membranproteinen in SLBs (die Mobilität ist hier aufgrund der Nähe zum Substrat am stärksten eingeschränkt) immer noch Werte für  $D$  zwischen 0,2 und  $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$  beschrieben sind<sup>17,18,40</sup>.

#### 1.4. Zielsetzung dieses Kapitels

Zunächst sollte ein geeignetes Membransystem gefunden werden, das unter Berücksichtigung der speziellen Eigenschaften (d.h. Ladung und Phasenverhalten; siehe **Kapitel I Abb. 2**) der Thylakoidlipide POPG, DGDG und MGDG valide Diffusionsmessungen mittels FRAP erlaubt. Dazu wurde die Ausbildung von SLBs in Abhängigkeit verschiedener Lipidmischungen auf zwei unterschiedlichen Oberflächen (Glas und Mica) untersucht. Weiterhin sollte überprüft werden, ob sich tBLMs und GUVs für Diffusionsmessungen unter Verwendung der ungeladenen Glykolipide eignen. Darüber hinaus wurden erste Versuche unternommen den LHCII in GUVs als Alternative zu Liposomen zu rekonstituieren.

Auf dieser Basis sollte durch Mobilitätsmessungen eines fluoreszierenden Lipids die Änderung der Membranviskosität durch die unterschiedlichen Thylakoidlipide beurteilt und im Anschluss bei den Diffusionsversuchen mit dem LHCII berücksichtigt werden. Dies sollte ermöglichen, den Einfluss spezifischer Effekte bedingt durch LHCII-Lipid-Interaktionen zu bestimmen. Dazu zählen mögliche Bremseffekte durch Ladung (bei POPG) oder Wasserstoffbrückenbindungen (bei DGDG) und Verringerung der Mobilität durch eine Vergrößerung des LHCII-Partikeldurchmessers im Fall einer direkten Assoziation mit MGDG-Molekülen. Um die Validität der Daten zu erhöhen, sollten analog zu den FRAP-Experimenten auch Diffusionsmessungen mittels FCS erfolgen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Präparation und Funktionalisierung von Oberflächen

Das Säubern und Funktionalisieren der Glasoberflächen (Deckgläschen) mit (3-aminopropyl)triethoxysilan (APTES) sowie das Präparieren der Micaoberflächen (Glimmer) erfolgten analog zu **Kapitel III, „Materials and Methods: Surface preparation and functionalization“**.

#### 2.1.1. Beschichtung von Glasoberflächen mit Polyethylenglykol-Palmitylsäure (PEG-PA)

Die chemische Modifikation von Glasoberflächen mit PEG-PA wurde in Anlehnung an Ref. (41) mit einigen Änderungen durchgeführt, weshalb nachfolgend das Protokoll im Ganzen beschrieben ist.

Die nicht-gesäuberten Deckgläschen wurden zunächst mit Milli-Q und Ethanol (p.A.) abgespült und danach mit einem Stickstoffstrom getrocknet. Als nächstes erfolgte für 20 min bei 75 °C (Heizplatte) eine Hydrophilisierung mit Milli-Q/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> (5:1:1), anschließend wurde mit Milli-Q und Aceton (p.A.) gespült und die Gläschen im Stickstoffstrom getrocknet. Die zu funktionalisierende Seite eines Deckgläschens wurde dann mit 20 µl (3-Glycidyoxypropyl)trimethoxysilan (GOPTS; Sigma Aldrich) benetzt und darauf ein anderes Deckgläschen gelegt. Zwischen den Gläschen durften sich keine Luftblasen befinden. Die Inkubation mit GOPTS erfolgte für 1 h bei RT. Währenddessen wurde das homofunktionale Diamino-polyethylenglycol (DAPEG; durchschnittliche Masse = 2000 g/mol; Rapp Polymere) bei 75 °C im Trockenschrank geschmolzen.

Nach der einstündigen Inkubation wurden die Deckgläschen mit Aceton (p.A.) abgespült, zweimal in ein frisches Acetonbad getaucht und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet. Analog zur GOPTS-Behandlung wurden die funktionalisierten Seiten der Deckgläschen nun paarweise mit 50 µl geschmolzenem DAPEG (luftblasenfrei) benetzt und für 3 h bei 75 °C im Trockenschrank inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen nacheinander rasch auseinandergezogen (da DAPEG schnell wieder fest wird) und gründlich mit Milli-Q gespült sowie danach mit einem Stickstoffstrom getrocknet.

Die Deckgläschen wurden nun mit der funktionalisierten Seite nach oben in Glas-Petrischalen gelegt, mit einer Lösung aus 0,125 M Palmitylsäure (PA; Sigma Aldrich) / 0,125 M Diisopropylcarbodiimid (Sigma-Aldrich) in DMSO übergossen und für 45 min bei RT inkubiert. Als letztes wurde noch einmal gründlich mit Ethanol (p.A.) und anschließend mit Milli-Q gespült. Die Deckgläschen wurden im Stickstoffstrom getrocknet und unter Argon-Atmosphäre bei -20 °C gelagert. In dieser Form können die PEG-PA beschichteten Deckgläschen für mehrere Monate aufbewahrt und verwendet werden.

## 2.2. Herstellung von Liposomen und Proteoliposomen

Die Herstellung von Liposomen, Isolation von nativen LHCII-Trimeren sowie die Insertion des Proteins in vorgeformte Liposomen erfolgten gemäß **Kapitel III, „Materials and Methods: Isolation of native LHCII complexes; Preparation of small unilamellar vesicles (SUVs); Reconstitution of LHCII into SUVs“**.

Für FRAP-Experimente mit Phenylethanol wurde bei der Liposomenherstellung die doppelte Konzentration Lipid und bei der Rekonstitution von LHCII die doppelte Konzentration Protein eingesetzt (molares Lipid-Protein-Verhältnis (LPV) bleibt konstant).

Zur direkten Ausbildung von tBLMs aus LHCII-Vesikeln nach Ref. (42) wurde bei der Liposomenherstellung vor dem Evaporationsschritt das in Chloroform gelöste Polymer-Lipid-Konjugat 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylenglykol)-550] (PEG-PE; Avanti Polar Lipids) in gewünschtem molaren Verhältnis zugegeben.

Für die Messungen via Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (siehe **2.6.2.**) wurde den Glykolipidliposomen der Membranmarker 1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanin Iodid (DiR; Biotium) im molaren Verhältnis 1:100 und das fluoreszierende Lipid C11TopFluor Galactosyl Ceramid (TopFluor-GC; Avanti Polar Lipids) im Verhältnis 1:15.000 – 1:30.000 zugemischt.

## 2.3. Bildung von SLBs

Das Spreitungsprotokoll von Liposomen und Proteoliposomen zu SLBs richtete sich jeweils nach der Oberfläche (Glas, Mica oder Polymerkissen) und ist in **Kapitel III „Materials and Methods: Formation of supported lipid bilayers (SLBs)“** beschrieben.

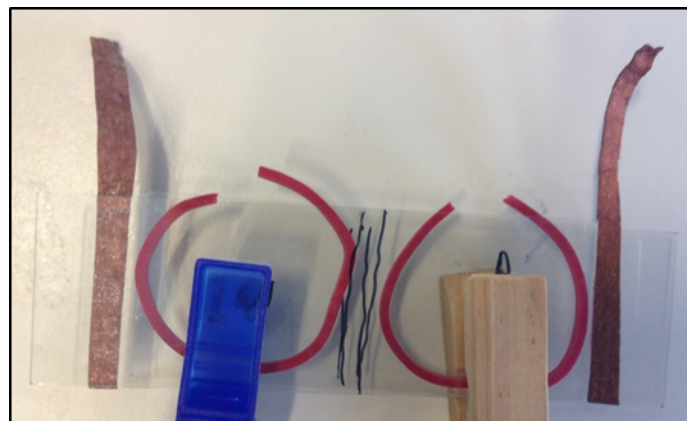
Zwecks FRAP-Messungen in Abhängigkeit von Phenylethanol (PEtOH; Sigma-Aldrich) wurde die Proteoliposomenlösung (siehe **2.2.**) jeweils 1:1 mit einer PEtOH-Stammlösung (inkl. 10 mM TRIS-HCl pH 7,5 / 0,1 mM EDTA) zur gewünschten PEtOH-Endkonzentration vermischt. Bei jeder Endkonzentration wurde anschließend durch Energieübertragungsexperimente fluoreszenzspektroskopisch mit einem FluoroMax-2 Spektrometer (Horiba Scientific) überprüft, ob nach der PEtOH-Zugabe die LHCII-Komplexe in den Liposomen ihre Integrität behalten <sup>43</sup>. Hierbei zeigte sich, dass Detergenzien (hier: TX-100) solubilisierte LHCII-Trimere sofort denaturieren, in den Liposomen bleiben die Komplexe jedoch vollständig intakt (auch nach PEtOH-Inkubation ü. N.). Die Spreitung erfolgte nach Standardprotokoll, wobei die Waschpuffer zusätzlich PEtOH in der zugehörigen Endkonzentration enthielten.

## 2.4. Elektroformation von GUVs

Zwei mit Indiumzinnoxid beschichtete Objektträger (ITO-„Slides“; 75 mm x 25 mm x 1,1 mm, 30 – 60  $\Omega$ /sq; Sigma-Aldrich) wurden zunächst mit Aceton getränktem Objektivreinigungspapier abgewischt (per Auge auf Lipidrückstände kontrolliert) und dann bei 150 °C für 30 min im Trockenschrank gebacken. Nach dem Abkühlen wurde am Rand jedes ITO-„Slides“ (auf der leitenden Oberfläche) ein Kupferklebestreifen (Hi-Bond HB 720A Conductive Copper Tape, 12mm x 33m, Hi-Bond Tapes Ltd) angebracht.

Dann wurden auf jedem der beiden ITO-„Slides“ mit einer Hamilton-Spritze insgesamt 10  $\mu$ l Lipidlösung (5 mg/ml in Chloroform) in Form zweier möglichst gleichmäßiger Filme (je 5  $\mu$ l) aufgetragen. Dabei sollte genug Abstand zum Kupferstreifen sowie zur benachbarten Lipidfläche gelassen und so aufgetragen werden, dass nach dem Zusammenbau der Kammer die jeweils zwei korrespondierenden Lipidfilmbereiche beider ITO-„Slides“ auf gleicher Höhe liegen. Im Anschluss wurde das Chloroform restlos durch 30 min im Vakuum mittels Speedvac (Vacuum Concentrator Mini-30, Bachhofer GmbH) entfernt.

Durch Übereinanderlegen der ITO-„Slides“ wurden nun jeweils die beiden mit Lipid benetzten Flächen zusammengeführt und durch einen Abstandshalter (aufgeschnittener Gummiring) getrennt. Die beiden Abstandshalter wurden dabei so platziert, dass sie jeden der beiden Lipidfilme pro Seite umschließen und die Öffnung der Abstandshalter zur Elektrodenseite zeigt (Richtung Überstände der Kupferstreifen; siehe **Abb. 9**). Die Kammer wurde anschließend mit zwei Klammern fixiert.



**Abb. 9 Aufnahme einer fertig zusammengebauten Elektroformationskammer zur Herstellung von GUVs.**

Die beiden von den Abstandshaltern eingeschlossenen Volumina wurden mit 200 mM Saccharose-Lösung gefüllt (je ca. 600  $\mu$ l; Luftblasen sollten vermieden werden) und die Kupferstreifen mit Krokodilklemmen an einen Funktionsgenerator (HT FG250D, H-TRONIC) angeschlossen. Der Kontakt sollte dabei auf der nicht-klebenden Seite der Streifen hergestellt werden.

Bei der Elektroformation wurde eine Sinus-Spannung mit 10 Hz / 2,5 V für 2,5 Stunden angelegt. Danach wurde die Frequenz für 30 min auf 5 Hz herabgesetzt, was die Ablösung der formierten GUVs von der ITO-Oberfläche erleichtern sollte. Abschließend wurden die beiden GUVs-Sucrose-Lösungen langsam mit einer „abgeknickten“ 200 µl-Pipettenspitze abgezogen, und in zuvor gewogene Reagiergefäße überführt. Hierdurch konnte gravimetrisch das genaue Volumen der Vesikellösungen bestimmt und somit deren Lipidkonzentrationen abgeschätzt werden. Die GUVs waren im Kühlschrank gelagert nur ca. eine Woche haltbar.

Nach der Prozedur wurden die Kupferstreifen entfernt und die ITO-„Slides“ gereinigt: zunächst wurden durch Abspülen unter warmem Leitungswasser Zuckerreste entfernt. Danach wurde solange mit Ethanol oder Isopropanol gespült, bis in der optischen Kontrolle keine Lipidrückstände mehr zu erkennen waren und die ITO-„Slides“ anschließend getrocknet.

#### 2.4.1. Fusion von GUVs mit Proteoliposomen

Gemäß Abschnitt 2.4. haben die GUVs nach Elektroformation eine Lipidkonzentration von ca. 0,1 mM, die Konzentration in Proteoliposomen beträgt 1 mM. Letztere wurden nach Abschnitt 2.2. inklusive 200 mM Saccharose in allen Puffern hergestellt und frisch extrudiert. Beim Fusionsansatz sollten jeweils äquivalente Mengen Lipid eingesetzt werden<sup>33</sup>, d.h. die GUVs (hergestellt nach 2.4.) wurden mit Proteoliposomen (LPV = 500) im Volumenverhältnis 10:1 zusammengegeben und die Fusionslösung vorsichtig mit einer abgeschnittenen Spitze resuspendiert. Zudem wurde mit einer 1 M Stammlösung eine TRIS-HCl pH 7,5-Konzentration von 10 mM eingestellt. Anschließend erfolgte eine Inkubation (ohne Schütteln oder Rühren) bei 4 °C ü. N. im Dunkeln. Bei vollständiger Fusion der LHCII-SUVs mit GUVs sollte das LPV in den Proteo-GUVs ungefähr 1000 betragen.

#### 2.4.2. Elektroformation von Proteo-GUVs aus Proteoliposomen

Die gesäuberten und gebackenen ITO-Slides (siehe 2.4.) wurden je in zwei Hälften unterteilt (siehe **Abb. 1**) und pro Hälfte mit 20 µl (Proteo-) Liposomenlösung ( $c(\text{Lipid}) = 0,8 \text{ mg/ml}$ ) tropfenweise (2 µl je Tropfen) benetzt<sup>34</sup>. Die Tropfen sollten sich dabei nicht berühren und es ist wichtig zügig zu arbeiten, damit die Tropfen nicht bereits an der Luft vor dem nächsten Schritt austrocknen. Daraufhin wurden die ITO-Slides in einem Exsikkator mit gesättigter NaCl-Lösung (359 g/l) ü. N. im Dunkeln inkubiert (partiell austrocknen).

Die Kammer wurde nun wie in 2.4. beschrieben zusammengebaut (**Abb. 1**) und die von den Abstandshaltern eingeschlossenen Lipidflächen sehr langsam vom Rand aus mit 100 mM Saccharose / 5 mM TRIS-HCl pH 7,5 befüllt, (ca. 600 µl je Lipidkammer). Danach wurde die Kammer abgedunkelt und über die Kupferstreifen an einen erweiterten Funktionsgenerator (TOE 7706, TOELLNER) angeschlossen, der auch die Modulation der Spannung erlaubt. Angelegt wurde eine Sinus-Spannung mit 12 Hz, beginnend bei 20 mV. Danach wurde alle 5 Minuten die Spannung um 22,5 mV erhöht,

sodass nach 4 Stunden 1,1 V erreicht wurden. Nach dieser Zeit wurde das Gerät auf 4 Hz und 2 V für 30 Minuten eingestellt (Ablösen der Vesikel).

Das Ernten der Proteo-GUVs sowie Säubern der ITO-Slides erfolgte gemäß **4.2**. Vor der mikroskopischen Untersuchung wurde zunächst fluoreszenzspektroskopisch überprüft, ob die LHCII-Komplexe nach der hier beschriebenen Prozedur ihre Integrität behalten (siehe **2.3**). Die Komplexe bleiben nach partiellem Austrocknen und Elektroformation in den Vesikeln vollkommen intakt.

### **2.4.3. Präparation der (Proteo-)GUVs für die Fluoreszenzmikroskopie**

Zur Mikroskopie der GUVs wurden pro Probe 20 µl GUVs-Puffer (100 mM NaCl / 0,1 M EDTA / 10 mM TRIS-HCl pH 7,5) auf ein gereinigtes Deckgläschen (siehe **2.1**.) gegeben und darauf 4 - 5 µl der GUVs- oder Proteo-GUVs-Lösung pipettiert. Innerhalb von 15 min Inkubation sollten die GUVs aufgrund der eingelagerten Saccharose (höhere Dichte) durch den Puffer hindurch auf die Substratoberfläche sedimentieren. Danach wurde das Deckgläschen auf einem Objektträger fixiert.

Bei den direkt aus (Proteo-) Liposomen geformten (Proteo-) GUVs (siehe **2.4.2**.) wurde der GUVs-Puffer zuvor im Verhältnis 1:1 mit 0,1 M EDTA / 10 mM TRIS-HCl pH 7,5 verdünnt. Im Falle LHCII-freier GUVs wurden diese mit 1 µg/ml des Fluoreszenzfarbstoffs BODIPY FL C<sub>16</sub> (Bodipy; Thermo Fisher Scientific) im GUVs-Puffer (durch 1:1000 Verdünnung einer DMSO-Stammlösung) sichtbar gemacht.

## **2.5. Überprüfung von Lipidstöchiometrien mittels Dünnschichtchromatographie**

Zur dünnschichtchromatographischen Analyse wurden Lipidvesikel (in wässriger Lösung) und Referenzlipide (in Chloroform gelöst) auf Kieselgelplatten (Kieselgel 60 Nr. 105553, Merck) aufgetragen. Die Proteoliposomenlösung (in der Regel 30 µl pro Laufspur mit 1 mM Lipid) wurde dabei schrittweise aufgetragen und auf einer Heizplatte getrocknet. Danach wurde die Platte in eine Laufkammer gestellt, deren Atmosphäre zuvor mit dem Laufmittel (Volumenverhältnis CHCl<sub>3</sub> / MeOH / CH<sub>3</sub>COOH / H<sub>2</sub>O = 85:15:10:3,5) gesättigt war. Nachdem die Laufmittelfront ca. 10 cm zurückgelegt hatte, wurde die Platte mit einem Luftstrom getrocknet und die Lipide anschließend in der abgeschlossenen Kammer mit Iod (doppelt sublimiert, Merck) angefärbt. Abschließend erfolgte die fotografische Dokumentation in einer Fotoeinheit (VersaDoc 3000, VersaDoc Imaging System) mit dem Programm „Quantity One“.

### 2.5.1. Dünnschichtchromatographie von GUV-Lösungen

Da die GUV-Lösungen im Vergleich zu den Liposomenlösungen theoretisch um den Faktor 10 geringer konzentriert waren (vgl. 2.2. und 2.4.) mussten diese für eine Lipidbestimmung vorher aufkonzentriert werden. Dazu wurden jeweils 300 µl GUV-Lösung (entspricht nach 2.4. theoretisch ~30 µg) in einer Speedvac (Vacuum Concentrator Mini-30, Bachhofer GmbH) im Vakuum unter Hitze eingedampft. Da die enthaltene Saccharose das Wasser beim Verdampfen zurückhält, wurde die Probe zur Störung von Zucker-Wasser-Wechselwirkungen währenddessen immer wieder mit Aceton durchmischt. Danach befand sich eine Art „Saccharosegel“ am Boden des Reagiergefäßes, welches die zu analysierenden Lipide enthält. Dieses „Pellet“ wurde mit 100 µl Chloroform durchmischt und anschließend für 2 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Der chloroformhaltige Überstand wurde abgenommen und weiter in der Speedvac auf ca. 15 µl eingedampft, das „Pellet“ wurde in ca. 15 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Überstand und „Pellet“ wurden jeweils auf die Dünnschichtplatte aufgetragen, wobei das „Pellet“ keine Lipidrückstände mehr enthielt (Daten nicht gezeigt; Überstand: siehe **Abb. 21**).

### 2.5.2. Densitometrische Auswertung

Die Densitometrie ist eine Methode zur Messung der Farbdichte, also der Farbeinheit pro Fläche – diese sollte proportional zur aufgetragenen Lipidmenge sein. Nach Färbung der Dünnschichtchromatographieplatten (2.5.) wurden die Lipidflecken jeweils in vollem erkennbarem Umfang umrandet und von jeder Fläche die mittlere Intensität pro Flächeneinheit mit dem Programm „Quantity One“ bestimmt. Diese Werte wurden dann untereinander verglichen.

### 2.6. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie sowie die FRAP-Messungen (siehe 2.6.1.) wurden wie in **Kapitel III** beschrieben an einem TCS SP5 Laser Scanning Mikroskop (Leica Microsystems) mit einem 63x Öbobjektiv (NA = 1.4; HCX PL APO CS, Leica Microsystems) durchgeführt. Sowohl LHCII (Detektionsbereich des Photomultipliers: 600 – 700 nm) als auch TopFluor-GC und Bodipy (Detektionsbereich: jeweils 520 – 600 nm) wurden mit einem 488 nm Argon Laser angeregt.

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (siehe 2.6.2.) und zugehörige Bildaufnahmen wurden an einem TCS STED CW Super-Resolution Mikroskop (Leica Microsystems) mit einem 63x Wasserobjektiv (NA = 1.2; HCX PL APO CS, Leica Microsystems) durchgeführt. Da bei den FCS-Messungen Schwankungen in der Fluoreszenzintensität von TopFluor-GC aufgezeichnet werden sollten, wurde eine sehr geringe Konzentration dieses Farbstoffs gewählt (siehe 2.2.). Deshalb musste die Visualisierung der SLBs stattdessen durch Anregung des Membranfarbstoffs DiR (siehe 2.2.) mit einem Helium-Neon Laser bei 633 nm und durch Detektion mit einem HyD-Detektor (Wellenlängenbereich: 650 – 795 nm) vorgenommen werden.

### 2.6.1. FRAP-Messungen

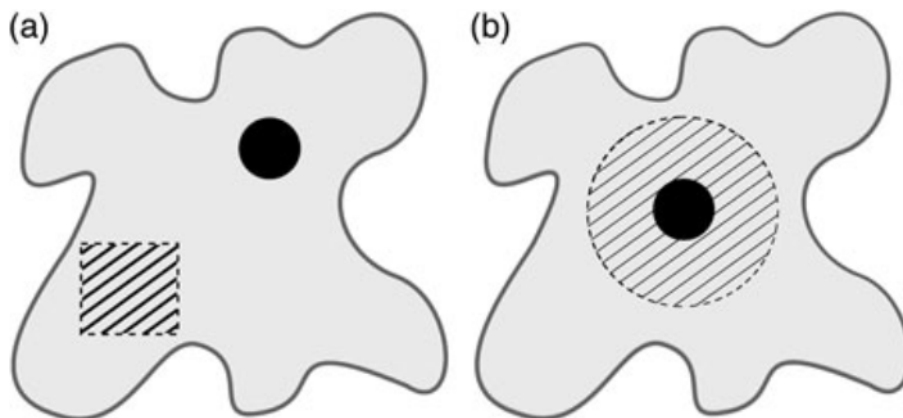
Die FRAP-Experimente wurden analog zu **Kapitel III, „Materials and Methods: Confocal laser scanning microscopy and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)“** durchgeführt. Alle Auswertungen wurden mit dem Programm „LAS X – FRAP wizard“ (Leica Microsystems) getätigt.

Der Radius  $r$  der zirkulären ROI und die Bildsequenz „Prebleach / Bleach / Postbleach“ sind im Ergebnissteil bei jeder Abbildung in  $\mu\text{m}$  bzw. in der Anzahl an Frames (Framerate: 1,037 s/Frame) angegeben. Um bei den FRAP-Messungen das Bleichen zu berücksichtigen, was durch die sequenzielle Bildaufzeichnung hervorgerufen wird, wurde zu jedem Zeitpunkt die Fluoreszenzintensität  $F_{frap}$  der ROI durch die Fluoreszenzintensität  $F_{ref}$  einer nicht gebleichten Referenzfläche wie folgt normiert:

$$F(t) = \frac{F_{frap}(t)}{F_{ref}(t)}$$

Dabei gibt es zwei Möglichkeiten die Referenz zu positionieren, was im Ergebnissteil bei jeder Abbildung hinterlegt ist. Bei den Diffusionsmessungen auf Glas (siehe **3.1.**) wurde eine zirkuläre Referenzfläche (1 – 2x so groß wie die ROI) in möglichst weiter Entfernung zur ROI - jedoch immer noch mit dem kontinuierlichen Membransystem der ROI erkennbar verbunden - platziert („externe Referenz-ROI“; **Abb. 10a**). Dies hat den Vorteil, dass hierbei auch Fluktuationen des Anregungslasers korrigiert werden können <sup>39</sup>.

Bei den FRAP-Messungen auf Mica (siehe **3.2.**) wurde jeweils eine zirkuläre Referenzfläche gewählt, die 5 – 10x so groß ist wie die ROI und letztere miteinschließt („Referenz-ROI schließt FRAP-ROI mit ein“; **Abb. 10b**). Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass die Referenzfläche bestmöglich die Membranbeschaffenheit der ROI simuliert <sup>39</sup>, da vor allem im Falle der Glykolipide das SLB-System in Hinblick auf Oberflächenbenetzung und Membranstapelung sehr heterogen ausgeprägt ist (siehe **Abb. 15; Kapitel III Fig. 3**).



**Abb. 10** Schematische Darstellung zur Auswertung der FRAP-Experimente bzgl. der Auswahl der Referenzfläche, mit der die Fluoreszenzintensität der ROI normiert wurde. (a) „Externe Referenz-ROI“, (b) „Referenz-ROI schließt FRAP-ROI mit ein“. Erläuterungen dazu sind im Text zu finden. Abbildung entnommen aus Ref. (39).

Die Kalkulation der mobilen Fraktion  $M$  ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$M = \frac{F_{\infty} - F_0}{F_i - F_0}$$

mit der Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen  $F_i$ , der Fluoreszenzintensität direkt nach dem Bleichen  $F_0$  und der Fluoreszenzintensität nach Erholung (stabiles Signal)  $F_{\infty}$  (siehe **Kapitel I Abb. 8**)<sup>44</sup>. Es wurden nur FRAP-Kurven in die Auswertung mit einbezogen, bei denen mindestens 50% der ursprünglichen Intensität gebleichen wurde ( $F_0 \leq 1/2 F_i$ )<sup>45</sup>.

Zur Bestimmung der Mobilität wurden die FRAP-Kurven mit einer einfachen exponentiellen Funktion „gefittet“<sup>44</sup>:

$$F(t) = A(1 - e^{-t/\tau})$$

mit  $A$ , der Fluoreszenzintensität nach Erholung gemäß dem „Fitten“, und  $\tau$ , der Zeitkonstanten. Mit  $\tau$  kann die „Half-time Recovery“  $t_{1/2}$  bestimmt werden<sup>44</sup>:

$$t_{1/2} = \ln(2 \cdot \tau)$$

$t_{1/2}$  verhält sich antiproportional zur Mobilität diffundierender Objekte; verschiedene  $t_{1/2}$ -Werte können bei gleichem  $r$  der ROI miteinander verglichen werden.

### 2.6.2. FCS-Messungen

Bei den FCS-Experimenten musste sichergestellt sein, dass sich die Spektren des Membranmarkers DiR und des zu messenden Lipids TopFluor-GC (siehe **2.6.**) nicht überschneiden, d.h. während der Aufzeichnung der Zeitspuren von TopFluor-GC durfte kein Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) auf DiR stattfinden. Das Anregungsspektrum von DiR liegt laut Herstellerangaben im dunkelroten Wellenlängenbereich, das Emissionsspektrum von TopFluor-GC liegt im grünen Wellenlängenbereich. Zur Überprüfung wurden mit einem FluoroMax-2 Spektrometer (Horiba Scientific) Emissionsspektren der Liposomen bei 488 nm Anregung aufgenommen. Hierbei ergab sich zwar, dass DiR auch bei dieser niedrigen Wellenlänge geringfügig angeregt wird (Maximum des Emissionsspektrums bei ~780 nm); jedoch findet kein oder zumindest nur geringfügig FRET statt, da auch das Emissionsspektrum von TopFluor-GC (Maximum bei ~540 nm) detektiert werden kann (siehe **Anhang**).

Weil der gewählte Photonencounter (Leica HyD SMD, Leica Microsystems) in einem Bereich von 535 – 585 nm aufzeichnet, wurde bei den FCS-Messungen somit ausschließlich das Emissionssignal von TopFluor-GC gemessen. Vor jeder FCS-Messung wurde von der SLB-Oberfläche ein Bild aufgenommen (siehe **2.6.**) und in diesem Bildausschnitt mehrere FCS-ROIs ( $r$  zwischen 200 nm und

400 nm; vorgegeben durch die numerische Apparatur<sup>37,46</sup>) festgelegt (siehe **Abb. 26a**). Danach wurde durch Anregung mit einem Argon Laser bei 488 nm und Detektion mit einem Photonencounter (s.o.) in jeder ROI eine FCS-Zeitspur mit dem Programm „SymPhoTime“ (PicoQuant) über einen Zeitraum von 60 s aufgezeichnet.

Der Teil mit starkem Bleichen des Intensitätsverlaufs am Anfang jeder Kurve wurde abgeschnitten und die restliche Zeitspur (siehe **Abb. 8b**) anschließend in der Software mit sich selbst korreliert (Autokorrelation  $G(\tau)$ ), basierend auf folgender Differentialgleichung<sup>47</sup>.

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

mit der Fluktuation der Fluoreszenzintensität  $\delta F(t)$  zu einem bestimmten Zeitpunkt, der Fluktuation der Fluoreszenzintensität  $\delta F(t + \tau)$  nach einer „Lagtime“  $\tau$  und dem mittleren Verlauf der Gesamtfluoreszenzintensität  $\langle F(t) \rangle^2$  in Abhängigkeit der Zeit.

Dies ergab den Verlauf von  $G(\tau)$  als Funktion von  $\log(\tau)$  (siehe **Abb. 8c**). Die Daten wurden exportiert und mit einem selbst geschriebenen Skript (Dr. Maria Hanulova, Institute of Molecular Biology, Mainz) in dem Programm „Matlab“ (The MathWorks) „gefittet“ gemäß folgender Funktion (Lösung obiger Differentialgleichung bei freier zweidimensionaler Diffusion in Membranen<sup>47</sup>):

$$G(\tau) = \frac{G_0}{1 + \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)}$$

mit der Amplitude  $G_0$  und der Diffusionszeit  $\tau_D$ , die reziprok zum Diffusionskoeffizienten ist. Das Skript gibt zusätzlich die Genauigkeit der „Fittings“ als Abweichung von den Daten (Reste) wie auch das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  an. Für die statistische Auswertung wurden nur Kurven mit  $R^2 > 0,8$  berücksichtigt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Vorversuche: FRAP-Messungen des LHCII in SLBs auf APTES-beschichteten Glasoberflächen

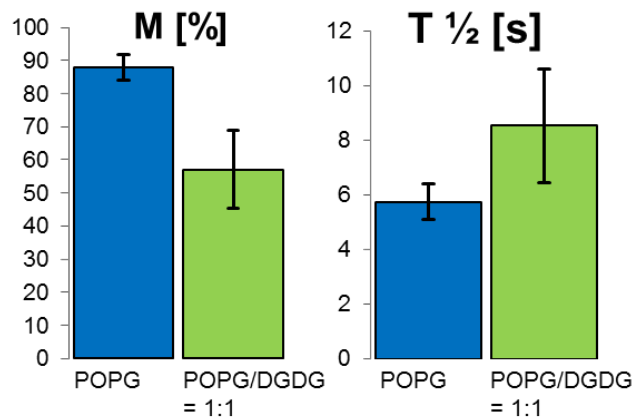
Für die Bestimmung der Mobilität von LHCII mittels FRAP (siehe **Kapitel I 3.1.**) wurden Proteoliposomen auf einer festen Oberfläche zu einem flachen Membransystem (SLBs) gespreitet (siehe **Abb. 3**). Weil dieser Vorgang vor allem durch elektrostatische Interaktionen begünstigt wird, wurden zunächst Versuche auf Glasoberflächen durchgeführt, die nach Reaktion mit APTES eine positive ionische Ladung trugen (siehe **Abb. 4a**). Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse und Erkenntnisse aus diesem Teil der Arbeit zusammengestellt.

##### 3.1.1. Abhängigkeit der mobilen Fraktion und „Half-time Recovery“ von dem Verhältnis aus POPG und DGDG

Wie bereits eingangs erwähnt, wird das Spreitungsverhalten von Lipidvesikeln durch ionische Ladungen beeinflusst. Wie sich dies quantitativ auf die FRAP-Experimente auswirkt, wurde durch Bildung von SLBs ausgehend von SUVs bestehend aus POPG (negativ geladen), POPG:DGDG = 1:1 (50% geladen) und DGDG (ungeladen) untersucht. Die Ergebnisse dessen sind qualitativ bereits in **Kapitel III** beschrieben: die Fluoreszenzaufnahmen zeigen mit steigendem Anteil an DGDG eine Zunahme von nicht gespreiteten Vesikeln in den SLBs, was bei FRAP-Messungen zu einer Abnahme der mobilen Fraktion führt (siehe **Kapitel III Fig. 1**).

Der Trend lässt sich durch mehrere Messungen signifikant bestätigen: die mobile Fraktion  $M$  fällt im Mittel von 87% auf 57% ab, wenn POPG-SLBs zu gleichen Anteilen DGDG enthalten (**Abb. 11**). Dies wirkt sich unmittelbar auf die Bestimmung der „Half-time Recovery“  $t_{1/2}$  aus: der Mittelwert für  $t_{1/2}$  erhöht sich von ~6 s auf ~9 s, was einer Verringerung der Mobilität des LHCII um ca. 50% entspräche. Diese Werte sind jedoch nicht das Resultat von veränderten Diffusionseigenschaften des LHCII, sie stellen lediglich eine Verminderung der SLB-Qualität dar: ein geringer Wert für  $M$  beschreibt normalerweise einen Anteil von Proteinen, die beispielsweise durch Aggregation in der Membran (hier: DGDG) immobilisiert sind<sup>48-51</sup>. Die zahlreichen intakten Vesikel (siehe **Kapitel III Fig. 1b**) zeigen jedoch ein verschlechtertes Spreitungsverhalten für DGDG auf, was sich auch in einer verringerten Benetzung der Oberfläche mit Membransystem widerspiegelt (siehe auch **Kapitel III Fig. 3 u. 4** am Beispiel von Mica). Das führt bei FRAP-Experimenten zu einer Unterschätzung von  $M$  und gleichzeitig zu einer Überschätzung von  $t_{1/2}$  (Erklärung: **siehe 4.1.**).  $M$  steigt dabei mit zunehmender Membrandichte pro Fläche.

Aus diesen Gründen wurde für alle weiteren Diffusionsmessungen  $M$  als Bestimmtheitsmaß zur Qualität des Membransystems zurate gezogen, und es wurden nur noch  $t_{1/2}$ -Werte miteinander verglichen, deren zugehörige mobile Fraktionen auf einem ähnlichen Level liegen.



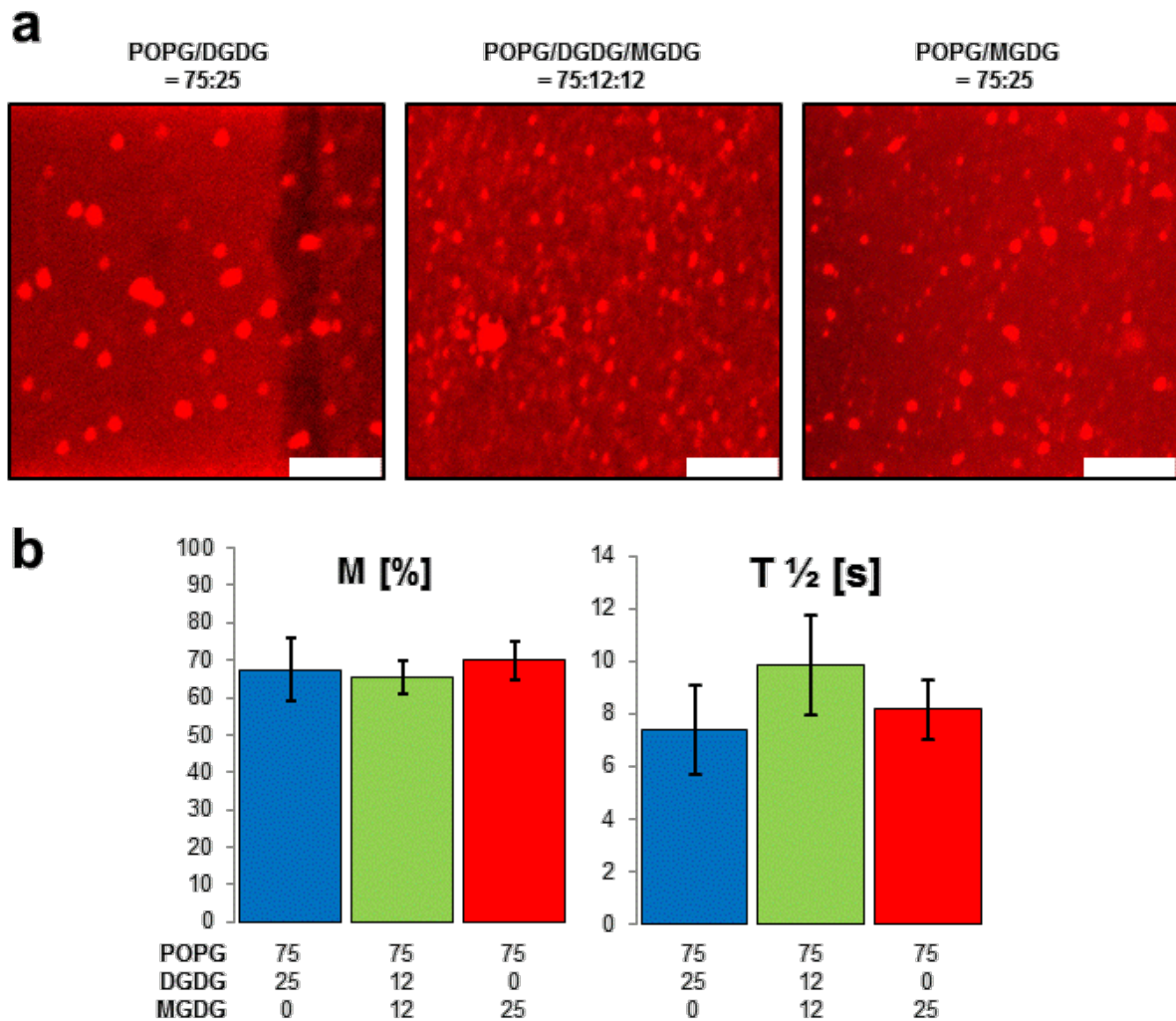
**Abb. 11 "Half-time Recovery" und mobile Fraktion von LHCII in Abhängigkeit des POPG/DGDG-Verhältnisses in SLBs auf APTES-beschichteten Glasoberflächen.** Durch einen Anteil von 50% DGDG in POPG-Vesikeln verringert sich die mobile Fraktion  $M$  um ca. 30%. Hierdurch wird auch die Bestimmung der Mobilität beeinflusst, da sich die "Half-time Recovery"  $t_{1/2}$  in ähnlichem Maße verringert (um ca. 50%). FRAP-Parameter:  $n = 10$ ,  $r$  (ROI) = 1,25  $\mu\text{m}$ , Bildsequenz Prebleach / Bleach / Postbleach = 10 / 3 / 50 – 100, externe Referenz-ROI (siehe 2.6.1. – auch zur Datenanalyse); die Probenpräparation erfolgte nach 2.1., 2.2. und 2.3.

### 3.1.2. Diffusionsmessungen bei konstantem Anteil an POPG in Abhängigkeit von DGDG und MGDG

Unter Berücksichtigung der Erkenntnis, dass FRAP-Messungen auf Glas mit unterschiedlichen Anteilen ungeladener Lipide (hier: Glykolipide DGDG und MGDG) zur Fehlbestimmung von Diffusionswerten führen (siehe 3.1.1.), wurden Versuche durchgeführt, bei denen der Anteil negativ geladener Lipide, d.h. POPG, konstant gehalten wurde. So sollte zumindest der Einfluss des nicht-lamellaren Lipids MGDG gegenüber DGDG auf die Diffusion des LHCII untersucht werden. Dazu wurden SUVs hergestellt, die zu 75% aus POPG bestehen, und anschließend zu SLBs gespreitet. Die restlichen 25% Lipid bestanden zu variierenden Anteilen aus DGDG und MGDG: nur DGDG (POPG/DGDG/MGDG = 75:25:0), DGDG:MGDG = 1:1 (POPG/DGDG/MGDG = 75:12:12) und nur MGDG (POPG/DGDG/MGDG = 75:0:25).

Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen bei allen drei Lipidmischungen ein ähnliches Bild (**Abb. 12a**): das homogene Fluoreszenzsignal weist auf ein kontinuierliches Membransystem hin, dem sowohl Membranstapel (intensiv rote Flächen) und in geringem Maße intakte Vesikel (weniger intensiv rote Punkte) aufgelagert sind (siehe dazu **Kapitel III Fig. 1a**). Die FRAP-Messungen ergeben im Mittel bei allen Mischungen eine mobile Fraktion von 65 - 70%, die Abweichungen liegen im Bereich der

Varianzen (**Abb. 12b**). Anhand der Argumentation aus **3.1.1.** ist plausibel, dass hier die Werte für  $M$  durch den Anteil von 75% POPG zwischen den Werten von  $M$  (87% und 57%) bei Anteilen von 100% und 50% POPG liegen (siehe **Abb. 12**). Da  $t_{1/2}$  unter anderem vom Radius  $r$  der ROI abhängt, können die Werte für  $t_{1/2}$  jedoch nicht mit den Ergebnissen zur Variation der Membranladung aus **3.1.1.** verglichen werden (siehe **Abb. 11** und **Abb. 12**).



**Abb. 12 FRAP-Messungen von LHCII in Abhängigkeit des DGDG/MGDG-Verhältnisses bei konstantem POPG-Anteil in SLBs auf APTES-beschichteten Glasoberflächen.** (a) Die Fluoreszenzaufnahmen bei verschiedenen Lipidmischungen (POPG/DGDG/MGDG = 75:25:0, 75:12:12 und 75:0:25) zeigen jeweils ein ähnliches Bild, d.h. ein weitgehend lückenloses SLB-System mit aufgelagerten Membranstapeln (siehe **Kapitel III**, vgl. **Kapitel III Fig. 1**). (b) Dies spiegelt sich in einem konstanten Level für die mobile Fraktion  $M$  wieder. Die "Half-time Recoveries"  $t_{1/2}$  für 25% DGDG und 25% MGDG zeigen einen geringen Unterschied, die Zusammensetzung aus beiden Lipidmischungen (12% DGDG + 12% MGDG) weist einen erhöhten Wert für  $t_{1/2}$  auf. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ ; FRAP-Parameter:  $n = 11 - 19$ ,  $r$  (ROI) = 0,75  $\mu\text{m}$ , Bildsequenz Prebleach / Bleach / Postbleach = 5 / 1 / 50 - 100, externe Referenz-ROI (siehe **2.6.1.** - auch zur Datenanalyse); die Probenpräparation erfolgte nach **2.1.**, **2.2.** und **2.3.**, die Bildaufnahmen gemäß **2.6.**

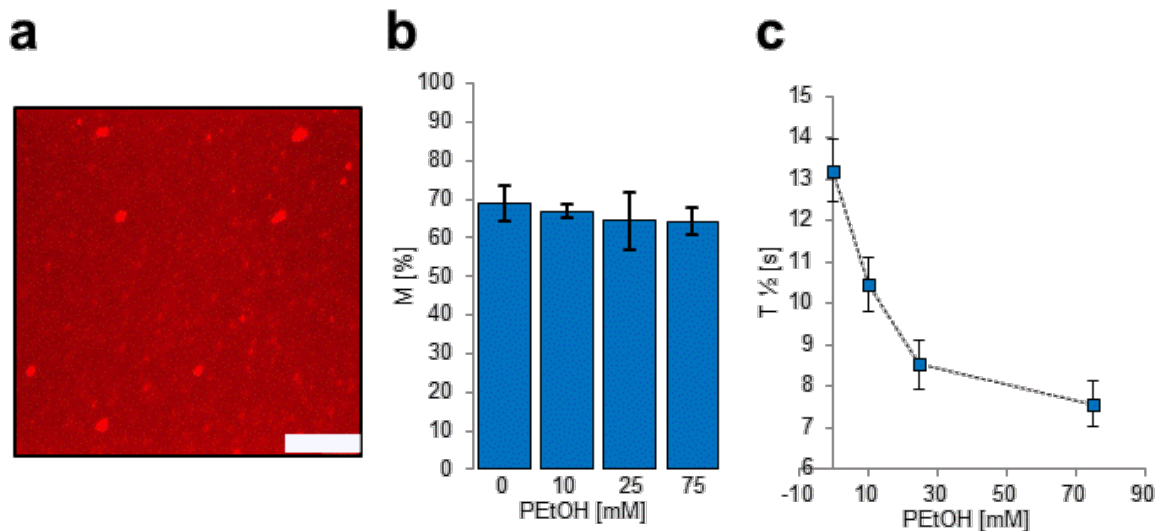
Bei den zugehörigen „Half-time Recoveries“ herrscht zwischen 25% DGDG und 25% MGDG nur ein geringfügiger Unterschied (~7 s bzw. ~8 s), die Kombination aus beiden Lipidmischungen (12% DGDG + 12% MGDG) weist dagegen einen erhöhten Wert für  $t_{1/2}$  auf (~10 s); allerdings sind die Unterschiede nicht signifikant, da sich die Fehlerbalken deutlich überschneiden. Somit ist der unter den verwendeten experimentellen Bedingungen geltende Einfluss von MGDG gegenüber DGDG (was hier untersucht werden soll) bei molaren Fraktionen von jeweils 25% nicht detektierbar. Das Diffusionsverhalten wird vermutlich durch den großen Anteil an Phospholipid (75% POPG) dominiert. Deshalb wurde im weiteren Verlauf der Arbeit versucht ein für FRAP geeignetes Messsystem zu etablieren, bei dem die Membran exklusiv aus den ungeladenen Lipiden DGDG und MGDG besteht (siehe 3.2. - 3.5.).

### 3.1.3. Diffusionsmessungen als Funktion der Phenylethanolkonzentration in POPG-Membranen zur Validierung der FRAP-Methodik

In dieser Versuchsreihe sollte überprüft werden, ob unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen signifikante Einflüsse auf die Diffusion in Membranen, welche beispielweise aus der Literatur bekannt sind, mittels FRAP prinzipiell nachgewiesen werden können. Dazu wurden FRAP-Messungen in POPG-SLBs bei verschiedenen Konzentrationen Phenylethanol (PEtOH) durchgeführt. Kurzkettige Alkohole wie PEtOH sind dafür bekannt, dass sie durch Penetration der Membran deren Fluidität erhöhen, d.h. die Mobilität der darin enthaltene Lipide und Proteine wird dadurch vergrößert<sup>52-54</sup>.

Die Spreitung von POPG-SUVs wird in Gegenwart von PEtOH nicht beeinflusst und lässt gemäß der Fluoreszenzaufnahmen auf ein homogenes SLB-System mit aufgelagerten Membranstapeln schließen (**Abb. 13a** am Beispiel von 25 mM PEtOH; vergleiche **Kapitel III Fig. 1a** sowie **Abb. 12a**). Entsprechend der einheitlichen SLB-Struktur und den Erkenntnissen aus 3.1.1. bleibt die mobile Fraktion unabhängig von der PEtOH-Konzentration (0, 10, 25 und 75 mM) konstant (**Abb. 13b**). Im Gegensatz dazu wird die Mobilität des LHCII dramatisch durch PEtOH erhöht (**Abb. 13c**):  $t_{1/2}$  sinkt signifikant von ~13 s (0 mM) auf ~10,5 s (10 mM), ~8,5 s (25 mM) und schließlich ~7,5 s (75 mM); es konnte also eine stufenweise Abnahme der Membranviskosität nachgewiesen werden.

Warum  $M$  in dieser Messreihe trotz der Verwendung von POPG-Membranen (Anteil: 100%) mit 65 - 70% nur vergleichsweise geringe Werte angenommen hat (vgl. **Abb. 11a**), kann nicht ohne weiteres geklärt werden. Denkbar sind beispielsweise Abweichungen in der APTES-Funktionalisierung der Glasoberflächen bei dieser Charge an Deckgläschen, was zu einer geringeren Ladungsdichte und damit verschlechterten Spreitung der POPG-SUVs geführt haben kann. Dies wiederum würde eine geringere Oberflächenbenetzung der Membran zur Folge haben und erklären, warum auch die „Half-time Recoveries“ im Vergleich zu 100% POPG in 3.1.1. (**Abb. 11**) deutlich erhöht sind (siehe Erläuterungen in 4.1.). Da alle Proben ein gemeinsames Level für  $M$  aufweisen und somit offenbar in gleichem Maße betroffen sind, können die Werte für  $t_{1/2}$  jedoch untereinander verglichen werden.



**Abb. 13 FRAP-Messungen von LHCII in Abhängigkeit der PEtOH-Konzentration in POPG-SLBs auf APTES-beschichteten Glasoberflächen.** (a) Eine repräsentative Fluoreszenzaufnahme bei 25 mM PEtOH zeigt ein vergleichbares Bild zur SLB-Herstellung ohne PEtOH (siehe **Abb. 12a**). (b) Die mobile Fraktion  $M$  liegt unabhängig von der PEtOH-Konzentration konstant zwischen 65 und 70%. (c) Die "Half-time Recovery"  $t_{1/2}$  hingegen sinkt deutlich mit zunehmender Konzentration an PEtOH. Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ ; FRAP-Parameter:  $n = 8 - 12$ ,  $r$  (ROI) = 1,25  $\mu\text{m}$ , Bildsequenz Prebleach / Bleach / Postbleach = 5 / 3 / 50 – 100, externe Referenz-ROI (siehe **2.6.1.** – auch zur Datenanalyse); die Probenpräparation erfolgte nach **2.1.**, **2.2.** und **2.3.**, die Bildaufnahme gemäß **2.6.**

Deshalb kann aus diesen Ergebnissen (**Abb. 13c**) die Schlussfolgerung gezogen werden, dass mithilfe der FRAP-Methodik signifikante Änderungen der Mobilität des LHCII in SLBs gemessen werden können. Die Ergebnisse unterstreichen auch, dass es sich lohnen könnte, valide Messungen mit hohen Anteilen an Glykolipiden (siehe **3.1.2.**) durchzuführen. Dazu muss jedoch eine geeignete Spreitungsmethodik etabliert werden.

### 3.2. FRAP-Messungen in Glykolipid-SLBs nach Spreitung mit Kalzium auf Micaoberflächen

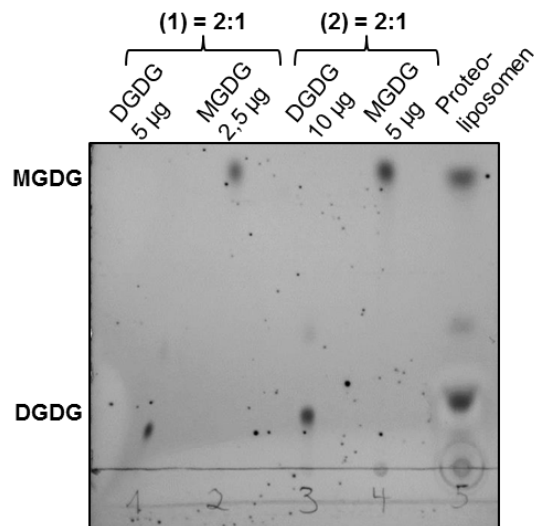
Im nachfolgenden Kapitel werden die Ergebnisse von FRAP-Messungen in SLBs vorgestellt, die u.a. ausschließlich aus Glykolipiden bestehen. Durch Wechselwirkungen mit der glatten Micaoberfläche und dem Einfluss von Kalzium (siehe **Abb. 4b**) sollte das Spreiten von Glykolipidvesikeln verbessert werden (vgl. **3.1.1.**), um so quantitativ den Einfluss von Ladung (100% POPG gegenüber 100% DGDG) und Phasenverhalten (MGDG in DGDG-Membranen) auf die Mobilität des LHCII untersuchen zu können (vgl. **3.1.2.**).

### 3.2.1. Diffusionsmessungen des LHCII in Membranen bestehend aus 100% POPG, 100% DGDG und DGDG/MGDG im Verhältnis 2:1

Um den größtmöglichen Einfluss der Ladung von Lipidkopfgruppen auf die Diffusion des LHCII zu betrachten (siehe 1.1.), wurden Liposomen zum einen exklusiv aus POPG (100% negativ geladen) und zum anderen exklusiv aus DGDG (ungeladen) hergestellt. Die dritte Lipidzusammensetzung sollte zu ~70% aus DGDG und ~30% aus MGDG bestehen, was Aufschluss über Veränderungen der Membranviskosität wie auch Hinweise zu einer eventuellen Assoziation von trimerem LHCII mit MGDG geben sollte (siehe 1.1. und Kapitel II Fig. 3c). Größere Anteile an MGDG wurden nicht eingesetzt, da dies die Ausbildung lamellarer Membranstrukturen verhindert<sup>55</sup>.

#### 3.2.1.1. Validierung des MGDG-Anteils in DGDG (Proteo-) Liposomen

Mit Hilfe einer Dünnschichtchromatographie sollte zunächst sichergestellt werden, dass die gewünschte Menge MGDG während der Herstellung in Liposomen eingebaut und nach Integration des LHCII weiterhin enthalten bleibt (Abb. 14). Aufgetragen wurden zwei Referenzen mit je einer definierten Menge an DGDG bzw. MGDG im Verhältnis 2:1 – Referenz (1) mit 7,5 µg und Referenz (2) mit 15 µg Gesamtlipid. Die aufgetragene Proteoliposomenlösung sollte dasselbe Lipidverhältnis enthalten. Nach der Färbung sind Flecken unterschiedlich starker Intensitäten zu erkennen, die entweder ein geringes (DGDG-Bande) oder weites Laufverhalten zeigen (MGDG-Bande).



**Abb. 14 Dünnschichtchromatographie zur Verifizierung der Anteile von DGDG und MGDG in Glykolipid-Proteoliposomen.** Das eingesetzte DGDG/MGDG-Verhältnis der Proteoliposomen ist 2:1, von diesen wurden 30 µl aufgetragen. Die densitometrische Auswertung der Aufnahme ist in Tab. 1 zu finden. die Probenpräparation und Chromatographie inkl. Dokumentation erfolgten nach 2.2. bzw. 2.5.

Die densitometrische Auswertung zu den entsprechenden Intensitätsverhältnissen der DGDG- und MGDG-Flecken ist in **Tab.1** zu finden. Anhand der beiden Referenzen zeigt sich einerseits, dass das Intensitätsverhältnis der Flecken aus DGDG und MGDG von der Gesamtmasse an Lipid beeinflusst wird – dies kann jedoch auch die Folge von Pipettierfehlern sein. Andererseits wird der Anteil von MGDG bei dieser Analyseverfahren systematisch überschätzt ( $\geq 44\%$ ). Im Mittel spiegeln die Referenzen jedoch das gleiche Intensitätsverhältnis von DGDG zu MGDG wieder, welches sich durch Auftragung der Proteoliposomenlösung ergibt. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die LHCII-haltigen Liposomen auch zu den gewünschten Anteilen aus DGDG ( $\sim 70\%$ ) und MGDG ( $\sim 30\%$ ) bestehen.

**Tab. 1 Densitometrische Auswertung der Dünnschichtchromatographie zur Verifizierung der Anteile von DGDG und MGDG in Glykolipid-Proteoliposomen.** Gezeigt ist jeweils das Verhältnis der Intensitäten von DGDG und MGDG für Referenz (1), (2) und Proteoliposomen aus **Abb. 3**. Die densitometrische Analyse erfolgte nach **2.5.2**.

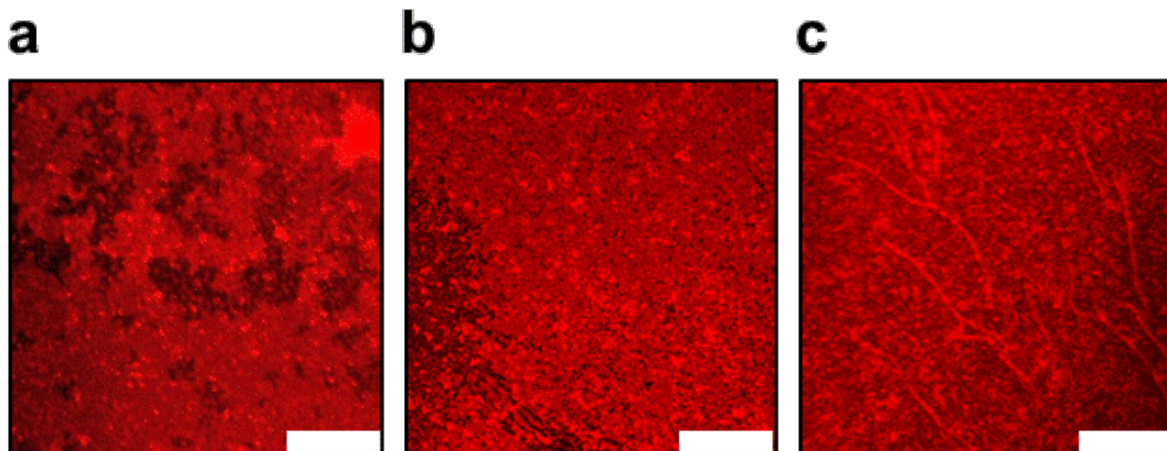
	MGDG [%]	DGDG [%]
Referenz (1)	44	56
Referenz (2)	49	51
<b>Mittelwert Referenz</b>	47	53
<b>Proteoliposomen</b>	47	53

### 3.2.1.2. Gemittelte „Half-time Recoveries“ und mobile Fraktionen

Wie in **Kapitel III** bereits beschrieben, läuft durch Spreiten auf Mica mit kalziumhaltigem Puffer das Aufplatzen von Glykolipidvesikeln nahezu vollständig ab, jedoch ist die Oberflächenbenetzung mit SLBs gegenüber POPG um ca. 50% reduziert (siehe **Kapitel III Fig. 3** und **4**). Für die FRAP-Messungen wurde deshalb vor allem bei den Proben bestehend aus DGDG- und DGDG/MGDG = 2:1 darauf geachtet Stellen auszuwählen, an denen das Membransystem – erkennbar an einer durchgängig fluoreszierenden Grundfläche – besonders dicht erscheint (**Abb. 15**). In den zugehörigen Fluoreszenzaufnahmen wird auch der bekannte Trend deutlich, wonach die Dichte an Membranstapeln von POPG (**Abb. 15a**) über DGDG (**Abb. 15b**) und schließlich dramatisch nach DGDG/MGDG (**Abb. 15c**) zunimmt (siehe **Kapitel III**, vgl. **Kapitel III Fig. 3**).

Gemäß den Erkenntnissen aus **3.1.1** wurden nur solche FRAP-Kurven für die Auswertung verwendet, die eine mobile Fraktion  $> 75\%$  aufweisen; dies ist jedoch bei einem Großteil der Messungen der Fall und unterstreicht sowohl, dass LHCII unabhängig von der jeweiligen Lipidumgebung in SLBs frei beweglich ist, als auch, dass die Spreitung auf Mica gegenüber Glas deutlich begünstigt ist (siehe dazu auch **Kapitel III**).  $M$  nimmt somit bei den drei verschiedenen Lipidzusammensetzungen im Durchschnitt Werte zwischen 82 – 87% an, wobei die Unterschiede nicht signifikant sind (**Tab. 2**). Auf Grundlage dessen (siehe **3.1.1.**) können die jeweils gemittelten „Half-time Recoveries“ miteinander

verglichen werden: hierbei steigt  $t_{1/2}$  von POPG nach DGDG um 0,7 s und von DGDG nach DGDG/MGDG um 1,4 s; dies entspricht einer Abnahme der Mobilität um ~15 bzw. ~25%.



**Abb. 15** Fluoreszenzaufnahmen von SLBs nach Spreitung von Proteoliposomen in Abhängigkeit von POPG, DGDG und MGDG auf Mica. (a) Aus POPG entstehen großflächige SLBs, die allerdings durch Membranlücken von mehreren Mikrometern unterbrochen werden können. Bei DGDG (b) und DGDG/MGDG = 2:1 (c) ist die Oberflächenbenetzung durch SLBs sehr lückenhaft (ca. 50%). In wenigen Bereichen der Probe ist das Membransystem jedoch so dicht, dass FRAP-Messungen durchgeführt werden können (siehe Aufnahmen (b) und (c)). Vor allem bei MGDG-haltigen SLBs ist die Topographie durch eine hohe Dichte von Membranstapeln geprägt ((c), siehe Kapitel III und vgl. Kapitel III Fig. 3). Maßstabsbalken: 15  $\mu\text{m}$ ; die Probenpräparation erfolgte nach 2.1., 2.2. und 2.3., die Bildaufnahmen gemäß 2.6.

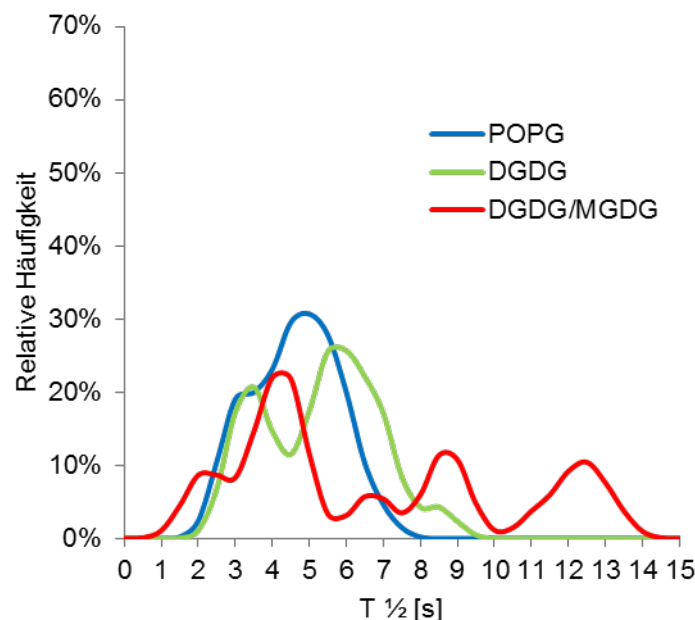
Aus Tab.2 ist allerdings auch ersichtlich, dass die Unterschiede für  $t_{1/2}$  nicht signifikant sind, da die relativen Fehler gemäß den Varianzen wesentlich größer sind: ~25% für POPG bzw. DGDG und > 50% für DGDG/MGDG = 2:1. Deshalb können auch aus dieser Messreihe keine fundierten Aussagen zum Einfluss der Lipide auf die Mobilität des LHCII getroffen werden. Um der Ursache für die großen Varianzen, vor allem bei Anwesenheit von MGDG, auf den Grund zu gehen, wurde die Verteilung der einzelnen  $t_{1/2}$  Werte je Lipidmischung genauer betrachtet.

**Tab. 2** Auswertung der FRAP-Messungen von LHCII in SLBs auf Mica in Abhängigkeit von POPG, DGDG und MGDG. Es wurden nur Kurven mit einer mobilen Fraktion  $M > 75\%$  berücksichtigt. Die zugehörigen Fluoreszenzaufnahmen sind in Abb. 5 zu finden. Die Unterschiede zwischen den "Half-time Recoveries"  $t_{1/2}$  liegen alle im Bereich der Standardabweichungen. Der relative Fehler der MGDG-haltigen Probe ist mit mehr als 50% besonders hoch. FRAP-Parameter:  $r$  (ROI) = 1,5  $\mu\text{m}$ , Bildsequenz Prebleach / Bleach / Postbleach = 3 / 2 / 50 – 100, Referenz-ROI schließt FRAP-ROI mit ein (siehe 2.6.1. – auch zur Datenanalyse).

	POPG	DGDG	DGDG/MGDG = 2:1
M [%]	82 $\pm$ 4	87 $\pm$ 6	86 $\pm$ 9
T $_{1/2}$ [s]	4,6 $\pm$ 1,1	5,3 $\pm$ 1,5	6,7 $\pm$ 3,6
Fehler [%]	24	28	54
n	23	19	23

### 3.2.1.3. Verteilung der $t_{1/2}$ -Werte nach Lipidzusammensetzung

Ähnlich der Erstellung von Histogrammen wurden je Lipidmischung alle  $t_{1/2}$  Werte (Mittelwerte und Anzahl der Stichproben  $n$  in **Tab. 2**) einer Kerndichteschätzung basierend auf einem Gauß-„Fit“ mit definierter Bandbreite unterzogen. Hieraus ergibt sich im Verlauf zu jeder „Half-time Recovery“-Kategorie deren relative Häufigkeit (**Abb. 16**). Es zeigt sich gemäß den Verläufen, dass die Werte für POPG (bis auf eine Schulter bei  $\sim 3$  s) um den Mittelwert bei  $\sim 5$  s annähernd normalverteilt sind. Beim Verlauf von DGDG tauchen 2 distinkte Populationen von Werten auf (bei  $\sim 3$  bzw.  $\sim 6$  s), im Falle von DGDG/MGDG = 2:1 lassen sich gar fünf getrennte Wertepopulationen detektieren (bei  $\sim 2$ ,  $\sim 4$ ,  $\sim 7$ ,  $\sim 9$  und  $\sim 12,5$  s). Neben der Hauptpopulation bei  $\sim 4$  s dominieren 2 weitere Fraktionen bei  $\sim 9$  s und  $\sim 12,5$  s, die entgegen des Mittelwertes von 6,7 s (siehe **Tab. 2**) eine deutlich reduzierte Mobilität des LHCII in Gegenwart von MGDG repräsentieren.



**Abb. 16** Relative Häufigkeiten der "Half-time Recoveries"  $t_{1/2}$  aus FRAP-Messungen von LHCII in SLBs auf Mica in Abhängigkeit von POPG, DGDG und MGDG. Unabhängig von der jeweiligen Lipidmischung sind die Werteverteilungen sehr breit, bei DGDG/MGDG = 2:1 sind mehrere distinkte Wertepopulationen erkennbar. Die Stichprobenzahlen  $n$  und die Mittelwerte für  $t_{1/2}$  sind in **Tab. 2** zu finden; das Diagramm wurde mit einer Kerndichteschätzung basierend auf einem Gauss-Fit mit einer Bandbreite von 0,5 s erstellt.

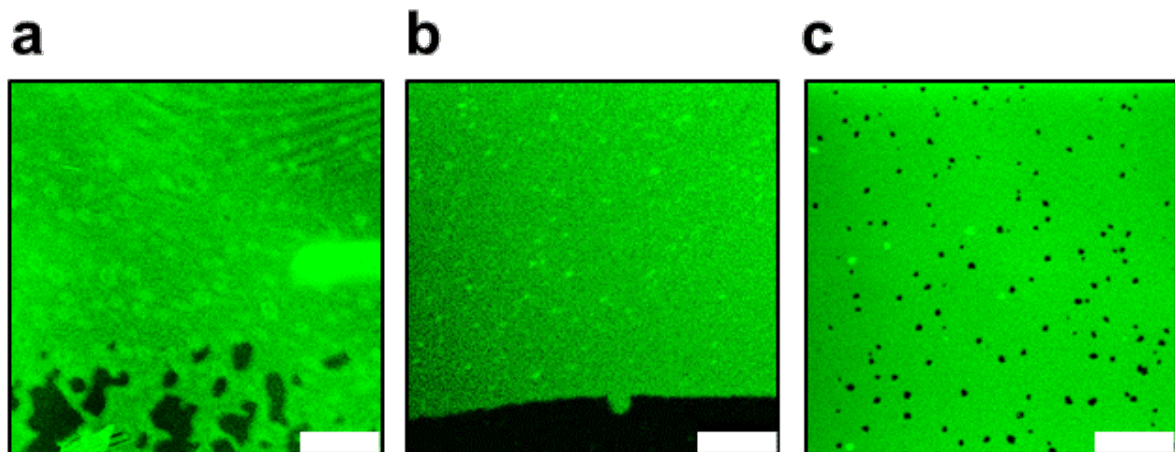
Auf mögliche Ursachen des Phänomens verschiedener Diffusionspopulationen in Abhängigkeit der Lipide wird im Diskussionsteil genauer eingegangen (siehe **4.2.**) – anhand der Fluoreszenzaufnahmen (**Abb. 15**) liegt es jedoch nahe, dass dies hauptsächlich in der unterschiedlichen Neigung zur Ausbildung von Membranstapeln begründet liegen dürfte (siehe explizit dazu **Kapitel III**). Um diese Hypothese zu überprüfen und darüber hinaus mögliche Unterschiede bezüglich der Membranviskosität in Abhängigkeit der Lipidzusammensetzung zu bestimmen, wurden analoge Spreitungsversuche und FRAP-Messungen in Abwesenheit des LHCII durchgeführt.

### 3.2.2. Diffusionsmessungen mit TopFluor-GC zur Bestimmung der Viskosität in Membranen bestehend aus 100% POPG, 100% DGDG und DGDG/MGDG im Verhältnis 2:1

Um unabhängig von spezifischen Einflüssen auf die Diffusion des LHCII (siehe 3.2.1. und 1.1.) mögliche Veränderungen der Membranviskosität zu bestimmen, sollte die Mobilität des fluoreszierenden Lipids C11-TopFluor Galactosyl Ceramid (TopFluor-GC) in Abhängigkeit der drei etablierten Lipidzusammensetzungen (siehe 3.2.1.) mittels FRAP in SLBs gemessen werden. Das markierte Lipid wurde bei der Liposomenherstellung in gewünschtem Verhältnis zugemischt und die Vesikel auf Mica gespreitet.

#### 3.2.2.1. Gemittelte „Half-time Recoveries“ und mobile Fraktionen

Auch die Bildung von SLBs auf Mica in Abwesenheit des LHCII wurde bereits in **Kapitel III** charakterisiert: die Oberflächenbenetzung ist bei den Glykolipidmischungen im Vergleich zu POPG ebenfalls deutlich reduziert, wobei sich die SLBs ohne LHCII durch das Fehlen von oder durch eine sehr geringe Dichte an Membranstapeln bzw. -vesikeln auszeichnen (siehe **Kapitel III Fig. 4**). Für die FRAP-Messungen wurden jeweils Stellen gesucht, die sich durch ein möglichst lückenloses Membransystem auszeichnen (**Abb. 17**). Im Vergleich zu POPG (**Abb. 17a**) und DGDG (**Abb. 17b**) ist das in dieser Messreihe erhaltene SLB-System für DGDG/MGDG = 2:1 jedoch sichtbar poröser (**Abb. 17c**).



**Abb. 17** Fluoreszenzaufnahmen von SLBs nach Spreitung von TopFluor-GC-Liposomen in Abhängigkeit von POPG, DGDG und MGDG auf Mica. (a) Wie bei LHCII-haltigen Liposomen entstehen bei POPG großflächige SLBs, die durch Membranlücken von mehreren Mikrometern unterbrochen werden können. Bei DGDG (b) und DGDG/MGDG = 2:1 (c) ist die Oberflächenbenetzung durch SLBs sehr lückenhaft (siehe **Kapitel III** und vgl. **Kapitel III Fig. 4**). In wenigen Bereichen der Probe ist das Membransystem jedoch dicht genug für FRAP-Messungen (siehe Aufnahmen (b) und (c)). Membranstapel bzw. -vesikel sind nicht oder nur sehr selten zu finden. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m; die Probenpräparation erfolgte nach 2.1., 2.2. und 2.3., die Bildaufnahmen gemäß 2.6.

Die FRAP-Versuche fanden unter Bedingungen statt, die zu **3.2.1.** vergleichbar waren, d.h. es wurden derselbe ROI-Radius und die gleiche Bildsequenz/-rate verwendet (sowie nur Kurven mit  $M > 75\%$  ausgewählt). Die mobilen Fraktionen bei DGDG und DGDG/MGDG unterscheiden sich mit 87 bzw. 86% nicht signifikant (**Tab. 3**). Bei POPG nimmt  $M$  allerdings einen signifikant höheren Wert von 95% an. In jedem Fall liegt bei allen Messkurven die mobile Fraktion auf einem ähnlichen Niveau, weshalb gemäß **3.1.1.** auch die  $t_{1/2}$  Werte näher betrachtet werden können. Hierbei ergibt sich ein Trend, wonach  $t_{1/2}$  von POPG über DGDG nach DGDG/MGDG = 2:1 jeweils um einen ähnlichen Betrag von 0,7 bzw. 0,8 s zunimmt, was einer Abnahme der Mobilität von TopFluor-GC um ~35 bzw. ~30% entspricht. Der Fehler beträgt dabei maximal ~20% (DGDG/MGDG = 2:1), weshalb von signifikanten Unterschieden bedingt durch eine Veränderung der Membranviskosität gesprochen werden kann.

**Tab. 3 Auswertung der FRAP-Messungen von TopFluor-GC in SLBs auf Mica in Abhängigkeit von POPG, DGDG und MGDG.** Es wurden nur Kurven mit einer mobilen Fraktion  $M > 75\%$  berücksichtigt. Die zugehörigen Fluoreszenzaufnahmen sind in **Abb. 7** zu finden. Die Unterschiede zwischen den "Half-time Recoveries"  $t_{1/2}$  liegen außerhalb der Standardabweichungen. Die relativen Fehler sind im Vergleich zu den Messungen mit LHCII z.T. fast (DGDG) oder gar weniger als (DGDG/MGDG = 2:1) halb so groß (vgl. **Tab. 2**). FRAP-Parameter:  $r$  (ROI) = 1,5  $\mu\text{m}$ , Bildsequenz Prebleach / Bleach / Postbleach = 3 / 2 / 50 – 100, Referenz-ROI schließt FRAP-ROI mit ein (siehe **2.6.1.** – auch zur Datenanalyse).

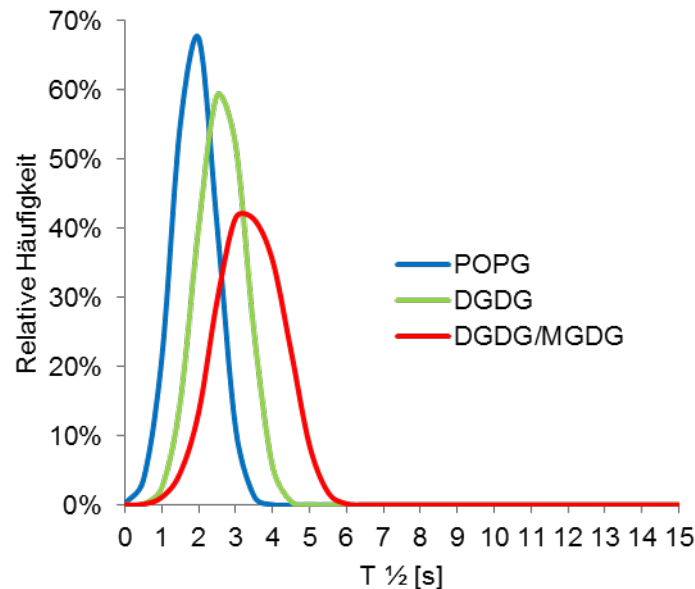
	POPG	DGDG	DGDG/MGDG = 2:1
<b>M [%]</b>	95 ± 5	87 ± 6	86 ± 7
<b>T 1/2 [s]</b>	1,9 ± 0,3	2,6 ± 0,4	3,4 ± 0,7
<b>Fehler [%]</b>	16	15	21
<b>n</b>	15	20	24

Im Vergleich zwischen LHCII und TopFluor-GC ist die Diffusionsgeschwindigkeit des Proteins je Lipidmischung im Mittel um ca. 50% geringer, wobei die gemittelten  $t_{1/2}$  Werte für den LHCII nicht als valide bezeichnet werden können (siehe **3.2.1.2.**). Analog zu **3.2.1.3.** wurden deshalb auch im Falle von TopFluor-GC die Werteverteilungen analysiert, um einem möglichen Einfluss des Membranstapels auf die Diffusion weiter auf den Grund zu gehen.

### 3.2.2.2. Verteilung der $t_{1/2}$ -Werte nach Lipidzusammensetzung

Wie in **3.2.1.3.** wurden auch für die Verteilungen der  $t_{1/2}$  Werte von TopFluor-GC in Abhängigkeit der Lipidmischung Kerndichteschätzungen (mit derselben Bandbreite) durchgeführt. Anhand der Verläufe von  $t_{1/2}$  als Funktion der relativen Häufigkeit stellt sich heraus, dass die Werte bei allen 3 Lipidmischungen um den jeweiligen Mittelwert (~2 s bei POPG, ~2,5 s bei DGDG und ~3,5 s bei

DGDG/MGDG = 2:1) normalverteilt sind, da jeweils nur eine einzelne Wertepopulation erkennbar ist (**Abb. 18**; vergleiche **Tab. 3**). Die Verteilung ist im Falle von DGDG/MGDG etwas breiter, was sich in der erhöhten Varianz des Mittelwertes widerspiegelt (siehe **Tab. 3**). Die Ursache hierfür liegt vermutlich – wie in **3.2.2.1.** angedeutet – in der größeren Porosität und damit Inhomogenität des Membransystems, wodurch an verschiedenen Messstellen unterschiedlich viel Membranfläche zum Einströmen fluoreszierender Moleküle zur Verfügung steht (siehe auch Erklärung in **4.1.**).



**Abb. 18** Relative Häufigkeiten der "Half-time Recoveries"  $t_{1/2}$  aus FRAP-Messungen von TopFluor-GC in SLBs auf Mica in Abhängigkeit von POPG, DGDG und MGDG. Die Werteverteilungen sind je Lipidmischung sehr schmal im Vergleich mit den entsprechenden Verteilungen bei LHCII (vgl. **Abb. 6**), sie folgen einer Normalverteilung. Die Stichprobenzahlen  $n$  und die Mittelwerte für  $t_{1/2}$  sind in **Tab. 3** zu finden; das Diagramm wurde mit einer Kerndichteschätzung basierend auf einem Gauss-Fit mit einer Bandbreite von 0,5 s erstellt.

Unabhängig davon kann durch die Vergleichsmessungen in Abwesenheit des LHCII der Verdacht erhärtet werden, wonach die verschiedenen Diffusionspopulationen des LHCII in **3.2.1.3.** (siehe **Abb. 16**) das Resultat von unterschiedlich ausgeprägter Membranstapelung in den SLBs sind (vgl. **Abb. 15** und **Abb. 17**; siehe **Kapitel III**). Deshalb wurde im weiteren Verlauf der Arbeit versucht eine Methode zu finden, um LHCII-Liposomen zu spreiten, ohne dass dabei Membranstapel entstehen.

### 3.3. Versuche zur kalziumfreien Spreitung von (Proteo-) Glykolipidliposomen auf Mica- und Polymeroberflächen

Aus der Literatur und **Kapitel III** (siehe darin auch entsprechende Referenzen) ist bekannt, dass es vor allem in Anwesenheit von bivalenten Kationen wie Kalzium zum Phänomen der Stapelung von Membranen im Zusammenspiel mit dem LHCII kommt. Bei FRAP-Messungen in SLBs verhindert dies offenbar trotz erleichtertem Spreiten der Proteoliposomen eine valide Analyse zur Mobilität des LHCII,

bedingt durch eine immense Streuung der Messdaten (siehe **3.2.**). Im folgenden Kapitel sind Versuche beschrieben, die sich – ausgehend von Glykolipidvesikeln ohne Verwendung von Kalzium als Spreitungsmittel – der Ausbildung eines kontinuierlichen Membransystems auf Mica- und Polymer-benetzen Oberflächen widmen. Als Modell wurden jeweils nur DGDG- oder DGDG/MGDG-Vesikel verwendet, weil diese nach den bisherigen Erfahrungen (siehe **3.1.** und **3.2.**) allgemein ein erschwertes Spreitungsverhalten aufweisen und deshalb als Maßstab zur Eignung der Methodik dienen.

### **3.3.1. Bildung von SLBs mit veränderter Temperatur, Inkubationszeit, Vesikelgröße und Ionenstärke**

In **Kapitel III** (siehe **Fig. 5**) konnte bereits in Erfahrung gebracht werden, dass ohne Kalzium nur durch reine Inkubation der Proteoliposomen auf Mica (nach dem etablierten Protokoll, siehe **2.3.**) keine Spreitung zu SLBs erfolgt. Daran anknüpfend läge es nahe, statt Kalzium alternative Agenzien oder Bedingungen zu testen, mit denen die SLB-Herstellung beeinflusst werden kann. Diesbezüglich sind (neben der Wahl der Oberfläche) in der Literatur einige Parameter zur Einflussnahme auf das Spreitungsverhalten beschrieben (siehe **1.2.1.**). Diesen Ansätzen wurde jedoch nicht weiter nachgegangen (bis auf einen vereinzelt Versuch zum osmotischen Schock im Zusammenhang mit **3.3.2.**), was im Diskussionsteil begründet wird (siehe **4.1.1.**). Stattdessen wurden andere Strategien verfolgt, die als erfolgsversprechender erachtet wurden (siehe **3.3.2.**, **3.4.** und **3.5.**).

### **3.3.2. Versuche zur Formierung von tBLMs**

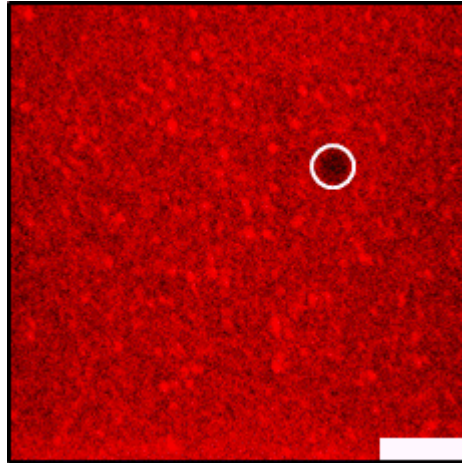
Zur Herstellung von tBLMs gibt es verschiedene Wege (siehe **1.2.2.**). In dieser Arbeit wurden aus zeitlichen Gründen jedoch nur solche Ansätze verfolgt, die mit relativ einfachen Mitteln durchführbar sind; d.h. die Oberflächenpräparation mit Polymer gestützten Lipideinzelschichten wurde nicht getestet (siehe **Abb. 5B**).

#### **3.3.2.1. Spreitung von Proteoliposomen aus Lipiden mit Polymer-„Spacer“**

Im ersten Ansatz wurden Proteoliposomen hergestellt, die zu gewissen Anteilen (1 bzw. 10%) das Polymer-Lipid-Konjugat Polyethylenglykol (PEG)-Phosphatidylethanolamin (PE) enthielten, und auf der Micaoberfläche inkubiert<sup>42</sup>. Durch Zugabe des Polymers PEG6000 (SERVA Electrophoresis GmbH) als Fusionsagens sollte eine Spreitung der Vesikel erfolgen<sup>56</sup>, woraus sich dank der PEG-„Spacer“ an den PE-Kopfgruppen tBLMs formieren sollten<sup>42</sup> (siehe **Abb. 5C**).

Bei beiden PEG-PE-Anteilen konnte hierdurch, wie auch nach Einstellung einer hohen Salzkonzentration im Sinne eines osmotischen Schocks, kein Aufplatzen der Vesikel erreicht werden, was sich bei FRAP-Experimenten durch das Ausbleiben einer mobilen Fraktion ausdrückt (**Abb. 19**).

Das Protokoll wurde darüber hinaus auch auf Glasoberflächen getestet, was ebenfalls keinen Erfolg brachte.



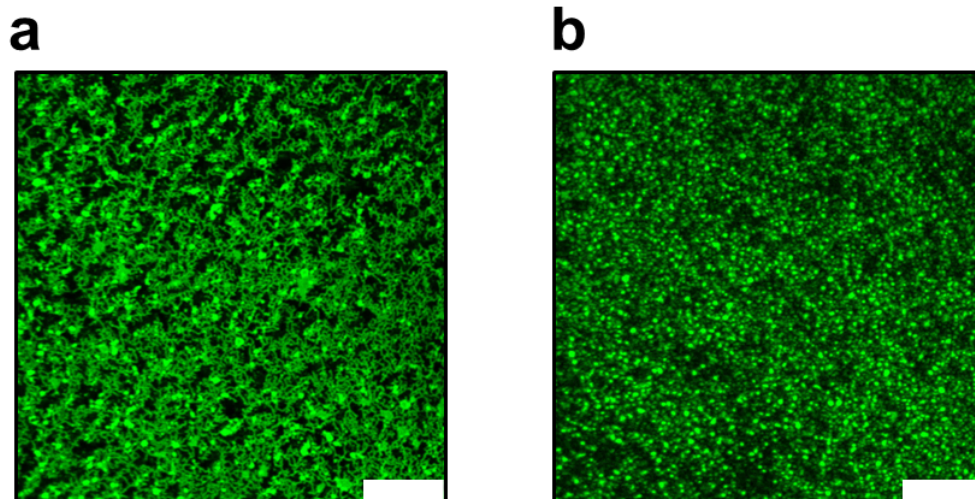
**Abb. 19** Fluoreszenzaufnahme nach versuchter Herstellung von tBLMs mit PEG-PE-haltigen (Anteil: 10%) Proteoliposomen (DGDG/MGDG = 2:1) auf Mica. FRAP-Versuche zeigen keine Erholung der Fluoreszenz nach dem Bleichen (weißer Kreis), d.h. es kommt nicht zur Ausbildung eines („getetherten“) Membransystems. Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ ; die Probenpräparation wurde gemäß 2.1. und 2.2., die Spreitung gemäß 2.3. für 10 min ohne Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  durchgeführt. Anschließend erfolgte jeweils eine 5 min Inkubation mit 500 mM NaCl und 30% (w/v) PEG6000. Nach jeder Inkubation wurden 4 Waschschrirte mit 10 mM TRIS-HCl pH 7,5 durchgeführt. Die Bildaufnahme wurde gemäß 2.6. getätigt.

### 3.3.2.2. Spreitung von Liposomen auf Polymerkissen mit Membrananker

In einem weiteren Ansatz wurden Glasoberflächen zunächst mit einem Polymerkissen aus PEG beschichtet, an dem exponierte Palmitylsäure (PA)-Reste verknüpft sind <sup>41</sup> (siehe **Abb. 5A**). Letztere sollten als hydrophile Membrananker fungieren und bei Inkubation mit (Proteo-) Liposomen diese in hoher Dichte an die Oberfläche binden. Schließlich sollte durch Zugabe von PEG als Fusionsagens (hier: PEG6000) das Aufplatzen der Vesikel erfolgen, woraus sich ein dem PEG-Kissen aufgelagertes Membransystem – also tBLMs – bilden sollten. Aus praktischen Gründen wurde das Protokoll zunächst mit Liposomen ohne LHCII getestet, die als Fluoreszenzmarker TopFluor-GC enthielten.

Hierbei ergab sich, dass weder bei den PEG-PA behandelten noch bei unbehandelten Glasoberflächen (Kontrolle) nach 30 min Inkubation ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann (Daten nicht gezeigt) – es erfolgte offenbar keine Adsorption der Vesikel an die Oberflächen. Dies ändert sich allerdings durch Zugabe von Kalzium: im Falle von PEG-PA ist ein sehr feinmaschiges Membrannetzwerk zu erkennen, dass zum einen auch große Lücken und zum anderen ungeplatze Vesikel bzw. -aggregate enthält (**Abb. 20a**). FRAP-Messungen bestätigten die Ausbildung eines kontinuierlichen Membransystems ( $M = \text{ca. } 70\%$ , Daten nicht gezeigt). Bei der Kontrolle auf unbehandelten Glasoberflächen bewirkt Kalzium lediglich eine Akkumulation und/oder Aggregation

der Vesikel (**Abb. 20b**), was die erfolgreiche Modifikation der Glasoberflächen mit PEG-PA bestätigt. Nichtsdestotrotz ist die Oberflächenbenetzung des tBLM-Systems zu gering und deshalb nicht für quantitative FRAP-Messungen geeignet (vgl. **3.1.1.**). Aus diesem Grund, und weil bei dem Protokoll Kalzium eingesetzt wird, wurde auch von einer versuchten Bildung ausgehend von Proteoliposomen abgesehen.



**Abb. 20 Fluoreszenzaufnahme nach Ausbildung von tBLMs mit TopFluor-GC-haltigen DGDG-Liposomen.** (a) Auf PEG-PA beschichteten Glasoberflächen kommt es nach 10 min Spreitung bei 5 mM  $\text{CaCl}_2$  zur Ausbildung eines getetherten Membransystems, das allerdings nur von sehr geringer Dichte ist. FRAP-Versuche zeigen eine Erholung der Fluoreszenz nach dem Bleichen (mobile Fraktion: ca. 70%). (b) Bei der Kontrolle, d.h. 10 min Spreiten der Liposomen bei 5 mM  $\text{CaCl}_2$  auf unbehandelten Glasoberflächen, entstehen nur Vesikelakkumulate bzw. -aggregate. Ohne Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  kann kein Fluoreszenzsignal auf der Oberfläche detektiert werden. Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ ; Probenpräparation und Spreitung erfolgten nach **2.1.1.**, **2.2.** und **2.3.**, die Bildaufnahmen gemäß **2.6.**

#### 3.4. Versuche zur Rekonstitution des LHCII in GUVs

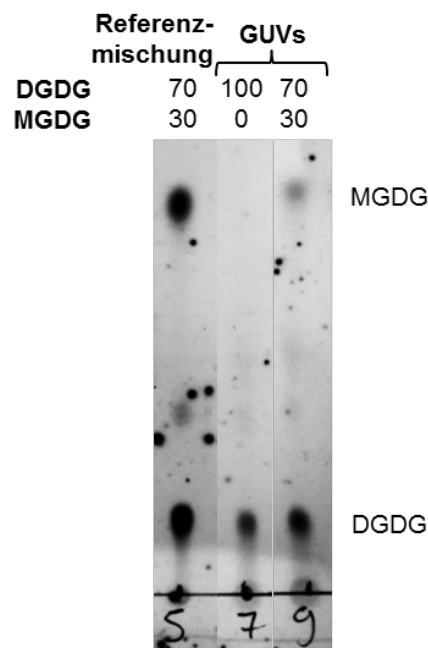
Jeder einzelne GUV ist erst ab einer gewissen Größe für FRAP-Messungen geeignet. Sofern die Herstellung von GUVs mit ausreichendem Durchmesser gelingt, muss anschließend ein Weg gefunden werden den LHCII in diese Strukturen zu integrieren. Die Rekonstitution von Proteinen in GUVs ist ein äußerst kritischer Schritt, denn die GUVs sind aufgrund ihrer enormen Größe recht instabil. Dennoch wurden in dieser Arbeit Versuche unternommen den LHCII in GUVs zu integrieren, da hierfür u.a. kein Kalzium vonnöten ist, welches in merklichem Ausmaß die Ausbildung von Membranstapeln begünstigt würde (siehe **Kapitel III**), und gleichzeitig lückenlose Membransysteme liefert

### 3.4.1. Elektroformation von GUVs ausgehend von DGDG und MGDG

Zunächst sollte unabhängig vom LHCII die Herstellung von GUVs erfolgen. Die Bildung von GUVs ausgehend von Glykolipiden wie DGDG und MGDG ist bislang nicht getestet worden. Hierfür wurde die in der Literatur am meisten benutzte Methode der Elektroformation angewendet (siehe **2.4.** und **Abb. 6**).

#### 3.4.1.1. Validierung des MGDG-Anteils in GUVs

Weil das hexagonale Phasenverhalten von MGDG<sup>57</sup> während der Elektroformation zu Komplikationen hinsichtlich des Einbaus in GUVs führen könnte, wurden die glykolipidhaltigen GUVs-Lösungen zur Überprüfung des MGDG-Gehalts einer Dünnschichtchromatographie unterzogen (**Abb. 21**). Bei der GUV-Herstellung wurde zum einen nur DGDG und zum anderen eine Mischung aus DGDG und MGDG eingesetzt, was nach Färbung der Platte anhand der Flecken zu erkennen ist (vgl. **Abb. 14**).



**Abb. 21 Dünnschichtchromatographie zur Überprüfung der Herstellung von glykolipidhaltigen GUVs.** Aufgetragen wurden 15 µg Lipid der Referenzlösung sowie jeweils theoretisch ~30 µg Lipid der GUV-Lösungen. Es zeigt sich, dass MGDG quantitativ in die Elektroformation von GUVs einbezogen wird. Die Probenpräparation und Chromatographie inkl. Dokumentation erfolgten nach **2.4.** sowie **2.5.** und **2.5.1.**

Die Referenzmischung enthält dasselbe DGDG/MGDG-Verhältnis, was zur Herstellung der GUVs eingesetzt wurde (70:30), jedoch theoretisch nur ca. die Hälfte an aufgetragener Masse Gesamtlipid. Die zugehörigen Flecken sind allerdings wesentlich intensiver gefärbt als bei der GUVs-Lösung, was bedeutet, dass ein großer Teil der eingesetzten Lipidmasse während der Elektroformation nicht in GUVs eingebaut wurde. Unabhängig davon zeigt die densitometrische Auswertung, dass das Verhältnis von DGDG zu MGDG in den GUVs wie gewünscht dem der Referenzmischung (70:30)

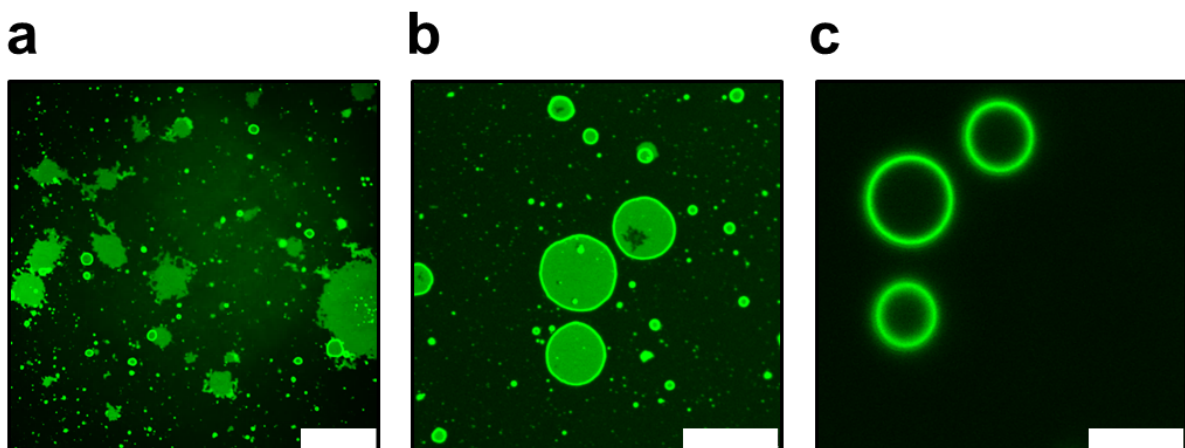
entspricht (**Tab. 4**); gleichwohl auch hier der MGDG-Gehalt in der Densitometrie systematisch überschätzt wird (vgl. **3.2.1.1.**, **Tab. 1**).

**Tab. 4 Densitometrische Auswertung der Dünnschichtchromatographie zur Verifizierung der Anteile von DGDG und MGDG in GUVs.** Gezeigt ist jeweils das Verhältnis der Intensitäten von DGDG und MGDG für die Referenzlipidmischung und GUVs aus **Abb. 11**. die densitometrische Analyse erfolgte nach **2.5.2**.

	MGDG [%]	DGDG [%]
Referenzmischung	46	54
GUVs	45	55

### 3.4.1.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der GUVs

Die GUVs wurden auf unbehandelten Glasoberflächen inkubiert und mithilfe des membrangängigen Farbstoffs BODIPY FL C<sub>16</sub> (Bodipy) sichtbar gemacht (**Abb. 22**). In den Fluoreszenzaufnahmen ist zu sehen, dass die GUVs nach Anheftung an die Oberfläche entweder intakt bleiben oder zu „Membranpatches“ aufplatzen (**Abb. 22a**). Dabei können durch Zusammenschluss mehrerer „Patches“ lückenlose Membransysteme mit einem Durchmesser von bis zu 50 µm entstehen. Eine nähere Betrachtung auf Substratebene bzw. auf mittlerer Ebene der Vesikel zeigt, dass die glykolipidhaltigen GUVs z.T. Defekte enthalten und in der Regel Größen von 5 – 10 µm Durchmesser aufweisen (**Abb. 22b** und **c**). Aus den Aufnahmen ist ersichtlich, dass mittels Elektroformation GUVs aus DGDG und MGDG formiert werden können, die für FRAP-Messungen geeignet sind. Der nächste notwendige Schritt bestand nun darin einen Weg zu finden, wie der LHCII in diese Membranstrukturen integriert werden kann.

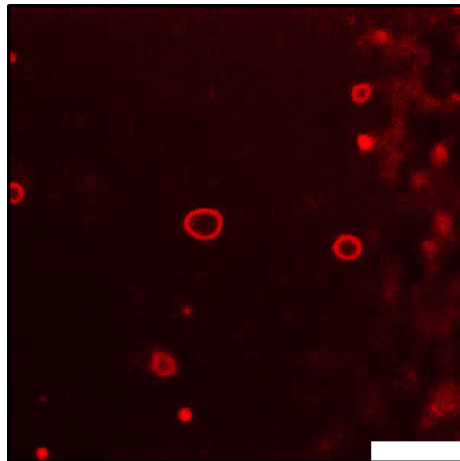


**Abb. 22 Fluoreszenzaufnahmen von glykolipidhaltigen GUVs auf Glasoberflächen.** (a) Die GUVs (hier: DGDG/MGDG = 2:1 + 5% POPG) bleiben entweder intakt oder formen große „Membranpatches“ auf der Oberfläche; Maßstabsbalken: 50 µm. (b, c) Nahaufnahmen der GUVs (hier: DGDG + 5% POPG) von unten (b) bzw. auf mittlerer Ebene (c) zeigen, dass die meisten Vesikel Größen von 5 – 10 µm Durchmesser annehmen; Maßstabsbalken: 10 µm. Probenpräparation und Färbung der GUVs mit Bodipy erfolgten nach **2.4.** und **2.4.3.**, die Bildaufnahmen gemäß **2.6**.

### 3.4.2. Fusion von GUVs mit Proteoliposomen

Eine vergleichsweise einfache Methode, Proteo-GUVs herzustellen, ist die spontane Fusion von vorgeformten GUVs mit Proteoliposomen („4“ in **Abb. 7**). Dazu sollen nach Ref. (33) GUVs mit Durchmessern von hauptsächlich 50  $\mu\text{m}$  nach erfolgter Elektroformation (bereits etabliert, siehe **3.4.1.**) zuerst durch vorsichtige Sedimentation aufkonzentriert und aufgereinigt sowie anschließend mit Proteoliposomen ähnlicher Lipidkonzentration über Nacht bei 4 °C inkubiert werden. Da die in dieser Arbeit generierten GUVs um den Faktor 5 – 10 kleiner sind (siehe **Abb. 22**), würden sie nach Ref. (33) praktisch nicht sedimentieren, weshalb der Sedimentationsschritt ausgelassen wurde. Beide eingesetzten Arten von Vesikeln bestanden aus DGDG/MGDG = 2:1 (+ 5% POPG im Fall der GUVs).

Nach dieser Fusionsprozedur können in der mikroskopischen Untersuchung auf Glas vereinzelt Strukturen detektiert werden, die anhand ihrer zirkulären Form und durch die Fluoreszenz des LHCII als intakte Proteo-GUVs identifizierbar sind (**Abb. 23**). Verglichen mit den vorgefertigten GUVs (siehe **3.4.1.2.** und **Abb. 22**) sind die so hergestellten LHCII-GUVs allerdings mit Durchmessern von 2 – 5  $\mu\text{m}$  relativ klein. Außerdem konnten diese Resultate nicht reproduziert werden (Diskussion: siehe **4.1.2.**), weshalb nachfolgend ein alternativer methodischer Ansatz zur Herstellung von Proteo-GUVs verfolgt wurde.



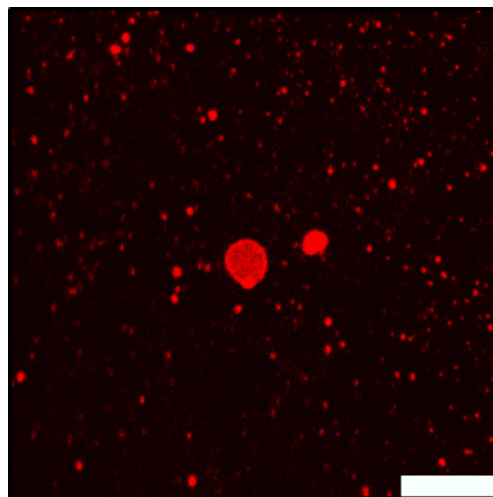
**Abb. 23** Fluoreszenzaufnahmen von glykolipidhaltigen Proteo-GUVs auf Glasoberflächen nach Fusion von Proteoliposomen mit vorgeformten GUVs. Die so erhaltenen Vesikel sind relativ klein (2 – 5  $\mu\text{m}$  Durchmesser). Lipidzusammensetzung: DGDG/MGDG = 2:1 + 5% POPG; Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ ; die Probenpräparation erfolgte nach **2.4.1.** und **2.4.3.**, die Bildaufnahme gemäß **2.6.**

### 3.4.3. Direkte Herstellung von LHCII-GUVs aus Glykolipid-Proteoliposomen

Bei dieser Methode zur Herstellung von Proteo-GUVs wurden LHCII-Liposomen auf Elektroden aufgetragen und anschließend partiell getrocknet<sup>34</sup> (siehe **2.4.2.**; „1“ in **Abb. 7**). Danach sollte ähnlich zu **3.4.1.** eine Elektroformation zu (LHCII-) GUVs erfolgen. Die Fluoreszenzaufnahmen auf Glasoberflächen belegen, dass das Protokoll ausgehend von DGDG-Proteoliposomen (+ 5% POPG)

prinzipiell funktioniert: zu sehen ist ein LHCII-GUV mit einem Durchmesser von  $\sim 3 \mu\text{m}$  (**Abb. 24**). Die Ausbeute der so hergestellten GUVs ist jedoch äußerst gering, was anhand der zahlreichen unverändert gebliebenen Proteoliposomen zu erkennen ist. Auch bei der Kontrolle, d.h. Elektroformation ausgehend von LHCII-freien DGDG-Liposomen, konnten anschließend nur in sehr geringem Ausmaß GUV-Strukturen unter dem Mikroskop detektiert werden (Durchmesser meist  $\sim 3 \mu\text{m}$ ; Daten nicht gezeigt) – die Probe ist überwiegend durch intakt gebliebene Liposomen charakterisiert.

Aus Gründen, die in **4.1.2.** genauer beschrieben sind, wurden keine Versuche unternommen, diese Methodik weiter zu optimieren. Stattdessen sollte im weiteren Verlauf der Arbeit mit Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie eine alternative Messmethode zur Bestimmung der Mobilität in SLBs eingeführt werden. Diese sollte trotz des Auftretens von Membranstapeln in Anwesenheit des LHCII (siehe **3.2.**) erlauben dessen Diffusionseigenschaften in Abhängigkeit verschiedener Lipidumgebungen zu bestimmen.

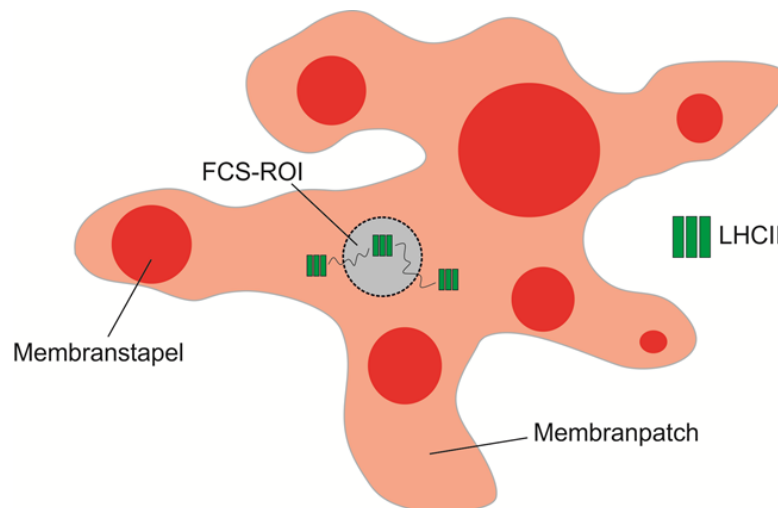


**Abb. 24** Fluoreszenzaufnahmen von glykolipidhaltigen Proteo-GUVs auf Glasoberflächen nach Elektroformation aus partiell eingetrockneten Proteoliposomen. Die Vesikel sind ebenfalls klein ( $2 - 5 \mu\text{m}$  Durchmesser; vgl. **Abb. 13**) und die Ausbeute ist äußerst gering. Der überwiegende Teil der Probe besteht noch aus Proteoliposomen, erkennbar anhand der kleinen fluoreszierenden Punkte. Lipidzusammensetzung: DGDG + 5% POPG; Maßstabsbalken:  $10 \mu\text{m}$ ; die Probenpräparation erfolgte nach **2.4.2.** und **2.4.3.**, die Bildaufnahme gemäß **2.6.**

### 3.5. FCS in Glykolipid-SLBs nach Spreitung mit Kalzium auf Micaoberflächen

Der Vorteil von FCS ist zum einen, dass die eingesetzte Fluorophorkonzentration – also die LHCII-Dichte in Liposomen – um ein Vielfaches geringer ist als beispielsweise bei FRAP. Dies sollte nach den Erkenntnissen aus **Kapitel III** zu einer deutlich reduzierten Membranstapelung in den SLBs führen, was förderlich für valide Mobilitätsbestimmungen des LHCII wäre (siehe **3.2.1.3.** und **3.2.2.2.**). Zum anderen ist die ROI bei FCS im Vergleich zu FRAP-Messungen wesentlich kleiner – der Radius

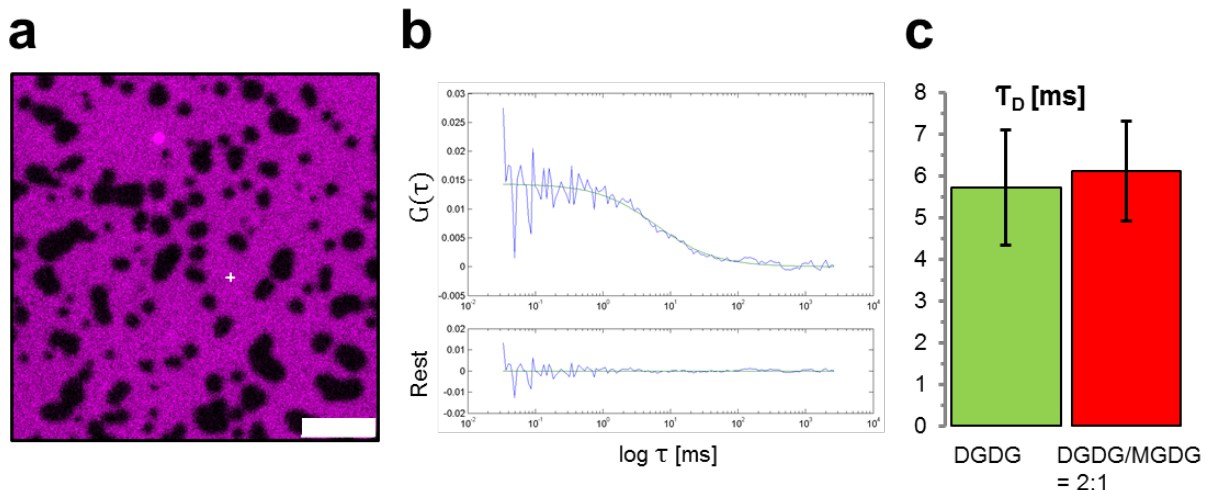
beträgt in der Regel nur ca. 300 nm<sup>37,46</sup> im Gegensatz zu den gewählten 1,5 µm bei FRAP (siehe **3.2.**). Hierdurch sollte es möglich sein, gezielt in bestimmten SLB-Abschnitten zwischen den Membranstapeln zu messen, d.h. ausschließlich in einer einzelnen Lipiddoppelschicht (**Abb. 25**). Weiterhin sollte dank der kleinen ROI die aus makroskopischer Sicht unvollständige Oberflächenbenetzung des SLB-Systems bei den Glykolipiden keine Rolle mehr spielen (siehe **Kapitel III**). Um herauszufinden, ob auch mit der neuen Messmethodik Unterschiede in der Membranviskosität detektiert werden können (vgl. **3.2.2.**), sollte FCS zunächst in Membranen ohne den LHCII etabliert werden.



**Abb. 25 Veranschaulichung der Strategie zu FCS-Messungen des LHCII in SLBs nach kalziumabhängiger Spreitung auf Mica.** Die „Region of Interest“ (ROI) ist bei der FCS-Methodik so klein, dass die Mobilitätsmessungen gezielt in einzelnen Membranabschnitten zwischen den Membranstapeln durchgeführt werden können. Schematisch dargestellt ist ein LHCII-Trimer, welches durch die ROI hindurch diffundiert.

### 3.5.1. Diffusionsmessungen mit TopFluor-GC in Membranen bestehend aus 100% DGDG und DGDG/MGDG im Verhältnis 2:1 zur Validierung der FCS-Methodik

Analog zu **3.2.2.** wurden in SLBs der beiden etablierten Glykolipidmischungen, d.h. 100% DGDG und DGDG/MGDG im Verhältnis 2:1, Mobilitätsmessungen von TopFluor-GC durchgeführt, die mit den entsprechenden Ergebnissen aus den FRAP-Messungen verglichen werden sollten. Da das markierte Lipid bei FCS-Messungen in sehr geringer Konzentration vorliegen muss, wurde die Membran durch einen längerwelligen Farbstoff (DiR) höherer Konzentration sichtbar gemacht (**Abb. 26a**). Es zeigt sich das gewohnte Bild eines makroskopisch lückenhaften Membransystems, das sich dank der Abwesenheit von LHCII durch das Ausbleiben von Membranstapeln auszeichnet (vgl. **Kapitel III Fig. 4b**). Die ROI ist so klein (weißes Kreuz in **Abb. 26a**), dass an vielen Stellen eine aus mikroskopischer Sicht lückenlose Lipiddoppelschicht vorliegt, in der FCS-Zeitspuren (siehe **Abb. 8b**) aufgezeichnet werden können.



**Abb. 26 FCS-Messungen von TopFluor-GC in SLBs auf Mica in Abhängigkeit des DGDG/MGDG-Verhältnisses.** (a) Die Fluoreszenzaufnahme zeigt das typische Bild nach Spreitung von Glykolipid-Liposomen (hier: DGDG) ohne LHCII, d.h. partiell verbundene „Membranpatches“ bilden ein lückenhaftes SLB-System ohne Membranstapel (vgl. **Kapitel III Fig. 4b**). Die ROI (angedeutet durch weißes Kreuz) hat einen Radius von ca. 300 nm; Maßstabsbalken: 5  $\mu\text{m}$ . (b) Beispielhafte Autokorrelationskurve (grün) durch „Fitten“ der Autokorrelation  $G(\tau)$  als Funktion vom Logarithmus der „Lagtime“  $\tau$  nach Aufnahme einer FCS-Zeitspur in der ROI aus (a). Der Rest (= Messdaten minus „Fitkurve“) stellt die Abweichung der Funktion vom „Fit“, also dessen Genauigkeit, dar. (c) Durchschnittliche Verweildauer  $\tau_D$  aus den Fits in (b) in Abhängigkeit von DGDG/MGDG nach mehreren Messungen. Die Zugabe von 30% MGDG zu DGDG ergibt keine signifikante Änderung für  $\tau_D$  (Fehler: 20 – 25%). Maßstabsbalken: 5  $\mu\text{m}$ ;  $n = 16 - 21$ ;  $R^2 > 0,8$ ; Probenpräparation, FCS-Messungen und FCS-Datenanalyse erfolgten gemäß **2.1.**, **2.2.**, **2.3.** und **2.6.2.**, die Bildaufnahme gemäß **2.6.**

Die unter **2.6.2.** gewählten Messbedingungen ergeben nach Autokorrelation der Zeitspuren Verläufe, die ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis sowie einen deutlich sigmoidalen Abfall der Korrelation  $G(\tau)$  entlang des Logarithmus der „Lagtime“  $\tau$  aufweisen (**Abb. 26b**; vgl. **Abb. 8c**). Somit ist ein valides „Fitten“ der Daten mit der Autokorrelationsfunktion (grün in **Abb. 26b**) möglich, was sich in Zahlen durch  $R^2$ -Werte  $\geq 0,8$  und optisch in einer geringen Abweichung der Datenpunkte vom „Fit“ (entspricht dem Rest) ausdrückt. Der Wendepunkt einer gefitteten Autokorrelationsfunktion gibt jeweils die Verweildauer  $\tau_D$  der Fluorophore in der ROI an (siehe **Abb. 8c**), wobei sich  $\tau_D$  reziprok zum Diffusionskoeffizienten verhält<sup>35–37</sup>.

Nach mehreren Messungen zeigt sich im Vergleich der Mittelwerte für  $\tau_D$  in Abhängigkeit der Lipidumgebung kein signifikanter Unterschied zwischen DGDG (~5,5 ms) und DGDG/MGDG = 2:1 (~6 ms); die Differenz beträgt ~10%, während der Fehler ca. doppelt so groß ist (**Abb. 26c**). Nach diesen Ergebnissen bewirkt ein Anteil von 30% MGDG keine detektierbare Veränderung der Viskosität in DGDG-Membranen, was im Widerspruch zu den entsprechenden FRAP-Messungen in **3.2.2.** steht. Mögliche Gründe hierfür sind in **4.3.3.** diskutiert. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse, und weil

die Standardabweichung der FCS-Methodik unter den in dieser Arbeit entwickelten Bedingungen mit 20 – 25% theoretisch zu groß ist, um den Einfluss einer möglichen Assoziation von LHCII mit MGDG-Molekülen nachzuweisen (siehe 4.4.), wurden keine weiteren FCS-Versuche mit dem LHCII durchgeführt.

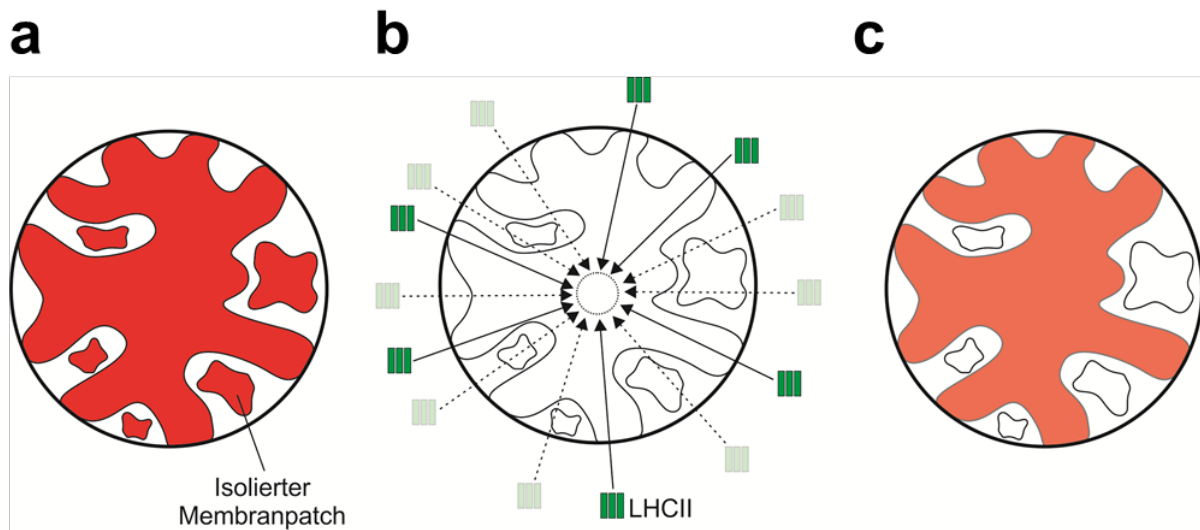
## 4. Diskussion

### 4.1. Ein lückenloses Membransystem ist essentiell für valide FRAP-Messungen

Die Bildung von SLBs ausgehend von Glykolipidliposomen und –proteoliposomen ist (vor allem auf Glas) immer von einer gewissen Menge intakt bleibender Vesikel geprägt – d.h. Vesikel, die nicht spreiten (siehe **Kapitel III Fig. 1**). Dieses verschlechterte Spreitungsverhalten spiegelt sich in einer geringeren Benetzung der Oberfläche mit Membransystem wieder (siehe dazu **Kapitel III Fig. 1, Fig. 3 und 4**).

In einem solch lückenhaften SLB-System existieren zum Teil isolierte Membranabschnitte, d.h. „Membranpatches“, die nicht mit dem umgebenden Membransystem verbunden sind (**Abb. 27a**). Diese werden bei FRAP-Messungen innerhalb einer ROI irreversibel geblichen (**Abb. 27b und c**), was zu einer Unterschätzung der mobilen Fraktion  $M$  führt und die Ergebnisse in **3.1.1**. (Verringerung von  $M$  bei Spreitung von Vesikeln mit geringerem Ladungsanteil) erklärt<sup>58–60</sup>. Gleichzeitig bewirkt ein unvollständiges Membransystem, dass nach dem Bleichvorgang nicht im kompletten Umfang der zirkulären ROI, d.h. nicht gleichzeitig aus allen Richtungen, neue Fluorophore (hier: LHCII-Komplexe) einströmen können (**Abb. 27b**). Somit dauert es länger, bis die gesamte Fluoreszenzlücke wieder aufgefüllt ist, was zur Erhöhung und damit zu einer Verfälschung der bestimmten  $t_{1/2}$  führt (siehe **Abb. 11**). Je größer die ROI desto mehr macht sich dieser Einfluss bemerkbar.

Durch den Einsatz von Mica als Substrat kann die SLB-Herstellung gegenüber Glasoberflächen merklich verbessert werden (siehe **Kapitel III**). So können bei den glykolipidhaltigen Proben vereinzelt Areale mit hoher Membrandichte detektiert werden, in denen sich FRAP-Kurven mit mobilen Fraktionen von über 75% aufzeichnen lassen (siehe **3.2.**; siehe **Abb. 15 und 17**). Dies beweist, dass der LHCII nicht durch die Anwesenheit von Glykolipiden in der Membran immobilisiert wird, und ermöglicht prinzipiell quantitative Mobilitätsbestimmungen mittels FRAP in Abhängigkeit der Lipidumgebung durchzuführen. Abgesehen von der geringen Reproduzierbarkeit solcher Areale stört hierbei aber vor allem das Phänomen der Membranstapelung in SLBs (**Kapitel III**), welches durch den LHCII selbst hervorgerufen wird (siehe **4.2.**).



**Abb. 27 Veranschaulichung eines FRAP-Experiments bei unvollständiger Oberflächenbenetzung des SLBs.** (a) Gezeigt ist eine ROI vor dem Bleichen, in der sich ein lückenhaftes Membransystem sowie isolierte Membranabschnitte befinden. (b) Unmittelbar nach dem Bleichen strömen Fluorophore (hier: LHCII-Komplexe) aus der Peripherie in die zirkuläre ROI hinein. Dies erfolgt im Idealfall radiär, d.h. gleichmäßig aus allen Richtungen im Umfang der ROI. Im Falle unvollständiger Oberflächenbenetzung der Membran können jedoch an einigen Stellen keine LHCII-Komplexe einströmen (transparent mit gestrichelten Pfeilen angedeutet), um beispielsweise die Fluoreszenz einer Fläche im Mittelpunkt der ROI (gestrichelter Kreis) wieder aufzufüllen. (c) Somit dauert es insgesamt länger bis sich die Fluoreszenz der ROI wieder vollständig erholt hat, wodurch  $t_{1/2}$  steigt. Weiterhin werden die isolierten „Membranpatches“ irreversibel geblichen, was sich nach dem „Fitten“ der Daten in einem verringerten Wert für  $M$  ausdrückt.

#### 4.1.1. Die speziellen Eigenschaften des LHCII und der Glykolipide erschweren eine vollständige Oberflächenbenetzung der SLBs

Hohe Membrandichten traten bei SLBs bestehend aus Glykolipiden äußerst selten auf (s.o.). Dies ist höchst wahrscheinlich durch das Ausbleiben elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den ungeladenen Vesikeln und dem geladenen Substrat während des Spreitungsvorgangs zu erklären (siehe **Kapitel III**). Nichtsdestotrotz sind in der Literatur einige Parameter beschrieben, die das Fusionieren sowie Aufplatzen von Vesikeln begünstigen und somit zu einer erhöhten SLB-Ausbeute führen können. Dazu zählen vor allem osmotischer Schock, erhöhte Temperatur und Ionenstärke, verlängerte Inkubationszeit sowie vergrößerte/-r Vesikelkonzentration und -durchmesser (die entsprechenden Quellen sind in den folgenden Absätzen einzeln aufgeführt). Nachfolgend ist erläutert, weshalb die Anwendung dieser Parameter beim Spreiten von LHCII-Glykolipidliposomen nicht oder nur bedingt geeignet ist bzw. nicht weiterverfolgt wurde.

Größere Vesikel sind leichter zu deformieren, wodurch ein Aufplatzen begünstigt ist<sup>10,14</sup>. Die in dieser Arbeit verwendeten Proteoliposomen haben (nach Extrudieren durch eine Membran mit 100 nm Porendurchmesser) laut Boggasch (2006) einen Durchmesser von 100 - 150 nm, was nach Ref. (14) deren Spreitung im Vergleich zu Vesikeln von beispielsweise nur 50 nm Durchmesser bereits deutlich

erleichtert. Die Deformation von Vesikeln kann vor allem auch durch einen osmotischen Salzgradienten gesteigert werden; außerdem ist in Hinblick auf elektrostatische Interaktionen die Ionenstärke des Puffers wichtig für den Adsorptionsvorgang der Vesikel<sup>9,14,61</sup>. Dies ist jedoch im Zusammenhang mit Glykolipidmembranen und dem LHCII kontraproduktiv, weil es bei salzhaltiger Umgebung zur Ausbildung besonders großflächiger Membranstapel und somit zum Verlust des kontinuierlichen SLB-Systems kommt (siehe **Kapitel III Fig. 6**). Membranstapel werden gerade durch die Präsenz von MGDG vermehrt hervorgerufen (siehe **Kapitel III Fig. 3**).

Wenn man die Kinetik des Spreitungsprozesses berücksichtigt, würde sich mit längeren Inkubationszeiten der Anteil an gespreiteten Vesikeln vergrößern. Zusätzlich kann der Prozess mit höheren Temperaturen beschleunigt werden, da dies die Aktivierungsenergie senkt. In entsprechenden Untersuchungen ist jedoch gezeigt worden, dass eine weitere Erhöhung der in dieser Arbeit verwendeten Inkubationszeit (10 min) und der Temperatur (Raumtemperatur) vermutlich keinen signifikanten Effekt hätte<sup>13</sup>. Darüber hinaus ist es vorstellbar, dass sich desto mehr Vesikel oder „Membranpatches“ auf der bereits formierten SLB-Membranschicht auflagern können je länger die Proteoliposomenlösung auf dem Substrat inkubiert wird (da der LHCII eine Membranadhäsion bewirkt; siehe **Kapitel III**), was wiederum ungünstig für FRAP-Messungen wäre (siehe **4.2.**). Dies konnte bereits in Vorversuchen beobachtet werden (Boggasch 2006). Weiterhin ist die in dieser Arbeit eingesetzte Lipidkonzentration (~1 mg/ml) rund 10x so groß (und somit ausreichend) wie die minimale Konzentration einer Vesikellösung, die zum Erreichen der kritischen Oberflächenbedeckung mit Vesikeln benötigt wird – wonach diese anschließend spreiten<sup>8</sup>. Für Diffusionsmessungen mittels FCS ist ein lückenhaftes SLB-System allerdings dennoch geeignet (siehe **Abb. 25** und **26**).

#### **4.1.2. GUVs sind bei Etablierung eines geeigneten Rekonstitutionsprotokolls für den LHCII ein valides Glykolipid-Modellmembransystem**

Da die Oberflächenbenetzung bei Glykolipid-SLBs vergleichsweise gering ist und auch innerhalb einer Probe stark schwanken kann, stellen GUVs als lückenlose abgeschlossene Membransysteme mit Durchmessern bis zu 10 µm eine geeignete Alternative zu SLBs dar. In dieser Arbeit konnte die Herstellung von GUVs mittels Elektroformation ausgehend von Glykolipiden etabliert werden (siehe **3.4.1.**), die Rekonstitution des LHCII in diese Membranstrukturen hingegen nicht (siehe **3.4.2.** und **3.4.3**).

Eine direkte Bildung von Proteo-GUVs aus Proteoliposomen („1“ in **Abb. 7**) ist bei der Verwendung von Glykolipiden vermutlich nicht geeignet (siehe **3.4.3.**), weil sie auf der Bildung eines mehrschichtigen Lipidfilms ausgehend von Lipidvesikeln basiert<sup>32,34</sup>; dies erfordert ein Spreiten der Vesikel auf der Elektrodenoberfläche, was bei DGDG und MGDG deutlich erschwert ist und die geringe Ausbeute an LHCII-GUVs erklären dürfte (siehe **Abb. 24**). Andere methodische Ansätze wie „Microfluidic Jetting“ oder die „Droplet Transfer Method“ („6“ und „5“ in **Abb. 7**) sind relativ kompliziert in der Durchführung und deshalb fehleranfälliger; zudem wird hierbei in Gegenwart von Ölphasen gearbeitet, was bei pigmenttragenden Proteinen wie dem LHCII zu Problemen hinsichtlich einer

Denaturierung führen kann<sup>32</sup>. Der Ansatz einer direkten detergensabhängigen Insertion des LHCII in vorgeformte GUVs („3“ in **Abb. 7**) wurde in dieser Arbeit ebenso nicht verfolgt. Das Problem ist, dass GUVs äußerst fragile Strukturen sind (Detergenzien destabilisieren diese zusätzlich) und mit Detergenzkonzentrationen weit unter der kritischen Mizellbildungskonzentration gearbeitet werden muss, was die Aggregation von Proteinen begünstigt<sup>32</sup>.

Vielversprechender erscheint dagegen eine Fusion von Proteoliposomen mit GUVs („4“ in **Abb. 7**): die mit dieser Methode erlangte Ausbeute an LHCII-GUVs war in dieser Arbeit zwar gering und nicht reproduzierbar (siehe **3.4.2.**), jedoch gibt es leicht justierbare Parameter, mit denen das Protokoll deutlich verbessert werden kann. Hierbei kommt es vor allem auf das Verhältnis von GUVs zu Proteoliposomen an. Im Vergleich zur angestrebten Stöchiometrie nach Varnier *et al.*<sup>33</sup> war das tatsächliche Verhältnis vermutlich viel zu niedrig, da die Lipidkonzentration von GUV-Lösungen offensichtlich überschätzt wurde (siehe **Abb. 21**). Eine weitere Diskrepanz stellt die Größe der eingesetzten GUVs dar, wonach die in dieser Arbeit produzierten GUVs im Durchschnitt 5 - 10x kleiner sind als in der Publikation von Varnier *et al.*<sup>33</sup> verwendet. Dadurch konnten letztere auch nicht, wie von den Autoren beschrieben, mittels Sedimentation vor dem Fusionsansatz aufkonzentriert werden<sup>33</sup>.

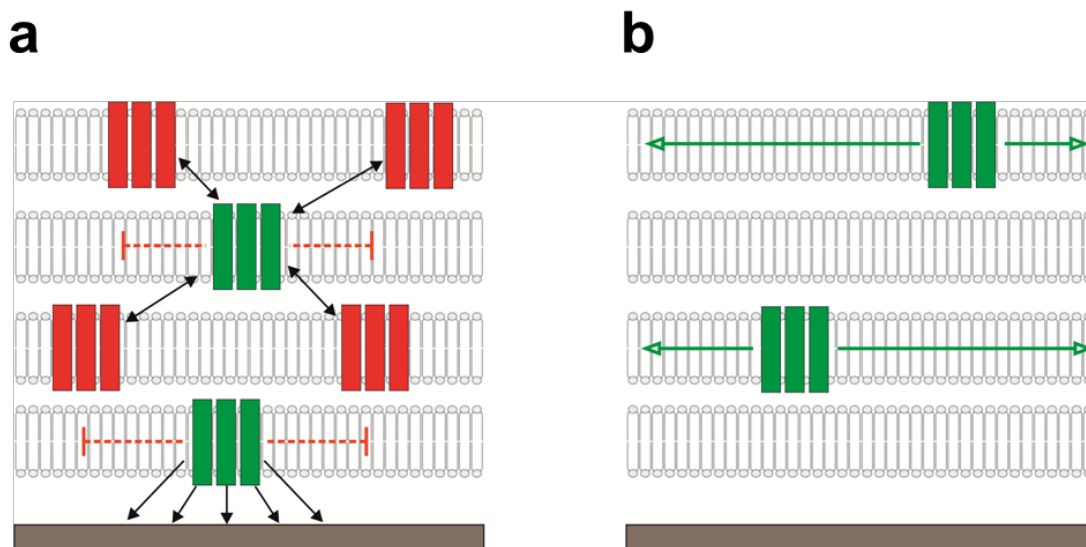
Für eine erfolgreiche Insertion des LHCII in GUVs im Rahmen dieser Methodik läge es also nahe, die Elektroformation in Hinblick auf größere Vesikel und eine erhöhte Ausbeute zu optimieren. Weiterhin sollte vor jedem Fusionsansatz die Lipidkonzentration der Lösung, beispielsweise mithilfe einer Dünnschichtchromatographie (siehe **2.5.1.**), quantifiziert werden. Darüber hinaus könnte der Fusionsvorgang auch mit dem Einsatz von Fusionspeptiden in den SUVs unterstützt werden (siehe „2“ in **Abb. 7**).

#### **4.2. In Membranstapeln kann die Mobilität von LHCII-Komplexen sowohl erhöht als auch verringert sein**

In **3.2.1.3.** und **3.2.2.2.** ist bereits angedeutet, dass das Auftreten verschiedener Diffusionspopulationen des LHCII in SLBs mit der unterschiedlichen Neigung zur Ausbildung von Membranstapeln – in Abhängigkeit der Lipidumgebung (siehe dazu **Kapitel III**) – korreliert werden kann. Ohne den LHCII, und damit in Abwesenheit von Membranstapeln, sind die Diffusionswerte pro Lipidmischung jeweils in Form einer Population normalverteilt (siehe **3.2.2.**). In Anwesenheit des LHCII kommt es vor allem bei DGDG/MGDG = 2:1 zur vermehrten Ausprägung von Membranstapeln. Auch diese werden während den FRAP-Messungen anteilig geblichen, was nicht nur zu einer sehr großen Varianz des Mittelwertes für  $t_{1/2}$  führt, sondern auch mehrere distinkte Diffusionspopulationen der Komplexe ergibt (siehe **3.2.1.**). Dies liegt daran, dass die Diffusion je nach Schichtebene und lokaler Umgebung in den Stapeln sowohl erleichtert als auch erschwert sein kann<sup>40</sup>.

Auf der einen Seite sind Bremseffekte vorstellbar, die durch Wechselwirkungen zwischen LHCII-Trimeren benachbarter Membranschichten (welche gleichzeitig eine entscheidende Triebkraft zur

Bildung von Membranstapeln darstellen – siehe **Kapitel III**) und durch LHCII-Substrat-Wechselwirkungen in der oberflächennahen Schicht hervorgerufen werden (**Abb. 28a**). Auf der anderen Seite bleiben letztere Wechselwirkungen in den aufgelagerten Membranschichten aus, was wiederum die Mobilität darin enthaltener Komplexe erhöht (**Abb. 28b**). Aus dem Zusammenspiel dieser möglichen Effekte und der variierenden Anzahl an Schichten pro Membranstapel (siehe **Kapitel III Fig. 3**) ergeben sich somit verschiedene Diffusionspopulationen.



**Abb. 28 Beeinflussung der Diffusion von LHCII durch Membranstapelung.** (a) Die laterale Mobilität diffundierender LHCII-Komplexe (grün) kann durch Wechselwirkungen (schwarze Pfeile) mit anderen Komplexen (rot) benachbarter Membranschichten eingeschränkt werden (rote Stopppfeile). Weiterhin werden die Komplexe in oberflächennahen Schichten durch Wechselwirkungen mit dem Substrat (braun) ausgebremst. (b) Im Gegensatz dazu kann die Diffusion einzelner Komplexe in oberflächenfernen Membranschichten aufgrund ausbleibender Substratwechselwirkungen erleichtert sein (grüne Pfeile).

Um dieses Problem zu umgehen, kann entweder in Membranbereichen zwischen den Stapeln gemessen werden (beispielweise durch sehr kleine ROIs wie bei FCS; in **Abb. 25** skizziert und Ergebnisse dessen in **4.4.** diskutiert) oder ein alternativer methodischer Ansatz zur Beurteilung einer eventuellen Assoziation zwischen LHCII und MGDG verfolgt werden (siehe **4.5.**).

#### 4.3. Zu veränderten Membraneigenschaften in Abhängigkeit der Thylakoidlipide kann keine eindeutige Aussage getroffen werden

Das Hauptziel dieses Kapitels der Arbeit war es, eine mögliche direkte Assoziation zwischen MGDG und trimerem LHCII mittels Diffusionsmessungen nachzuweisen, aber auch den Einfluss der Membranladung hinsichtlich der Mobilität des Proteins zu untersuchen (siehe **1.1.** und **4.4.**).

Unabhängig von spezifischen Effekten müssen Änderungen der physikalischen Membraneigenschaften in Hinblick auf die Diffusion in den verwendeten Membranen untersucht werden (siehe 1.1.1.). Dazu wurde die Mobilität des fluoreszierenden Lipids TopFluor-GC in Abhängigkeit der drei etablierten Lipidzusammensetzungen mittels FRAP in SLBs gemessen: bei DGDG ist die Diffusion signifikant um ~35% im Vergleich zu POPG reduziert, während MGDG bei einem Anteil von 1:2 die Diffusion in DGDG-Membranen signifikant um ~30% reduziert (siehe 3.2.2.). Dementgegen stehen die Resultate der FCS-Messungen in SLBs, wonach die Mobilität von TopFluor-GC durch MGDG in DGDG-Membranen um nur ~10% verringert wird; darüber hinaus ist diese Änderung nicht signifikant (siehe 3.5.1.). Da diese Ergebnisse im Widerspruch zueinanderstehen, soll nachfolgend erörtert werden, ob und inwiefern Trends zu erwarten sind.

#### 4.3.1. POPG gegenüber DGDG

POPG hat im Vergleich zu DGDG eine kleinere Kopfgruppe, eine hohe Packungsdichte dürfte in diesem Bereich dennoch aufgrund von Abstoßungskräften durch die negativen Ladungen der Phosphatreste erschwert sein; im Gegensatz dazu besitzt das Lipid aber nur eine C=C-Doppelbindung. Der großen räumlichen Beanspruchung durch die DGDG-Kopfgruppen wirken intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen der Zuckerreste entgegen<sup>62</sup>, was wiederum theoretisch die Packungsdichte und damit die Viskosität erhöht; allerdings sind die Fettsäuren von DGDG hochgradig ungesättigt, wodurch der Abstand zwischen den Kopfgruppen vergrößert wird. Aus diesen Gründen kann keine genaue Vorhersage zur Fluidität von reinen POPG- gegenüber reinen DGDG-Membranen getroffen werden, auch in der Literatur ist hierfür keine vergleichende Untersuchung zu finden.

In Hinblick auf die Membrandicke  $h$  ist die Lipiddoppelschicht von DGDG mit ~4,2 nm<sup>63</sup> etwas dicker als die von POPG mit ~3,7 nm<sup>64–66</sup>, weshalb bei DGDG mehr bremsende van der Waals-Wechselwirkungen für TopFluor-GC vorstellbar sind. Zusätzlich sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Zuckerkopfgruppen von DGDG und TopFluor-GC denkbar, was ebenfalls zu einer Verlangsamung beitragen würde. In diesem Kontext erscheint die mittels FRAP bestimmte signifikante Verringerung der Diffusionsgeschwindigkeit durch DGDG (siehe **Tab. 3**) allerdings plausibel.

#### 4.3.2. DGDG gegenüber DGDG/MGDG im Verhältnis 2:1

Da sich MGDG gegenüber DGDG nur durch die kleinere Kopfgruppe (ein Galaktoserest fehlt) unterscheidet, ist theoretisch bei MGDG im Falle lamellarer Lipiddoppelschichten mehr freier Raum zwischen den Lipidköpfen verfügbar; dies müsste die Diffusion von Lipiden erleichtern. Gleichzeitig ist aber aufgrund dieses freien Raumes eine stärkere Kompression der Lipide möglich, was anhand von „Lipidmonolayern“ gezeigt wurde: die beanspruchte Fläche pro Lipid sinkt, wenn reine DGDG-„Monolayer“ zusätzlich MGDG enthalten<sup>57</sup> – demnach müsste die Packungsdichte und somit die

Viskosität zunehmen. Andere Studien beschreiben eine Zunahme der Fläche pro Lipid durch MGDG in DGDG-„Monolayern“ bei jedoch erhöhtem Ordnungsgrad der Alkylketten<sup>67</sup>. Eindeutig und plausibel ist hingegen die geringere Membrandicke von MGDG in Lipiddoppelschichten, welche laut Simulationen zwischen 3,5 und 3,7 nm beträgt<sup>68</sup>. Demnach käme es zu weniger Bremskräften im Vergleich zu DGDG und damit zu einer erleichterten Diffusion.

In der Literatur sind zwar keine Diffusionsmessungen von DGDG/MGDG-Mischmembranen beschrieben, jedoch wurde in Simulationen von Membranen bestehend aus Phosphatidylcholin (PC) gezeigt, dass die Mobilität von Lipiden mit zunehmendem Anteil an MGDG signifikant sinkt<sup>68</sup>. Dieser Trend ist experimentell in PC-Bizellen nachgewiesen<sup>69</sup>. In dieser Versuchsreihe wurde ebenso der Einfluss von DGDG untersucht: es zeigte sich, dass auch DGDG die Mobilität von Lipiden in den PC-Bizellen signifikant verringert – jedoch in einem geringeren Ausmaß als MGDG. Die Diffusionskonstante für PC ist bei denselben Anteilen an MGDG im Vergleich zu DGDG um 11 - 16% signifikant kleiner<sup>69</sup>.

Da MGDG die Mobilität offenbar stärker reduziert als DGDG, wäre prinzipiell zu erwarten, dass die Diffusion in reinen DGDG-Membranen durch die Präsenz von MGDG verlangsamt wird; genaue quantitative Prognosen können allerdings nicht getätigt werden. Der Trend kann in dieser Arbeit zwar sowohl mittels FRAP als auch via FCS qualitativ bestätigt werden, jedoch sind die Unterschiede bei FCS nicht signifikant (siehe **Abb. 26c**). Weiterhin war bei den FRAP-Messungen das SLB-System der gemessenen MGDG-Probe sichtbar poröser als das der DGDG-Probe (siehe **Abb. 17**), was nach der Argumentation in **4.1.** die gemittelte „Half-time Recovery“ im Sinne einer Erhöhung verfälscht haben kann. Deshalb sollen die Ergebnisse auch in Hinblick auf die beiden verschiedenen Messmethoden diskutiert werden (**4.3.3.**).

#### 4.3.3. FRAP gegenüber FCS

Nach Axelrod<sup>44</sup> können die in FRAP-Experimenten ermittelten  $t_{1/2}$ -Werte für TopFluor-GC in DGDG- bzw. DGDG/MGDG = 2:1-Membranen wie folgt in die Diffusionskoeffizienten  $D$  umgerechnet werden:

$$D_{FRAP} = 0,88 \cdot \frac{r^2}{4t_{1/2}}$$

Gemäß **Tab. 3** ergeben sich dabei Werte für  $D$  zwischen 0,15 und 0,19  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ .

Die korrespondierenden Diffusionskonstanten aus den FCS-Messungen können wie folgt bestimmt werden<sup>47</sup>:

$$D_{FCS} = \frac{r^2}{4\tau_D}$$

Entsprechend der  $\tau_D$ -Werte aus **Abb. 26c** und der Annahme eines Radius  $r$  von  $\sim 0,3 \mu\text{m}$ <sup>37,46</sup> werden für  $D$  Werte zwischen  $3,8$  und  $4,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$  erhalten. Die Diffusionskonstanten sind also bei den FCS-Experimenten um den Faktor  $\sim 20$  größer. Die FCS-Werte bewegen sich – im Gegensatz zu den FRAP-Werten – in einer Größenordnung, die durch zahlreiche Literaturwerte gegeben ist ( $> 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ )<sup>5,31,41,70,71</sup> – siehe explizit dazu Table 1 in Ref. (30). Es sei jedoch erwähnt, dass für Lipide in SLBs auch Werte weit unter  $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$  publiziert sind<sup>72,73</sup>.

In systematischen Studien wurde bereits die Diffusion von Lipiden in SLBs zum direkten Vergleich von FRAP und FCS gemessen: es zeigte sich, dass  $D_{FCS}$  in der Regel ca. doppelt so groß ist wie  $D_{FRAP}$ <sup>41,74</sup>. Dies wird hauptsächlich damit begründet, dass die zeitliche Auflösung bei FRAP gegenüber FCS wesentlich geringer ist, weshalb die Methode eher für die Bestimmung kleiner Diffusionskonstanten geeignet ist<sup>30</sup>. Es ist deshalb zu vermuten, dass die in dieser Arbeit vorgefundene immense Diskrepanz zwischen FRAP und FCS durch eine zu niedrige zeitliche Auflösung, bedingt durch eine kleinflächige ROI, zustande kommt.

Bei FRAP sinkt  $t_{1/2}$  mit abnehmendem Radius der ROI, wodurch die zeitliche Auflösung – gerade im Anfangsbereich der „Recovery“-Kurven – eine immer größere Bedeutung gewinnt<sup>30</sup>. Letztere kann durch eine geringere Bildauflösung erhöht werden, was jedoch das Signal-Rausch-Verhältnis verschlechtert. Da es während der Messungen allein durch die Bildaufnahme zu einem deutlichen Bleicheffekt und damit zum kontinuierlichen Abfall der Gesamtfluoreszenzintensität kam, wurde jedoch von einer höheren Bildsequenz abgesehen. Nach obiger Argumentation könnte eine Vergrößerung der ROI bei gleichbleibender zeitlicher Auflösung zu valideren FRAP-Ergebnissen in **3.2.2.** führen. Dem entgegen würde aber – gerade bei Glykolipid-SLBs – aufgrund des inhomogenen Membransystems (siehe **Kapitel III Fig. 4**) mit einer Erhöhung des ROI-Radius auch eine zunehmende Verfälschung von  $t_{1/2}$  einhergehen (siehe **4.1.**). Zudem würde auch die Varianz der Messungen größer, was am Beispiel des vergleichsweise lückenhaften SLBs der MGDG-Probe in **Abb.17 / Tab. 3** deutlich wird.

Prinzipiell kann also festgehalten werden, dass FRAP – vor allem aufgrund der merklichen Beeinflussung durch eine variierende Oberflächenbenetzung der Membran – zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten in Glykolipid-SLBs schlechter geeignet ist als FCS. Bei konstantem Spreitungsverhalten, das in weitgehend lückenlosen SLBs resultiert, kann FRAP hingegen zum Nachweis von deutlich messbaren Veränderungen der Membraneigenschaften zurate gezogen werden; dies konnte im Fall der verringerten Membranviskosität durch PEtOH in POPG-SLBs gezeigt werden (siehe **Abb. 13**). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine quantitative Beurteilung von veränderten Membraneigenschaften in Abhängigkeit der Lipide gelungen ist, was wiederum zusätzlich die Interpretation von Diffusionsmessungen des LHCII erschwert (siehe **4.4.**).

#### 4.4. Die Genauigkeit von FRAP und FCS reicht vermutlich nicht für den Nachweis einer Assoziation von MGDG und trimerem LHCII aus

Durch die Etablierung von FCS sollte es prinzipiell möglich sein, die Bildung eventueller LHCII-MGDG-Mikrodomänen in Hinblick auf die Mobilität des Proteins zu untersuchen (siehe 1.1.), da die Diffusionsmessungen – im Gegensatz zu FRAP – außerhalb des Einflusses von Membranstapeln stattfinden können oder es durch die geringe Proteindichte womöglich erst gar nicht zum Phänomen der Stapelung kommt (siehe 3.5.). Mithilfe von Referenzmessungen des markierten Lipids TopFluor-GC sollten Auswirkungen von veränderten physikalischen Membraneigenschaften (Parameter  $\mu$  und  $h$ , siehe 4.3.) in Abhängigkeit der einzelnen Lipidmischungen bestimmt werden. Auf dieser Basis kann der Anteil eines veränderten Diffusionskoeffizienten von LHCII abgeschätzt werden, welcher allein aus einer Zunahme des Radius  $R$  im Falle einer Assoziation mit MGDG resultiert (siehe 1.1.). Im Folgenden ist eine Kalkulation aufgezeigt, welche Werteveränderungen hierdurch für  $D$  maximal zu erwarten wären.

Mit jedem MGDG-Lipidgürtel um den LHCII nimmt  $R$  des diffundierenden Partikels um den Durchmesser  $d$  des MGDG-Moleküls zu (**Abb. 29**):

$$R' = R + d$$

Mit dem vergrößerten Radius  $R'$  kann der erweiterte Umfang  $U'$  berechnet werden:

$$U' = 2\pi \cdot R'$$

Gleichzeit kann  $U'$  grob durch das Produkt aus  $d$  (als mittlerer Abstand zwischen 2 Lipiden) und der Anzahl MGDG-Molekülen  $n$  im Lipidgürtel beschrieben werden (**Abb. 29**).

$$U' \approx d \cdot n$$

Somit gilt:

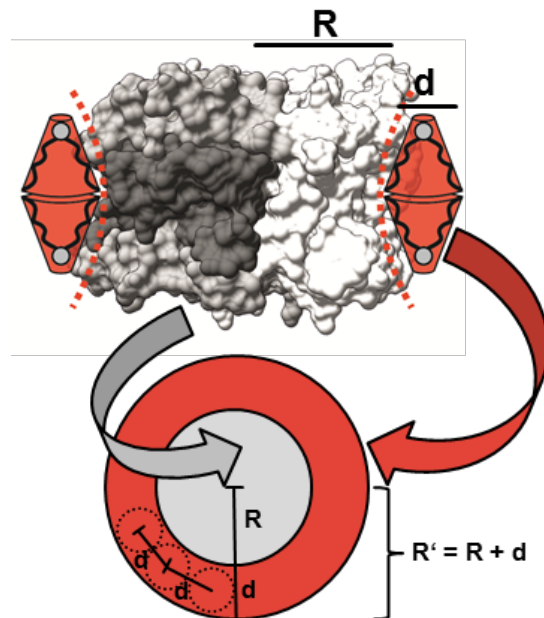
$$n \approx \frac{2\pi \cdot R'}{d} \approx \frac{2\pi(R + d)}{d}$$

Weiterhin muss die Zahl  $n$  der benötigten Lipide pro Gürtel mit 2 multipliziert werden, da es sich um eine Lipiddoppelschicht handelt:

$$n_1 \approx 2 \cdot \left( \frac{2\pi(R + d)}{d} \right)$$

Laut Simulationen nimmt jedes MGDG-Molekül bei einem Anteil zwischen 20% und 45% in lamellaren Membranen eine Fläche von  $\sim 0,6 \text{ nm}^2$  ein<sup>68</sup>, was wiederum (unter der Annahme einer zirkulären Raumbeanspruchung) einem Durchmesser  $d_{MGDG}$  von  $\sim 0,62 \text{ nm}$  entspricht. Gemäß

kristallographischer Daten beträgt  $R_{LHCII} = 3,75 \text{ nm}$ <sup>75</sup>. Setzt man diese Werte in obige Gleichung ein, so besteht der erste Lipidgürtel aus ~88 Lipiden.



**Abb. 29** Darstellung zur Zunahme des hydrodynamischen Radius von trimerem LHCII durch direkte Assoziation mit MGDG. Der Radius  $R$  von LHCII wird pro Lipidgürtel um den Durchmesser  $d$  von MGDG auf den Radius  $R'$  vergrößert. Der so erweiterte Umfang des diffundierenden Partikels kann durch das Produkt aus  $d$  (als mittlerer Abstand zwischen 2 Lipiden) und der Anzahl an MGDG-Molekülen im Lipidgürtel beschrieben werden.

Bei einem zweiten Gürtel muss auf Basis des neuen Radius

$$R'' = R' + d = R + 2d$$

die Zahl an Lipiden im zweiten Gürtel berechnet und mit der Zahl an Lipiden im ersten Gürtel summiert werden:

$$n_2 \approx 2 \cdot \left( \frac{2\pi(R + 2d)}{d} \right) + n_1$$

Hierbei ergibt sich eine Zahl von ~189 Lipiden, die sich in Form von zwei Schichten um den trimeren LHCII anordnen können. Bei drei Gürteln wären es ~302 und bei vier Gürteln ~428 MGDG-Moleküle.

Nach Simidjiev *et al.* können im Zuge der Ausbildung einer lamellaren Membran aus LHCII-Aggregaten (siehe **Kapitel I Abb. 3**) pro LHCII Monomer zwischen 110 und 120 MGDG-Moleküle gebunden werden, was 330 - 360 Lipiden pro LHCII Trimer entspricht<sup>76</sup>. Unter dieser Annahme

können gemäß obiger Kalkulation drei vollständige MGDG-Gürtel um den trimeren LHCII herum assoziiert werden. Dies entspräche einer Vergrößerung von  $R$  um  $3d$ , also ist

$$\frac{R_{LHCII+MGDG}}{R_{LHCII}} = \frac{(R_{LHCII} + 3d)}{R_{LHCII}} = 1,5$$

Der Radius von LHCII nähme theoretisch maximal um  $\Delta R_{LHCII} = 50\%$  zu. Hiermit lässt sich in Kombination mit dem Saffman-Delbrück-Modell<sup>3</sup> die Änderung von  $D$  vorhersagen. Wenn  $h \approx 4 \text{ nm}$  (als mittlere Membrandicke zwischen DGDG und MGDG; siehe **4.3.**),  $\mu \approx 40 \text{ mPa}$  und  $\mu' \approx 1 \text{ mPa}$  als typische Werte für Membranen bzw. das Umgebungsmedium konstant gesetzt werden<sup>1</sup>, kann das Verhältnis der Diffusionskoeffizienten wie folgt berechnet werden (mit der Euler-Konstanten  $\gamma \approx 0,5772$ ):

$$\frac{D_{LHCII+MGDG}}{D_{LHCII}} = \frac{\frac{k_B T}{4\pi\mu h} \left( \ln \left( \frac{\mu h}{\mu' \cdot 1,5 R_{LHCII}} \right) - \gamma \right)}{\frac{k_B T}{4\pi\mu h} \left( \ln \left( \frac{\mu h}{\mu' R_{LHCII}} \right) - \gamma \right)} = \frac{\ln \left( \frac{\mu h}{\mu' \cdot 1,5 R_{LHCII}} \right) - \gamma}{\ln \left( \frac{\mu h}{\mu' R_{LHCII}} \right) - \gamma} \approx 0,87$$

Die Änderung des Diffusionskoeffizienten würde somit  $\Delta D_{LHCII} \approx -13\%$  betragen.

Die Standardabweichung der in dieser Arbeit durchgeführten FCS-Messungen beträgt zwischen 20% und 25% (im Fall von TopFluor-GC; siehe **Abb. 26**). Der maximale, theoretisch zu erwartende Effekt einer LHCII-MGDG Assoziation wäre somit unter diesen Bedingungen nicht signifikant messbar. Selbst wenn der Beitrag einer insignifikanten Verringerung für  $D$  um  $\sim 10\%$ , bedingt durch ein vergrößertes Produkt aus  $\mu$  und  $h$  durch den Anteil von 30% MGDG in DGDG-Membranen gemäß FCS (siehe **4.3.** und **Abb. 26**), hinzukäme, würde sich der Gesamtunterschied immer noch im Bereich der Varianz bewegen. Weiterhin würden auch die FRAP-Messungen, sofern es gelänge in Anwesenheit des LHCII ein lückenloses Membransystem frei von Membranstapeln zu produzieren, vermutlich keine entscheidende Verbesserung darstellen: die Varianz wäre mit  $\sim 15\%$  immer noch so groß wie  $\Delta D_{LHCII}$  selbst (siehe **Tab. 3**). Darüber hinaus ist zum Einfluss von  $\mu$  und  $h$  insgesamt keine gesicherte quantitative Einschätzung gelungen (siehe **4.3.**).

Hinzu kommt, dass bei obiger Kalkulation von einer maximalen Assoziationsneigung der MGDG-Moleküle gemäß den Berechnungen nach Simidjiev *et al.* ausgegangen wird<sup>76</sup> – der Assoziationsgrad ist in Proteoliposomen vermutlich um einiges geringer. Dies liegt daran, dass die MGDG-Moleküle bei den Versuchen von Simidjiev *et al.* für die Organisation als lamellare Membranstruktur auf die Wechselwirkung mit LHCII-Komplexen angewiesen waren. Bei den Liposomen hingegen handelt es sich durch den hohen DGDG-Anteil um vorgefertigte lamellare Membranen, in welche die LHCII-Trimere anschließend inseriert werden (siehe **2.2.**). In dieser Form ist MGDG wahrscheinlich weniger stark „gezwungen“ mit dem LHCII zu assoziieren. Somit wäre  $\Delta D_{LHCII}$  noch kleiner.

Es sei jedoch erwähnt, dass vor ca. 10 Jahren von Gambin *et al.* eine heuristische Stokes-Einstein-Expression postuliert wurde und diese von einer weiteren Studie unterstützt wird, welche im Gegensatz zum häufig angewandten Saffman-Delbrück-Modell eine direkte antiproportionale Abhängigkeit von  $D$  und  $R$  in Membranen beschreibt<sup>77,78</sup>. Demnach ergäbe sich:

$$\frac{D_{LHCII+MGDG}}{D_{LHCII}} = \frac{\left(\frac{k_B T \lambda}{4\pi\mu h \cdot 1,5R_{LHCII}}\right)}{\left(\frac{k_B T \lambda}{4\pi\mu h \cdot R_{LHCII}}\right)} = 0,67$$

Dies entspräche einer Änderung von  $\Delta D_{LHCII} = -33\%$ , was sich in dieser Arbeit durchaus signifikant bestimmen ließe. Allerdings wurde das Stokes-Einstein-Modell in nachfolgenden Untersuchungen explizit widerlegt, und gleichzeitig die besondere Eignung des Saffman-Delbrück-Modells für Proteine mit einem Radius von bis zu 8 nm – was den trimeren LHCII mit einschließt – herausgestellt<sup>1,2</sup>. Es muss also letztendlich resümiert werden, dass mit den hier gezeigten Versuchen zur Bestimmung der Mobilität des LHCII keine ausreichende Genauigkeit erreicht wurde, welche die Beurteilung einer direkten Assoziation des Proteins mit MGDG erlaubt.

#### 4.5. Ausblick: Nachweis einer möglichen Assoziation von MGDG mit trimerem LHCII

##### 4.5.1. Alternative oder verbesserte Diffusionsmessungen des LHCII sind nicht vielversprechend

Unter Beibehaltung des etablierten SLB-Systems in Verbindung mit fluoreszenzbasierten Diffusionsmessungen des LHCII gibt es nur bedingt Möglichkeiten die Validität und Genauigkeit der Messungen zu erhöhen (siehe 4.3.3.). Bei FRAP-Messungen könnte eine Verringerung des kontinuierlichen Bleichens eine höhere zeitliche Auflösung ermöglichen. Dies könnte beispielsweise durch die Einführung anaerober Bedingungen mithilfe eines Katalase-Peroxidase basierten Puffersystems erreicht werden<sup>79-81</sup>. Ob die Genauigkeit der FRAP-Methodik danach hoch genug ist, um den Effekt einer möglichen LHCII-MGDG-Assoziation signifikant zu bestimmen (siehe 4.4.), kann allerdings nicht vorhergesagt werden. Neben FCS ist „Single Particle Tracking“ (SPT) eine weitere etablierte Methode zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten in SLBs. Das Problem bei SPT ist allerdings, dass die Proteindichte in Membranen so gering sein muss, sodass der LHCII hierbei bereits dissoziieren würde (LPV > 100.000; Boggasch 2006). Des Weiteren ist die Varianz der Methodik vergleichsweise hoch<sup>74</sup> – dieser Effekt wird bei inhomogenen SLBs umso mehr verstärkt<sup>82</sup>.

#### 4.5.1.1. Eine veränderte Mobilität von MGDG könnte signifikant bestimmt werden

Ein ganz anderer Weg wäre statt LHCII die Mobilität von MGDG zu messen. Im Falle einer Assoziation mit LHCII-Trimeren würde der Radius eines diffundierenden MGDG-Moleküls gemäß der Kalkulation in 4.4. um den Faktor 7 zunehmen, was nach dem Saffman-Delbrück-Modell eine Verringerung des Diffusionskoeffizienten um ~86% bewirken würde. Dieser Effekt dürfte durch FRAP- oder FCS-Messungen in An- und Abwesenheit des LHCII sehr gut zu messen sein. Dazu müsste MGDG allerdings mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, was wiederum dessen molekulare Gestalt verändern würde<sup>83</sup>. Dadurch könnte eine Assoziation auf Basis der zu trimerem LHCII komplementären Lipidform gestört werden (siehe **Kapitel II Fig. 3c**).

#### 4.5.2. Andere Methoden zur Bestimmung von Lipid-Protein Interaktionen

Zu den etablierten Methoden für die Bestimmung von direkten Lipid-Protein-Interaktionen zählt u.a. die Röntgenkristallographie. Diese Technik liefert zwar eine hohe strukturelle Auflösung, jedoch ist dazu das Kristallisieren von Proteinen erforderlich, wodurch gebundene Lipide verloren gehen können und eventuelle Mikrodomänen der Membran zerstört werden<sup>84,85</sup>. Das könnte auch beim LHCII der Fall gewesen sein, für dessen Kristallstruktur kein assoziiertes MGDG-Molekül nachgewiesen werden konnte<sup>75,86</sup>.

Eine bei Liposomen praktikable fluoreszenzbasierte Methode ist Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), d.h. im Falle einer Assoziation von Protein und Lipid käme es zu einer Verschiebung des Fluoreszenzemissionsspektrums<sup>83,87</sup>. Der Vorteil hierbei wäre, dass nur MGDG mit einem (Akzeptor-) Farbstoff markiert werden müsste, die LHCII-Komplexe hingegen nicht. Das könnte aber auch gleichzeitig das größte Problem darstellen: die gebundenen Fluoreszenzmarker haben eine ähnliche Größenordnung wie die Lipide selbst, wodurch die Assoziation zum Protein beeinträchtigt werden kann<sup>83</sup> (siehe 4.5.1.1.).

Aus diesem Grund würde es sich anbieten auf Elektronenspinresonanzspektroskopie (EPR) zurückzugreifen – eine Technik, die bereits bei der Strukturaufklärung des LHCII verwendet wurde<sup>88–91</sup>. EPR-Signale beruhen auf der Spinkopplung zweier paramagnetischer Marker, die sowohl an das Protein als auch an das Lipid geknüpft werden müssen. Die sogenannten „Spin Label“ sind kleine organische Moleküle, welche die räumliche Gestalt von Protein und Lipid nicht merklich verändern. Deshalb, und weil bei EPR besonders sensitiv an der Schnittstelle zwischen Protein und Lipid gemessen werden kann, wird EPR sehr häufig für die Detektion von Lipid-Protein-Interaktionen verwendet<sup>83–85</sup>. Darüber hinaus kann mithilfe dieser Methodik sogar die Anzahl und Verweildauer von Lipiden eines Gürtels um das Protein herum abgeschätzt werden<sup>85</sup>. Bei EPR werden allerdings hohe Proteinkonzentrationen benötigt<sup>85</sup>, was im Falle von Proteoliposomen entweder zur Proteinkristallbildung in den Vesikeln (bei starker Erhöhung der LHCII-Dichte in Liposomen; Boggasch 2006) oder zur Aggregation von Vesikeln (bei konstanter Proteindichte sowie Erhöhung der Konzentration von Lipid und Protein) führen kann.

Die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) kommt ohne externe Marker aus und ist seit der Einführung von „Solid-State NMR“ auch bei Membranproteinen mit Größen >100 kDa, zu denen der LHCII in seiner trimeren Form zählt, zur Detektion von Lipid-Protein-Interaktionen geeignet<sup>84,85</sup>. Diese Technik liefert zwar hochaufgelöste Strukturen – sie ist allerdings im Vergleich zu EPR sehr teuer, denn zwecks paramagnetischer Kopplung müssen bei der Herstellung von Protein und Lipid jeweils bestimmte C-, H-, O-, N- oder P-Isotope verwendet werden. Weiterhin können aufgrund der tiefen Temperaturen keine Informationen zur Dynamik in den Membranen gewonnen werden<sup>84,85</sup>. Darüber hinaus kann das „Schockfrost“ der Probe zu Beschädigungen der Membranstrukturen führen.

AFM wird gängigerweise für die Detektion von Mikrodomänen, meist bedingt durch ein unterschiedliches Phasenverhalten der Lipide, in SLBs verwendet. Es können aber auch durch Lipid-Protein-Interaktionen verursachte Domänenbildungen topographisch nachgewiesen werden<sup>85</sup>, sofern zum einen die Höhenunterschiede zwischen den Lipidspezies groß genug sind und zum anderen die Ausdehnung der Domänen weit genug ist. In DGDG/MGDG-SLBs wären MGDG-dominierte Bereiche um ein LHCII-Trimer herum, welches 0,8 – 1,3 nm aus der Membran herausragt<sup>75</sup>, vermutlich ~0,5 nm tiefer als DGDG-haltige Membranbereiche (siehe **4.3.2**). Diese Diskrepanz dürfte bei einer maximalen Höhenauflösung der AFM von 0,1 nm noch detektierbar sein<sup>85</sup>. Limitierend könnte hingegen die laterale Auflösung von einigen Nanometern sein<sup>85</sup>, wenn sich beispielsweise pro trimerem LHCII nur ein MGDG-Gürtel bilden würde (was einem Domänendurchmesser von ~8,7 nm entspräche (siehe **4.4**)).

Letzterer Ansatz wäre durchaus lohnenswert, da AFM eines vergleichsweise geringen Aufwandes bedarf und die Bildung von glykolipidhaltigen SLBs mit inseriertem LHCII-Protein bereits in dieser Arbeit etabliert wurde. Weiterhin können Lipid-Protein-Interaktionen neuerdings auch mit Massenspektrometrie und zweidimensionaler Infrarotspektroskopie adressiert werden<sup>83,87</sup>.

## 5. Quellenangaben

1. Weiß, K. *et al.* Quantifying the diffusion of membrane proteins and peptides in black lipid membranes with 2-focus fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* **105**, 455–462 (2013).
2. Ramadurai, S. *et al.* Lateral diffusion of membrane proteins. *J Am Chem Soc* **131**, 12650–12656 (2009).
3. Saffman, P. G. & Delbrück, M. Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3111–3113 (1975).
4. Ramadurai, S., Duurkens, R., Krasnikov, V. V. & Poolman, B. Lateral diffusion of membrane proteins: consequences of hydrophobic mismatch and lipid composition. *Biophys J* **99**, 1482–1489 (2010).
5. Seu, K. J., Cambrea, L. R., Everly, R. M. & Hovis, J. S. Influence of lipid chemistry on membrane fluidity: tail and headgroup interactions. *Biophys J* **91**, 3727–3735 (2006).
6. Lindblom, G. & Orädd, G. Lipid lateral diffusion and membrane heterogeneity. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 234–244 (2009).
7. Filippov, A., Orädd, G. & Lindblom, G. Domain formation in model membranes studied by pulsed-field gradient-NMR: the role of lipid polyunsaturation. *Biophys J* **93**, 3182–3190 (2007).
8. Anderson, T. H. *et al.* Formation of supported bilayers on silica substrates. *Langmuir* **25**, 6997–7005 (2009).
9. Hardy, G. J., Nayak, R. & Zauscher, S. Model cell membranes: techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **18**, 448–458 (2013).
10. Goksu, E. I., Vanegas, J. M., Blanchette, C. D., Lin, W.-C. & Longo, M. L. AFM for structure and dynamics of biomembranes. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 254–266 (2009).
11. Richter, R. P., Berat, R. & Brisson, A. R. Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view. *Langmuir* **22**, 3497–3505 (2006).
12. Cremer, P. S. & Boxer, S. G. Formation and spreading of lipid bilayers on planar glass supports. *J Phys Chem B* **103**, 2554–2559 (1999).
13. Reimhult, E., Höök, F. & Kasemo, B. Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: influence of surface chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. *Langmuir* **19**, 1681–1691 (2003).
14. Reviakine, I. & Brisson, A. Formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy. *Langmuir* **16**, 1806–1815 (2000).
15. Kim, Y.-H. *et al.* Supported lipid bilayer formation by the giant vesicle fusion induced by vesicle–surface electrostatic attractive interaction. *Chem Phys Lett* **420**, 569–573 (2006).
16. Seantier, B. & Kasemo, B. Influence of mono- and divalent ions on the formation of supported phospholipid bilayers via vesicle adsorption. *Langmuir* **25**, 5767–5772 (2009).
17. Dewa, T. *et al.* Lateral organization of a membrane protein in a supported binary lipid domain: direct observation of the organization of bacterial light-harvesting complex 2 by total internal reflection fluorescence microscopy. *Langmuir* **22**, 5412–5418 (2006).
18. Sumino, A. *et al.* Construction and Structural Analysis of Tethered Lipid Bilayer Containing Photosynthetic Antenna Proteins for Functional Analysis. *Biomacromolecules* **12**, 2850–2858 (2011).

19. Leonenko, Z. V., Carnini, A. & Cramb, D. T. Supported planar bilayer formation by vesicle fusion: the interaction of phospholipid vesicles with surfaces and the effect of gramicidin on bilayerproperties using atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta* **1509**, 131–147 (2000).
20. Richter, R. P. & Brisson, A. R. Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophys J* **88**, 3422–3433 (2005).
21. Jass, J., Tjærnhage, T. & Puu, G. From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys J*, 3153–3163 (2000).
22. Benes, M. *et al.* Surface-dependent transitions during self-assembly of phospholipid membranes on mica, silica, and glass. *Langmuir* **20**, 10129–10137 (2004).
23. Castellana, E. T. & Cremer, P. S. Solid supported lipid bilayers: from biophysical studies to sensor design. *Surf Sci Rep* **61**, 429–444 (2006).
24. Wong, J. Y. *et al.* Polymer-cushioned bilayers. I. A structural study of various preparation methods using neutron reflectometry. *Biophys J* **77**, 1445–1457 (1999).
25. Walde, P., Cosentino, K., Engel, H. & Stano, P. Giant vesicles: preparations and applications. *ChemBiochem* **11**, 848–865 (2010).
26. Pincet, F. *et al.* FRAP to characterize molecular diffusion and interaction in various membrane environments. *PLoS ONE* **11**, 1–19 (2016).
27. Rayan, G., Guet, J.-E., Taulier, N., Pincet, F. & Urbach, W. Recent applications of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to membrane bio-macromolecules. *Sensors* **10**, 5927–5948 (2010).
28. Tareste, D., Shen, J., Melia, T. J. & Rothman, J. E. SNAREpin/Munc18 promotes adhesion and fusion of large vesicles to giant membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2380–2385 (2008).
29. Yurlova, L. *et al.* Self-segregation of myelin membrane lipids in model membranes. *Biophys J* **101**, 2713–2720 (2011).
30. Machán, R. & Hof, M. Lipid diffusion in planar membranes investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **1798**, 1377–1391 (2010).
31. Przybylo, M. *et al.* Lipid diffusion in giant unilamellar vesicles is more than 2 times faster than in supported phospholipid bilayers under identical conditions. *Langmuir* **22**, 9096–9099 (2006).
32. Jørgensen, I. L., Kemmer, G. C. & Pomorski, T. G. Membrane protein reconstitution into giant unilamellar vesicles: a review on current techniques. *Eur Biophys J* (2016).
33. Varnier, A. *et al.* A simple method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *J Membr Biol* **233**, 85–92 (2010).
34. Girard, P. *et al.* A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. *Biophys J* **87**, 419–429 (2004).
35. Leica Microsystems. Fluorescence correlation spectroscopy : the femtoliter test tube–system calibration and *in vitro* applications. *Confocal Application Letter* **36**, 1–12 (2010).
36. Haustein, E. & Schwille, P. Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**, 151–169 (2007).
37. Schwille, P. & Haustein, E. Fluorescence correlation spectroscopy. An introduction to its concepts and applications. *BTOL*, 1–33 (2014).
38. García-Sáez, A. J. & Schwille, P. Fluorescence correlation spectroscopy for the study of membrane dynamics and protein/lipid interactions. *Methods* **46**, 116–122 (2008).

39. Lorén, N. *et al.* Fluorescence recovery after photobleaching in material and life sciences: putting theory into practice. *Q Rev Biophys* **48**, 323–387 (2015).
40. Heath, G. R. *et al.* Layer-by-layer assembly of supported lipid bilayer poly-L-lysine multilayers. *Biomacromolecules* **17**, 324–335 (2016).
41. Roder, F. *et al.* Reconstitution of membrane Proteins into polymer-supported membranes for probing diffusion and interactions by single molecule techniques. *Anal Chem* **83**, 6792–6799 (2011).
42. Albertorio, F. *et al.* Fluid and air-stable lipopolymer membranes for biosensor applications. *Langmuir* **21**, 7476–7482 (2005).
43. Yang, C., Horn, R. & Paulsen, H. The light-Harvesting chlorophyll *a/b* complex can be reconstituted *in vitro* from its completely unfolded apoprotein. *Biochemistry* **42**, 4527–4533 (2003).
44. D. Axelrod, D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson & W.W. Webb. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* **16**, 1055–1069 (1976).
45. Kang, M., Day, C. A., Kenworthy, A. K. & DiBenedetto, E. Simplified equation to extract diffusion coefficients from confocal FRAP data. *Traffic* **13**, 1589–1600 (2012).
46. He, H.-T. & Marguet, D. Detecting nanodomains in living cell membrane by fluorescence correlation spectroscopy. *Annu Rev Phys Chem* **62**, 417–436 (2011).
47. Elson, E. L. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* **13**, 1–27 (1974).
48. Kappel, C. & Eils, R. Fluorescence recovery after photobleaching with Leica TCS SP2. *Confocal Application Letter* **18**, 1–12 (2004).
49. Crosby, K. C. *et al.* Quantitative analysis of self-association and mobility of annexin A4 at the plasma membrane. *Biophys J* **104**, 1875–1885 (2013).
50. Vetri, V. *et al.* Fluctuation methods to study protein aggregation in live cells: concanavalin A oligomers formation. *Biophys J* **100**, 774–783 (2011).
51. Wu, Y.-X., Masison, D. C., Eisenberg, E. & Greene, L. E. Application of photobleaching for measuring diffusion of prion proteins in cytosol of yeast cells. *Methods* **39**, 43–49 (2006).
52. Griepnerau, B. & Böckmann, R. A. The influence of 1-alkanols and external pressure on the lateral pressure profiles of lipid bilayers. *Biophys J* **95**, 5766–5778 (2008).
53. Terama, E. *et al.* Influence of ethanol on lipid membranes: from lateral pressure profiles to dynamics and partitioning. *J Phys Chem B* **112**, 4131–4139 (2008).
54. Rifichi, S. *et al.* Influence of Alcohols on the Lateral Diffusion in Phospholipid Membranes. *J Phys Chem B* **120**, 1285–1290 (2016).
55. Sprague, S. G. & Staehelin, A. Effects of reconstitution method on the structural organization of isolated chloroplast membrane lipids. *Biochim Biophys Acta* **777**, 306–322 (1984).
56. Berquand, A. *et al.* Two-step Formation of streptavidin-supported lipid bilayers by PEG-triggered vesicle Fusion. fluorescence and atomic force microscopy characterization. *Langmuir* **19**, 1700–1707 (2003).
57. Hoyo, J., Gaus, E. & Torrent-Burgués, J. Monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol role, physical states, applications and biomimetic monolayer films. *Eur Phys J E* **39** (2016).
58. Kobayashi, T., Kono, A., Futagawa, M., Sawada, K. & Tero, R. Formation and fluidity measurement of supported lipid bilayer on polyvinyl chloride membrane. *AIP Conf Proc* **1585**, 145–152 (2014).

59. Figueira, T. N. *et al.* Quantitative analysis of molecular partition towards lipid membranes using surface plasmon resonance. *Sci Rep* **7**, 1–10 (2017).
60. Kim, M. C., Gunnarsson, A., Tabaei, S. R., Höök, F. & Cho, N.-J. Supported lipid bilayer repair mediated by AH peptide. *Phys Chem Chem Phys* **18**, 3040–3047 (2016).
61. Tokumasu, F., Jin, A. J., Feigenson, G. W. & Dvorak, J. A. Atomic force microscopy of nanometric liposome adsorption and nanoscopic membrane domain formation. *Ultramicroscopy* **97**, 217–227 (2003).
62. Deme, B., Cataye, C., Block, M. A., Marechal, E. & Jouhet, J. Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *FASEB J* **28**, 3373–3383 (2014).
63. Shipley, G. G., Green, J. P. & Nichols, B. W. The phase behavior of monogalactosyl, digalactosyl, and sulphiquinoyl diglycerides. *Biochim Biophys Acta* **311**, 531–544 (1973).
64. Pan, J. *et al.* Molecular structures of fluid phase phosphatidylglycerol bilayers as determined by small angle neutron and X-ray scattering. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 2135–2148 (2012).
65. Kučerka, N., Holland, B. W., Gray, C. G., Tomberli, B. & Katsaras, J. Scattering density profile model of POPG bilayers as determined by molecular dynamics simulations and small-angle neutron and X-ray scattering experiments. *J Phys Chem B* **116**, 232–239 (2012).
66. Murzyn, K., Róg, T. & Pasenkiewicz-Gierula, M. Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane. *Biophys J* **88**, 1091–1103 (2005).
67. Bottier, C. *et al.* Galactosyl headgroup interactions control the molecular packing of wheat lipids in Langmuir films and in hydrated liquid-crystalline mesophases. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1526–1540 (2007).
68. Kapla, J., Stevansson, B., Dahlberg, M. & Maliniak, A. Molecular Dynamics Simulations of Membranes Composed of Glycolipids and Phospholipids. *J Phys Chem B* **116**, 244–252 (2012).
69. Ye, W., Liebau, J. & Mäler, L. New membrane mimetics with galactolipids: lipid properties in fast-tumbling bicelles. *J Phys Chem B* **117**, 1044–1050 (2013).
70. Burns, A. R., Frankel, D. J. & Buranda, T. Local mobility in lipid domains of supported bilayers characterized by atomic force microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* **89**, 1081–1093 (2005).
71. Hamai, C., Yang, T., Kataoka, S., Cremer, P. S. & Musser, S. M. Effect of average phospholipid curvature on supported bilayer formation on glass by vesicle fusion. *Biophys J* **90**, 1241–1248 (2006).
72. Sumino, A. *et al.* Selective assembly of photosynthetic antenna proteins into a domain-structured lipid bilayer for the construction of artificial photosynthetic antenna systems: structural analysis of the assembly using surface plasmon resonance and atomic force microscopy. *Langmuir* **27**, 1092–1099 (2011).
73. Gräß, O., Abacilar, M., Daus, F., Geyer, A. & Steinem, C. 3D-membrane stacks on supported membranes composed of diatom lipids induced by long-chain polyamines. *Langmuir* **32**, 10144–10152 (2016).
74. Guo, L. *et al.* Molecular diffusion measurement in lipid bilayers over wide concentration ranges: a comparative study. *Chemphyschem* **9**, 721–728 (2008).
75. Standfuss, J., van Scheltinga, A. C. T., Lamborghini, M. & Kühlbrandt, W. Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *EMBO J* **24**, 919–928 (2005).
76. Simidjiev, I. *et al.* Self-assembly of large, ordered lamellae from non-bilayer lipids and integral membrane proteins *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1473–1476 (2000).

77. Gambin, Y. *et al.* Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A* **7**, 2098–2102 (2006).
78. Kriegsmann, J. *et al.* Translational diffusion and interaction of a photoreceptor and its cognate transducer observed in giant unilamellar vesicles by using dual-focus FCS. *Chembiochem* **10**, 1823–1829 (2009).
79. J. D. Corbett, M. R. Cho & D. E. Golan. Deoxygenation affects fluorescence photobleaching recovery measurements of red cell membrane protein lateral mobility. *Biophys J* **66**, 25–30 (1994).
80. Mullineaux, C. W. & Kirchhoff, H. Using fluorescence recovery after photobleaching to measure lipid diffusion in membranes. *Methods Mol Biol* **400**, 267–275 (2008).
81. Yoshie Harada, Katsuhiko Sakurada, Toshiaki Aoki, David D. Thomas & Toshio Yanagida. Mechanochemical coupling in actomyosin energy transduction studied by *in vitro* movement assay. *J Mol Biol* **216**, 49–68 (1990).
82. Schmidt, T., Schütz, G. J., Baumgartner, W., Gruber, H. J. & Schindler, H. Characterization of photoophysics and mobility of single molecules in a fluid lipid membrane. *J Phys Chem* **99**, 17662–17668 (1995).
83. Smith, A. W. Lipid-protein interactions in biological membranes: a dynamic perspective. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 172–177 (2012).
84. Hsia, C.-Y., Richards, M. J. & Daniel, S. A review of traditional and emerging methods to characterize lipid-protein interactions in biological membranes. *Anal Methods* **7**, 7076–7094 (2015).
85. Contreras, F.-X., Ernst, A. M., Wieland, F. & Brügger, B. Specificity of intramembrane protein-lipid interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, 1–18 (2011).
86. Liu, Z. *et al.* Crystal structure of spinach major light harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **428**, 287–292 (2004).
87. Barrera, N. P., Zhou, M. & Robinson, C. V. The role of lipids in defining membrane protein interactions: insights from mass spectrometry. *Trends Cell Biol* **23**, 1–8 (2013).
88. Fehr, N. *et al.* Modelling of the N-terminal section and the luminal loop of trimeric light harvesting complex II. *J Biol Chem* **43**, 26007–26020 (2015).
89. Fehr, N., García-Rubio, I., Jeschke, G. & Paulsen, H. Early folding events during light harvesting complex II assembly *in vitro* monitored by pulsed electron paramagnetic resonance. *Biochim Biophys Acta* (2016).
90. Dockter, C. *et al.* Rigid core and flexible terminus: structure of solubilized light-harvesting chlorophyll *a/b* complex (LHCII) measured by EPR. *J Biol Chem* **287**, 2915–2925 (2012).
91. Dockter, C. *et al.* Refolding of the integral membrane protein light-harvesting complex II monitored by pulse EPR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18485–18490 (2009).

Nicht im Fließtext zitierte Quellen:

Rossi, C., Chopineau, J. Biomimetic tethered lipid membranes designed for membrane-protein interaction studies. *Eur Biophys J* **36**, 955–965 (2007).

Taylor, P., Xu, C., Fletcher, P. D. I., Paunov, V. N. A novel technique for preparation of monodisperse giant liposomes. *Chem Commun* **14**, 1732–1733 (2003).

Zitierte Abschlussarbeiten am Institut für Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz:

Boggasch, S. Immobilisierung von rekombinantem Haupt-Lichtsammlerkomplex LHCIIb in Liposomen, an Affinitätsmaterialien und Nanokristallen (2006).

# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Kapitel I: Allgemeine Einleitung

<b>Abb. 1</b> Struktur und Proteinverteilung bei der Thyalkoidmembran von Chloroplasten. _____	2
<b>Abb. 2</b> Physikochemische Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Thylakoidlipide. _____	4
<b>Abb. 3</b> Ausbildung lamellarer MGDG-Membranstrukturen durch den LHCII. _____	5
<b>Abb. 4</b> Veränderung des Lateraldruckprofils einer lamellarer Membran durch MGDG. _____	5
<b>Abb. 5</b> Kristallstruktur des LHCII und MGDG. _____	7
<b>Abb. 6</b> Mechanische Entfaltung des LHCII mittels Einzelmolekülkraftspektroskopie. _____	9
<b>Abb. 7</b> Mögliche Arten von Lipid-Protein-Interaktionen in biologischen Membranen. _____	10
<b>Abb. 8</b> Vereinfachte Darstellung eines FRAP-Experimentes mit LHCII-Proteinen in künstlichen Membranen. _____	12
<b>Abb. 9</b> Schematische Darstellung zu Untersuchungen des LHCII in SLBs unter dem Einfluss verschiedener Thylakoidlipide. _____	14

## Kapitel II: The non-bilayer lipid MGDG stabilizes the major light-harvesting complex (LHCII) against unfolding

<b>Figure 1</b> Mechanical unfolding of LHCII in membranes assembled from thylakoid lipids. _____	23
<b>Figure 2</b> Unfolding forces of LHCII depend on trimerization and the lipid matrix. _____	26
<b>Figure 3</b> Lateral pressure by MGDG stabilizes LHCII in a structure dependent manner. _____	31
<b>Supplementary Figure 1</b> Topography of trimeric LHCII reconstituted into DGDG membranes as obtained from AFM imaging. _____	39
<b>Supplementary Figure 2</b> Exemplary force-distance curves showing mechanical unfolding of LHCII polypeptides extracted from the trimeric LHCII in POPG. _____	39
<b>Supplementary Figure 3</b> Chl8 mediated stabilization of trimeric LHCII between Trp128 and His212 of adjacent monomers. _____	40

## Kapitel III: Grana-like membrane stacking in supported lipid bilayers is driven by non-bilayer lipid MGDG and major light-harvesting complex (LHCII): the role of membrane curvature and electrostatic protein interactions

<b>Figure 1</b> Fluorescence micrographs and FRAP curves of SLBs formed by spreading of LHCII containing SUVs at different thylakoid lipid compositions on APTES-coated coverglass. _____	47
<b>Figure 2</b> FRAP experiment on a multilayer patch (see "1" in Figure 1) formed by spreading of LHCII containing SUVs at POPG/DGDG = 1:1 on APTES-coated coverglass. _____	48

<b>Figure 3</b> Fluorescence micrographs (top), AFM topographs (middle) and height profiles (bottom) of SLBs formed by spreading of LHCII containing SUVs with Ca <sup>2+</sup> at different thylakoid lipid compositions on mica. _____	50
<b>Figure 4</b> Fluorescence micrographs (a-c) and AFM topograph (d) of SLBs formed by spreading of SUVs containing TopFluor-GC with Ca <sup>2+</sup> at different thylakoid lipid compositions on mica. _____	51
<b>Figure 5</b> Fluorescence micrographs of SLBs formed by spreading of LHCII containing SUVs at DGDG/MGDG = 2:1 on mica depending on Ca <sup>2+</sup> . _____	52
<b>Figure 6</b> Fluorescence micrographs of SLBs formed by spreading of LHCII containing DGDG-SUVs with Ca <sup>2+</sup> on mica affected by NaCl. _____	53
<b>Figure 7</b> LHCII and MGDG make the major contribution towards grana-like membrane stacking in supported lipid bilayers. _____	55
<b>Supplementary Figure 1</b> FRAP experiment on a membrane stack formed by spreading of LHCII containing SUVs at DGDG/MGDG = 2:1 with Ca <sup>2+</sup> on mica. _____	62

*Kapitel IV: Diffusionsmessungen des LHCII und Bestimmung der Membranfluidität in Abhängigkeit der Thylakoidlipide*

**Abbildungen**

<b>Abb. 1</b> Veränderung der lateralen Mobilität von LHCII bei einer Assoziation mit MGDG. _____	64
<b>Abb. 2</b> Zusammenhang zwischen Größe und Mobilität von Membranproteinen. _____	65
<b>Abb. 3</b> Mechanismus der Bildung von SLBs aus Lipidvesikeln. _____	66
<b>Abb. 4</b> Strategien zur Spreitung von Lipidvesikeln durch elektrostatische Interaktionen. _____	67
<b>Abb. 5</b> Verschiedene Wege zur Herstellung von tBLMs. _____	68
<b>Abb. 6</b> Prinzip der Elektroformation von GUVs. _____	69
<b>Abb. 7</b> Möglichkeiten zur Herstellung von Proteo-GUVs. _____	70
<b>Abb. 8</b> Funktionsweise von FCS. _____	71
<b>Abb. 9</b> Aufnahme einer fertig zusammengebauten Elektroformationskammer zur Herstellung von GUVs. _____	75
<b>Abb. 10</b> Schematische Darstellung zur Auswertung der FRAP-Experimente bzgl. der Auswahl der Referenzfläche, mit der die Fluoreszenzintensität der ROI normiert wurde. _____	79
<b>Abb. 11</b> "Half-time Recovery" und mobile Fraktion von LHCII in Abhängigkeit des POPG/DGDG-Verhältnisses in SLBs auf APTES-beschichteten Glasoberflächen. _____	83
<b>Abb. 12</b> FRAP-Messungen von LHCII in Abhängigkeit des DGDG/MGDG-Verhältnisses bei konstantem POPG-Anteil in SLBs auf APTES-beschichteten Glasoberflächen. _____	84
<b>Abb. 13</b> FRAP-Messungen von LHCII in Abhängigkeit der PEtOH-Konzentration in POPG-SLBs auf APTES-beschichteten Glasoberflächen. _____	86
<b>Abb. 14</b> Dünnschichtchromatographie zur Verifizierung der Anteile von DGDG und MGDG in Glykolipid-Proteoliposomen. _____	87

<b>Abb. 15</b> Fluoreszenzaufnahmen von SLBs nach Spreitung von Proteoliposomen in Abhängigkeit von POPG, DGDG und MGDG auf Mica. _____	89
<b>Abb. 16</b> Relative Häufigkeiten der "Half-time Recoveries" $t_{1/2}$ aus FRAP-Messungen von LHCII in SLBs auf Mica in Abhängigkeit von POPG, DGDG und MGDG. _____	90
<b>Abb. 17</b> Fluoreszenzaufnahmen von SLBs nach Spreitung von TopFluor-GC-Liposomen in Abhängigkeit von POPG, DGDG und MGDG auf Mica. _____	91
<b>Abb. 18</b> Relative Häufigkeiten der "Half-time Recoveries" $t_{1/2}$ aus FRAP-Messungen von TopFluor-GC in SLBs auf Mica in Abhängigkeit von POPG, DGDG und MGDG. _____	93
<b>Abb. 19</b> Fluoreszenzaufnahme nach versuchter Herstellung von tBLMs mit PEG-PE-haltigen (Anteil: 10%) Proteoliposomen (DGDG/MGDG = 2:1) auf Mica. _____	95
<b>Abb. 20</b> Fluoreszenzaufnahme nach Ausbildung von tBLMs mit TopFluor-GC-haltigen DGDG-Liposomen. _____	96
<b>Abb. 21</b> Dünnschichtchromatographie zur Überprüfung der Herstellung von glykolipidhaltigen GUVs. _____	97
<b>Abb. 22</b> Fluoreszenzaufnahmen von glykolipidhaltigen GUVs auf Glasoberflächen. _____	98
<b>Abb. 23</b> Fluoreszenzaufnahmen von glykolipidhaltigen Proteo-GUVs auf Glasoberflächen nach Fusion von Proteoliposomen mit vorgeformten GUVs. _____	99
<b>Abb. 24</b> Fluoreszenzaufnahmen von glykolipidhaltigen Proteo-GUVs auf Glasoberflächen nach Elektroformation aus partiell eingetrockneten Proteoliposomen. _____	100
<b>Abb. 25</b> Veranschaulichung der Strategie zu FCS-Messungen des LHCII in SLBs nach kalziumabhängiger Spreitung auf Mica. _____	101
<b>Abb. 26</b> FCS-Messungen von TopFluor-GC in SLBs auf Mica in Abhängigkeit des DGDG/MGDG-Verhältnisses. _____	102
<b>Abb. 27</b> Veranschaulichung eines FRAP-Experiments bei unvollständiger Oberflächenbenetzung des SLBs. _____	105
<b>Abb. 28</b> Beeinflussung der Diffusion von LHCII durch Membranstapelung. _____	108
<b>Abb. 29</b> Darstellung zur Zunahme des hydrodynamischen Radius von trimerem LHCII durch direkte Assoziation mit MGDG. _____	113

## Tabellen

<b>Tab. 1</b> Densitometrische Auswertung der Dünnschichtchromatographie zur Verifizierung der Anteile von DGDG und MGDG in Glykolipid-Proteoliposomen. _____	88
<b>Tab. 2</b> Auswertung der FRAP-Messungen von LHCII in SLBs auf Mica in Abhängigkeit von POPG, DGDG und MGDG. _____	89
<b>Tab. 3</b> Auswertung der FRAP-Messungen von TopFluor-GC in SLBs auf Mica in Abhängigkeit von POPG, DGDG und MGDG. _____	92
<b>Tab. 4</b> Densitometrische Auswertung der Dünnschichtchromatographie zur Verifizierung der Anteile von DGDG und MGDG in GUVs. _____	98

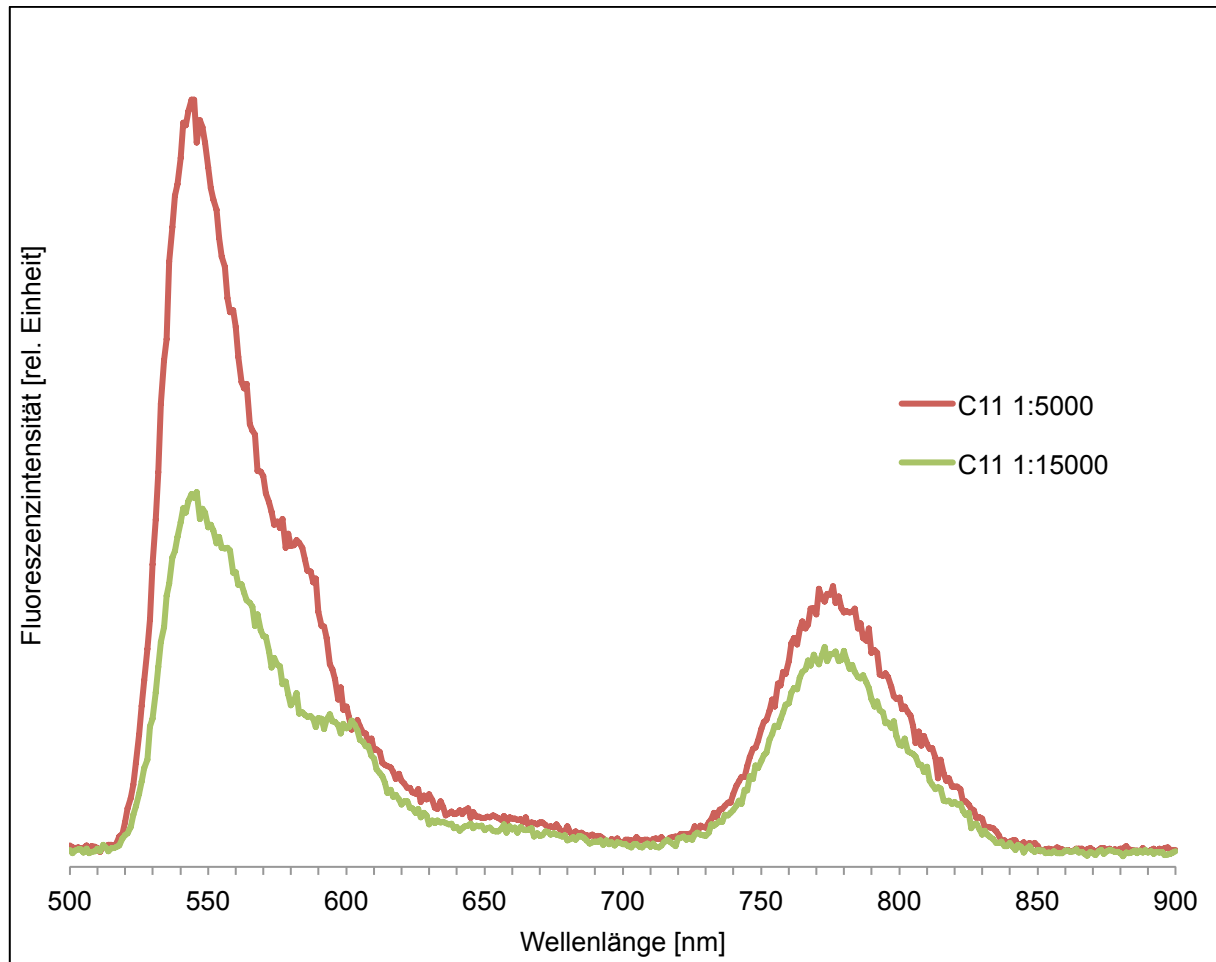
## Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomic force microscopy (atomare Kraftmikroskopie)
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
Bodipy	BODIPY FL C <sub>16</sub>
Chl	Chlorophyll
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
CURT	CURVATURE THYLAKOID1
<i>Cytb<sub>6f</sub></i>	Cytochrom- <i>b<sub>6f</sub></i> -Komplex
DAPEG	Diamino-polyethylenglycol
DGDG	Digalaktosyldiacylglycerol
DIR	1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindotricarboyanin Iodid
EPR	Elektronenspinresonanzspektroskopie
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GOPTS	(3-Glycidylxypropyl)trimethoxysilan
GUVs	Giant unilamellar vesicles
H	Helix
ITO	Indium-Zinnoxid
LHCII	Major light-harvesting complex (Hauptlichtsammelkomplex)
Lhcs	Light-harvesting complexes
LPV	(Molares) Lipid-Protein-Verhältnis
MGDG	Monogalaktosyldiacylglycerol
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
PA	Palmitylsäure

PE	Phosphatidylethanolamin
PEtOH	Phenylethanol
PEG	Polyethylenglykol
PG	Phosphatidylglycerol
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
PQ	Plastochinon
PSI	Photosystem I (Fotosystem I)
PSII	Photosystem II (Fotosystem II)
ROI	Region of interest
SLBs	Supported lipid bilayers
SMFS	Single-molecule force spectroscopy (Einzelmolekülkraftspektroskopie)
SPT	Single-particle tracking
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerol
SUVs	Small unilamellar vesicles
tBLMs	Tethered bilayer lipid membranes
TM	Thylakoidmembran
TopFluor-GC	C11TopFluor galactosyl ceramide
WLC	Worm-like chain

## Anhang

### Fluoreszenzemissionsspektrum von TopFluor-GC und DiR in Liposomen



Die DGDG/MGDG = 2:1 Liposomen wurden nach **Kapitel IV 2.2.** hergestellt. „C11“ gibt die Verdünnung des Farbstoffs TopFluor-GC im molaren Verhältnis zur Lipidkonzentration der Vesikel an; die Verdünnung von DiR betrug 1:100. Die Anregung erfolgte bei 488 nm.

## Sequenzen der rekombinanten LHCII-Varianten aus Kapitel II

LHCII-Variante mit N-terminalem Cystein-tag (Klon Nt3xC):

```

ATGTGCTGTTGTCGTAATCTGCTACCACCAAGAAAGTAGCGAGCTCTGGAAGCCCATGGTACGGACCAGACCGTGTAAAGTACTTAGGCCCATTCCTCCGG
M C C G R K S A T T K K V A S S G S P W Y G P D R V K Y L G P F S G
TACACGACAA CAGCATTTAGACGATGGTGGTCTTTTCATCGCTCGAGACCTTCGGGTACCATGCCTGGTCTGGCACAATTCATGAATCCGGGTAAGAGGC
10 20 30 40 50 60 70 80 90

GTGAGTCTCCATCCTACTTGTACTGGAGAGTTCCCGGTGACTACGGTTGGGACACTGCCGGACTCTCTGCTGACCCAGAGACATTTCTCAAGAACCCTGA
E S P S Y L T G E F P G D Y G W D T A G L S A D P E T F S K N R E
CACTCAGAGGTAGGATGAACTGACCTCTCAAGGGGCCACTGATGCCAACCTGTGACGGCCTGAGAGACGACTGGGTCTCTGTAAGAGGTTCTTGGCACT
110 120 130 140 150 160 170 180 190

GCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCTATGTTGGGTGCTTTGGGATCTGCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTCGGCGAAGCTGTG
L E V I H S R W A M L G A L G S V F P E L L S R N G V K F G E A V
CGAACTTCAGTAGGTGAGGTCTACCCGATACAACCCACGAAACCTAGACAGAAGGGTCTCGAAAAACAGAGCGTTGCCACAATTTAAGCCGCTTCGCACAC
210 220 230 240 250 260 270 280 290

TGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTACTTTGGGCAACCAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCA
W F K A G S Q I F S E G G L D Y L G N P S L V H A Q S I L A I W A T
ACCAAGTTCGCTCCTAGAGTTTAGAAATCACTCCCACCTGAACTAATGAACCCGTTGGGTTCGAACCCAGGTACGAGTTTCGTAGGAACGGTATACCCGGT
310 320 330 340 350 360 370 380 390

CTCAGGTTATCTTGATGGGAGCTGTCGAAGGTTACCGTATTGCCGGTGGGCTCTCGGTGAGGTGGTTGATCCACTTTACCAGGTGGAAGCTTTGATCC
Q V I L M G A V E G Y R I A G G P L G E V V D P L Y P G G S F D P
GAGTCCAATAGAACTACCCTCGACAGCTTCCAATGGCATAACGGCCACCCGGAGGCCACTCCACCAACTAGGTGAAATGGGTCCACCTTCGAAACTAGG
410 420 430 440 450 460 470 480 490

ATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCATTCCGAGAATTGAAGTGAAGGAACCTCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTTGGATTCTTCGTT
L G L A D D P E A F A E L K V K E L K N G R L A M F S M F G F F V
TAACCCGAATCGACTACTAGGTCTTCGTAAGCGTCTTAACCTCCACTTCCTTGAGTTCTTGCCATCTAATCGGTACAAGAGTTACAAACCTAAGAAGCAA
510 520 530 540 550 560 570 580 590

CAAGCTATTGTAAC TGAAAGGGTCTTTGGAGAACCCTGCTGATCATCTTCGACACCAGTCAACAACAATGCATGGTTCATATGCCACCAACTTTGTTC
Q A I V T G K G P L E N L A D H L A D P V N N N A W S Y A T N F V P
GTTTCGATAACATTGACCTTTCCAGGAAACCTCTTGGAACGACTAGTAGAACGCTCGGGTCAAGTTGTTGTTACGTACCAGTATACGGTGGTGAACAACAG
610 620 630 640 650 660 670 680 690

CCGGAACACACCATCACCATCACCAT
G K H H H H H H
GGCCTTTCTGGTAGTGGTAGTGGTA
710 720

```

Cys-Cys-Cys-Bindemotiv

His<sub>6</sub>-tag

LHCII-Variante mit N-terminalem Cystein-tag und Mutation im N-terminalen Trimerisierungsmotiv  
(Klon Nt3xCWY16,17AV):

ATGTCGCTGTTGTCGTAATCTGCTACCAAGAAAGTAGCGAGCTCTGGAAGCCAGCGGTCGGACCAGACCGTGAAGTACTTAGGCCATTCCTCCGCG  
M C C C R K S A T T K K V A S S G S P A V G P D R V K Y L G P F S G  
TACACGACAAACAGCATTTAGACGATGGTGGTTCTTTCATCGCTCGAGACCTTCGGGTACCAATGCCTGGTCTGGCACAATTCATGAATCCGGGTAAGAGGC  
10 20 30 40 50 60 70 80 90

GTTGAGTCTCCATCCTACTTGTAGCTGGAGAGTTCCCCGGTGACTACGGTTGGGACACTGCCGGACTCTCTGCTGACCCAGAGACATTCCTCAAGAACCCTGA  
E S P S Y L T G E F P G D Y G W D T A G L S A D P E T F S K N R E  
CACTCAGAGGTAGGATGAACCTGACCTCTCAAGGGGCCACTGATGCCAACCTGTGACGGCCTGAGAGACGACTGGGTCTCTGTAAGAGGTTCTTGGCACT  
110 120 130 140 150 160 170 180 190

GCTTGAAGTCATCCACTCCAGATGGGCTATGTTGGGTGCTTTGGGATCTGTCTTCCCAGAGCTTTTGTCTCGCAACGGTGTAAATTCGGCGAAGCTGTG  
L E V I H S R W A M L G A L G S V F P E L L S R N G V K F G E A V  
CGAATTCAGTAGGTGAGGTTACCCGATACACCCACGAAACCTAGACAGAGGGTCTCGAAAACAGAGCGTTGCCACAATTTAAGCCGCTTCGACAC  
210 220 230 240 250 260 270 280 290

TGGTTCAAGGCAGGATCTCAAATCTTTAGTGAGGGTGGACTTGATTACTTTGGGCAACCCAAAGCTTGGTCCATGCTCAAAGCATCCTTGCCATATGGGCCA  
W F K A G S Q I F S E G G L D Y L G N P S L V H A Q S I L A I W A T  
ACCAAGTTCGCTTAGAGTTAGAAATCACTCCACCTGAACCTAATGAACCCGTTGGGTTGCAACCCAGGTACGAGTTTCGTAACCGGTATACCCGGT  
310 320 330 340 350 360 370 380 390

CTCAGGTTATCTTGTAGGGAGCTGTGCAAGGTTACCGTATTGCCGGTGGGCTCTCGGTGAGGTGGTTGATCCACTTTACCAGGTGGAAGCTTTGATCC  
Q V I L M G A V E G Y R I A G G P L G E V V D P L Y P G G S F D P  
GAGTCCAATAGAACTACCTCGACAGCTTCCAATGGCATAACGGCCACCCGGAGGCCACTCCACCACTAGGTGAAATGGGTCCACCTTCGAAACTAGG  
410 420 430 440 450 460 470 480 490

ATTGGGCTTAGCTGATGATCCAGAAGCATTGCGAGAATTGAAGGTGAAGGAACCAAGAACGGTAGATTAGCCATGTTCTCAATGTTTGGATTCTTCGTT  
L G L A D D P E A F A E L K V K E L K N G R L A M F S M F G F F V  
TAACCCGAATCGACTACTAGGTTCTCGTAAGCGTCTTAACCTCCACTTCCCTTGTAGTTCTTGCATCTAATCGGTACAAGATTACAAACCTAAGAAGCAA  
510 520 530 540 550 560 570 580 590

CAAGCTATTGTAACCTGAAAGGGTCTTTGGAGAACCTTGCTGATCATCTTGCAGACCCAGTCAACAACAATGCATGGTCATATGCCACCAACTTTGTTC  
Q A I V T G K G P L E N L A D H L A D P V N N N A W S Y A T N F V P  
GTTGATAACATTGACCTTCCCAGGAAACCTCTTGAACGACTAGTAGAACGCTGGGTGAGTTGTTGTTACGTACCAGTATACGGTGGTTGAAACAAG  
610 620 630 640 650 660 670 680 690

CCGGAAACACCATCACCATCACCAT  
G K H H H H H H  
GGCCTTTGTGGTAGTGGTGGTA  
710 720

Cys-Cys-Cys-Bindemotiv

Ausgetauschte Aminosäuren im Trimerisierungsmotiv

His<sub>6</sub>

