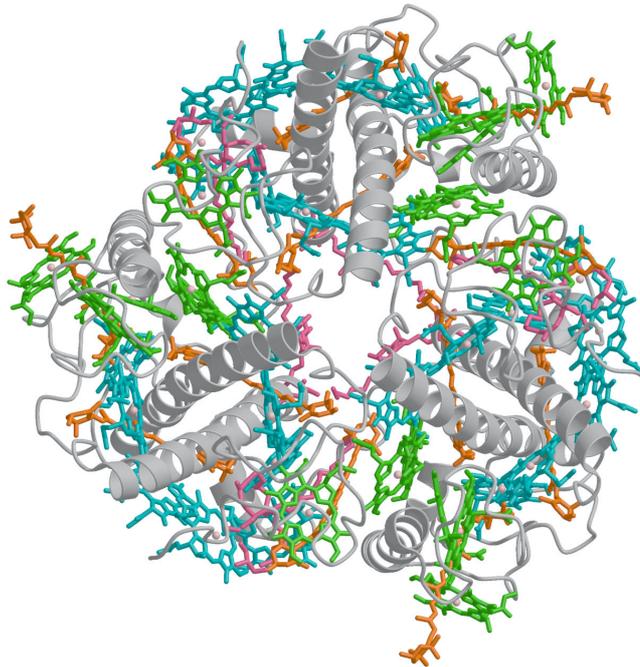


# Struktur und Funktion des LHC-II

## Röntgenkristallographische Strukturaufklärung und funktionelle Charakterisierung der drei Isoformen



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich der pharmazeutischen und chemischen  
Wissenschaften

an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main

von

Jörg Standfuß aus Neuwied

Frankfurt am Main 2004

vom Fachbereich Biochemie der Johann Wolfgang Goethe  
Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:

Datum der Disputation:

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Photosynthese .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Lichtsammlersysteme der pflanzlichen Photosynthese .....	3
1.1.2	Funktionen des LHC-II .....	6
1.1.3	Funktioneller Hintergrund der LHC-II Heterogenität .....	7
1.1.4	Elektronenkristallographisches Modell des LHC-II .....	9
<b>1.2</b>	<b>Membranproteine in der Strukturbiologie .....</b>	<b>13</b>
1.2.1	Protein Aufreinigung .....	14
1.2.2	Kristallisation .....	15
1.2.3	Datensammlung .....	18
1.2.4	Phasenbestimmung .....	19
1.2.5	Modellbau und Verfeinerung .....	21
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Molekularbiologische und biochemische Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1.1	Klonierung der LHC-II Isoformen .....	22
2.1.2	Expression und Aufreinigung von LHC-II Einschlusskörpern .....	23
2.1.3	Isolierung von photosynthetischen Pigmenten .....	24
2.1.4	Isolierung von Thylakoidmembranen .....	26
2.1.5	Aufreinigung von Thylakoidlipiden .....	27
2.1.6	Reinigung von nativem LHC-II .....	28
2.1.7	Trennung von nativem LHC-II mittels chromatographischer Fokussierung .....	29
2.1.8	Faltung von LHC-II Monomeren durch Detergenzpräzipitation .....	29
2.1.9	Trimerisierung von LHC-II Monomeren auf einer Ni-Säule .....	30
2.1.10	Nativgelelektrophorese .....	32
2.1.11	Denaturierende Gelelektrophorese .....	32
2.1.12	Lipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie (TLC) .....	32
2.1.13	Pigmentanalyse mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	33
<b>2.2</b>	<b>Spektroskopische Methoden .....</b>	<b>33</b>
2.2.1	Photometrische Pigmentanalyse .....	33
2.2.2	Konzentrationsbestimmung von Galactolipiden .....	34
2.2.3	Absorptionsspektroskopie .....	34
2.2.4	Cirkulardichroismus (CD) Spektroskopie .....	35

2.2.5	Fluoreszenz-Emissions Spektroskopie .....	35
<b>2.3</b>	<b>Kristallographische Methoden .....</b>	<b>36</b>
2.3.1	Proteinkristallisation .....	36
2.3.2	Einfrieren von Proteinkristallen .....	36
2.3.3	Testen von Kristallen und Datensammlung .....	37
2.3.4	Datenprozessierung .....	38
2.3.5	Molekularer Ersatz.....	39
2.3.6	Verfeinerung und Modellbau.....	40
2.3.7	Erstellen von Abbildungen .....	41
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Klonierung und Expression der LHC-II Isoformen .....</b>	<b>42</b>
<b>3.2</b>	<b>Faltung reiner LHC-II Isoformen.....</b>	<b>43</b>
3.2.1	Rückfaltung von LHC-II im analytischen Ansatz.....	44
3.2.2	Rückfaltung von LHC-II im präparativen Ansatz.....	45
<b>3.3</b>	<b>Charakterisierung der LHC-II Isoformen.....</b>	<b>48</b>
3.3.1	Faltung der monomeren LHC-II Isoformen .....	48
3.3.2	Homo- und Heterotrimere der drei LHC-II Isoformen .....	49
3.3.3	Pigmentstoichiometrie der drei LHC-II Isoformen.....	52
3.3.4	Spektroskopische Eigenschaften der LHC-II Isoformen.....	53
<b>3.4</b>	<b>Reinigung von nativem LHC-II aus Erbsenblättern.....</b>	<b>57</b>
3.4.1	Chromatographische Fokussierung des nativen LHC-II.....	58
<b>3.5</b>	<b>Kristallisation von LHC-II .....</b>	<b>60</b>
3.5.1	Verwendung von reinen LHC-II Isoformen.....	60
3.5.2	Neue Bedingungen zur Kristallisation von LHC-II.....	65
<b>3.6</b>	<b>Datensammlung und Reduktion.....</b>	<b>70</b>
3.6.1	Qualität der für die Strukturaufklärung verwendeten Datensätze .....	72
<b>3.7</b>	<b>Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz.....</b>	<b>75</b>
3.7.1	Kristallpackung verschiedener LHC-II Kristalltypen.....	76
3.7.2	Kristallkontakte in den verschiedenen 3D Kristallen.....	78
<b>3.8</b>	<b>Verfeinerung und Modellbau .....</b>	<b>79</b>
<b>3.9</b>	<b>Struktur des Erbsen LHC-II bei 2.5 Å Auflösung .....</b>	<b>83</b>
3.9.1	Übersicht des LHC-II Pigment/Protein Komplexes .....	83
3.9.2	Oberflächen des LHC-II Komplexes .....	87
3.9.3	Orientierung und Art der Chlorophylle.....	89

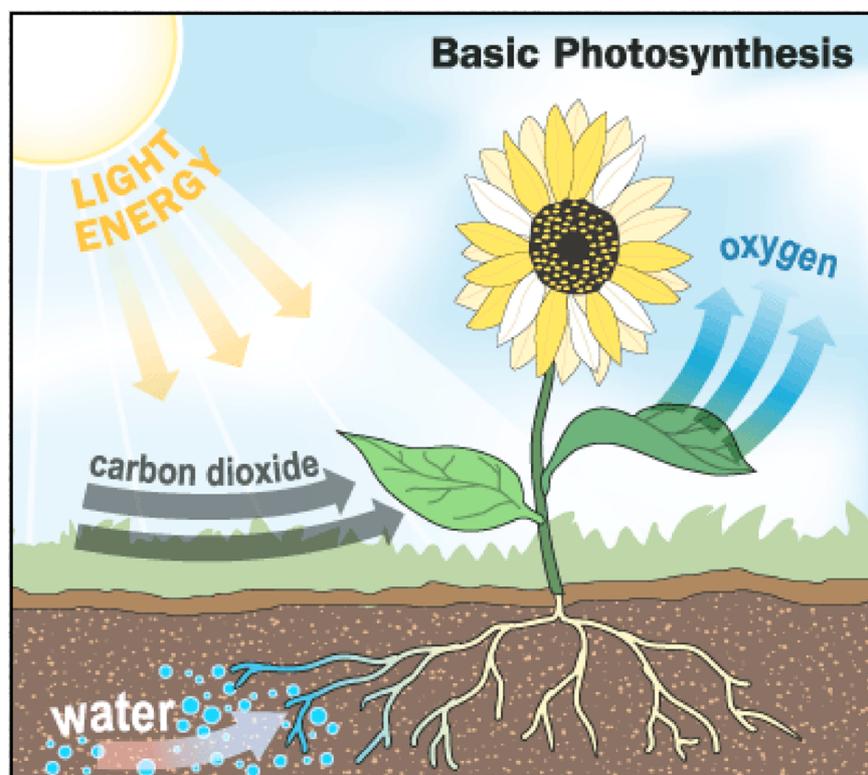
3.9.4	Carotinoide in der LHC-II Struktur .....	91
3.9.5	Lipide in der LHC-II Struktur .....	94
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>97</b>
<b>4.1</b>	<b>LHC-II Isoformen.....</b>	<b>97</b>
4.1.1	Darstellung von reinen, funktionell intakten LHC-II Isoformen .....	97
4.1.2	Pigment Organisation der LHC-II Isoformen .....	100
4.1.3	Homo- und Heterotrimere der LHC-II Isoformen.....	101
4.1.4	Mögliche Funktionen der LHC-II Isoformen .....	103
<b>4.2</b>	<b>Kristallisation und Strukturbestimmung von LHC-II.....</b>	<b>105</b>
4.2.1	Kristallformen von LHC-II .....	105
4.2.2	Verbesserung der hexagonalen LHC-II Kristalle.....	106
4.2.3	Kristallisierte LHC-II Isoform .....	110
4.2.4	Strukturbestimmung des nativen LHC-II .....	111
<b>4.3</b>	<b>Struktur und Funktion des LHC-II .....</b>	<b>113</b>
4.3.1	Bedeutung des Lipids PG .....	113
4.3.2	Bedeutung von LHC-II für die Bildung von Granastapeln .....	114
4.3.3	Bedeutung der Struktur für den Energietransfer innerhalb des LHC-II.....	117
4.3.4	Schützende und regulative Funktionen der Carotinoide.....	122
<b>5</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>131</b>
<b>5.1</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>131</b>
5.1.1	Zusammenfassung in deutscher Sprache.....	131
5.1.2	Abstract in English.....	134
<b>5.2</b>	<b>Sequenzvergleich von Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 .....</b>	<b>137</b>
5.2.1	LHC-II gebundene Co-Faktoren .....	138
<b>5.3</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>141</b>
<b>5.4</b>	<b>Wissenschaftlicher Werdegang .....</b>	<b>143</b>
<b>5.5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>145</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Photosynthese

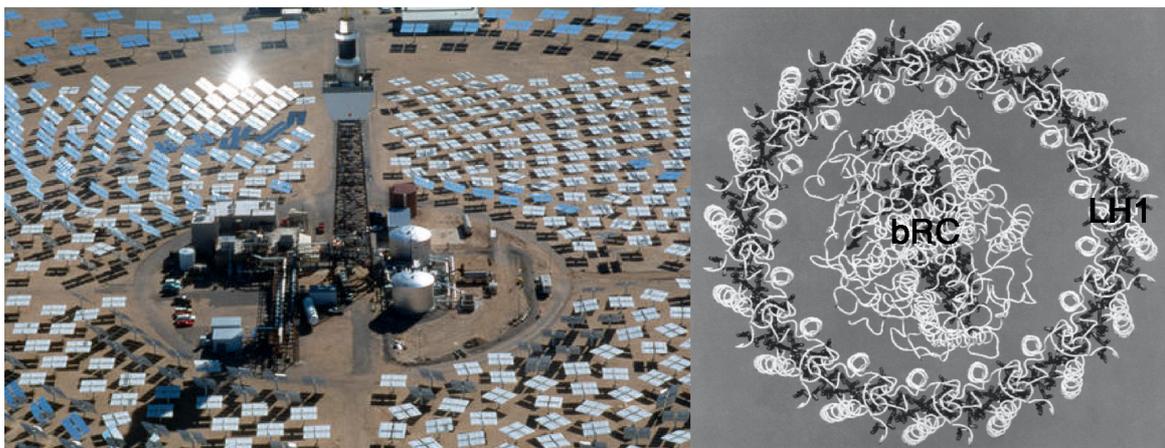
Was ist Leben? So einfach diese Frage im ersten Moment erscheint, desto schwieriger wird es im zweiten, detailliert zu erläutern was Leben wirklich ausmacht und wie es eindeutig von unbelebter Materie zu unterscheiden ist. Eine eingehende, multidisziplinäre Beantwortung dieser Frage wurde bis heute nicht erreicht. Einigkeit herrscht jedoch darüber, dass jede Definition von Leben dessen Eigenschaft der Energieumwandlung enthalten sollte. Die große Bedeutung der Photosynthese in diesem Kontext liegt in der Umwandlung von Lichtenergie in eine für das Leben nutzbare Form von chemischer Energie. Diese dient sowohl den photosynthetisch aktiven Organismen selbst, wie auch allen sekundären Konsumenten und damit letztlich auch dem Menschen zum Aufbau von Biomasse und zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels.



**Abbildung 1:** Vereinfachte Darstellung der Prinzipien und des Stoffumsatzes bei der oxygenen Photosynthese.

Im Fall der oxygenen Photosynthese (Abbildung 1) wird die Lichtenergie zur Spaltung von Wassermolekülen verwendet. Der dabei entstehende Sauerstoff wird in die Atmosphäre entlassen und die freiwerdende elektrochemische Energie wird in Form von Reduktionäquivalenten über die sogenannte Dunkelreaktion zum Aufbau von Zucker aus Kohlendioxid und Wasserstoff verwendet. Der Prozess der Photosynthese dient demnach als Energiequelle und Rohstoffproduzent, ist treibende Kraft des Kohlenstoff/Sauerstoff Zyklus und damit wichtigste Grundlage für alles höhere Leben auf der Erde.

Die meisten photosynthetischen Organismen sind grün gefärbt, was auf die wichtigsten photosynthetischen Pigmente, die Chlorophylle zurückzuführen ist. Diese bilden die Grundlage für die Absorption, Weiterleitung und Umsetzung der Lichtenergie in elektrochemische Energie. Um diese Funktionen erfüllen zu können sind die photosynthetischen Pigmente hochspezifisch innerhalb von Pigment/Protein Komplexen gebunden. Diese Komplexe sind größtenteils in Lipidmembranen eingebettet und bilden zusammen mit einigen anderen Proteinen die für die Photosynthese nötige Maschinerie. Den Kern dieser Maschinerie bilden die Photoreaktionszentren, welche die Umwandlung von absorbierte Lichtenergie in elektrochemische Energie durchführen. Assoziiert mit den Photoreaktionszentren sind Lichtsammlersysteme, welche Analog zu den Spiegeln in einer photothermischen Anlage (Abbildung 2) Lichtenergie aufnehmen und an die Reaktionszentren weiterleiten.

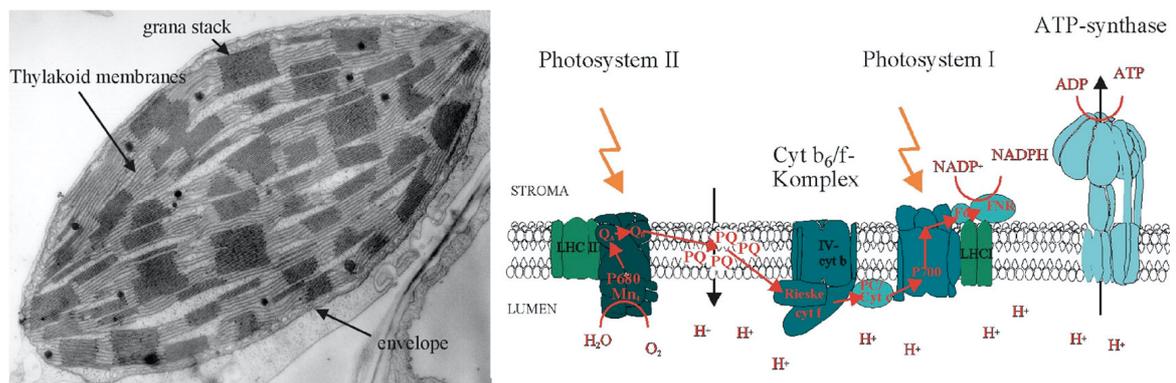


**Abbildung 2:** Analogie einer solarthermischen Anlage mit dem Reaktionszentrum der Purpurbakterien (bRC) und seinem ringförmigen Lichtsammlersystem (LH1).

Die Reaktionszentren enthalten zwar eigene Pigmente für die Absorption des Lichts, ohne die zusätzlichen absorbierenden Pigmente der Lichtsammlersysteme würde aber nur wenig Lichtenergie in den Reaktionszentren zu Verfügung stehen und die Effizienz der Photosynthese wäre deutlich geringer. Darüber hinaus sind Lichtsammlersysteme an der Regulation der Photosynthese beteiligt und erlauben eine flexible Anpassung an die jeweils vorherrschenden Umweltbedingungen.

### 1.1.1 Lichtsammlersysteme der pflanzlichen Photosynthese

Ein Großteil der photosynthetisch aktiven Biomasse auf der Erde wird von Pflanzen bereitgestellt. Bei diesen ist der Photosyntheseapparat in der Thylakoidmembran der Chloroplasten lokalisiert (Abbildung 3)



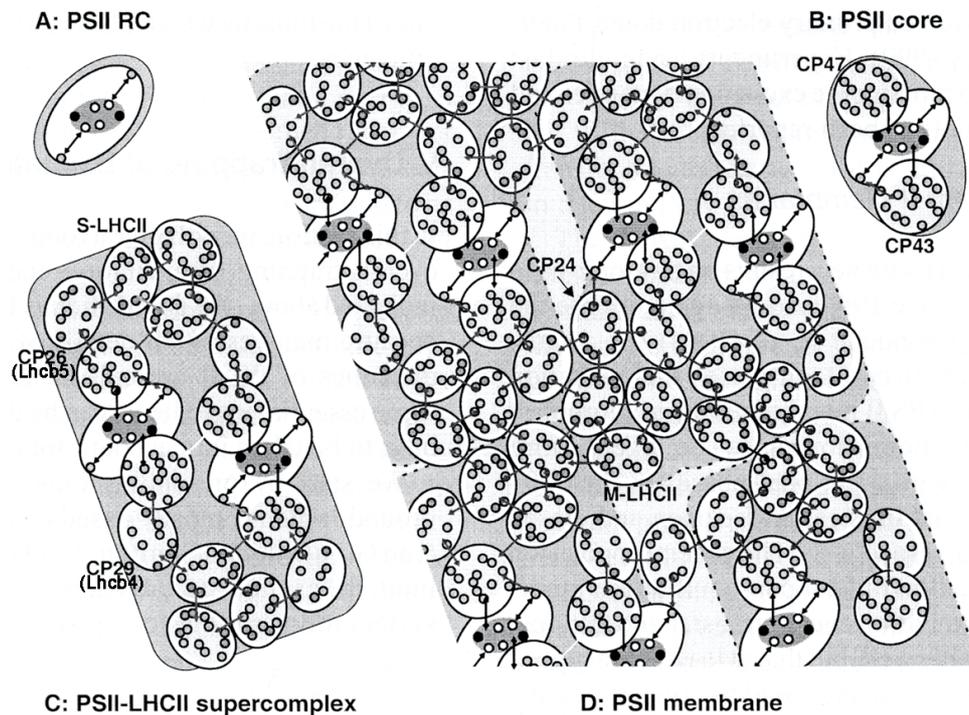
**Abbildung 3:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Chloroplasten und schematische Darstellung des Photosyntheseapparates in der Thylakoidmembran (mit freundlicher Genehmigung von Prof. C. Büchel).

und besteht im wesentlichen aus vier Proteinkomplexen; Photoreaktionszentrum I (PS-I), Photoreaktionszentrum II (PS-II), Cytochrom  $b_6/f$ -Komplex und ATP-Synthase. Die beiden Photoreaktionszentren sind zusätzlich mit Lichtsammlersystemen (LHCs, *light-harvesting complexes*) umgeben. Unterschieden wird zwischen Lichtsammlersystem I assoziiert mit PS-I und Lichtsammlersystem II assoziiert mit PS-II. Am Aufbau beider Lichtsammlersysteme sind insgesamt zehn Protein/Pigment Komplexe beteiligt, die auch als Chlorophyll a/b bindende (CAB) Proteine bezeichnet werden. Alle zehn CAB Proteine weisen in einigen Sequenzbereichen große Homologien auf (Green und Pichersky 1994; Jansson 1994; Green und

Kühlbrandt 1995) und sind daher auch evolutionär und strukturell miteinander verwandt. Die Homologie zwischen zwei CAB Proteinen einer Spezies liegt typischerweise um 50%, wohingegen dasselbe CAB Protein unterschiedlicher Spezies meist mehr als 90% Homologie aufweist (Pichersky und Jansson 1996). Dies zeigt, dass sich die CAB Proteine in mehreren Hundert Millionen Jahren Evolution nur wenig verändert haben und daher wird, auch wenn diese noch nicht für alle etabliert ist, generell von einer speziellen Funktion für jedes CAB Protein ausgegangen.

Die CAB Proteine Lhca1-4 werden dem PS-I zugeordnet und bilden als Dimere dessen Lichtantenne LHC-I (Ben-Shem et al. 2003). Die zwei bekannten Dimere Lhca1/Lhca4 und Lhca2/Lhca3 unterscheiden sich stark in ihrer Fluoreszenzmission (Thornber et al. 1993; Schmid et al. 1997) und werden daher auch als LHC-I-680 und LHC-I-730 bezeichnet.

Die innere Lichtantenne des PS-II wird aus den Lhcb4-6 Komplexen gebildet, wohingegen der äußere Teil der PS-II Lichtantenne aus den Lhcb1-3 Protein/Pigment Komplexen besteht. Dieser äußere Bereich des Lichtsammlersystems bindet bis zu 50% der in der Thylakoidmembran vorhandenen Chlorophylle und wird als LHC-II bezeichnet (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Modell der regelmäßigen Anordnung einer prominenten Form von PS-II/LHC-II Superkomplexen (C2S2M) in der Thylakoidmembran (van Amerongen und Dekker 2003). Wichtige Pigmentmoleküle sind durch kleine Kreise dargestellt und Energietransferprozesse durch Pfeile angedeutet.

Das Lhcb1 Protein macht je nach Wachstumsbedingungen, Präparation und Spezies 70-90% des LHC-II aus und wird deshalb häufig als dessen Synonym verwendet. Tatsächlich enthält isoliertes LHC-II jedoch auch variable Anteile von Lhcb2 und Lhcb3 (Jansson 1994; Jackowski et al. 2001), weshalb Lhcb1-3 auch als Isoformen des LHC-II bezeichnet werden. Der aus PS-II Reaktionszentrum und seiner Lichtantenne bestehende Superkomplex kann in verschiedenen Konformationen vorliegen (Barber und Kühlbrandt 1999; Boekema et al. 1999). In den verschiedenen Superkomplexen wurden insgesamt drei verschiedene Bindungsstellen (S, M, L) für den LHC-II Komplex nachgewiesen.

### 1.1.2 Funktionen des LHC-II

Der gesamte Protein/Pigment Komplex von PS-II und seiner Lichtsammelantenne wird als PS-II/LHC-II Superkomplex bezeichnet. Der Superkomplex ist in den Grana der Chloroplasten lokalisiert. Eine Funktion des LHC-II ist die Aufrechterhaltung der Adhäsion zwischen den Granamembranen, wobei Ladungseffekte eine wichtige Rolle spielen (Barber 1980). Die Hauptaufgaben des LHC-II sind jedoch das Sammeln und Weiterleiten von Lichtenergie und die Aufrechterhaltung einer gleichmäßigen Anregung des Photoreaktionszentrums. Dies ist von besonderer Bedeutung, da sich Pflanzen an Lichtbedingungen anpassen müssen, die sich in unterschiedlichstem Zeitrahmen ändern. Der Zeitrahmen reicht dabei vom Wechsel der Jahreszeiten, über den Tag/Nachtzyklus, bis zu schnellen Schatten und Lichtwechseln, die im Verlauf eines Tages auftreten. Neben der lichtregulierten Expression von LHC Komplexen (Larsson et al. 1987; Walters und Horton 1999) und den damit einhergehenden Unterschieden in Ausprägung und Aufbau der Lichtsammlersysteme ist LHC-II an zwei weiteren Regulationsmechanismen beteiligt. So kann LHC-II unter Bedingungen bei denen zu viel Lichtenergie auf das PS-II übertragen wird durch eine redox-kontrollierte spezifische Kinase phosphoryliert werden (Allen und Forsberg 2001; Allen und Race 2002). Die äußeren LHC-II Komplexe lösen sich anschließend vom PS-II/LHC-II Superkomplex und reduzieren damit die auf dieses Reaktionszentrum übertragene Lichtenergie (Bennett 1991). Ein Teil der Lichtenergie wird an das PS-I Reaktionszentrum übertragen, was zu einem Ausgleich der Anregung von PS-II und PS-I führt.

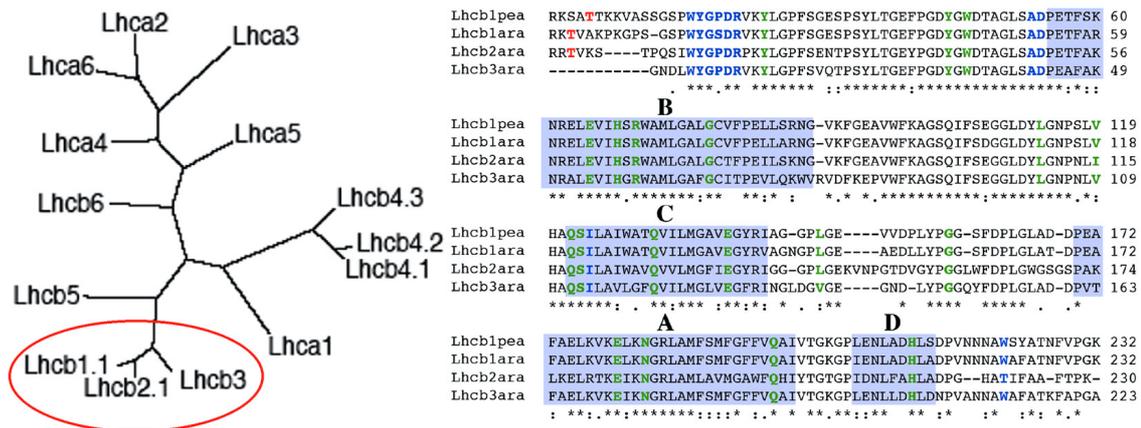
Ein weiterer Mechanismus zur Ableitung überschüssiger Anregungsenergie basiert auf an den LHC-II Komplex gebundene Carotinoide und wird als nicht-photochemische Eliminierung von Anregungsenergie (NPQ, *non-photochemical quenching*) bezeichnet (Demmig-Adams 1990). Dieser Prozess ist eng mit dem Xanthophyll-Zyklus verbunden, bei dem durch eine pH abhängige De-Epoxidierung Violaxanthin in Zeaxanthin umgewandelt wird (Horton und Ruban 1992; Pfundel und Bilger 1994). Da Zeaxanthin in der Lage ist die Anregung der LHC Komplexe zu eliminieren (Horton und Ruban

1992; Frank et al. 1994; Farber et al. 1997; Ma et al. 2003) kann auch dieser Mechanismus eine Überanregung des Photosyntheseapparates verhindern und diesen so vor photochemischen Schäden schützen.

Somit stellt der LHC-II Komplex zusätzliche absorbierende Pigmente bereit und hilft den Photosyntheseapparat optimal an die unterschiedlichsten Lichtbedingungen anzupassen. Die besondere Bedeutung der regulativen Mechanismen wird durch genetisch modifizierte Pflanzen, denen ein Großteil des LHC-II fehlt, bestätigt. Diese zeigen zwar unter optimalen Laborbedingungen ein ähnliches Wachstum wie unmodifizierte Pflanzen, unter den variablen Lichtbedingungen auf freiem Feld sind die modifizierten Pflanzen jedoch deutlich im Wachstum gehemmt (Andersson et al. 2003).

### **1.1.3 Funktioneller Hintergrund der LHC-II Heterogenität**

Auf Proteinebene spiegeln sich die vielfältigen Funktionen des LHC-II in einer großen Variabilität der Komplexe wider. Diese basiert zum Teil auf posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierung und Variation der gebundenen Pigmente. Einen bis heute nur wenig erforschten Beitrag zur Heterogenität liefern die drei Isoformen des LHC-II. Die Lhcb1-3 Proteine sind, wie alle CAB Proteine hoch konserviert. Auch innerhalb einer Art zeigen die LHC-II Isoformen untereinander einen höheren Grad an Homologie als zu den anderen CAB Proteinen, wie in Abbildung 5 exemplarisch an *Arabidopsis thaliana* gezeigt.



**Abbildung 5:** Wurzelloses Cladogram der CAB Proteinsequenzen von *Arabidopsis thaliana* (Jansson 1999). Vergleich der Proteinsequenzen von Lhcb1-3 aus *Arabidopsis thaliana* (Standfuss und Kühlbrandt 2004) und Lhcb1 der Erbse (*Pisum sativum*). Konservierte Chlorophyll Liganden sind grün, an der Trimerbildung beteiligte Aminosäuren sind dunkelblau und die Hauptphosphorylierungsstelle ist rot gefärbt. Die  $\alpha$ -helikalen Bereiche sind entsprechend (Kühlbrandt et al. 1994) hellblau gefärbt.

In *Arabidopsis* sind die drei Isoformen zu 56.6% identisch und 75.4% homolog. Die Unterschiede in der Sequenz sind hauptsächlich am N- und C-Terminus und der Schleife zwischen Helix C und A lokalisiert. Trotz dieser Sequenzvariabilität wird jedoch eine sehr ähnliche Struktur aller drei Isoformen erwartet. Auch funktionell sollten sich die drei Isoformen nur geringfügig unterscheiden, da die meisten Seitenketten bekannter Funktion konserviert sind. Eine der Ausnahmen hierfür ist die große Variabilität des N-Terminus von Lhcb1 und Lhcb2 und dessen Fehlen in Lhcb3.

Die funktionelle Einheit des LHC-II ist das Trimer (Butler und Kühlbrandt 1988; Kühlbrandt und Wang 1991) und alle LHC-II Isoformen bilden Trimere in verschiedenen Kombinationen. Mindestens drei Kombinationen, Lhcb1 Homotrimere und Heterotrimere aus Lhcb1/Lhcb2 und Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3, konnten mittels isoelektrischer Fokussierung isoliert werden (Jackowski et al. 2001). Die jeweiligen Anteile der Isoformen am gesamten LHC-II schwanken je nach Wachstumsbedingungen und betragen ca. 70-90% für Lhcb1, 10-20% für Lhcb2 und ~10% für Lhcb3 (Jansson 1994; Jackowski et al. 2001). Die Lhcb1 Isoform stellt damit den Hauptanteil des LHC-II und ist konsequenterweise auch die am besten untersuchte LHC-II Isoform, welche nicht nur in der Photosyntheseforschung, sondern auch in verwandten Gebieten häufig als Modellprotein verwendet wird. Die Bedeutung der

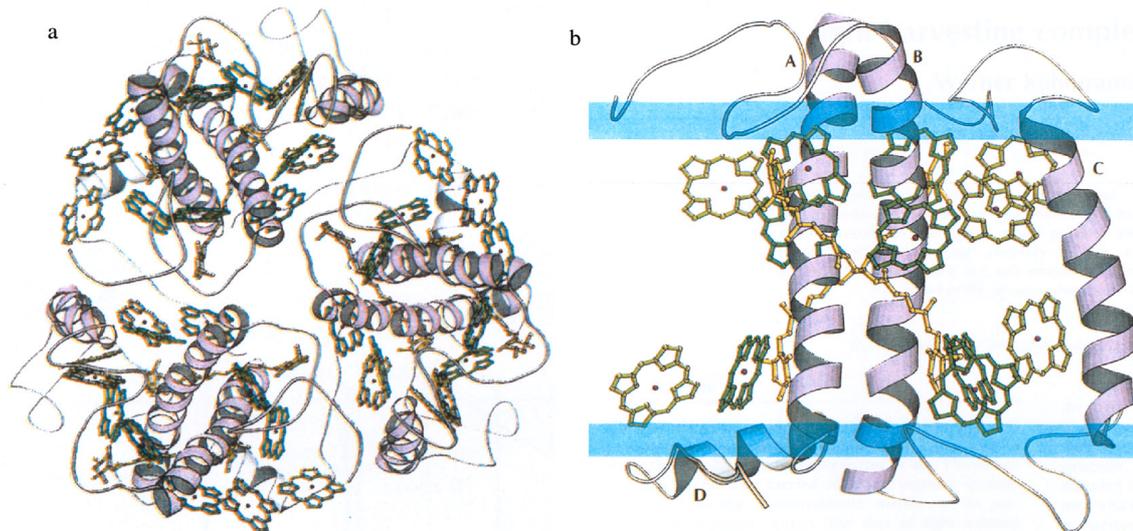
anderen zwei Isoformen ist weitestgehend unklar. Bekannt ist eine lichtregulierte Expression der Lhcb2 Isoform (Larsson et al. 1987; Walters und Horton 1999) und eine schnellere Phosphorylierung einer Lhcb2 reichen LHC-II Präparation (Islam 1987; Jansson et al. 1990). Da außerdem ein höherer Anteil an Lhcb2 in der, relativ zum PS-II, äußersten LHC-II Population nachgewiesen wurde (Larsson und Andersson 1985; Larsson et al. 1987), gilt als gesichert, dass diese Isoform an der Lichtregulation der Photosynthese beteiligt ist.

Im Gegensatz zum Lhcb2 wird die Lhcb3 Isoform nahe am PS-II Reaktionszentrum vermutet (Bassi et al. 1988; Morrissey et al. 1989). Da ihr auch die N-Terminale Phosphorylierungsstelle fehlt, scheint sie zumindest an der redoxkontrollierten Lichtregulation nicht beteiligt zu sein.

Dass über die Lhcb2 und Lhcb3 Isoformen nur so wenig bekannt ist, liegt vor allem an einer fehlenden Methode zu deren Isolierung aus nativem LHC-II. Seit vielen Jahren besteht eine Methode zur rekombinanten Herstellung und *in vitro* Faltung von Lhcb1 (Paulsen et al. 1990; Hobe et al. 1994; Rogl et al. 1998). Dies eröffnete die Möglichkeit der gerichteten Mutagenese und ist für einen großen Teil des heutigen Wissens über Lhcb1, aber auch der gesamten LHC-II Antenne verantwortlich. Die entsprechenden Klone für Lhcb2 und Lhcb3 fehlten jedoch und konnten daher in diese Studien nicht einbezogen werden. Diese zwei Isoformen wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit kloniert, gefaltet und biochemisch/spektroskopisch mit der Lhcb1 Isoform verglichen. Die Eigenschaften von Lhcb1 und Lhcb2 waren dabei nahezu identisch, wohingegen Lhcb3 klare Unterschiede in Pigmentorganisation, Trimerbildung und spektroskopischen Eigenschaften zeigte.

#### **1.1.4 Elektronenkristallographisches Modell des LHC-II**

Auch strukturell ist LHC-II gut charakterisiert. Anhand von Cryo-Elektronenmikroskopie von 2D Kristallen konnte eine Dichte bis zu einer maximalen Auflösung von 3.4 Å erstellt werden. In diese Dichte wurde ein Modell der Lhcb1 Isoform der Erbse eingepasst (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des LHC-II mit Sekundärstruktur des Peptidrückgrats und Pigmenten a: Trimer von der Stromaseite der Membran aus betrachtet, b: Seitenansicht eines Monomers mit Stromaseite nach oben und angenommener Position der Thylakoidmembran. Die vier Helices sind mit Großbuchstaben beschriftet (Kühlbrandt 1994).

Das Modell enthält mit 182 der 232 Aminosäuren einen Großteil des Polypeptides. Im Wesentlichen fehlen nur die Termini und die Schleife zwischen Ala 100 und Pro 116. Insgesamt zeigt der Membranteil jedoch eine bessere Ordnung als der extramembrane Teil des Proteins. Die Aminosäuren in diesen Bereichen konnten daher auch deutlich besser eingepasst werden. Ein genaueres und vollständigeres Modell, welches insbesondere die Anordnung des N-Terminus mit der regulativen Phosphorylierungsstelle klärt, ist jedoch für das Verständnis der Funktion des LHC-II unerlässlich.

Der gut aufgelöste transmembrane Teil des EM Modells enthält drei hydrophobe  $\alpha$ -Helices (A, B, C). Eine vierte aliphatische Helix (D) nahe dem C-Terminus liegt teilweise außerhalb der Membran. Helix A und B kreuzen sich in der Mitte des Komplexes und werden durch zwei Glutamat- und Arginin- Ionenpaare, die gleichzeitig als Chlorophyllliganden fungieren, im hydrophoben Innern des Proteins stabilisiert. Diese Anordnung des Polypeptides lässt viel Platz zwischen den Helices, welcher zum größten Teil durch die gebundenen photosynthetischen Pigmente eingenommen wird. Diese sind für alle Funktionen des LHC-II essentiell und machen ca. 30% der Masse des gesamten Komplexes aus. Trotz intensiver Forschung war die genaue Anzahl der an den Komplex gebundenen Pigmente unklar, wurde

aber mittels chromatographischer Methoden auf 12-16 Chlorophylle, 2 Luteine, 1 Neoxanthin und 0-1 Violaxanthin/Zeaxanthin eingegrenzt (Butler und Kühlbrandt 1988; Rogl und Kühlbrandt 1999; Ruban et al. 1999; Yang et al. 1999). In der elektronenkristallographischen Struktur konnten jedoch nur 12 Chlorophylle und zwei Luteine aufgelöst werden und es erschien aufgrund der chromatographischen Analysen wahrscheinlich, dass noch 1-2 Carotinoide und eventuell auch Chlorophylle fehlen. Auch konnte anhand der Elektronendichte nicht zwischen Chlorophyll a und b unterschieden werden, denn der Unterschied zwischen Chlorophyll a und Chlorophyll b, ein Sauerstoff- und ein Wasserstoffatom, war bei der gegebenen Auflösung nicht zu erkennen. Die Zuordnung der Chlorophylle basierte ausschließlich auf deren Abstand zu den zentralen Luteinen. Alle Chlorophylle ließen sich grob in zwei Gruppen einteilen, die jeweils  $\sim 4 \text{ \AA}$  oder  $\sim 8 \text{ \AA}$  von den zentralen Luteinen entfernt waren. Da Chlorophyll b Moleküle ihre Anregungsenergie extrem schnell (Sub-Picosekunden) auf die Chlorophyll a Moleküle übertragen (Eads et al. 1989), besteht nur bei den Chlorophyll a Molekülen die Gefahr der Bildung von Triplettanregungszuständen. Solche angeregten Chlorophylle können Sauerstoff in aggressive Singlettzustände überführen, welche den Photosyntheseapparat beschädigen könnten. Die potentiell gefährlichen Triplettanregungen von Chlorophyll a Molekülen werden daher durch Übertragung auf nahe gelegene Carotinoidmoleküle gelöscht, weshalb alle Chlorophyllmoleküle mit Abständen um  $4 \text{ \AA}$  zu den zentralen Luteinen dem Chlorophyll a zugeordnet wurden. Die Zuordnung der Chlorophylle basierte also nur indirekt auf strukturellen Daten und wurde aufgrund von funktionellen Überlegungen durchgeführt. Auch wenn diese Zuordnung eventuelle zusätzliche Carotinoide nicht berücksichtigte, wurde die Zuordnung durch eine Reihe von Mutationsanalysen größtenteils bestätigt (Remelli et al. 1999; Rogl und Kühlbrandt 1999; Yang et al. 1999). Eine eindeutige Zuordnung mit Hilfe einer hochauflösenden Struktur war jedoch wünschenswert, da sich die Ergebnisse aus den Mutationsexperimenten teilweise widersprechen.

Für ein detailliertes Verständnis des Energietransfers innerhalb des Komplexes ist nicht nur die genaue Anzahl und Art der gebundenen Pigmente essentiell, sondern auch deren Abstände und räumlichen Orientierungen. Während die Abstände zwischen den in der elektronenkristallographischen Struktur erkennbaren Pigmenten mit ausreichender Genauigkeit bestimmt

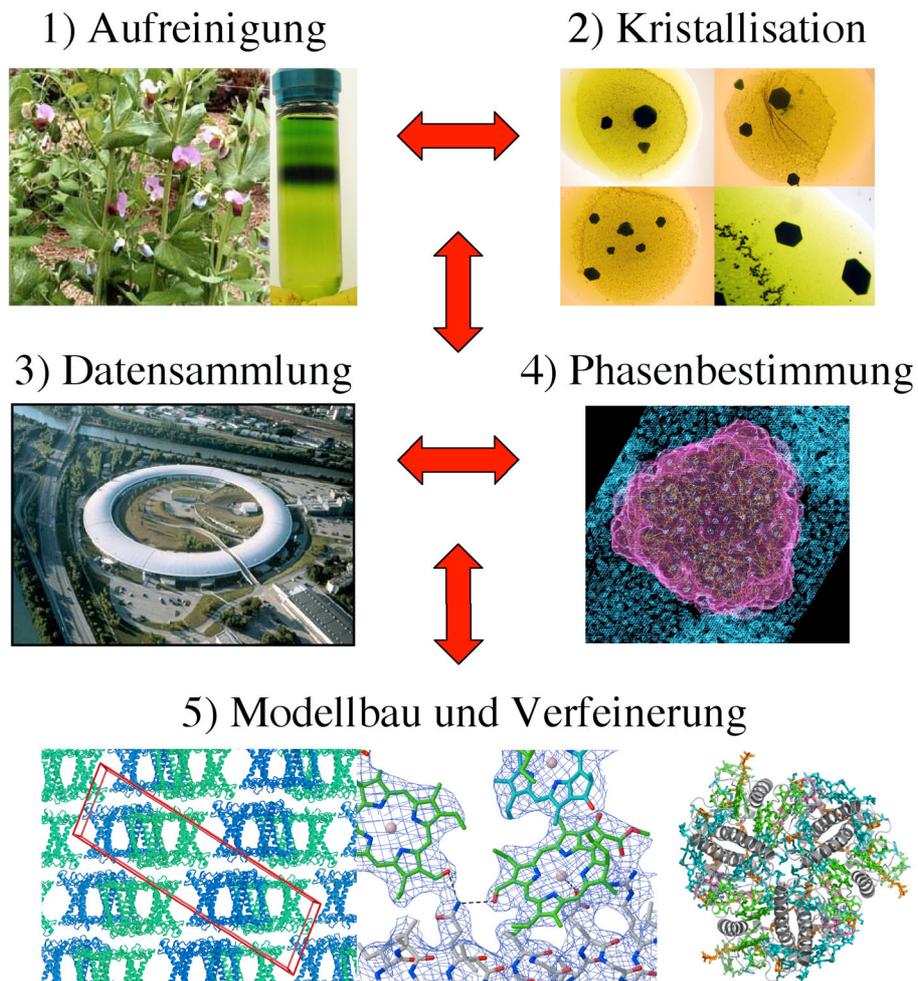
werden konnten, ist die Orientierung insbesondere der Chlorophyllmoleküle nur ungenügend bekannt. Die Tetrapyrrolringe der Chlorophylle konnten zwar klar der Elektronendichte zugeordnet werden, jedoch waren die für eine Orientierung nötigen Seitenketten nicht erkennbar. In einer anderen Arbeit wurde versucht die Orientierung der Chlorophylle durch spektroskopische Analyse von Lhcb1 Mutanten zu klären (Iseri und Gulen 2001), jedoch basieren auch diese Ergebnisse letztendlich auf der vorhandenen Struktur. Eine bessere LHC-II Struktur, in der auch die Orientierung der Chlorophylle eindeutig bestimmt werden kann, ist daher essentiell für das detaillierte Verständnis der Energietransferfunktion des LHC-II.

Eine Reihe von Strukturen von Membranproteinen enthalten spezielle, festgebundene Lipide (Essen et al. 1998; McAuley et al. 1999; Hunte et al. 2000; Jordan et al. 2001; Lange et al. 2001). Diese haben häufig nicht nur eine strukturelle, sondern auch eine funktionelle Bedeutung. Zum Beispiel ist im PS-I Komplex ein Lipid maßgeblich am Verlauf der Elektronentransportkette beteiligt. Auch der LHC-II Komplex enthält mindestens ein funktionell wichtiges Lipid, das Phosphatidyl-Glycerol (PG), welches an der Bildung und Stabilisierung des LHC-II Trimers beteiligt ist (Nußberger et al. 1993). Auch eine Abspaltung von 15-61 Aminosäuren am größtenteils hydrophilen N-Terminus verhindert die Trimerbildung. Besonders die Aminosäuren 15-21 scheinen nach Mutationsexperimenten ein für die Trimerisierung wichtiges Motiv (WYPGDR) zu enthalten und könnten über ein stark konserviertes Arginin als PG Bindungsstelle dienen (Hobe et al. 1995). Da neben PG auch das Lipid Digalaktosyl-diacyl-glycerol (DGDG) für eine Kristallisation (Nußberger et al. 1993; Nußberger 1994) benötigt wird, könnte auch dieses Lipid eine strukturelle oder funktionelle Bedeutung für den LHC-II Komplex haben. Eine genauere Untersuchung der fest mit dem Komplex assoziierten Lipide und besonders die PG Bindung und dessen Beteiligung an der Trimerbildung kann nun anhand einer hochaufgelösten Struktur durchgeführt werden.

## 1.2 Membranproteine in der Strukturbiologie

Das Wissen um die atomare Struktur ist eine wichtige Voraussetzung für das detaillierte Verständnis eines Proteins. Viel deutet darauf hin, dass nach der Bestimmung aller Proteinsequenzen eines Organismus in der Ära der Genomics nun eine Phase der Proteomics, also der Strukturaufklärung aller Proteine eines Organismus, folgt. Die Anzahl der in der Protein Daten Bank (PDB) gespeicherten Strukturen hat seit Beginn der neunziger Jahre annähernd exponentiell zugenommen und beträgt ca. 25000 im Oktober 2004. Mit etwa 70-80 vertretenen Strukturen machen Membranproteine davon nur einen geringen Anteil aus, obwohl sie von geschätzten 20-30% aller Gene kodiert werden und maßgeblich an wichtigen Prozessen wie Energieumwandlung, Stofftransport über die Membran, Proteintranslokation, Zellerkennung und Signaltransduktion beteiligt sind. Die Anzahl der bekannten Strukturen ist daher im Vergleich zu der biologischen Vielfalt und Bedeutung von Membranproteinen sehr gering. Dies ist vor allem auf die besonderen Probleme die im Verlauf der kristallographischen Strukturbestimmung von Membranproteinen auftreten zurückzuführen. Die Verwendung von Kristallen zur Bestimmung von Proteinstrukturen geht auf Bernal und Crowfoot (1934) zurück, denen als ersten die Erzeugung eines Diffraktionsmusters durch Bestrahlung eines Proteinkristalls mit Röntgenstrahlung gelang. In der speziellen Gruppe von Membranproteinen wird neben der röntgenkristallographischen Untersuchung von 3D Kristallen auch eine elektronenmikroskopische Analyse von 2D Kristallen zur Strukturaufklärung verwendet und kann zur Erstellung eines atomaren Modells führen (Henderson et al. 1990; Kühlbrandt et al. 1994; Murata et al. 2000). Meist ist die mit der 2D Kristallographie erreichte Auflösung jedoch niedriger. Obwohl auch schon bei niedriger Auflösung wichtige strukturelle Informationen gewonnen werden können (Williams 2000; Breyton et al. 2002; Vonck et al. 2003), macht die potentiell höhere Auflösung die röntgenkristallographische Untersuchung von 3D Kristallen zu der vorherrschenden Methode bei der Bestimmung der atomaren Struktur von Membranproteinen. Im Folgenden werden die für eine röntgenkristallographische Strukturaufklärung nötigen Schritte, unter

Berücksichtigung der Besonderheiten von Membranproteinen, kurz eingeführt.



**Abbildung 7:** Schematische Übersicht über die für eine röntgenkristallographische Strukturaufklärung nötigen Schritte. Die wichtigsten wechselseitigen Beziehungen zwischen den einzelnen Schritten sind durch rote Pfeile hervorgehoben.

### 1.2.1 Protein Aufreinigung

Eine Proteinprobe die bei hoher Konzentration, in ausreichenden Mengen und „kristallographischer“ Reinheit vorliegt ist eine Voraussetzung für die Herstellung von Proteinkristallen hoher Qualität. Unter „kristallographischer“ Reinheit ist in diesem Zusammenhang nicht nur die Abwesenheit anderer Proteine zu verstehen, sondern auch die Homogenität des zu kristallisierenden Proteins. Dieses sollte möglichst in einem einzigen oligomeren Zustand vorliegen und keine Mikroheterogenitäten wie

unterschiedliche Konformationen, Isoformen, posttranslationale Modifikationen oder teilweise denaturiertes Protein aufweisen. Aus diesen Gründen ist die Kristallisation von statischen, stabilen Proteinen im Allgemeinen einfacher zu erreichen, als die von Proteinen mit geringer Stabilität oder hoher Flexibilität. In vielen Fällen können auch die Beugungseigenschaften vorhandener Kristalle durch eine optimierte Aufreinigung des Proteins verbessert werden.

Membranproteine können, genau wie Proteine anderer Gruppen, entweder direkt aus dem Organismus isoliert oder auch mit Hilfe genetischer Methoden rekombinant hergestellt werden. Die Aufreinigung eines Membranproteins gestaltet sich jedoch häufig schwieriger, da das Protein aus seiner nativen Lipidumgebung entfernt und mit Hilfe von Detergenzien in Lösung gehalten werden muss. Die amphiphilen Detergenzien schirmen dabei den hydrophoben Teil des Membranproteins ab und erhöhen so dessen Löslichkeit in wässriger Umgebung. Teilweise haben Detergenzien jedoch auch einen denaturierenden Effekt oder können für die Stabilität und Funktion des Proteins wichtige Lipide ablösen. Um eine ausreichende Löslichkeit bei minimaler Destabilisierung des Proteins zu erreichen, müssen daher sowohl der Typ wie auch die Konzentration des Detergenz genau abgestimmt werden, was die Aufreinigung von Membranproteinen teils erheblich komplizieren kann.

### **1.2.2 Kristallisation**

Auch der nächste Schritt einer Strukturbestimmung, die Züchtung von hochgeordneten Kristallen, wird bei Membranproteinen durch die Anwesenheit von Detergenz erschwert. Kristalle bestehen aus einem dreidimensionalen Gitter indem sich eine Einheitszelle in regelmäßigem Muster wiederholt. Bei Proteinen wird dieser kristalline Zustand durch eine Verbindung der Proteinmoleküle über hochspezifische Kontakte wie Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken und seltener auch van der Waals Kontakte erreicht. Im Fall von Membranproteinen wird jedoch ein großer Teil des Proteins durch das Detergenz verdeckt und steht nicht für Kristallkontakte zu Verfügung. Im Prinzip kann diesem Effekt durch die Verwendung von

Detergenzien mit kurzen hydrophoben Kohlenwasserstoffketten entgegengewirkt werden, jedoch neigen gerade diese Detergenzien mehr zu einer Destabilisierung des Proteins. Weiterhin neigen Detergenzlösungen in Anwesenheit vieler zur Kristallisation verwendeter Präzipitantien zu einer Phasentrennung, welche eine Kristallisation verhindern kann.

Die meisten Membranproteinpräparationen enthalten Lipide, die mitunter auch funktionelle und stabilisierende Bedeutung für das Protein haben können. Der Einfluss von Lipiden auf die Kristallisation wird immer wieder diskutiert, und tatsächlich gibt es Beispiele bei denen bestimmte Lipide absolut notwendig für die Kristallisation sind (Nußberger et al. 1993; Lamborghini 2002), keinen Einfluss haben oder entfernt werden müssen (R. Lancaster, persönliche Mitteilung). Der Einfluss von Lipiden auf die Kristallisation hängt entscheidend vom Typ (Michel 1983) des Membranproteinkristalls ab. Typ I Kristalle entstehen durch eine Stapelung von Lipidmembranen die 2-dimensional geordnetes Protein enthalten und Lipide sind daher ein essentieller Bestandteil dieser Anordnung. Ebenfalls für die Kristallpackung essentiell sind Lipide in den kürzlich erstmals beschriebenen ikosahedralen Proteoliposomen (Liu et al. 2004). In dieser Kristallanordnung bilden das Protein und vorhandene Lipide Proteoliposomen, die wiederum über die hydrophilen Schleifen des Proteins Kristallkontakte untereinander herstellen. Die Typ II Membranproteinkristalle entsprechen mehr typischen 3D Kristallen, wie sie auch von den meisten löslichen Proteinen gebildet werden. In diesen sind die hydrophoben Bereiche des Proteins von einem Ring aus Detergenz umgeben. Wenn auch die Detergenzringe miteinander wechselwirken können, werden die Kontakte bei Typ II Kristallen hauptsächlich von den hydrophilen Schleifen des Proteins gebildet. Lipid ist in dieser Anordnung in den meisten Fällen nicht nötig und könnte, falls es nicht für die Stabilität oder Funktion des Proteins von Bedeutung ist, eher einen störenden Einfluss auf die Kristallisation haben.

Doch auch wenn erste Kristalle gezüchtet wurden, sind diese häufig nicht von ausreichender Qualität, um eine Strukturbestimmung zu ermöglichen. Auch unter Verwendung von Synchrotronstrahlung beugen Membranproteinkristalle häufig nur bis zu einer niedrigen Auflösung oder sind extrem anisotrop. Diese schlechten Beugungseigenschaften können unterschiedliche, im Einzelnen

schwer zu bestimmende Ursachen haben. Von entscheidender Bedeutung ist die zur Kristallisation verwendete Proteinprobe und eine Optimierung der Aufreinigung kann Kristalle häufig entscheidend verbessern. Auch die Entfernung oder Zugabe von zusätzlichen Lipiden kann die Qualität vorhandener Kristalle erhöhen. Weitere Ursachen für schlechte Beugungseigenschaften können in den verwendeten Kristallisationsbedingungen liegen, so kann die Detergenzmizelle zu groß sein und die Bildung von starken Kristallkontakten verhindern. In einem solchen Falle kann ein Detergenz mit etwas kürzerer Kohlenwasserstoffkette (Michel 1983; Marone et al. 1999), eine Mischung von Detergenzien (Lancaster et al. 1999; Kuo et al. 2003) oder die Modifikation der Detergenzmizelle durch kleine amphiphile Additive (Deisenhofer et al. 1985; Köpke et al. 1996; Palczewski et al. 2000) die Kristallkontakte verbessern und die Qualität der Kristalle erhöhen. Auch der Verzicht auf Detergenz während der Kristallisation und dessen Ersatz durch spezielle Lipide (Landau und Rosenbusch 1996) war schon erfolgreich oder wird im Falle der so genannten Amphipole (Tribe et al. 1996) erst diskutiert. In einigen Fällen konnten durch Binden von Antikörperfragmenten die für Kristallkontakte zu Verfügung stehenden hydrophilen Bereiche vergrößert und auf diese Weise Kristalle mit guten Beugungseigenschaften erzeugt werden (Hunte et al. 2000; Zhou et al. 2001). Auch gezielte Mutationen spezieller Aminosäuren z.B. in den Schleifenregionen können zu einer deutlichen Verbesserung von Kristallen führen (van den Berg et al. 2004). Ebenfalls klassische Kristallisationstechniken wie das Säen von Kristallisationskeimen (Jordan et al. 2001; Zouni et al. 2001) oder die Verwendung von Additiven (McDermott et al. 1995; Lancaster et al. 1999; Stroebel et al. 2003) wurden schon erfolgreich bei Membranproteinen angewandt. Keiner dieser Ansätze ist jedoch generell anwendbar und die Kristallisation von Membranproteinen ist daher, vielleicht in noch größerem Umfang als bei löslichen Proteinen, auf Versuch und Irrtum angewiesen. Dennoch hat sich durch die relativ große Anzahl der in den letzten Jahren veröffentlichten Strukturen ein gewisses Muster abgebildet. So sind bei mehr als 50% aller Strukturaufklärungen nur drei verschiedene Detergenzien verwendet worden und fast 90% aller qualitativ hochwertigen Kristalle wurden mit Hilfe von Polyethylenglycol gezüchtet.

Ist es gelungen Kristalle zu erzeugen die für eine Strukturbestimmung akzeptable Diffraktionseigenschaften aufweisen, besteht bei den folgenden Schritten prinzipiell kein Unterschied mehr zwischen Membranproteinen und löslichen Proteinen. Da aber Membranproteinkristalle tendenziell schlechtere Beugungseigenschaften aufweisen, muss auch bei diesen Schritten meist besondere Sorgfalt auf die Optimierung der Datenaufnahme und Auswertung gelegt werden.

### **1.2.3 Datensammlung**

Der nächste Schritt einer röntgenkristallographischen Strukturbestimmung ist die Sammlung von Beugungsdaten. Diese wird aufgrund der höheren Strahlintensität und der damit möglichen besseren Datenqualität meist an Synchrotronstrahlenquellen durchgeführt. Ein Nachteil der hohen Strahlenintensität ist der bei den meisten Kristallen relativ schnell eintretende Strahlenschaden. Dieser geht zum Teil auf direkte Schäden durch Bestrahlung der Proteinmoleküle zurück. Ein Großteil wird jedoch von aggressiven Radikalen hervorgerufen, die durch die Röntgenstrahlung entstehen. Die Radikale können aufgrund des hohen Wasseranteils in Proteinkristallen frei diffundieren und damit innerhalb kurzer Zeit die Ordnung im ganzen Kristall zerstören. Um die Diffusion der aggressiven Radikale zu verhindern, werden daher röntgenkristallographische Daten seit den 90er Jahren meist an gefrorenen Kristallen gesammelt. Dies reduziert den entstehenden Strahlenschaden und ermöglicht in den meisten Fällen komplette Daten hoher Auflösung und Qualität von einem einzigen Kristall aufzunehmen.

Auch eine Vereinfachung der Montage von gefrorenen Kristallen hilft die Datenqualität zu erhöhen, da in kurzer Zeit mehrere Kristalle getestet werden können und die Datenaufnahme nur an den besten erfolgt. Dies ist von besonderer Bedeutung, wenn große Variationen in der Beugungsqualität auftreten und nur wenige gute Kristalle zu Verfügung stehen, wie es häufig bei Membranproteinen vorkommt. Meist können Kristalle jedoch nicht direkt gefroren werden, da die Bildung von Eis zu einer Verringerung oder Zerstörung der Kristallordnung führen kann. Dies wird durch

Gefrierschutzmittel verhindert, die optimalerweise schon in den Kristallisationsansätzen vorhanden sind, mit denen die Kristalle aber auch vor dem Frieren getränkt werden können. Dies zerstört oder verringert die Ordnung des Kristalls jedoch häufig durch osmotischen Schock und das Einfrieren muss daher sorgfältig optimiert werden, wobei neben Typ und Konzentration des Gefrierschutzmittels auch die Methode des Einfrierens eine Rolle spielt.

Die röntgenkristallographische Datenaufnahme erfolgt meist mittels der Rotationsmethode (Arndt und Wonacott 1977). Dabei wird ein Kristall im Röntgenstrahl gedreht und von kleinen Rotationsbereichen separate Beugungsbilder aufgenommen. Vor der Datenaufnahme müssen die Distanz zwischen Detektor und Kristall, Gesamtrotation, Rotationsbereich pro Bild und Belichtungszeit so aufeinander abgestimmt werden, dass ein möglichst kompletter Datensatz bei möglichst niedrigem Strahlenschaden und möglichst hoher Auflösung aufgenommen wird. Wie viele Daten für einen kompletten Datensatz aufgenommen werden müssen, hängt dabei von der Symmetrie und Orientierung des Kristalls ab. Um eine optimale Datenaufnahme zu ermöglichen, sollte daher eine vorläufige Charakterisierung des Kristalls anhand einiger Beugungsbilder vorgenommen werden. In bestimmten Fällen mit anisotropen Daten, wie sie häufig von Membranproteinen aufgenommen werden, kann sich die Charakterisierung des Kristalls, wie auch die endgültige Bestimmung der Beugungsintensitäten als sehr schwierig erweisen. Gelingt es in einem solchen Fall nicht bessere Kristalle zu erzeugen, können bestimmte Programme (wie z.B. das Programm XDS (Kabsch 1988; Kabsch 1993)), bei denen jede Reflektion über mehrere Diffraktionsbilder betrachtet und daraus ein Profil errechnet wird, dennoch eine Auswertung erlauben.

#### **1.2.4 Phasenbestimmung**

Ein röntgenkristallographisches Beugungsbild wird durch Interferenz der Streuung von Röntgenstrahlen an dem regelmäßigen Gitter eines Kristalls erzeugt. Die eigentlichen Streuzentren sind dabei hauptsächlich die Elektronen und weniger die Kerne der Atome. Bei der röntgenkristallographischen Strukturbestimmung wird die Streuung anhand

eines Satzes von Beugungsbildern gemessen und in eine Dichteverteilung der Elektronen rückgerechnet, in die anschließend Atome eingepasst werden. Das für die Rückrechnung in Elektronendichte verwendete mathematische Verfahren der Fouriertransformation benötigt die Intensität und Phase jedes unabhängigen Reflexes. Aus den gemessenen Beugungsbildern können jedoch nur die Intensitäten direkt entnommen werden, da die Phaseninformation bei der Datenaufnahme verloren geht. In speziellen Fällen kann die Phaseninformation durch Generierung eines zufälligen Phasensatzes und dessen kontinuierliche Verfeinerung gegen die gemessenen Daten teilweise zurückgewonnen werden. Da diese direkte Methode der Phasenbestimmung jedoch röntgenkristallographische Daten höchster Qualität und Auflösung benötigt und nur bei relativ kleinen Molekülen angewandt werden kann, ist sie für die meisten Proteine keine Alternative. Bei der Strukturbestimmung von Proteinen werden die benötigten Phasen daher meist über indirekte Methoden bestimmt.

Häufig verwendete indirekte Methoden beruhen auf Modifikationen des Proteins, bei denen Schwermetallatome als starke Streuzentren (MIR, SIR) oder die anormale Beugung (MAD, SAD) von z.B. eingebautem Selenomethionin verwendet werden. Im Gegensatz zu diesen indirekten Methoden wird für den molekularen Ersatz keine Modifikation des Proteins benötigt und die Phaseninformation wird stattdessen aus der Kenntnis der Struktur eines nahe verwandten Proteins gewonnen. Die Struktur des verwandten Proteins wird beim molekularen Ersatz als Suchmodell verwendet und anhand der gemessenen Daten rechnerisch bestmöglich in die Kristallpackung eingepasst. Aus dieser Lösung lässt sich dann ein Satz annähernd korrekter Phasen gewinnen. Bei dem Suchmodell muss es sich nicht unbedingt um eine röntgenkristallographische Struktur handeln, sondern auch elektronenmikroskopische Untersuchungen von 2D Kristallen (Pebay-Peyroula et al. 1997) oder Einzelpartikeln (Wang et al. 1997; Prasad et al. 1999) wurden schon erfolgreich verwendet. Der größte Vorteil der Phasenbestimmung mittels molekularen Ersatzes ist die geringe Menge an röntgenkristallographischen Daten, die für eine Strukturaufklärung benötigt wird. Die Qualität der erhaltenen Phasen ist jedoch immer stark von der Ähnlichkeit und der Qualität des Suchmodells abhängig. Eine Gefahr ist auch

der große Einfluss des Suchmodells auf die errechnete Elektronendichte, welcher im Laufe der Verfeinerung sorgfältig verringert werden muss.

### 1.2.5 Modellbau und Verfeinerung

Wurde ein vorläufiger Satz an Phasen ermittelt, kann dieser zusammen mit den gemessenen Intensitäten zur Berechnung einer ersten Elektronendichtekarte verwendet werden. Der nächste Schritt einer Strukturbestimmung ist die Interpretation dieser Karte und die Platzierung eines Modells in die Elektronendichte. Aufgrund von Ungenauigkeiten, vor allem der vorläufigen Phasen, aber auch der Intensitäten und des manuellen Modellbaus, zeigt ein so erstelltes Modell zu Beginn jedoch meist nur eine geringe Übereinstimmung mit den gemessenen Daten und muss weiter verfeinert werden. Hierbei werden die Position und ein Temperaturfaktor, der die Beweglichkeit angibt, für jedes Atom des Modells mit einer Reihe von Verfahren (z. B. *rigid-body*, *simulated annealing*) an die röntgenkristallographischen Daten angepasst. Selbst kleine Proteine haben jedoch tausende von Atomen und meist sind nicht genug Daten vorhanden um alle Parameter gleichzeitig anzupassen. Die Anzahl der zu verfeinernden Parameter wird daher zu Beginn durch zusätzliche Annahmen wie z.B. chemische Parameter der Aminosäuren oder gruppenweise verfeinerte Temperaturfaktoren eingeschränkt. Aus dem mit Hilfe dieser Annahmen verfeinerten Modell werden neue Phasen ermittelt und anschließend zusammen mit den experimentellen Intensitäten eine neue Elektronendichte errechnet, an die wiederum das Modell neu angepasst werden kann. Im weiteren Verlauf der Strukturbestimmung können die Annahmen nach und nach verringert und nach meist mehrmaliger Berechnung einer neuen Elektronendichtekarte und anschließender Anpassung des Modells ganz ausgelassen werden. Bei einer erfolgreichen Strukturbestimmung sollten anschließend die gemessenen Daten gut mit dem Strukturmodell übereinstimmen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische und biochemische Methoden

#### 2.1.1 Klonierung der LHC-II Isoformen

Zur Expression der Lhcb1 Isoform wurde der Klon C3.2h verwendet. Dieser trägt das Plasmid (d7f.3) mit der Sequenz für matures LHC-II Protein mit einer C-terminalen hexa-Histidin Markierung (Rogl et al. 1998; Rogl 2000). Das rekombinante Lhcb1 Gen stammt aus der Erbse und wurde unter dem Namen cab AB80 publiziert (Cashmore 1984). Es kodiert nach der Prozessierung im Chloroplasten ursprünglich für ein 232 Aminosäuren langes Polypeptid. Die in dieser Arbeit verwendete Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich immer auf die native Kette ohne das Startmethionin.

Plasmide die cDNA der lhcb2\*1 und lhcb3 Gene von *Arabidopsis thaliana* tragen, wurden vom Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio State University, USA) bereitgestellt. Die cDNA wurden vor der Verwendung mittels Sequenzierung und Datenbankabgleich kontrolliert.

Zur Klonierung von Lhcb2 wurden die Plasmide des Lhcb1 C.3.2h Klons mittels PCR mit der Histidin Markierung aber ohne das lhcb1 Gen amplifiziert. In das zu klonierende lhcb2 Gen wurde durch PCR eine *SphI* Schnittstelle eingefügt und das Gen anschließend in die leeren Lhcb1 Plasmide ligiert. Das nun das Lhcb2 Gen enthaltende Plasmid wurde in XL1-blue *E. coli* kompetente Zellen überführt und mittels Sequenzierung überprüft. Für die Expression wurden XL1-blue *E. coli* verwendet.

Für das lhcb3 Gen wurde zunächst dieselbe Klonierungsmethode wie für das lhcb2 Gen geprüft. Das lhcb3 Gen konnte jedoch nicht unter Kontrolle des T5 Promoters expremiert werden. Deshalb wurde für diese Isoform das pET Expressionssystem mit dem stärkeren T7 Promoter verwendet. Dazu wurden *NdeI* und *XhoI* Schnittstellen mittels PCR N- und C-Terminal in das lhcb3 Gen eingefügt. Zur Bildung der *XhoI* Schnittstelle musste die zusätzliche Sequenz

CTCGAG an das 3' Ende des Gens angefügt werden. Dies führt zu zusätzlichen Leucin und Glutamat Aminosäuren am C-Terminus des exprimierten Polypeptids. Das Gen wurde mittels der Schnittstellen in einen pET-20b(+) Vektor eingefügt. Die Expression des Proteins fand in BL21(DE3) pLys *E. coli* statt. Nach der Transformation wurde das Gen durch Sequenzierung überprüft.

### **2.1.2 Expression und Aufreinigung von LHC-II Einschlusskörpern**

Sterile Falcongefäße wurden mit 20 ml LB-Medium gefüllt und 60 µg/ml Ampicillin zugegeben. Die Vorkulturen wurden mit dem gewünschten Klon angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Zum Animpfen wurden 20 ml Vorkultur zu 5 l Erlenmyerkolben mit 2l LB-Medium (+60 µg/ml Ampicillin) gegeben. Anschließend wurde die Kultur in einem Schüttler bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die Expression des Proteins wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6-1 durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-thiogalactopyranoside (IPTG, SIGMA) gestartet. Nach ca. 4 Stunden wurden die Zellen geerntet.

Das Zellpellet wurde in 50 ml destilliertem Wasser, einer Tablette Complete Protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim), ca. 20 mg Dithiothreitol (DTT, Sigma) und einer Spatelspitze Desoxyribonuclease I (DNAse I, Merck) resuspendiert. Um eine möglichst komplette Resuspension zu erreichen, wurde der Zentrifugenbehälter für 3 Minuten in ein Ultraschallbad gehalten und danach sofort auf Eis gestellt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Mikrofluidizers in zwei Durchläufen. Hierbei wurden die aufgebrochenen Zellen in ein 40 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Um die Einschlusskörper von den Zelltrümmern zu trennen wurde die Suspension abzentrifugiert (JA30.50 TI, 20000 rpm, 10 min, 4°C). Der Überstand mit dem größten Teil der Zelltrümmer wurde verworfen und das Pellet mit 30 ml Detergenzpuffer (50 mM Tris pH 7.5, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Desoxycholate und 1 % IGEPAL C63 [Sigma]) und ca. 20 mg DTT gewaschen und wiederum abzentrifugiert (JA30.50 TI, 20000 rpm, 10 min, 4°C). Hierauf folgten zwei weitere Waschschrirte mit 40 ml Tris pH 7.5 (20 mM).

Um die Proteinkonzentration einer Lösung mit gereinigten Einschlusskörpern abzuschätzen, wurde diese 1:200 mit A 280 PUFFER (10 mM Tris pH 7.5, 2% SDS, 1mM Mercaptoethanol) verdünnt und danach 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Durch diese Behandlung wurde das Protein vollständig denaturiert, wodurch die Konzentration an einem Absorptionsspektrometer abgeschätzt werden konnte. Eine  $OD_{280}$  von 1 entsprach dabei einer Proteinkonzentration von  $\approx 0.525$  mg/ml.

### **2.1.3 Isolierung von photosynthetischen Pigmenten**

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung der Pigmente wurde Spinat gewählt. Hierbei handelte es sich um frischen Spinat von einem Gemüsehändler oder um Hydrokulturen aus der Instituts-eigenen Klimakammer.

Da die Pigmente temperatur- und lichtempfindlich sind, wurden die Arbeiten lichtgeschützt auf Eis ausgeführt. Zum Beschleunigen der Lösung von Pigmenten in Aceton oder Ether wurde bei den entsprechenden Schritten ein Ultraschallbad verwendet.

#### **2.1.3.1 Totalextraktion der Pigmente in Aceton**

Von ca. 2 kg Spinat wurden die Blätter entfernt. Diese wurden anschließend gewaschen und möglichst vollständig getrocknet.

Anschließend wurden die Blätter mit Aceton in einem Mixer homogenisiert. Das Homogenat wurde zunächst durch Baumwollgaze und anschließend durch einen Faltenfilter filtriert. Der Filtrerrückstand wurde zusammen mit frischem Aceton zurück in den Mixer gegeben und danach erneut filtriert. Dieses wurde solange wiederholt, bis der Filtrerrückstand eine hellgrüne Farbe angenommen hatte und somit der Großteil der Pigmente im Aceton gelöst war. Die Lösung wurde in einen Kolben überführt und mittels eines Rotationsverdampfers bis zum kleinst möglichen Volumen (ca. 150 ml) eingengt. Das Lösungsmittel konnte nicht völlig verdampft werden, da es aus den Blättern stammendes Wasser enthielt. Um dieses zu entfernen, wurden

die Pigmente durch Ausschütteln in einem Scheidetrichter in eine Etherphase überführt. Der Ether konnte anschließend im Rotationsverdampfer vollständig entfernt werden.

### **2.1.3.2 Trennung von Chlorophyllen und Carotinoiden durch Dioxanfällung**

Die getrockneten Pigmente wurden mit 100 ml Aceton aufgenommen und in eine verschließbare 0.5 l Flasche überführt. Hierzu wurden 10 ml Wasser und 10 ml Dioxan hinzugefügt und der Ansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zum Ausfällen der Chlorophylle wurde die Flasche für 2 h bei -20°C gelagert und die präzipitierten Chlorophylle anschließend durch Filtration entfernt. Das die Carotinoide enthaltende Filtrat wurde gesammelt und für die weitere Aufreinigung der Carotinoide verwendet.

### **2.1.3.3 Isolierung und Aufreinigung der Carotinoide**

Das Filtrat der Dioxanfällung wurde im Rotationsverdampfer bis zum kleinstmöglichen Volumen eingedampft und mit 100 ml Ethanol und 10 ml 60% KOH versetzt. Der Ansatz wurde mit Stickstoff überschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert. Diese Behandlung zerstört alle eventuell noch vorhandenen Chlorophylle und Lipide. Die Carotinoide wurden durch Ausschütteln in eine Etherphase überführt und wiederholt mit Wasser gewaschen, bis sich eine orangene Färbung ergibt. Der Ether wurde im Rotationsverdampfer entfernt und die Carotinoide unter Stickstoff bei -20°C eingefroren. Die Ausbeute betrug 50-60 mg Carotinoidmix.

#### **2.1.3.4 Isolierung und Aufreinigung des präzipitierten Chlorophylls**

Die nach der Dioxanfällung abfiltrierten Chlorophylle wurden durch Lösen in ca. 100 ml Ether aus dem Filter gewaschen. Um das Dioxan zu entfernen, wurde die Lösung im Scheidetrichter viermal mit gleichem Volumen Wasser gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Lösung mit dem Rotationsverdampfer eingeengt. In geringen Mengen vorhandenes Restwasser konnte durch Zugabe von zusätzlichem Ether und erneutem Eindampfen entfernt werden. Die getrockneten Chlorophylle wurden unter Stickstoff eingefroren.

Die Ausbeute an Chlorophyll betrug 200-300 mg, bei einem a/b Verhältnis von ca. 3.

#### **2.1.4 Isolierung von Thylakoidmembranen**

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von nativem LHC-II dienen Erbsenpflanzen, welche 15-18 Tage bei 10 Stunden Licht und 14 Stunden Dunkelheit in einer Klimakammer bei 20° C. und 45% Feuchtigkeit gewachsen sind. Die Intensität des Lichts wurde im Verlauf der Arbeit zwischen 2000 und 20000 Lux variiert. Die Pflanzen die das Protein für die Strukturaufklärung lieferten wuchsen bei ~10000 Lux.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Thylakoidlipiden wurde Spinat gewählt. Hierbei handelte es sich um frischen Spinat von einem Gemüsehändler oder um Hydrokulturen aus einer Klimakammer.

Thylakoidmembranen wurden wie beschrieben (Burke et al. 1978; Kühlbrandt et al. 1983) aus Pflanzenblättern isoliert. Die Blätter wurden in 0.33 M Sorbitol und 0.1 M Tricine (pH 7.8, 100ml/35g Blätter) in einem Mixer zerkleinert. Der Blattextrakt wurde gefiltert und zentrifugiert (15 min, 6000 rpm, Sorvall, Rotor 34SS). Das Pellet, bestehend im wesentlichen aus Chloroplasten und großen Zellbruchstücken, wurde in 10 mM NaCl und 1 mM Tricine (pH 7.8) suspendiert, homogenisiert und gewaschen. Nach Zentrifugation der Chloroplasten wurden diese durch osmotischen Schock in 10 mM NaCl, 1 mM

Tricine und 5 mM EDTA (pH 7.8) aufgeschlossen (30 min bei Raumtemperatur), pelletiert (15 min, 6000 rpm, SS34) und im gleichen Puffer gewaschen. Danach wurden die Thylakoidmembranen in 5 mM EDTA und 0.1 M Sorbit (pH 7.8) suspendiert und bei pH 6.0 für 15 min bei Raumtemperatur entstapelt. Die entstapelten Thylakoidmembranen wurden schließlich nach weiterer Zentrifugation (15 min, 6000 rpm, SS34) in 0.1 M Sorbit aufgenommen. So isolierte Thylakoidmembranen wurden anschließend für die Isolation von Lipiden oder für die Aufreinigung von nativem LHC-II verwendet.

### **2.1.5 Aufreinigung von Thylakoidlipiden**

Eine Zusammenfassung zur Isolierung von Lipiden aus Thylakoidmembranen ist in der Literatur zu finden (Chapman und Barber 1987). Vor Verwendung wurden sämtliche Glasgefäße, Säulen und Filter in Chloroform/Methanol (1:1, v/v) gereinigt.

Die Thylakoidmembranen wurden pelletiert und das Pellet in einem kleinen Volumen von etwa 10 ml 0.1 M Sorbit aufgenommen. Lipide und Pigmente wurden durch Zugabe von Chloroform/Methanol (1:1, v/v) extrahiert (Verhältnis Lösungsmittel:Chlorophyll ~20 ml/1 mg). Der Extrakt wurde homogenisiert und filtriert. Nach wenigen Minuten hatten sich die wässrige und die organische Phase entmischt, so dass letztere dekantiert werden konnte. Um Oxidation der Fettsäuren zu vermeiden, wurden sämtliche Lipidpräparationen unter Stickstoff gehalten. Der Lipid- und Pigmentextrakt wurde in einem Rotationsverdampfer bei 30°C. unter Vakuum eingeeengt. Um hydrophile, kontaminierende Substanzen zu absorbieren, wurde Dextran Gel (Sephadex G-25 Medium, Merck) in einem Verhältnis von 0.5 g pro mg Chlorophyll beigegeben. Nach dem Eindampfen wurden die Lipide und Pigmente in Chloroform gelöst und das Lösungsmittel wie oben wieder abgezogen. Dieser Schritt wurde 2-3 Mal wiederholt. Zur Abtrennung des Dextrangels wurde das Gemisch in Chloroform aufgenommen und durch einen Glasfilter filtriert. Das Lösungsmittel wurde eingedampft und die Lipide und Pigmente in Chloroform gelöst. Die Lipide und Pigmente wurden unter Stickstoff bei -20 °C. gelagert.

Die Aufreinigung der Lipide erfolgte über eine SIL-LC Silikatsäule (Sigma) (Sprague und Staehelin 1987). Die Säule wurde mit Chloroform/Methanol (1:1, v/v) gewaschen und mit etwa 2 Säulenvolumina Chloroform equilibriert. Nach Laden der Säule mit Lipid/Pigmentextrakt wurden zuerst die Pigmente mit 10 Säulenvolumina Chloroform, dann das Lipid MGDG mit 5 Säulenvolumina Chloroform/Aceton (1:1, v/v) und schließlich DGDG mit 10-20 Säulenvolumina Aceton eluiert. SQDG wurde mit weiteren 20 Säulenvolumina Aceton, die Lipide PG und PC mit 10 Säulenvolumina Methanol in der genannten Reihenfolge eluiert. Die Lipidfraktionen wurden mittels eindimensionaler Dünnschichtchromatographie auf ihre Reinheit getestet, die Lösungsmittel gegen Chloroform ausgetauscht und in Konzentrationen von etwa 6 mg/ml unter Stickstoff bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . gelagert.

### **2.1.6 Reinigung von nativem LHC-II**

Homogenisierte Thylakoidmembranen mit einer Chlorophyllkonzentration von 0.5 mg/ml wurden in Triton X-100 (0.5% (w/v)) für 30 min bei  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . solubilisiert und anschließend zentrifugiert (Sorvall, 18000 rpm, SS34 Rotor). Das Solubilisat wurde auf einem Saccharose-Dichtegradienten (0.1M-1.0M Saccharose) in einer Ultrazentrifuge ( $\sim 15\text{h}$ , 32000 rpm, Ti45 Rotor) aufgetrennt. Die LHC-II Fraktion, als dunkelgrüne Bande leicht zu erkennen, wurde mit 300 mM KCl ausgefällt, zweimal in 100 mM KCl, einmal mit destilliertem Wasser durch resuspendieren und zentrifugieren (SW34 Rotor, 25000 rpm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ., 15 min) gewaschen. Schließlich wurde das Protein bei einer Chlorophyllkonzentration von 3.5 mg/ml in 0.9% (w/v) n-Nonyl- $\beta$ ,D-glucopyranosid (NG) solubilisiert. Für Kristallisationsexperimente wurde das Protein zusätzlich durch Ultrazentrifugation (100000 rpm, TLA120.2 Rotor) teilweise aufkonzentriert. Der leicht grüne Überstand wurde entfernt und das verbleibende Protein auf eine Endkonzentration von 5.5 mg/ml in 1% NG eingestellt. Das Protein wurde bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . gelagert.

### **2.1.7 Trennung von nativem LHC-II mittels chromatographischer Fokussierung**

Die chromatographische Fokussierung wurde auf einer MonoP Säule (Pharmacia) durchgeführt. Die Säule wurde mit Equilibrierungspuffer (25 mM Methylpiperazin pH 4.8, 0.6% NG) auf den Start pH-Wert eingestellt. Das Protein (1ml, 3 mg/ml, 1% NG) wurde 1:10 mit Equilibrierungspuffer versetzt und 5 min abzentrifugiert bevor es auf die Säule geladen wurde. Die Elution erfolgte mit 1:20 verdünntem Polybuffer74 (0,6 %NG, pH 3.7, Pharmacia). Das Elutionsprofil wurde anhand der Absorption bei 280 nm und des pH-Wertes detektiert. Das Protein wurde während der Elution mit 0.1M Tris pH 7.5 gepuffert und mittels KCl (0.3 M) präzipitiert und nach erfolgter Elution durch Zentrifugation (Ti 45 Rotor, 25000 rpm, 4 °C.) pelletiert. Die Pellets wurden 2x durch Resuspension und Zentrifugation (SW34 Rotor, 25000 rpm, 4 °C., 15 min) mit destilliertem Wasser gewaschen. Abschließend wurde das pelletierte Protein bei einer Chlorophyllkonzentration von 3.5 mg/ml in 1% (w/v) NG solubilisiert. Für Kristallisationsexperimente wurde das Protein zusätzlich durch Ultrazentrifugation (100000 rpm, TLA120.2 Rotor) aufkonzentriert. Der leicht grüne Überstand wurde entfernt und das verbleibende Protein mit einer Endkonzentration von 5.5 mg/ml in 1% NG eingestellt. Das Protein wurde bei -80°C. gelagert.

### **2.1.8 Faltung von LHC-II Monomeren durch Detergenzpräzipitation**

Die Faltung durch Detergenzpräzipitation wurde in Anlehnung an ein publiziertes Protokoll (Hobe et al. 1994) durchgeführt. Das Protokoll wurde jedoch modifiziert und vereinfacht. Der für die analytische Faltung verwendete Ansatz von 2 ml wird im Folgenden beschrieben. Für die präparative Faltung wurden die Ansätze proportional auf 150 ml Endvolumen vergrößert.

In *E. coli* expremierte Einschlusskörper (1 mg) wurden in 1.8 ml Rekonstitutionspuffer (0.1 M Tris pH 9.0, 12,5% Saccharose, 2% Li-dodecylsulfat) für 5 min auf 95°C. erhitzt. Nach Abkühlung wurden 0.2 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol (0.1 M) zugegeben. Die Pigmente (0.5 mg Chl, a/b=3.0,

0.15 mg Carotinoidmix) in 0.2 ml Ethanol wurden schnell mit der Lösung vermischt. Nach 20 min wurde nacheinander 0.2 ml n-Octyl- $\beta$ -D-glucoside (OG) (10%, w/v) und 0.3 ml KCl (3M) zugegeben, anschließend 5 min abzentrifugiert. Das sich bildende K-Dodecylsulfat präzipitierte als weißes Pellet. Der grüne Überstand enthielt die gefalteten Monomere und überschüssige Pigmente und wurde zur Trimerisierung und weiteren Aufreinigung auf der Ni-Säule verwendet.

### **2.1.9 Trimerisierung von LHC-II Monomeren auf einer Ni-Säule**

#### **2.1.9.1 Trimerisierung im analytischen Ansatz**

Die in dieser Arbeit verwendete Trimerisierung auf einer Ni-Säule basiert auf einem publizierten Protokoll (Rogl et al. 1998). Jedoch wurde nur die Trimerisierung auf der Säule übernommen und die Monomere wie beschrieben gefaltet.

10 ml Chromatographiesäulen (Biorad) wurden mit chelatierender Sepharose (Pharmacia) bis zur 1 ml Marke beladen und mit 5ml destilliertem Wasser gewaschen. Der Auffangbehälter wurde entleert und die Ni<sup>2+</sup> Ionen in Form von 1 ml NiCl<sub>2</sub> (0.3M) zugegeben. Hierauf folgte ein weiterer Waschschrift mit 3 ml Tris (50 mM, pH 9.0), um die ungebundenen Ni<sup>2+</sup> Ionen zu entfernen.

Um zur Monomerfaltung vergleichbare Bedingungen zu erhalten, wurde die Säule mit 1 ml OG-Puffer (1% [w/v] OG, 0.1 M Tris pH 9.0, 12.5% [w/v] Saccharose) beschickt. Die Säule wurde anschließend mit 2 ml gefalteten Monomeren beladen und ein Großteil der ungebundenen Pigmente mit 1 ml OG-Puffer von der Säule gewaschen. Zur Trimerisierung der Monomere wurde die Säule mit 1 ml TX/PG Puffer (0.05% [v/v] Triton X-100, 0.1 mg/ml L-phosphatidyl-D,L-glycerol-dipalmitoyl [PG], 0.1 M Tris pH 7.5) gewaschen. Die gefalteten Komplexe wurden durch Auftragen von Elutions-Puffer (0.05% [v/v] Triton X-100, 0.1 mg/ml L-phosphatidyl-D,L-glycerol-dipalmitoyl [PG], 0.3 M Imidazol pH 7.5) eluiert. Der eluierte Komplex wurde anschließend mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Gradienten wurden durch Einfrieren und langsames Auftauen einer Saccharoselösung (20.5%

[w/v] Saccharose, 25 mM Tris pH 7.5, 0.06 % [w/v] Dodecylmaltosid) in SW 40 Röhrchen hergestellt. Die Zentrifugation erfolgte im SW-40 Rotor bei 40000 rpm für 20h bei 4°C.

### **2.1.9.2 Trimerisierung im präparativen Ansatz und weitere Aufreinigung für Kristallisationsexperimente**

Prinzipiell wurden für die Trimerisierung im präparativen Ansatz die gleichen Puffer wie für die analytische Trimerisierung verwendet. Um genügend Material für 3D Kristallisationsversuche zu erhalten wurde jedoch eine Säule mit 60 ml chelatierender Sepharose (Pharmacia) und 150 ml gefaltete Monomere verwendet und auch die Puffervolumina entsprechend angepasst. Die Trimerisierung wurde des Weiteren mit Hilfe einer FPLC Anlage (Äkta purifier, Pharmacia) durchgeführt. Die Elutionslösung tropfte direkt in 200 ml 0.6 M KCl Lösung, was zur Präzipitation des LHC-II führte. Die Lösung wurde zentrifugiert (20 min, 20000 rpm, Ti45 Rotor, 4°C.). Die Pellets wurden vereinigt und 2x mit destilliertem Wasser gewaschen und abzentrifugiert (SW34 Rotor, 25000 rpm, 4 °C., 15 min). Anschließend wurde der Komplex solubilisiert (0.5 mg/ml, 0.5% [v/v] TritonX 100) und verbleibende Monomere durch Zentrifugation (16 h, 60000 rpm, 4°C., Ti70 Rotor) in einer Saccharoselösung (25 % Saccharose, 0.05 % [v/v] TritonX 100, 25 mM Tris pH 7.5) entfernt. Die Trimerbanden wurden abgenommen und auf ein Volumen von 360 ml mit einer KCl Konzentration von 0.3 M aufgefüllt. Die Präzipitation des Proteins erfolgte in Anwesenheit von 1g Biobeads (Sigma) unter Rühren innerhalb von 45 min bei 4°C. Die Biobeads wurden abfiltriert und das Protein durch Zentrifugation (Ti 45 Rotor, 25000 rpm, 4 °C.) pelletiert. Die Pellets wurden vereinigt und 2x mit destilliertem Wasser gewaschen und abzentrifugiert (SW34 Rotor, 25000 rpm, 4 °C., 15 min). Abschließend wurde das pelletierte Protein bei einer Chlorophyllkonzentration von 3.5 mg/ml in 1% (w/v) n-Nonyl- $\beta$ ,D-glucopyranosid (NG) solubilisiert und bei -80°C. gelagert.

### **2.1.10 Nativgelelektrophorese**

Die Proben wurden in einem Verhältnis von 9:1 mit Glycerin (87%) beschwert und auf ein diskontinuierliches Gel nach Laemmli (1970) aufgetragen. Das Gel enthielt kein SDS und die Elektrophorese wurde mit vorgekühltem Laufpuffer in einem Kühlraum bei 6°C durchgeführt. Aufgrund der grünen Farbe des LHC II konnte bei diesen Gelen auf eine Färbung verzichtet werden.

### **2.1.11 Denaturierende Gelelektrophorese**

Die Proben wurden in einem Verhältnis von 4:1 mit Probenpuffer (12.5 mM Tris pH 6.8, 4% [w/v] SDS, 5% [v/v]  $\beta$ -Mercaptoethanol und Bromphenol-Blau) versetzt und auf ein diskontinuierliches Gel aufgetragen (Schägger und von Jagow 1987). Zur Detektion der Proteinbanden wurden die Gele anschließend mit Coomassie Brilliant Blue oder Silber gefärbt.

### **2.1.12 Lipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie (TLC)**

Die Analyse von Lipiden oder LHC-II Proben wurde mittels Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Dazu wurden Silika Gel 60 Dünnschichtplatten (Merck) verwendet. Zur Auftrennung der Lipide wurde ein Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4, v/v/v) Lösungsmittelsystem übernommen (Allen und Good 1971). Die Lipide und Detergenzien wurden detektiert durch Reaktion der Fettsäuren mit Ioddampf. Die Galactolipide wurden mit  $\alpha$ -Naphthol (Sigma), einem Sprayreagenz für Zucker, nachgewiesen. Die Phospholipide wurden mit einem kommerziell erhältlichen Sprayreagenz (Sigma, M3389; Molybdenoxid/Schwefelsäure) detektiert.

### 2.1.13 Pigmentanalyse mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Durch HPLC konnten in einem Lauf Chlorophylle zusammen mit Carotinoiden mit hoher Sensitivität bestimmt werden. Die HPLC Läufe wurden im Labor von Prof. H. Paulsen (Universität Mainz) durchgeführt. Pigmente wurden aus Dichtegradientenbanden durch Zugabe von sec-Butanol und NaCl bis zu einer Konzentration von 33% v/v bzw. 1M extrahiert. Die Proben wurden 1 min zentrifugiert und der grüne Überstand auf 80% Aceton eingestellt. Die Trennung der Pigmente auf der Säule (Chromolith SpeedROD; RP-18e, Merck, Darmstadt, Germany) erfolgte durch einen mit 0.2 M Tris pH 7.0 gepufferten Aceton/Wasser Gradienten. Die Detektion erfolgte anhand der Absorption bei 440 nm. Die Quantifizierung der Pigmente wurde durch einen Vergleich der Absorption mit Eichkurven der gereinigten Pigmente durchgeführt.

## 2.2 Spektroskopische Methoden

### 2.2.1 Photometrische Pigmentanalyse

Chlorophyllkonzentrationen wurden photometrisch in 80% Aceton bestimmt (Porra et al. 1989). Die Absorption einer vorher zentrifugierten Probe wurde bei den Wellenlängen 646.8 nm und 663.6 nm gemessen, die Absorption bei 750 nm als Referenz subtrahiert. Folgende Gleichungen wurden verwendet:

$$\text{Chl a } [\mu\text{g/ml}] = 12.25 A^{663.6} - 2.55 A^{646.6}$$

$$\text{Chl b } [\mu\text{g/ml}] = 20.31 A^{646.6} - 4.91 A^{663.6}$$

Bei bekannter Chlorophyllkonzentration konnte die Konzentration der Carotinoide abgeschätzt werden (Lichtenthaler 1987):

$$\text{Car } [\mu\text{g/ml}] = ( 1000 A^{470} - 1.82 [\text{Chl a}] - 85.02 [\text{Chl b}] ) / 198$$

### **2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Galactolipiden**

Die Konzentration von Galactolipiden (MGDG, DGDG) wurde photometrisch bestimmt (Roughan und Batt 1968). Dafür wurde Chloroform gelöstes Lipid zunächst mit Phenol (2%, v/v) und anschließend mit Schwefelsäure im Verhältnis 1:4 versetzt. Die Probe wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, abzentrifugiert und die Absorption bei 485 nm gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Vergleich mit einer Galactoseeichkurve.

### **2.2.3 Absorptionsspektroskopie**

Mittels Saccharosegradienten aufgereinigte Monomere und Trimere wurden durch zusätzliche Ultrazentrifugation (3h, 100000 rpm, 4°C., TLA120.2 Rotor) aufkonzentriert. Der leicht grüne Überstand wurde entfernt und die verbleibende Probe mit 20% Saccharose, 0.1% DDM, 25 mM Tris pH 7.5 auf eine OD<sub>437</sub> von 1.5 eingestellt.

Die Absorptionsspektren bei 77 K wurden an der Universität von Mainz am Institut für Allgemeine Botanik erstellt. Hierzu wurden in einem Selbstbaucryostaten kommerzielle Plastikküvetten (1x0.5mm) mit flüssigem Stickstoff gefroren. Um eine Eisbildung zu vermeiden wurden der Probe Glycerin und DDM bis zu einer finalen Konzentration von 60% [v/v] bzw. 0.05% [w/v] zugegeben. Die Spaltbreite bei der Absorptionsmessung betrug 0.2 nm. Zunächst wurde eine Grundlinie mit 20% Saccharose, 0.05% DDM, 25 mM Tris pH 7.5, 60% Glycerin aufgenommen und von allen Spektren subtrahiert. Alle Spektren sind auf gleiche OD<sub>437</sub> normiert. Um Hintergrundrauschen zu minimieren wurden vor Berechnung der 4. Ableitung 5 Messungen der Region 600-750 nm gemittelt.

#### **2.2.4 Cirkulardichroismus (CD) Spektroskopie**

Die Probenvorbereitung für die CD-Spektroskopie wurde ähnlich wie die bereits beschriebene Vorbereitung der Proben für die 77 K Absorptionsspektroskopie durchgeführt. Jedoch wurde kein Glycerin zugegeben und die Proben bei einer OD<sub>437</sub> von 1.5 verwendet.

Die Spektren wurden bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Spaltbreite von 0.2 nm aufgenommen. Die Messküvette wurde auf 4°C. gekühlt.

#### **2.2.5 Fluoreszenz-Emissions Spektroskopie**

Die Proben für die Fluoreszenz-Emissions Spektroskopie wurden direkt aus einem Saccharosegradienten zur Auftrennung von Monomeren und Trimeren entnommen. Die Proben wurden jedoch vor der Aufnahme bis zur Sichtbarkeitsgrenze verdünnt, um einen „Innerfilter“ Effekt auszuschließen. Für Raumtemperaturspektren wurde mit 0.05% DDM, 25 mM Tris pH 7.5 verdünnt. Sollten die Proben in Stickstoff gefroren werden, enthielt der Verdünnungspuffer zusätzlich 60% [v/v] Glycerin. Alle Fluoreszenz-Emissions Spektren wurden auf die maximale Fluoreszenz normiert.

Fluoreszenz-Emissions Spektren bei Raumtemperatur wurden im Institut erstellt. Die Anregung erfolgte im Chl b Bereich bei 469 nm (1 nm Bandbreite), der Detektionsspalt war auf 2.5 nm eingestellt.

Fluoreszenzspektren bei 77 K wurden am Institut für Botanik der Universität Mainz mit einer Anregungswellenlänge von 469 nm aufgenommen. Die Spaltbreite betrug 2 nm für die Anregungswellenlänge und 0.5 nm für die Emissionswellenlänge. Die Proben wurden in einem Glasdewar eingefroren, der mit flüssigem Stickstoff gefüllt war.

## **2.3 Kristallographische Methoden**

### **2.3.1 Proteinkristallisation**

Alle Kristallisationsexperimente wurden als miniaturisierte Dampfdiffusionsexperimente (Davies und Segal 1971) nach der Methode des hängenden Tropfen durchgeführt. Sollte der Proteinlösung DGDG zugegeben werden, wurde das in Chloroform gelöste DGDG zunächst in einem Glasröhrchen mittels eines Stickstoffstrahls getrocknet. Das getrocknete Lipid wurde mit Protein/Detergenzlösung versetzt, in einem Ultraschallbad gelöst und anschließend 30 min bei 20°C. inkubiert.

Die Mutterlauge wurde in 24-Loch-Limbro-Zellkulturplatten (Hampton Research) gegeben. Die Proteinlösung (0.5-2 µl) wurde auf silanisierte Deckgläschen (Hampton Research) gegeben und auf die Kammer mit Mutterlauge (1 ml) aufgesetzt, wobei zur Abdichtung Baisilon-Siliconpaste (Bayer AG) verwendet wurde. Bei den weitaus meisten Kristallisationsexperimenten wurde der Proteinlösung vor dem Schließen der Kammer noch Mutterlauge im Verhältnis 1:1 zugesetzt.

Für die Suche nach neuen Kristallisationsbedingungen wurden entweder kommerziell erhältliche Sätze von Kristallisationsbedingungen (Crystal Screen I+II, Membrane Screen, Hampton Research) oder selbsterstellte Sätze von Bedingungen, die auf dem Konzept des unvollständigen faktoriellen Testens beruhen, verwendet. In diesen wurden meist 8 verschiedene Polyethylenglycole (PEGs) gegen pH-Werte von 4.5-9.5 und verschiedene Salzbedingungen variiert.

### **2.3.2 Einfrieren von Proteinkristallen**

Die Diffraktionsexperimente dieser Arbeit wurden ausnahmslos an tiefgekühlten Proteinkristallen durchgeführt. Zum Einfrieren müssen die Kristalle aus dem Kristallisationstropfen entnommen werden. Dies geschah mit einer 0.2-0.5 mm großen, auf einer Stahlnadel montierten Gefrierschleife (Cryoloop, Hampton Research) unter Zuhilfenahme eines Mikroskops.

Enthielten die Kristalle nicht genügend Gefrierschutzmittel, wurden sie vor dem Einfrieren zwischen 1 s und 5 min in verschiedenen Gefrierschutzmitteln inkubiert. Die Kristalle wurden anschließend in einem durch einen Cryostaten (Oxford Cryosystems) erzeugten 100K Stickstoffstrahl, oder flüssigem Stickstoff bzw. flüssigem Ethan gefroren. Die Kristalle wurden für die weitere Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.3.3 Testen von Kristallen und Datensammlung**

Ein Teil der Kristalle wurde im Institut unter Verwendung zweier Röntgengeneratoren (rotierenden Anode,  $\text{CuK}_\alpha$ -Strahlung) und Image Plate-Detektoren (Mar345 bzw. MSC R-Axis 4++) getestet. Die Kristalle wurden unter Verwendung eines Goniometerkopfs auf ein Einkreis-Diffraktometer montiert und mit einer senkrecht zur Achse des Röntgenstrahles positionierten CCD-Kamera justiert.

Ein großer Teil der Kristalle wurde an verschiedenen Synchrotronstrahlengängen getestet. Diese waren im einzelnen BW7A, X11, X31 (EMBL, DESY, Hamburg), ID14-1, ID14-3 (ESRF, Grenoble, Frankreich) und PX (SLS, Villingen, Schweiz).

Von jedem Kristall wurden 3 Diffraktionsbilder im Abstand von je  $45^\circ$  aufgenommen und anhand dieser die Anisotropie und Beugungsgrenze des Kristalls beurteilt. Eignete sich der Kristall für die Datenaufnahme, wurden bis zu 3 weitere Aufnahmen bei unterschiedlichen Bestrahlungszeiten und Kristall-Detektor Abständen durchgeführt. Aufgrund dieser Aufnahmen konnten Kristall-Detektor Abstand, Rotationsbereich pro Aufnahme und Belichtungszeit für die Datenaufnahme mittels der Rotationsmethode (Arndt und Wonacott 1977) aufeinander abgestimmt werden. Als Startpunkt der Datenaufnahme wurde der Kristall so justiert, dass der Röntgenstrahl zwischen der flachen und der dünnen Oberfläche der hexagonalen Kristalle eindrang. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Datenaufnahme in der meist besser beugenden Orientierung des Kristalls startet. Gleichzeitig wurde sichergestellt, dass bei den für einen kompletten Datensatz benötigten  $90^\circ$  bis  $180^\circ$  Gesamtrotation (C2 oder  $\text{P3}_121$  Symmetrie, (Dauter 1999)) auch von der

häufig schlechter beugenden dünnen Seite des Kristalls Daten aufgenommen wurden.

### 2.3.4 Datenprozessierung

Für die Indizierung, Integration und Skalierung der Beugungsreflexe wurde das Programmpaket XDS verwendet (Kabsch 1988; Kabsch 1993). Dabei wurde für die Indizierung der gesamte aufgenommene Rotationsbereich verwendet. Dies gewährleistete möglichst genaue Parameter für Kristallorientierung, Strahlrichtung, Kristall-Detektor Abstand, Einheitszelle und Symmetrie.

Bei der folgenden Integration wurden die Daten in 20-30° Teilbereiche aufgeteilt und unter Verwendung der vorher bestimmten Parameter unabhängig prozessiert und optimiert.

Für jeden Teilbereich wurde einzeln eine maximale Auflösung bestimmt. Als Kriterien für die Beurteilung der Auflösung eines Teilbereichs dienten ein  $R_{\text{sym}}$  von maximal 40% und einem Signal-zu-Rausch Verhältnis ( $I/\sigma(I)$ ) von minimal 2.0.

$$R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})}$$

$I_i(\text{hkl})$ : Intensitäten von äquivalenten Reflexen mit gleicher hkl Indizierung

$\langle I_i(\text{hkl}) \rangle$ : durchschnittliche Intensität aller Reflexe mit gleicher hkl Indizierung

Alle Teilbereiche wurden anschließend in einem Datensatz vereinigt und entsprechend skaliert. Als Referenz für die Skalierung diente der in einem Durchgang ohne Teilbereiche prozessierte Datensatz. Die Vollständigkeit des fertigen Datensatzes ergab sich aus der Anzahl der gemessenen Reflexe, dividiert durch die Anzahl der theoretisch möglichen Reflexe.

Zur weiteren Kontrolle der Datensätze wurde eine Selbst-Rotations-Funktion mittels des Programms MOLREP (Vagin und Teplyakov 1997) durchgeführt. Die Verzwillingung der Daten wurde mittels des Programms DETWIN aus dem CCP4 Programmpaket untersucht.

### 2.3.5 Molekularer Ersatz

Die Phasenbestimmung wurde mittels molekularem Ersatz durchgeführt. Als Suchmodell diente dabei entweder das EM-Modell des LHC-II der Erbse (Kühlbrandt et al. 1994) oder die EM-Dichte, welche zur Erstellung dieses Modells geführt hatte. Aus der Dichte wurde vor der Verwendung als Suchmodell mittels des Programmpakets USF (Kleywegt und Jones 1999) ein LHC-II Trimer mit einer zusätzlichen Hülle von 5 Å ausgeschnitten. Der molekulare Ersatz wurde mittels des Programms MOLREP (Vagin und Teplyakov 1997) durchgeführt. Die Lösung wurde zunächst mittels des Programms O (Jones et al. 1991) begutachtet. Dabei wurde geprüft, ob keine Überlappung von Komplexen vorliegt und diese einen geeigneten Abstand für Kristallkontakte aufweisen. Die Qualität der Lösung wurde des Weiteren durch R-Faktor und Korrelation zwischen Lösung und Daten beurteilt.

$$\text{R-Faktor} = \frac{\sum_{hkl} | |F_o| - |F_c| |}{\sum_{hkl} |F_o|}$$

$$\text{Korrelation} = \frac{\sum[(|F_o|^2 - \langle |F_o|^2 \rangle)(|F_c|^2 - \langle |F_c|^2 \rangle)]}{\sqrt{[\sum (|F_o|^2 - \langle |F_o|^2 \rangle)^2 (\sum (|F_c|^2 - \langle |F_c|^2 \rangle)^2)]}}$$

$F_o$ : beobachtete Strukturaktoren

$F_c$ : berechnete Strukturaktoren der entsprechenden Lösung

### 2.3.6 Verfeinerung und Modellbau

Aus dem molekularen Ersatz wurden zwei voneinander unabhängige Lösungen der P<sub>3</sub><sub>1</sub>21 und C<sub>2</sub> Datensätze mit der EM-Dichte als Suchmodell erhalten. Die Elektronendichten beider Lösungen wurden gemittelt und einer Dichtemodifikation (*solvent flattening, histogram mapping*) unterzogen (Programm DMMULTI (Cowtan 1994)). Die so erhaltene Elektronendichte enthielt damit Beiträge beider Datensätze und der elektronenmikroskopischen Phasen. Aus dieser Elektronendichte wurde ein Satz an Phasen extrahiert und als Beschränkung während der ersten Verfeinerungsschritte verwendet.

Das atomare EM-Modell (Kühlbrandt et al. 1994) wurde in die Elektronendichte platziert und mittels manuellem Modellbau (Programm O, (Jones et al. 1991)) erweitert. Das erweiterte Modell wurde Verfeinerungen mit den Programmen REFMAC (Murshudov et al. 1997) und BUSTER-TNT (Tronrud 1997; Roversi et al. 2000) mit dem Verfeinerungsziel der höchsten Wahrscheinlichkeit (*Maximum-Likelihood Method*) unterzogen. Mit dem verfeinerten Modell wurde eine neue, verbesserte Elektronendichte errechnet und das Modell erneut manuell erweitert. Diese Zyklen von Modellbau und Verfeinerung wurden wiederholt, wobei während aller Zyklen von Verfeinerung und Modellbau die nichtkristallographische Symmetrie der drei Monomere im LHC-II Trimer ausgenutzt wurde.

Die Qualitätsverbesserung des Modells wurde im Verlauf der Verfeinerung anhand der R-Faktoren (R<sub>cryst</sub> und R<sub>free</sub>) und anhand der Geometrie des Ramachandran Diagramms (Programm PROCHECK) beurteilt.

$$R\text{-Faktor} = \frac{\sum_{hkl} ||F_O| - |F_C||}{\sum_{hkl} |F_O|}$$

F<sub>O</sub>: beobachtete Strukturaktoren

F<sub>C</sub>: berechnete Strukturaktoren der entsprechenden Lösung

$R_{\text{cryst}}$ : Berechnung mittels für die Verfeinerung verwendeten Reflexen (Arbeitsdatensatz)

$R_{\text{free}}$ : Berechnung mittels von der Verfeinerung ausgenommenen Reflexen (Testdatensatz)

### **2.3.7 Erstellen von Abbildungen**

Für die schematische Darstellung von Strukturmodellen und Elektronendichten wurden die Programme BOBSCRIPT (Esnouf 1997) und PYMOL (DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002) [pymol.sourceforge.net](http://pymol.sourceforge.net)) verwendet. Die Berechnung der elektrostatischen Potentiale wurde entweder mit dem in das Programm PYMOL integrierten AMBER Algorithmus (Pearlman et al. 1995) oder dem Programm GRASP (Nicholls et al. 1991) durchgeführt. Chemische Strukturformeln der LHC-II Co-Faktoren wurden mit dem Programm Chemdraw erstellt.

## 3 Ergebnisse

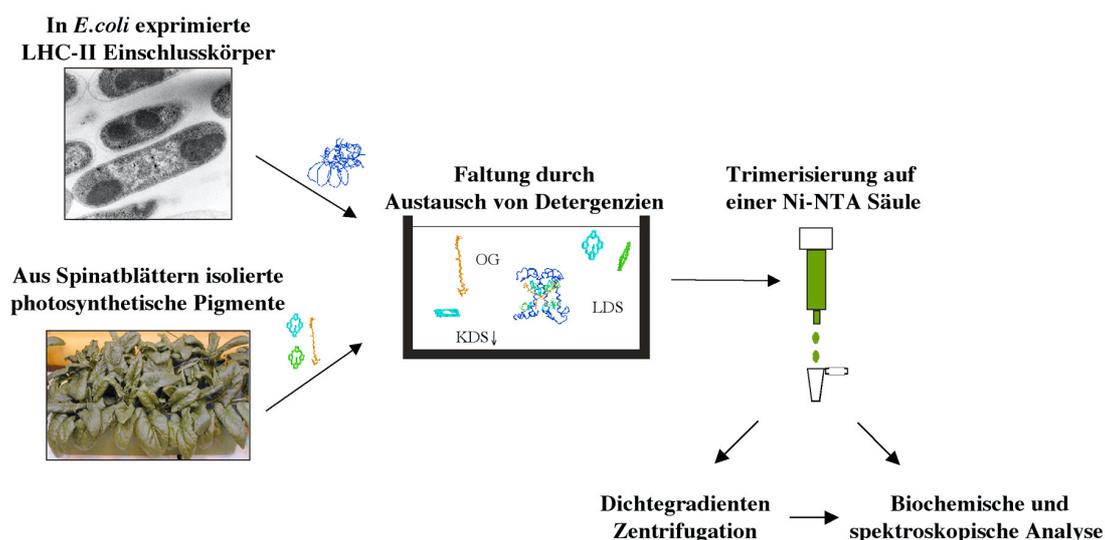
### 3.1 Klonierung und Expression der LHC-II Isoformen

Alle drei LHC-II Isoformen konnten in dieser Arbeit rekombinant hergestellt werden. Zur Expression der Lhcb1 Isoform wurde der *E. coli* Klon C3.2h verwendet, der das Lhcb1\*2 Gen aus der Erbse enthält und in einer Reihe vorangegangener Arbeiten verwendet wurde (Dilly-Hartwig et al. 1998; Rogl et al. 1998; Rogl 2000). Die Gene der Lhcb2 und Lhcb3 Isoformen von *Arabidopsis thaliana* wurden als cDNA vom Arabidopsis Resource Center (Ohio State University) zur Verfügung gestellt und wurden jeweils um eine C-terminale His6 Markierung erweitert. Hierbei musste an die Lhcb3 Isoform C-terminal die Sequenz CTCGAG zusätzlich angehängt werden. Dies verlängerte das expremierte Polypeptid um die Aminosäuren Leucin und Glutamat. Die Lhcb1 und Lhcb2 Isoformen konnten mit Hilfe des selben Vektors (pDS12, (Cashmore 1984)) in *E. coli* expremiert werden. Die Lhcb3 Isoform zeigte keine Expression mit diesem System und das Pet Expressionssystem wurde stattdessen verwendet. Alle Gene wurden vor und nach der Klonierung mittels Sequenzierung und Datenbankabgleich kontrolliert.

Alle Klone bildeten nach der Induktion mit Isopropyl-thio- $\beta$ -galaktosid (IPTG) Einschlusskörper und es konnte ein hohes Expressionsniveau erreicht werden. Das expremierte LHC-II wurde durch SDS-PAGE ganzer Zellen detektiert. Starke Banden bei ca. 26 kD zeigen die Expression der jeweiligen Isoform an. Ein schneller und zuverlässiger Indikator für vorhandene Einschlusskörper war auch ein weißes, statt bräunliches Zellpellet, das man nach Zentrifugation einer kleinen Probenmenge aus der Kultur erhielt. Alle drei Isoformen wurden auf vergleichbarem Niveau expremiert. Aus 1l *E. coli* Expressionskultur konnten 50-100 mg Einschlusskörper gereinigt werden.

### 3.2 Faltung reiner LHC-II Isoformen

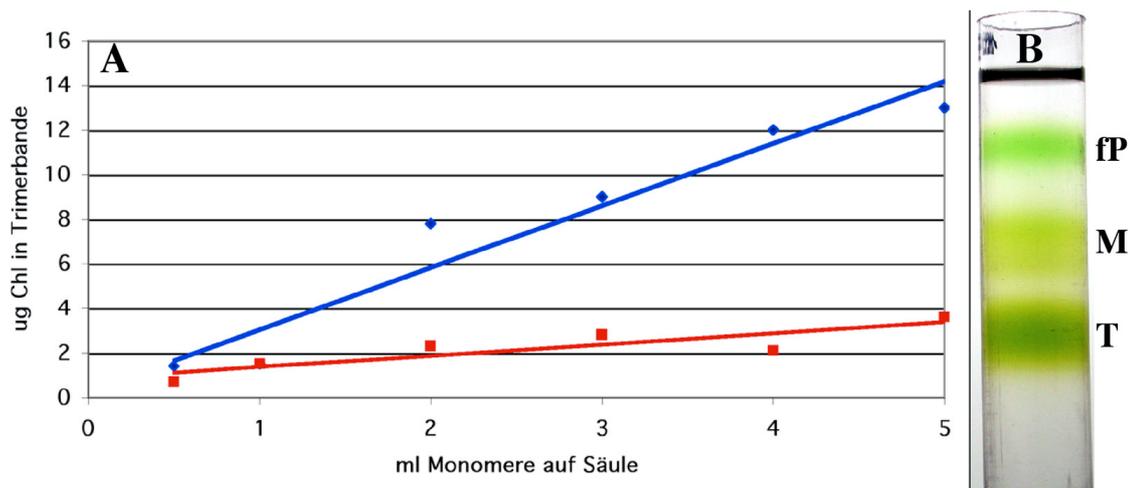
Aufgrund der fehlenden Pigmente kann nach heterologer Expression in *E. coli* nicht sofort ein funktioneller LHC-II Pigment/Proteinkomplex isoliert werden. Von verschiedenen Gruppen wurden daher Protokolle entwickelt um exprimierte Lhcb1 Einschlusskörper durch Zugabe von Pigmenten *in vitro* rückzufalten. Bei der gängigsten Methode wird das gereinigte Apoprotein aus den Einschlusskörpern mit Hilfe von Lithium-dodecylsulfat (LDS) aufgelöst und mit Pigmenten versetzt. Die Faltung zu monomeren Komplexen erfolgt anschließend durch den Austausch des Detergenz von Dodecylsulfat zu Octylglycosid (Paulsen et al. 1993). Lhcb1, welches eine C-terminale Histidin Markierung enthält, kann alternativ auch auf einer Ni-NTA Affinitätssäule rückgefaltet werden (Rogl et al. 1998). Dies hat den Vorteil, dass der Großteil von verunreinigenden Proteinen und überschüssiges freies Pigment nicht an die Säule binden und daher durch Waschen der Säule entfernt werden können. Ein weiterer Vorteil der Säulenfaltung ist die Möglichkeit, LHC-II Trimere direkt von der Säule zu eluieren. Ein Nachteil der Faltung auf der Säule ist die deutlich geringere Ausbeute im Vergleich zur Faltung in Lösung. Während dieser Arbeit wurde deshalb eine Kombination beider Methoden entwickelt. Diese ist schematisch in Abbildung 8 gezeigt.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Faltung von LHC-II aus Einschlusskörpern und photosynthetischen Pigmenten. Die Faltung der Monomere aus ihren Bestandteilen erfolgte durch Präzipitation des ionischen Detergenz LDS. Die Komplexe werden dabei durch das anwesende ungeladene Detergenz OG in Lösung gehalten. (Paulsen et al. 1993). Die anschließende Aufreinigung mittels einer Ni-NTA Säule entfernt überschüssige Pigmente und führt zur Trimerisierung des LHC-II (Rogl et al. 1998).

### 3.2.1 Rückfaltung von LHC-II im analytischen Ansatz

Für die neue Faltungsmethode wurden monomere LHC-II Komplexe in Lösung gefaltet und anschließend mittels einer Ni-NTA Säule gereinigt und trimerisiert. Zunächst wurden hierbei die gefalteten Monomere auf die Säule geladen und anschließend ein Großteil des freien Pigments und ungebundenes Protein durch Waschen mit Faltungspuffer entfernt. Anschließend wurde in einem zusätzlichen Waschschrift das Lipid Phosphatidyl-glycerol zugefügt, welches an LHC-II bindet und an der Bildung von LHC-II Trimeren beteiligt ist. Die Elution der Komplexe erfolgte mittels Imidazol. Als wichtige Faktoren für die Effizienz der Rückfaltung und Trimerisierung stellten sich die Art der verwendeten Pigmente und die Menge der auf die Säule aufgetragenen Monomere heraus.



**Abbildung 9:** A: Einfluss der zur Faltung verwendeten Pigmentmischung und des Volumens der auf die Ni-NTA Säule geladenen Monomerlösung auf die aus Dichtegradienten isolierte Trimermenge, Rot: Faltung mit Pigmenttotalextrakt, Blau: Faltung bei Verwendung von mit Carotinoiden angereicherten Chlorophyllen B: Oligomere Zustände einer auf Trimerausbeute optimierten analytischen Rückfaltung der Lhcb1 Isoform. fP: freies Pigment, M: Monomer, T: Trimer

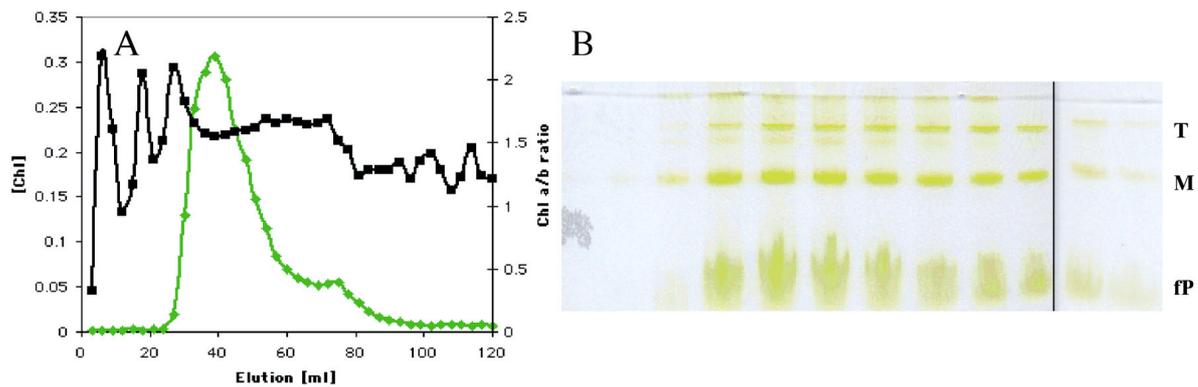
Wie Abbildung 9 zeigt konnte nach der Verwendung von Chlorophyllen, die mit Carotinoiden angereichert wurden, deutlich mehr Trimer auf den Saccharose-Dichtegradienten nachgewiesen werden als nach der Rückfaltung mit einem Pigmenttotalextrakt. Die Menge der spektroskopisch bestimmten Trimere steigt erwartungsgemäß näherungsweise linear mit dem Volumen der verwendeten Monomerlösung an. Da aber ein Verhältnis von

mehr als 3 ml Monomerlösung pro 1 ml Säulenmaterial zur Bildung von Aggregaten mit höherem Molekulargewicht führte, wurde für weitere Versuche und die präparative Faltung maximal dieses Verhältnis verwendet. Die Säulenelektion einer optimierten analytischen Faltung zeigte bei Auftrennung der oligomeren Zustände mittels Dichtegradientenzentrifugation deutlich mehr Trimer als Monomer. Da nur korrekt gefaltete Monomere den nativen trimeren Zustand einnehmen können, ist dies ein Indikator für die Qualität des gefalteten LHC-II Komplexes.

Die Analyse von LHC-II mit den meisten spektroskopischen und biochemischen Methoden benötigt nur Mengen im  $\mu\text{g}$  Bereich. Für die Charakterisierung der LHC-II Isoformen wurde daher ausschließlich ein analytisches Protokoll für die Faltung kleiner Mengen und deren Trimerisierung auf 1 ml Ni-NTA Säulen verwendet.

### **3.2.2 Rückfaltung von LHC-II im präparativen Ansatz**

Im Gegensatz zu den meisten spektroskopischen Untersuchungen werden für Kristallisationsexperimente deutlich größere Mengen Protein benötigt. Insbesondere für 3D Kristallisationsexperimente muss das Protein außerdem einen hohen Reinheits- und Homogenitätsgrad aufweisen und in relativ hohen Konzentrationen vorliegen. Im Fall von LHC-II sollten für die 3D Kristallisation außerdem Trimere verwendet werden, da sich alle bisher bekannten Kristallformen aus trimeren LHC-II bilden (Nußberger et al. 1993; Lamborghini 2002). Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, ein Protokoll zu entwickeln, mit dem rekombinantes, trimeres LHC-II in der Größenordnung von mehreren mg rückgefaltet werden kann. Hierzu wurde die optimierte analytische Rückfaltung mit anschließender Trimerisierung auf einer Ni-NTA Säule um den Faktor 50 erhöht. Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit und zur besseren Kontrolle von Fließgeschwindigkeit und Puffervolumen wurde die präparative Reinigung und Trimerisierung mit Hilfe einer FPLC Anlage durchgeführt.

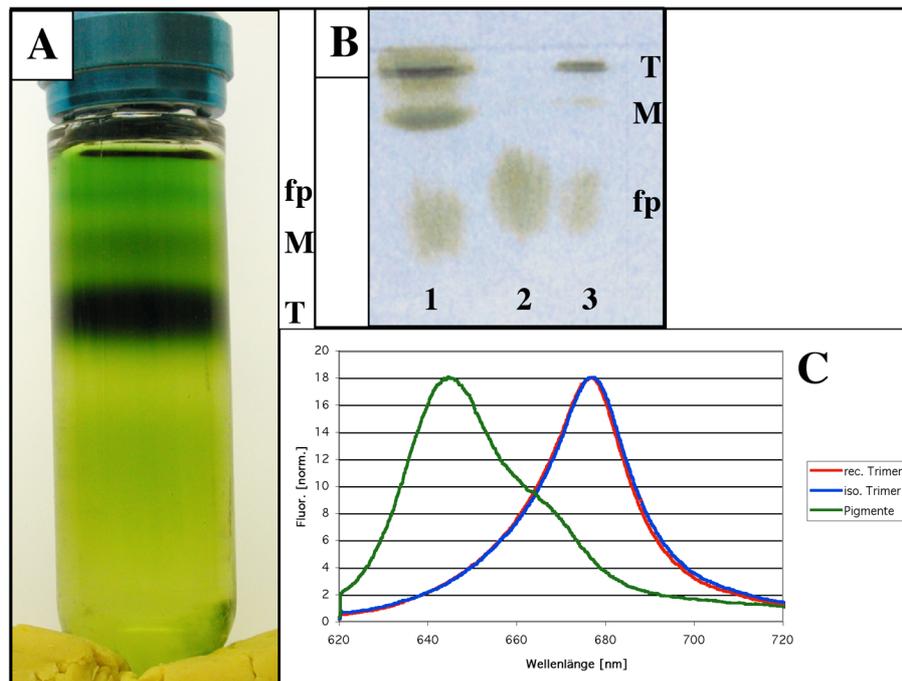


**Abbildung 10:** Elutionsprofil einer präparativen Säulentrimerisierung der Lhcb1 Isoform. A: spektroskopisch bestimmte Chlorophyllkonzentrationen (Grün) und Chla/Chlb Verhältnisse (Schwarz) einzelner Fraktionen. B: natives Gel zur Auftrennung von Trimer (T), Monomer (M) und freiem Pigment (fP) einzelner Fraktionen.

In Abbildung 10 ist das Elutionsprofil einer präparativen Säulentrimerisierung und der oligomere Zustand der einzelnen Fraktionen mittels eines Nativgels gezeigt. Der eluierte Protein/Pigment Komplex zeigte ein konstantes Chl a/b Verhältnis von ca. 1.5, welches gut mit dem für natives LHC-II gefundenen Verhältnis von 1.2-1.4 übereinstimmt. Der leicht höhere Wert von 1.5 ist dabei auf unspezifisch gebundenes oder freies Pigment zurückzuführen, wie auf dem Nativgel zu erkennen ist. Es handelt sich bei den eluierten Komplexen um eine Mischung aus Monomeren und Trimeren, aber auch eine geringe Menge an Dimeren konnte auftreten. Bei diesen Dimeren handelt es sich wahrscheinlich um unspezifische Aggregate, ähnlich zu den Dimeren die bei ausschließlicher Faltung auf der Säule auftreten können (Rogl 2000). Das Verhältnis von Monomeren und Trimeren wurde stark durch die Geschwindigkeit der Elution von der Säule beeinflusst. Hierbei hatte eine langsamere Elution einen höheren Anteil an Trimeren zur Folge. Ein optimaler Trimeranteil wurde mit einer Elutionsgeschwindigkeit von 0.3 ml/min erreicht. Der Zusammenhang zwischen Trimeranteil und Elutionsgeschwindigkeit deutet darauf hin, dass die Trimere erst während der Elution entstehen und sich nicht durch die dichte Packung auf der Säule bilden.

Das erhaltene Protein musste zur weiteren Reinigung aufkonzentriert werden. Hierzu wurden sowohl Ionenaustauschchromatographie, als auch die spezifische Eigenschaft von LHC-II in Anwesenheit von  $K^+$  Ionen zu präzipitieren getestet. Die Präzipitation und anschließende Resolubilisierung des Komplexes stellte sich dabei als deutlich effektiver heraus, stabilisierte außerdem die Trimere und wurde daher in allen folgenden Versuchen

verwendet. Die Trennung von LHC-II Monomeren und Trimeren erfolgte durch Zentrifugation in einer Saccharoselösung. Die Konzentration der Lösung, die Zentrifugationsgeschwindigkeit und Zentrifugationszeit wurden dabei so gewählt, dass sich Trimere deutlich von Monomeren und freiem Pigment trennten. Monomere und freies Pigment drangen nur wenig in die Lösung ein und waren somit im oberen Bereich, die schwereren Trimere dagegen im unteren Bereich der Lösung zu finden.



**Abbildung 11:** Präparative Faltung von rekombinantem LHC-II. A: Präparative Zentrifugation zur Trennung von freiem Pigment (fP), Monomer (M) und Trimer (T), B: Natives Gel zur Auftrennung der oligomeren Zustände von 1: der nach der Ni-NTA Säule durch Präzipitation konzentrierten Probe, 2: Überstand nach Zentrifugation, 3: Aufkonzentrierte für Kristallisationsexperimente verwendete Probe, C: Vergleich der Fluoreszenz-Emissions-Spektren nach Anregung bei 469 nm (normiert auf Fluoreszenzmaximum). Grün: für die Faltung verwendete Pigmentmischung, Blau: aus Erbsenblättern isoliertes LHC-II, Rot: mittels des präparativen Protokolls gefaltete Lhcb1 Isoform

Abbildung 11A zeigt eine solche Auftrennung in Monomer und Trimer. Die Trimerbande wurde abgenommen und wiederum durch Präzipitation und Resolubilisation konzentriert, um für Kristallisationsexperimente ausreichende Konzentrationen zu erreichen. Die Ausbeute einer Faltung betrug ca. 4.5-7.5 mg (1.5-2.5 mg gebundenes Chlorophyll) LHC-II Komplex, was auf Chlorophyll bezogen einer Effizienz von 6-10% entspricht. Wie anhand von nativen Gelen abgeschätzt werden konnte (Abbildung 11B), lag der Anteil der trimeren Komplexe bei über 90% in der aufgereinigten Probe. Das endgültige

Chl a/b Verhältnis der im großen Maßstab gefalteten Trimere lag bei 1.0-1.1 und deutet auf einen leichten Verlust von Chl a bei dieser Art der Faltung hin. Der intramolekulare Energietransfer von Chl b zu Chl a kann bei LHC-II mittels Fluoreszenz-Emissions Spektroskopie gemessen werden. Hierbei werden Chl b Moleküle anhand der verwendeten Wellenlänge spezifisch angeregt und die resultierende Emission gemessen. Anhand der Wellenlänge kann die Emission eindeutig Chl a oder Chl b zugeordnet werden. Da der Energietransfer von freien Pigmenten vernachlässigt werden kann, muss jede gemessene Chl a Emission durch einen intramolekularen Energietransfer entstanden sein und erlaubt daher eine Aussage über den funktionellen Zustand der LHC-II Komplexe. Wie am Vergleich der Fluoreszenz-Emissions-Spektren von gefalteten und nativen Komplexen zu erkennen (Abbildung 11C) trat bei den gefalteten Komplexen keine vermehrte Chl b Fluoreszenz um 650 nm auf. Auch das im präparativen Maßstab gefalteten LHC-II zeigt daher eine zum nativen LHC-II vergleichbare Effizienz des Energietransfers auf und ist voll funktionstüchtig.

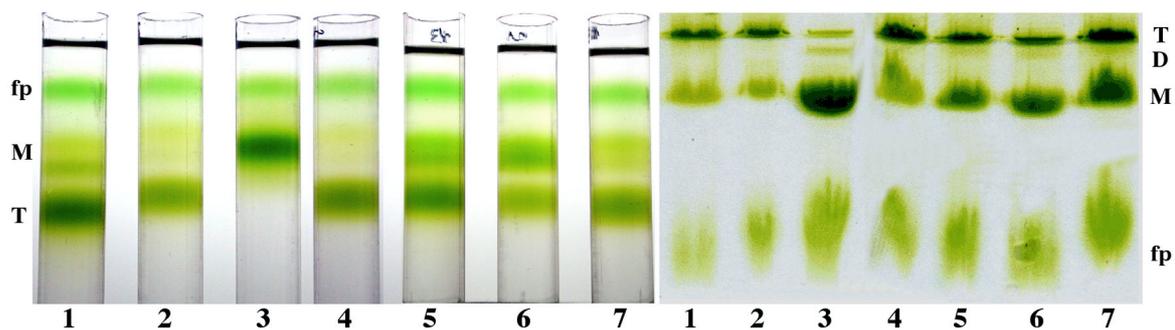
### **3.3 Charakterisierung der LHC-II Isoformen**

#### **3.3.1 Faltung der monomeren LHC-II Isoformen**

Alle drei LHC-II Isoformen konnten durch Austausch des ionischen Detergenz LDS mit dem nicht ionischen, milden Detergenz OG zu stabilen Pigment/Protein Komplexen rückgefaltet werden. Die Effizienz der Faltung wurde mittels partiell denaturierender Gelelektrophorese, welche freie Pigmente von Monomeren und Trimeren trennt, überprüft und war für alle Isoformen vergleichbar. Das Fehlen von Banden mit höherem Molekulargewicht zeigte, dass wie erwartet keine der Isoformen spontan Trimere unter diesen Bedingungen bildete.

### 3.3.2 Homo- und Heterotrimerere der drei LHC-II Isoformen

Alle drei LHC-II Isoformen konnten sowohl mit dem analytischen, wie auch mit dem präparativen Protokoll gefaltet und trimerisiert werden. Zur Charakterisierung der Isoformen wurde jedoch nur das schnellere analytische Protokoll verwendet. Der oligomere Zustand wurde anschließend mittels nativer Gelelektrophorese und Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation untersucht.

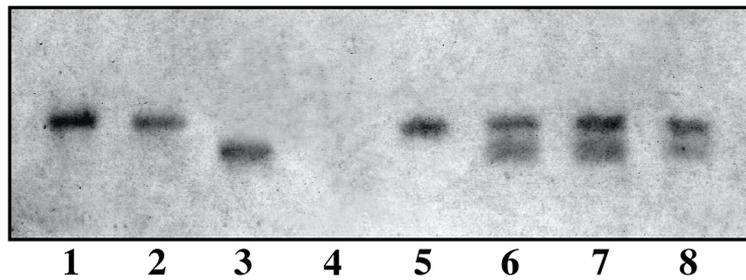


**Abbildung 12:** Oligomerer Zustand der LHC-II Isoformen. Reine monomere Isoformen, 1:1 Mischungen zweier Isoformen oder eine 1:1:1 Mischung aller Isoformen wurden auf einer Ni-NTA Säule mittels des analytischen Protokolls oligomerisiert. Die eluierten Komplexe wurden mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (links) oder nativer Gelelektrophorese (rechts) auf ihren oligomeren Zustand untersucht. 1) Lhcb1, 2) Lhcb2, 3) Lhcb3, 4) Lhcb1/Lhcb2, 5) Lhcb1/Lhcb3, 6) Lhcb2/Lhcb3, 7) Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3

Wie in Abbildung 12 gezeigt, bildete sich für die Lhcb1 und Lhcb2 Isoformen ein klarer Überschuss an Homotrimeren, wohingegen die Lhcb3 Isoform nur eine sehr schwache Trimerbande auf dem Gel aufzeigte. Dieses Lhcb3 Homotrimer konnte nur nachgewiesen werden, wenn die Komplexe innerhalb von 30 Minuten nach der Elution von der Säule aufgetragen wurden. Zusätzlich zur dominanten Monomerbande und der schwachen Trimerbande konnte für Lhcb3 auch eine Dimerbande festgestellt werden, bei der es sich aber wahrscheinlich um unspezifische Aggregation von Monomeren handelte. Im Gegensatz zum partiell denaturierenden Gel konnten auf dem Saccharosegradienten keinerlei Lhcb3 Oligomere festgestellt werden. Da die Saccharose-Dichtegradienten Zentrifugation aufgrund des fehlenden SDS die schonendere Methode zum Isolieren von LHC-II Trimeren darstellt, ist dies ein klarer Hinweis auf die niedrige Stabilität der Lhcb3 Homotrimeren. Die manchmal auf dem Gel zu erkennende und im Vergleich zu Lhcb1 und Lhcb2 sehr geringe Menge an Lhcb3 Homotrimer zerfällt demnach schon nach ca. einer Stunde.

Pflanzen enthalten nicht nur LHC-II Homotrimere, sondern auch Heterotrimere in verschiedenen Kombinationen. Um die *in vitro* Bildung von Heterotrimeren zu untersuchen, wurden daher alle möglichen Kombinationen von Isoformen in gleichen Anteilen auf kleine Ni-NTA Säulen geladen und trimerisiert. Das Verhältnis der gebildeten Monomere und Trimere wurde anschließend mittels nativer Gelelektrophorese und Dichtegradienten-Zentrifugation verglichen (Abbildung 12). Eine Mischung von Lhcb1 und Lhcb2 ergab dabei eine Trimerbande von vergleichbarer Intensität wie reines Lhcb1 und Lhcb2. Alle Kombinationen die Lhcb3 enthielten (Lhcb1/Lhcb3, Lhcb2/Lhcb3, Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3) ergaben jeweils einen größeren Anteil an Monomeren als die Ansätze in denen diese Isoform nicht enthalten war, wenn auch die Trimerbande immer vorherrschte. Lhcb3 hat demnach auch in Anwesenheit der anderen zwei Isoformen eine starke Tendenz zur monomeren Form.

Zur weiteren Charakterisierung wurden aus Mischungen von Isoformen gebildete Trimere mittels denaturierender Gelelektrophorese auf ihre Zusammensetzung untersucht. Die Trimere wurden zunächst mittels Gradientenzentrifugation gereinigt und anschließend alle möglicherweise verbliebenen Monomere mittels nativer Gelelektrophorese entfernt. Die Trimere wurden aus dem Gel extrahiert, durch kochen denaturiert und mittels Gelelektrophorese (Schägger und von Jagow 1987) untersucht. Da die Lhcb3 Isoform keine Trimere bildete, wurden Monomere und als zusätzliche Kontrolle eine aus Trimerhöhe des Lhcb3 Gradienten gewonnene Saccharosefraktion verwendet.



**Abbildung 13:** Zusammensetzung der rückgefalteten LHC-II Trimere. Reine monomere Isoformen, 1:1 Mischungen zweier Isoformen oder eine 1:1:1 Mischung aller Isoformen wurden auf einer Ni-NTA Säule mittels des analytischen Protokolls oligomerisiert. Trimere wurden mittels Saccharose-Dichtegradienten Zentrifugation gereinigt und restliches Monomer auf einer nachfolgenden nativen Gelelektrophorese entfernt. Die Trimere, im Fall von Lhcb3 Monomere und eine Lhcb3 Kontrolle von der Höhe der Trimerbande auf dem Saccharose-Dichtegradienten wurden aus dem nativen Gel extrahiert und vor der SDS-Gelelektrophorese denaturiert. 1) Lhcb1, 2) Lhcb2, 3) Lhcb3, 4) Lhcb3 Kontrolle, 5) Lhcb1/Lhcb2, 6) Lhcb1/Lhcb3, 7) Lhcb2/Lhcb3, 8) Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3

Wie in Abbildung 13 zu erkennen, konnten Lhcb1 und Lhcb2 aufgrund ihres nahezu identischen Molekulargewichts nicht getrennt werden. Die Lhcb3 Isoform hat dagegen ein um 0.8 kDa niedrigeres Molekulargewicht und setzte sich daher klar von den anderen Isoformen ab. Alle denaturierten Trimere aus Mischungen mit der Lhcb3 Isoform zeigen eine klare zweite Bande mit leicht geringerem Molekulargewicht. Der Ursprung dieser Banden aus Verunreinigungen mit ungefalteten Apoprotein oder monomeren Lhcb3 kann aufgrund der vorherigen Aufreinigung mittels nativer Gelelektrophorese und der negativen Kontrolle ausgeschlossen werden. Da Lhcb3 keine stabilen Homotrimere bildet, muss Lhcb3 demnach sowohl mit Lhcb1 als auch mit Lhcb2 Trimere gebildet haben. In allen Mischungen war die Intensität der Lhcb3 Bande deutlich geringer als die von Lhcb1 und Lhcb2. Dies liegt wahrscheinlich an der starken Tendenz von Lhcb1 und Lhcb2 Homotrimere zu bilden, so dass weniger von ihnen zur Bildung von Heterotrimeren mit Lhcb3 zur Verfügung steht.

### 3.3.3 Pigmentstoichiometrie der drei LHC-II Isoformen

Aus Pflanzenthylakoiden isoliertes LHC-II enthält Chl a, Chl b und hauptsächlich drei Carotinoide (Lutein, Neoxanthin und Violaxanthin). Die genaue Art und Anzahl der gebundenen Pigmente ist von besonderer Bedeutung für die Funktion des LHC-II. Funktionelle Besonderheiten der Isoformen könnten daher auch eine unterschiedliche Pigmentbindung erfordern. Tatsächlich wurde für Lhcb2 aufgrund indirekter Daten die Bindung von zusätzlichem Chlorophyll a postuliert (Walters und Horton 1999). Im Verlauf dieser Arbeit wurden deshalb die Pigmentbindungseigenschaften der reinen Isoformen mittels HPLC-Analyse von rekombinant hergestellten Monomeren und Trimeren untersucht. Da LHC-II bekanntermaßen zwei Moleküle Lutein pro Monomer enthält, (Simpson und Knoetzel 1996) wurde dieses Carotinoid als interner Standard zur Quantifizierung der Anzahl von Pigmenten pro Polypeptid verwendet. Die Ergebnisse der HPLC-Analyse von vier unabhängigen Faltungsexperimenten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

	<b>Nx</b>	<b>Vx</b>	<b>Lu</b>	<b>Chlb</b>	<b>Chla</b>	<b>Chla/b</b>
<b>Lhcb1 M</b>	<b>0.86±0.05</b>	<b>0.11±0.02</b>	<b>2</b>	<b>7.06±0.36</b>	<b>7.82±0.31</b>	<b>1.11</b>
<b>Lhcb2 M</b>	<b>0.80±0.09</b>	<b>0.14±0.02</b>	<b>2</b>	<b>6.90±0.36</b>	<b>8.01±0.08</b>	<b>1.16</b>
<b>Lhcb3 M</b>	<b>0.72±0.05</b>	<b>0.14±0.01</b>	<b>2</b>	<b>6.13±0.28</b>	<b>8.32±0.26</b>	<b>1.36</b>
<b>Lhcb1 T</b>	<b>0.86±0.02</b>	<b>0.07±0.01</b>	<b>2</b>	<b>7.72±0.15</b>	<b>8.49±0.24</b>	<b>1.10</b>
<b>Lhcb2 T</b>	<b>0.80±0.08</b>	<b>0.07±0.01</b>	<b>2</b>	<b>7.58±0.28</b>	<b>8.48±0.28</b>	<b>1.12</b>

**Tabelle 1:** Stochiometrie der an die LHC-II Isoformen gebundenen Pigmente. Monomere und Trimere der gefalteten Isoformen wurden mittel Saccharose-Dichtegradienten Zentrifugation isoliert und mittels HPLC Analyse auf relative Pigmentzusammensetzung untersucht. Läufe mit gereinigten Standardpigmenten dienten als Vergleich zur Bestimmung der absoluten Pigmentmengen. Gezeigte Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 unabhängigen Faltungsexperimenten und sind auf 2 Luteine pro Monomer genormt. M: Monomer, T: Trimer, Nx: Neoxanthin, Vx: Violaxanthin, Lu: Lutein

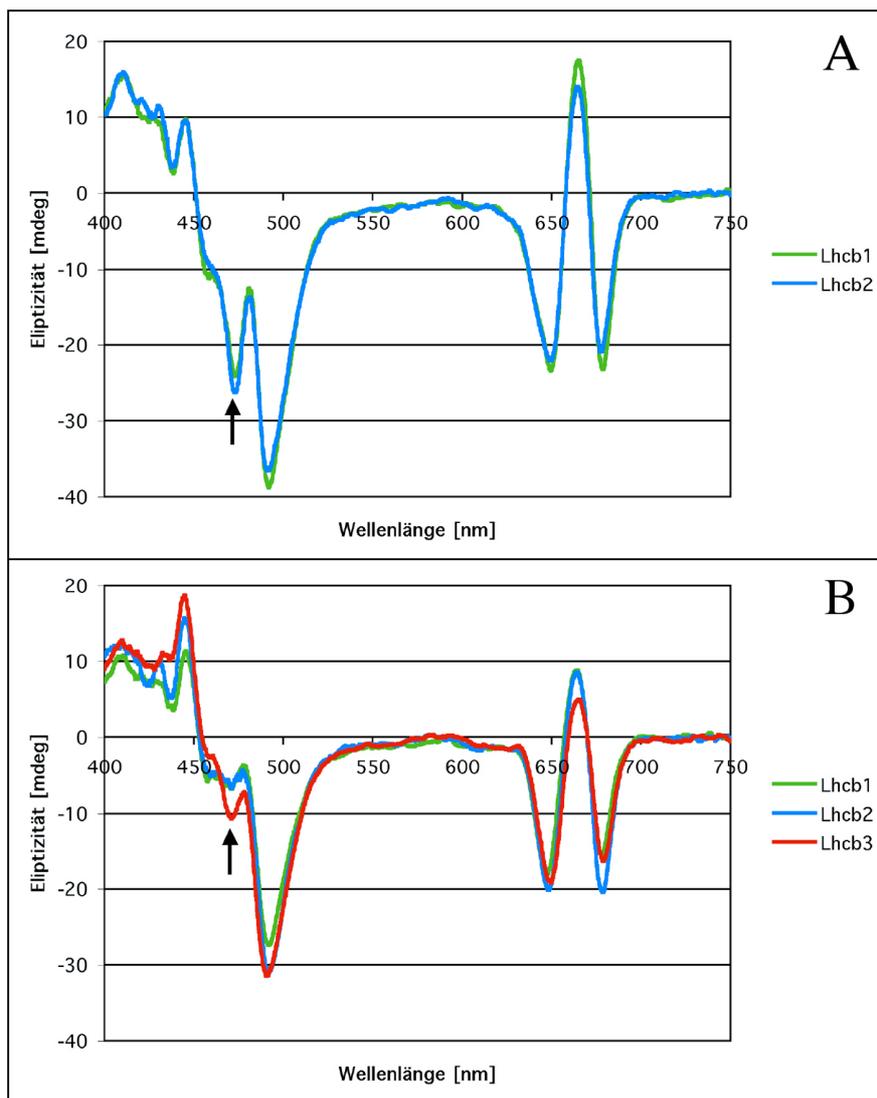
Insgesamt waren die Pigmentstochiometrien aller Isoformen zueinander ähnlich und nah an den für das native LHC-II und rekombinantes Lhcb1 (12-15 Chlorophylle und 3-4 Carotinoide pro Monomer) publizierten Werten.

(Butler und Kühlbrandt 1988) (Rogl und Kühlbrandt 1999) (Yang et al. 1999). Bis auf die häufig bei gefaltetem Protein unbesetzte Violaxanthinbindestelle stimmten die Pigmentstochiometrien innerhalb der Fehlertoleranz gut mit den in der Struktur erkennbaren Pigmenten überein.

Das Chl a/b Verhältnis der gefalteten Lhcb1 und Lhcb2 Trimere war mit 1.10 und 1.12 nahezu identisch. Die gemessene Anzahl der Chlorophylle betrug 16 in den Trimeren und 14-15 in den Monomeren. Dieser hohe Chlorophyllgehalt ist wahrscheinlich auf kleine Verunreinigungen mit unspezifisch gebundenem Chl a und Chl b zurückzuführen, welche auf dem Dichtegradienten nicht entfernt wurden. Während der Pigmentgehalt von Lhcb1 und Lhcb2 annähernd gleich war, zeigte Lhcb3 klare Unterschiede. Der Gehalt an Neoxanthin war für Lhcb3 leicht erniedrigt, blieb aber innerhalb der Standardabweichung der Experimente. Das Chl a/b Verhältnis von 1.36 war signifikant höher und rührte größtenteils von dem Verlust eines Chl b Moleküls her. Da aber auch der Gehalt an Chl a leicht erhöht war, ist es schwer zu unterscheiden ob das unterschiedliche Chl a/b Verhältnis wirklich von dem Verlust eines Chl b herrührt oder von einer teilweise gemischte Besetzung einzelner Bindungstaschen herrührt. Da diese in Untersuchungen von Mutanten und Wildtyp von Lhcb1 nicht auftrat (Rogl und Kühlbrandt 1999; Hobe et al. 2003), erscheint eine gemischte Besetzung auch für Lhcb3 unwahrscheinlich.

### **3.3.4 Spektroskopische Eigenschaften der LHC-II Isoformen**

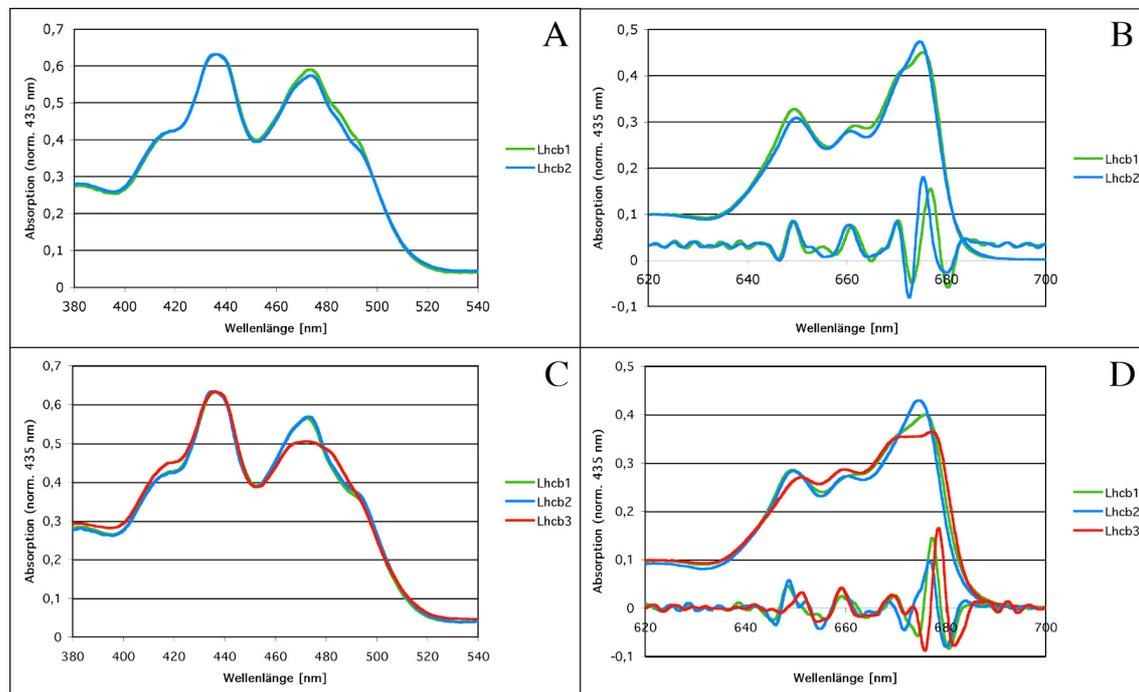
Nicht nur die Art und Anzahl der gebundenen Pigmente, sondern auch deren Organisation innerhalb des Pigment-Protein Komplexes ist von besonderer Bedeutung für die Funktion von LHC-II. Mittels verschiedener spektroskopischer Methoden lässt sich die genaue Pigmentorganisation der LHC-II Komplexe untersuchen. Das CD-Spektrum von LHC-II ist z.B. ein sensibler Monitor für intramolekulare Pigment-Pigment Interaktionen und ermöglicht zusätzlich die Unterscheidung von monomerem und trimerem LHC-II anhand eines trimerspezifischen Signals bei 472 nm (Hobe et al. 1994).



**Abbildung 14:** CD-Spektren der trimeren (A) und monomeren (B) LHC-II Isoformen bei 4° C.. Monomere und Trimere wurden mittel Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt und mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Alle Proben wurden vor Aufnahme der Spektren auf gleiche OD437 eingestellt. Die Spektren sind nicht normiert. Der kleine Pfeil zeigt das in Hobe et al. dem trimeren LHC-II zugeordnete Signal.

Die CD-Spektren der monomeren und trimeren LHC-II Isoformen (Abbildung 14) ähneln sich sehr und sind vergleichbar zum Spektrum von nativem LHC-II. Diese sind damit ein weiterer Beweis für die korrekte Faltung aller Isoformen. Besonders die Spektren von Lhcb1 und Lhcb2 sind fast identisch und die Trimere zeigen den erwarteten Peak bei 472 nm. In dieser Region liegt auch der größte Unterschied zwischen den Monomeren von Lhcb3 und denen der anderen Isoformen. Dieses zusätzliche negative Signal von Lhcb3 liegt allerdings bei 470 nm. Da Lhcb3 nach Gradientenzentrifugation keinerlei Trimere enthielt, muss dieses Signal eine andere Ursache haben. Ein

Erklärung wären Pigment-Pigment Interaktionen welche zwar in Lhcb3 aber nicht in Lhcb1 und Lhcb2 auftreten.

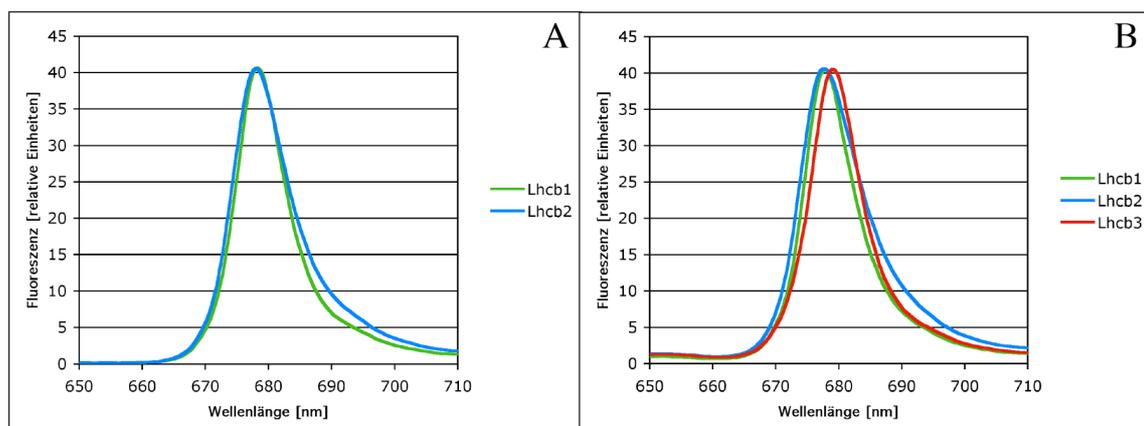


**Abbildung 15:** Tieftemperatur-Absorptionsspektren (77K) der monomeren (C und D) und trimeren (A und B) LHC-II Isoformen. Monomere und Trimere wurden mittel Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt und mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Für eine bessere Übersichtlichkeit ist nur der blaue (A und C) und rote (B und D) Bereich des sichtbaren Spektrums gezeigt. Alle Spektren sind auf 437 nm normiert. Zur besseren Auflösung der spektralen Substruktur wurde vom roten Bereich des Spektrums zusätzlich die vierte Ableitung errechnet.

Auch die Tieftemperatur-Absorptionsspektren (Abbildung 15) spiegelten die hohe Homologie der LHC-II Isoformen wieder. Wiederum zeigte Lhcb3 die größten Unterschiede zu den anderen Isoformen. In der Chl a dominierten Region von 670 nm bis 680 nm zeigten zwei Subbanden unterschiedliche relative Höhen im Vergleich zu den anderen Isoformen. Von besonderem Interesse ist die spektrale Region um 470 nm, in der auch die Unterschiede im CD-Spektrum auftraten. Hier ist die Absorption von Lhcb3 im Vergleich zu den anderen Isoformen deutlich reduziert. Die Absorption in dieser Region wird von Chlorophyll b und Carotinoiden dominiert. Da Lhcb3 aber auch im roten Bereich um 650 nm, in dem Carotinoide nicht absorbieren, eine deutlich geringere Absorption zeigt, weisen diese Unterschiede eher auf den Verlust von Chlorophyll b hin. Dies ist konsistent mit den Ergebnissen der HPLC-Analyse und deutet wie diese auf ein fehlendes Chlorophyll b Molekül in Lhcb3 hin.

Zusätzliche Unterschiede zwischen den drei Isoformen konnten durch die vierte Ableitung der Absorptionsspektren aufgelöst werden. Besonders im Absorptionsbereich von Chlorophyll a zwischen 670 nm und 680 nm sind die Spektren der Isoformen deutlich gegeneinander verschoben. Während die monomeren und trimeren Spektren von Lhcb2 im Vergleich mit denen von Lhcb1 um 1-1.5 nm blauverschoben sind, zeigte das monomere Lhcb3 Spektrum eine Rotverschiebung um ca. 1.5 nm. Am roten Ende des LHC-II Spektrums absorbierten die drei LHC-II Isoformen daher Licht verschiedener Energie, mit Lhcb2 bei kürzeren und Lhcb3 bei längeren Wellenlängen als Lhcb1.

Auch die nach dem analytischen Protokoll gefalteten Komplexe wurden mittels Fluoreszenz-Emissions Spektroskopie auf intermolekularen Energietransfer getestet. Sowohl Monomere wie auch Trimere der drei Isoformen zeigten effizienten Energietransfer ohne verbleibende Chl b Emission und waren daher völlig intakt und korrekt gefaltet (Abbildung 16).



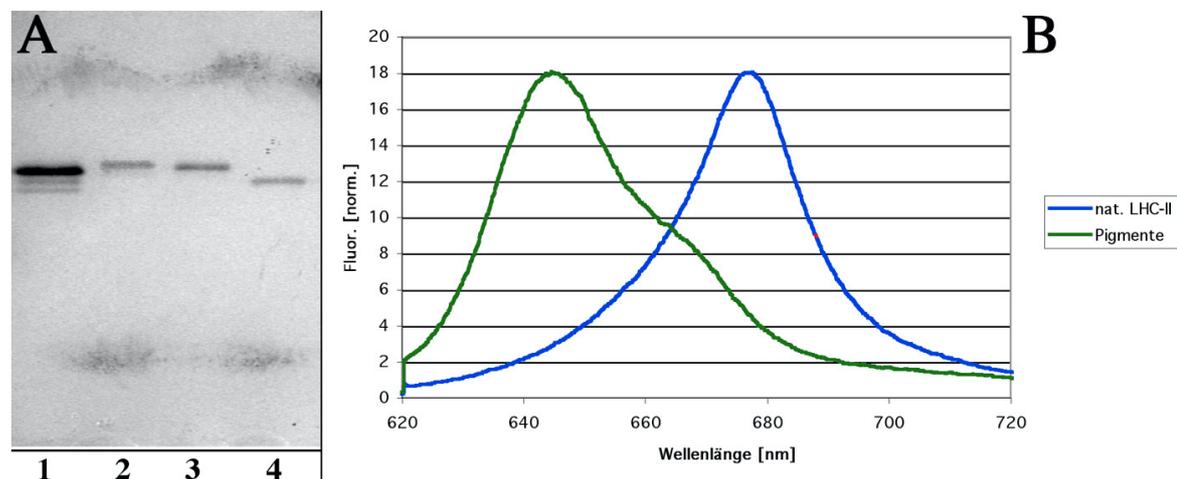
**Abbildung 16:** Tieftemperatur Fluoreszenz-Emissions Spektren (77K) der mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigten trimeren (A) und monomeren (B) LHC-II Isoformen. Die Anregung erfolgte im Chlorophyll b Maximum bei 469 nm, einem spektralen Bereich in dem Chlorophyll a Absorption vernachlässigbar ist. Spektren sind auf Fluoreszenzmaximum normiert.

Interessanterweise zeigten sich jedoch kleine Unterschiede in der Emission der Isoformen. Das Emissionsmaximum von Lhcb1 lag bei 678 nm und hatte eine Halbwertsbreite von 9.5 nm für Monomere und 9.0 nm für Trimere. Das Emissionssignal der Lhcb2 Isoform hatte dasselbe Maximum, aber eine 2 nm höhere Halbwertsbreite als Lhcb1. Dieser Anstieg in der Emissionsbreite könnte auf eine fehlerhafte Faltung zurückzuführen sein. Da aber keinerlei Chl b Emission detektiert wurde und die Verbreiterung sowohl in Monomeren als

auch in Trimeren auftrat, scheint sie eher ein Charakteristikum der Lhcb2 Isoform zu sein. Wiederum zeigten sich die deutlichsten Unterschiede bei den Lhcb3 Monomeren, deren Emission im Vergleich zu den anderen Isoformen um 1.5 nm rotverschoben war.

### 3.4 Reinigung von nativem LHC-II aus Erbsenblättern

Die Reinigung von LHC-II aus Erbsenblättern wurde mit ähnlichen Ergebnissen und Reproduzierbarkeit wie in (Lamborghini 2002) beschrieben durchgeführt. Allerdings wurde, wo immer möglich die Aufreinigung bei diffusem Licht durchgeführt, um Schäden durch direkte Lichteinstrahlung zu verhindern. Auch wurde für die meisten der durchgeführten Kristallisationsexperimente eine höhere Proteinkonzentration benötigt, als durch direktes Solubilisieren des Proteins in NG zu erreichen ist. Daher wurde das Protein nachdem es bei einer Konzentration von 3.5mg/ml Chlorophyll in 1%  $\beta$ -NG solubilisiert wurde, für vier Stunden bei 100000 rpm zentrifugiert. Der leicht grüne Überstand wurde abgenommen und das Protein auf die Endkonzentration von 5.5 mg/ml in 1% NG eingestellt.

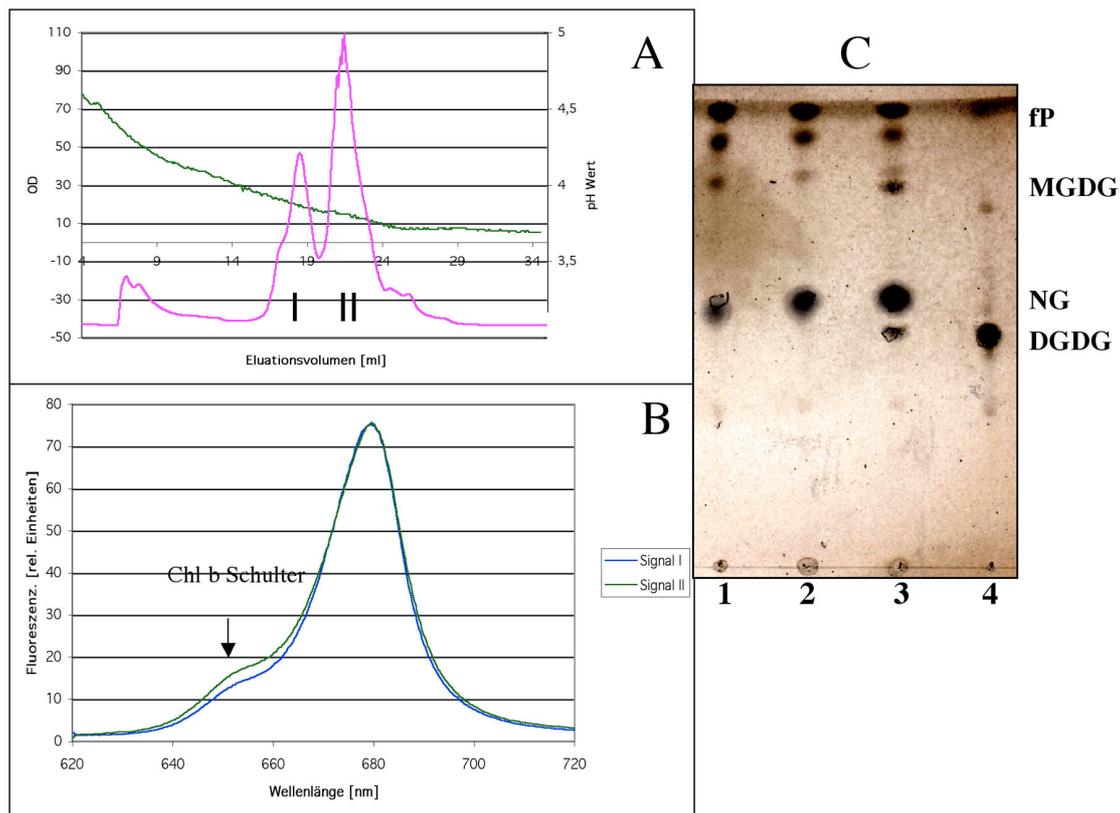


**Abbildung 17:** Reinheit und Funktion des aus Erbsenblättern isolierten LHC-II. A: SDS/Harnstoff Gel (Schägger und von Jagow 1987) des aus Erbsen isolierten nativen LHC-II (1) und der nach dem präparativen Protokoll gefalteten rekombinanten Isoformen (Lhcb1 (2), Lhcb2 (3) und Lhcb3 (3)). B: Raumtemperatur Fluoreszenz-Emissions Spektrum nach Anregung von Chlorophyll b (469 nm) von isolierten photosynthetischen Pigmenten (rot) und einer für die Kristallisation verwendeten nativen LHC-II Probe (blau).

Wie anhand des SDS-Gels und des Fluoreszenz-Emissions-Spektrums in Abbildung 17 zu sehen, konnte funktionelles, aktives LHC-II mit großer Reinheit gewonnen werden. Auf dem Gel waren unterhalb der LHC-II Hauptbande, die mindestens 90% des Gesamtproteins ausmachte, zwei weitere Banden erkennbar. Nach einem Vergleich mit den rekombinanten Isoformen aus *Arabidopsis* handelte es sich bei der Hauptbande wahrscheinlich um eine Mischung aus Lhcb1 und Lhcb2 mit einem klaren Überschuss an Lhcb1. Da aber auch ein leicht unterschiedliches Laufverhalten der LHC-II Proteine von *Arabidopsis* und Erbse möglich ist, könnte es sich bei den zwei unteren Banden auch um Lhcb2 und Lhcb3 gehandelt haben.

### **3.4.1 Chromatographische Fokussierung des nativen LHC-II**

Alternativ zur Verwendung von rekombinanten LHC-II Isoformen wurde auch versucht natives LHC-II nach Isoformen oder unterschiedlichen Heterotrimeren aufzutrennen. Ein Problem bei dieser Vorgehensweise war allerdings die große Ähnlichkeit der verschiedenen Isoformen, welche eine Auftrennung sehr schwierig machte. Eine Methode, die im analytischen Maßstab beschrieben wurde (Tremolieres et al. 1994; Jackowski et al. 2001; Jackowski und Pielucha 2001) ist die native isoelektrische Fokussierung in Acrylamidgelen, welche Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes auftrennt. Da das Protein nicht aus dem Gel extrahiert werden muss, wurde für die präparativen Zwecke dieser Arbeit allerdings eine auf ähnlichen Prinzipien beruhende chromatographische Methode verwendet. Bei dieser chromatographischen Fokussierung wird das Protein an eine Säule mit einem starken Ionenaustauschermaterial gebunden und anschließend mittels eines pH Gradienten eluiert.



**Abbildung 18:** Chromatographische Fokussierung von nativen LHC-II. A: Elutionsprofil von nativen LHC-II. LHC-II wurde aus Erbsenblättern isoliert und an eine auf pH-Wert von 4.5 equilibrierte MONO P Säule (Pharmacia) gebunden. Elution erfolgte mittels auf einen pH-Wert von 3.7 eingestelltem Polybuffer74 (Pharmacia). B: Raumtemperatur Fluoreszenz-Emissions-Spektren nach Anregung von Chlorophyll b (469 nm) der zwei Elutionssignale. C: Lipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie. 1: Elutionssignal I, 2: Elutionssignal II, 3: natives LHC-II, 4: für Kristallisationsexperimente verwendetes aus Spinatblättern isoliertes DGDG.

In Abbildung 18 ist das Elutionsprofil von nativem LHC-II der Erbse in einem pH Bereich von 4.5-3.7 gezeigt. Der Verlauf zeigt zunächst eine Spitze, deren Position annähernd mit dem Volumen der Säule übereinstimmt und daher von Probe stammt, die nicht an die Säule gebunden hat. Native Gelelektrophorese bestätigte, dass es sich bei dieser Spitze um freie Pigmente handelte, die wahrscheinlich von aufgrund der extremen pH-Werte denaturierten Komplexen stammt. Auf dieses Anfangssignal folgten zwei Hauptspitzen, die bei dem pH-Werten 3.81 und 3.72 eluiert wurden. Das zweite Signal zeigte außerdem eine Schulter auf und bestand daher wahrscheinlich aus zwei Subspezies, welche nur unzureichend getrennt wurden. Wie die Analyse mittels Dünnschichtchromatographie zeigte, waren auf der Säule ein Großteil der Lipide entfernt worden. Insgesamt hatte das mittels chromatographischer Fokussierung erhaltene Elutionsprofil große Ähnlichkeit mit der Aufreinigung von LHC-II mittels Anionen-Austausch-Chromatographie (Nußberger et al.

1993; Lamborghini 2002). Wie bei diesen handelte es sich bei beiden Fraktionen eindeutig um LHC-II Komplexe, die allerdings nicht klar verschiedenen Isoformen zugeordnet werden konnten. Wie an den Fluoreszenz-Emissions Spektren zu erkennen, zeigten beide Fraktionen außerdem eine klare Chl b Emission bei 650 nm auf und enthielten damit, wahrscheinlich aufgrund der entfernten Lipide und der niedrigen pH-Werte, teilweise denaturiertes Protein.

### **3.5 Kristallisation von LHC-II**

Die ersten 3D Kristalle von LHC-II wurden schon vor 17 Jahren beschrieben (Kühlbrandt 1987). Innerhalb dieser Zeit wurde eine Vielzahl von Kristallisationsexperimenten durchgeführt und eine Reihe von Kristallen unter verschiedensten Bedingungen gezüchtet. Bei der Kristallform mit den besten Beugungseigenschaften handelte es sich um dünne hexagonale Platten. Diese beugten, unter Verwendung von Synchrotronstrahlung, bis zu einer relativ hohen Auflösung von 3.2 Å. Die Kristalle wiesen jedoch eine hohe Mosaizität auf und die Beugung war zudem anisotrop, so dass in bestimmten Orientierungen nur Reflexe bis ca. 4.5 Å beobachtet wurden. Von diesen Kristallen gesammelte Daten führten zu einer ersten Elektronendichtekarte, die allerdings nicht eindeutig interpretiert werden konnte (Lamborghini 2002). Verschiedene Ansätze die Beugungseigenschaften der hexagonalen Kristallform des LHC-II zu verbessern wurden in dieser Arbeit verfolgt. Bis Daten von ausreichender Qualität für die röntgenkristallographische Strukturaufklärung erhalten werden konnten, wurden insgesamt mehr als 100000 Kristallisationsexperimente mit verschiedenen LHC-II Präparationen unter einer Vielzahl von Bedingungen durchgeführt.

#### **3.5.1 Verwendung von reinen LHC-II Isoformen**

Von entscheidender Bedeutung für die Bildung von hochgeordneten Kristallen ist die verwendete Proteinprobe. Diese sollte möglichst rein, stabil und homogen sein. Da natives LHC-II aus verschiedenen Isoformen besteht, stellt

---

theoretisch vor allem die Heterogenität der Probe ein Problem dar. Während dieser Arbeit wurden zwei Ansätze verfolgt, reine LHC-II Isoformen herzustellen und zu kristallisieren.

### **3.5.1.1 Aufreinigung mittels chromatographischer Fokussierung**

Wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, wurden mittels chromatographischer Fokussierung zwei Fraktionen erhalten. Diese konnten zwar keinen Isoformen zugeordnet werden, stellen jedoch eindeutig LHC-II Komplexe mit unterschiedlicher Ladungsverteilung dar und wurden unter den für natives LHC-II und rekombinantem Protein entwickelten Bedingungen auf ihre Kristallisierbarkeit getestet. Da die Aufreinigung mittels chromatographischer Fokussierung einen Großteil der Lipide entfernte, wurden den Proteinproben vor der Kristallisation DGDG zugegeben. Hierbei wurden Lipid/Protein Verhältnisse (M/M) von 0 bis 30 getestet. Trotz Zugabe von DGDG konnte jedoch keine der beiden Fraktionen kristallisiert werden. Da beide Präparationen eine Verringerung des Energietransfers aufwiesen, ist dies wahrscheinlich auf eine teilweise Denaturierung des Proteins zurückzuführen, die trotz der eventuell verbesserten Homogenität der Probe eine Kristallisation verhinderte.

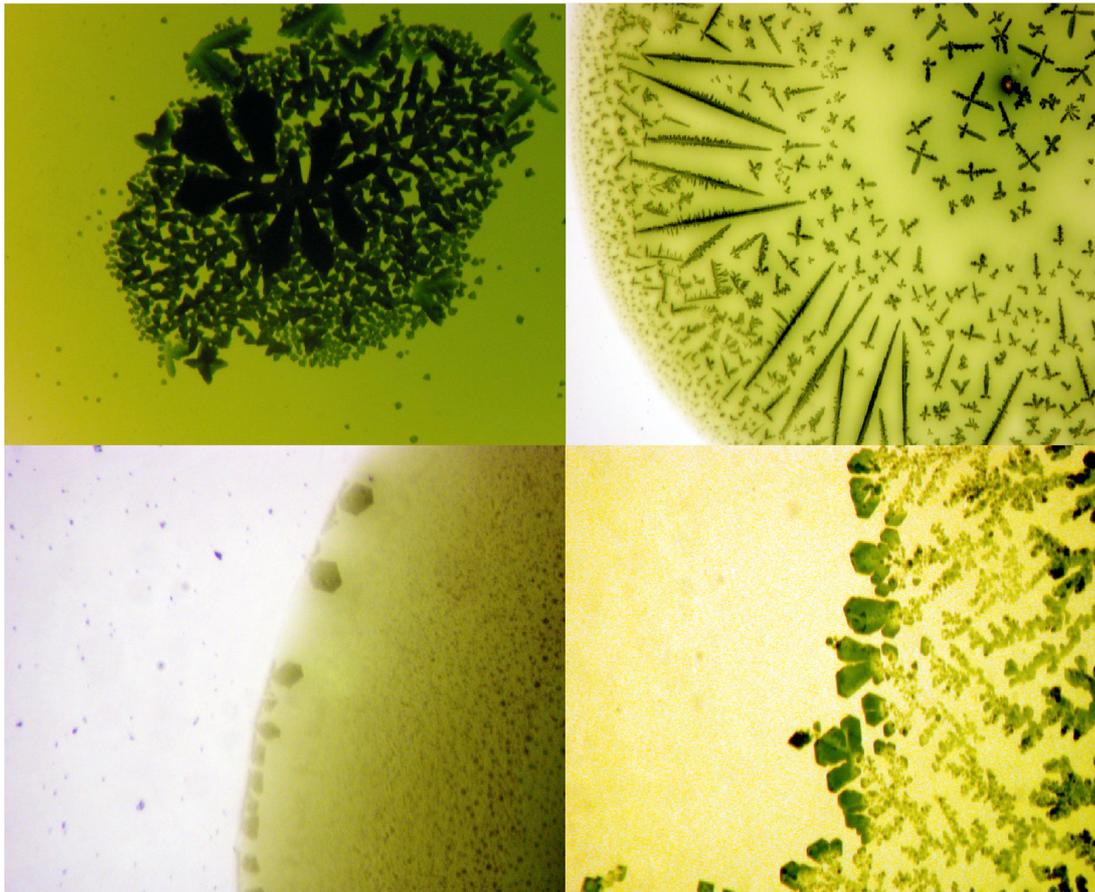
### **3.5.1.2 Rekombinante Isoformen**

Wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, gelang es im Zuge dieser Arbeit alle drei Isoformen des LHC-II in ausreichender Menge für die Kristallisation rekombinant herzustellen. Zunächst wurde versucht, in DDM solubilisiertes Lhcb1 ohne Zugabe von Lipid zu kristallisieren. Hierzu wurden drei kommerzielle Kristallisationsscreens (Hampton Research Screen I+II, Hampton Membrane Screen) und ein in unserem Labor entwickelter Screen (Bedingungen bereitgestellt von Johan Zeelen) verwendet. Mit dem von Johan Zeelen entwickelten Screen konnten auf Anhieb 3D Kristalle von Lhcb1 erzeugt werden. Nach Optimierung kristallisierte das Protein reproduzierbar mittels Dampfdiffusion im hängenden Tropfen. Dabei wurde das solubilierte

Lhcb1 (0.01% DDM, 3.5 mg/ml Chl) 1:1 mit Mutterlauge (0.1 M TAE 7,0, 0.1 M MgSO<sub>4</sub>, 0.01 M ZnAcetat, 12.5 % Peg1000) gemischt und bei 20° C. für 2 Wochen inkubiert. In den Kristallisationstropfen traten auch Kristalle des Detergenz DDM auf. Dies deutete auf überschüssiges DDM hin und konnte durch die Inkubation der Probe mit Biobeads reduziert, aber nicht vollständig verhindert werden. Da diese Kristalle bei mehreren Diffraktionsexperimenten kaum Beugungsreflexe zeigten, wurden diese Kristallisationsbedingungen nicht weiter verfolgt.

Als aussichtsreicher für die Züchtung hochgeordneter Kristalle erschienen die Bedingungen zur Kristallisation von LHC-II in der hexagonalen Kristallform (Lamborghini 2002). Bei diesen Bedingungen wird das solubilisierte Protein (0.9% w/v NG, 10 mM NaCl, 10 mM ADA Puffer pH 6.4) gegen eine Mutterlauge (9% PEG4000, 50-80 mM NaCl) mittels Dampfdiffusion equilibriert. Im Gegensatz zu den gängigsten Kristallisationsmethoden wird dem Protein dabei keinerlei Präzipitantz zugefügt und die Kristallisation findet alleine durch die langsame Konzentration des Proteins statt. Da es sich bei den hexagonalen Platten um Typ I Membranproteinkristalle (Kühlbrandt 1987), also Stapel von 2D Kristallen, handelte, mussten der rekombinanten Probe große Mengen des Lipids DGDG zugegeben werden. Hierbei wurden molare Lipid/Protein Verhältnisse von 0 bis 30 getestet. Untersucht wurde die Zugabe des Lipids während der Faltung der Monomere, vor der Gradientenzentrifugation zur Trennung von Monomer und Trimer, vor der letzten Präzipitation des Proteins und direkt vor der Kristallisation. Die Zugabe direkt vor der Kristallisation stellte sich als praktikabelste Methode heraus und wurde anschließend standardmäßig verwendet.

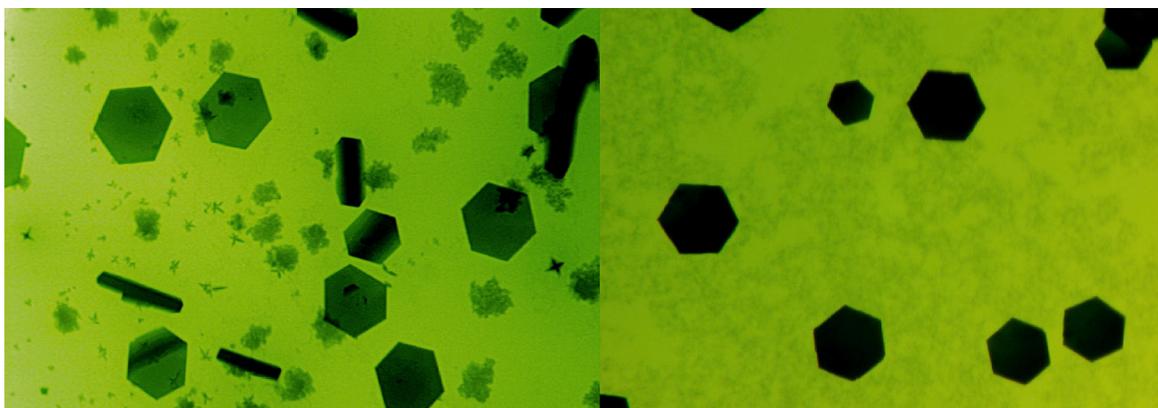
Alle drei Isoformen wurden auf ihre Fähigkeit untersucht hexagonale Kristalle zu bilden. Für die Experimente mit Lhcb1 und Lhcb2 wurden möglichst reine Trimerproben, für Lhcb3 nur Monomere verwendet. Für Lhcb1 bildeten sich unter den in Lamborghini 2002 beschriebenen Bedingungen keine hexagonalen Platten, sondern hauptsächlich Sterne, Sphärolithe oder dünne Platten am Rand des Tropfen (Abbildung 19)



**Abbildung 19:** Eine Auswahl der bei Kristallisationsexperimenten mit rekombinantem Lhcb1 erhaltenen Formen.

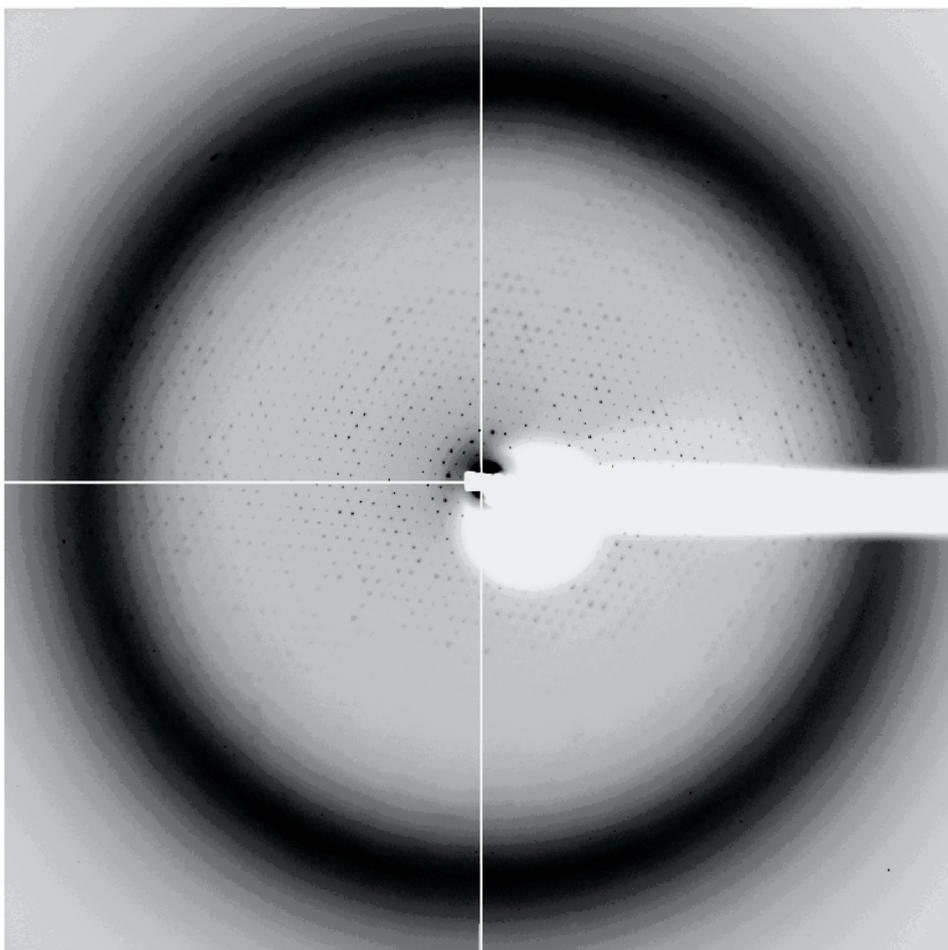
In dieser Arbeit ist es nicht gelungen, die Lhcb3 Isoform zu kristallisieren. Dies ist wahrscheinlich auf die unstabilen Trimere des Lhcb3 zurückzuführen.

Überraschenderweise gelang es schon im ersten Versuch, Lhcb2 in Form hexagonaler Platten zu kristallisieren (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Vergleich von unter ähnlichen Bedingungen gewachsenen hexagonalen Kristallen aus nativem LHC-II (links) und rekombinantem Lhcb2 (rechts).

Diese bildeten sich bei Dampfdiffusion einer Proteinlösung (0.9% w/v  $\beta$ -NG, 3.0-3.5 mg/ml Lhcb1, 10 mM ADA 7.2-7.5, 15x DGDG mol/mol) gegen eine Mutterlauge (10-15% PEG4000, 50-200 mM NaCl). Die einzigen Unterschiede zur der in (Lamborghini 2002) beschriebenen Kristallisation des nativen LHC-II waren der um eine Einheit verschobene pH-Wert, das Fehlen von NaCl in der Probe und die Zugabe von DGDG in einem molaren Verhältnis von 15:1. Als wichtigster Parameter, bei dem schon geringe Abweichungen die Kristallisation verhindern konnte, stellte sich das Lipid/Protein Verhältnis heraus. Interessanterweise konnten größere Kristalle nur mit selbst aufgereinigtem DGDG erhalten werden. Gründe dafür könnten Verunreinigungen mit MGDG (vgl. Abbildung 18C) oder auch ein im Vergleich zu kommerziellen DGDG variierender Sättigungsgrad der Fettsäuren sein.



**Abbildung 21:** Diffraktionsbild eines hexagonalen Kristalls aus rekombinantem Lhcb2. Das Bild wurde am ID14.1 Strahlengang des ESRF an einem nach Tränken in 35% DMSO gefrorenen Kristall aufgenommen. Der dunkle Ring im Diffraktionsmuster wird durch diffuse Beugung von Wasser hervorgerufen und entspricht einer Auflösung von ca. 3.5 Å. Deutlich ist die ungleichmäßige Verteilung der Beugungsreflexe zu erkennen, welche die hohe Anisotropie des Kristalls widerspiegelt.

Die hexagonalen Kristalle aus rekombinantem Lhcb2 zeigten bei Röntgenbestrahlung Reflexe bis ca. 3.5 Å (Abbildung 21). Die Beugung war allerdings hoch anisotrop und in einigen Orientierungen des Kristalls zum Strahl traten fast keine Reflexe auf. Auch nach Optimierung der Kristallisations- und Frierbedingungen zeigte nur ein Bruchteil der rekombinanten Lhcb2 Kristalle Beugungsreflexe. Doch auch wenn Lhcb2 Kristalle Beugung zeigten, blieb diese deutlich schlechter als bei Kristallen aus nativem LHC-II. Die rekombinanten Lhcb2 Kristalle eigneten sich daher nicht für eine Strukturaufklärung.

### **3.5.2 Neue Bedingungen zur Kristallisation von LHC-II**

Auch wenn es nicht zu einer Bildung von Eis kommt, können schlechte Beugungseigenschaften von Kristallen, und insbesondere hohe Anisotropie und Mosaizität, auf schlechte Frierbedingungen zurückzuführen sein (Garman und Schneider 1997; Walker et al. 1998). Zur Reduzierung der Kristallordnung kommt es dabei durch das Gefrierschutzmittel selbst oder durch osmotischen Schock während dessen Zugabe. Daher wurde versucht, die hexagonalen Kristalle schon in Anwesenheit verschiedener Gefrierschutzmittel zu züchten. Eine Reihe von häufig verwendeten Gefrierschutzmitteln wurden als Additive zur Kristallisation (Tabelle 2) getestet.

Gefrierschutzmittel (5-15%)	Kristallisation	Gefrierschutzmittel (5-15%)	Kristallisation
Ethylen-Glycol	+	DMSO	+
PEG200/400/600/1000	+	Saccharose	-
PEG400DME	++	Glukose	-
PEG350MME	+++		
		Glycerin	+++

**Tabelle 2:** Als Additive zur Kristallisation von rekombinantem Lhcb2 getestete Gefrierschutzmittel. Die Klassifizierung mit – und + verdeutlicht den Kristallisationserfolg bei Zugabe des jeweiligen Gefrierschutzmittels.

Auch wenn mit einigen Gefrierschutzmitteln Kristalle erzeugt werden konnten, waren die erreichbaren Konzentrationen zum direkten Einfrieren der Kristalle nicht ausreichend. Als gute Additive stellten sich Polyethylenglykole (PEG) verschiedener mittlerer Molekulargewichte heraus. Die Kristallisation von LHC-II wurde daher auf die Verwendung von PEG als Präzipitanz erneut untersucht. Dabei wurden 10 PEGs mit unterschiedlichem mittlerem Molekulargewicht und Konzentrationen gegen sechs pH-Werte und zwei unterschiedlichen Salzkonzentrationen für rekombinantes Lhcb2 und natives LHC-II getestet. Im Gegensatz zu früheren Versuchen wurde jedoch die Detergenzkonzentration verdoppelt, um auch nach dem Mischen von Mutterlauge und Protein nahe an den ursprünglichen Bedingungen zu bleiben. Sowohl aus rekombinantem Lhcb2, wie auch aus isoliertem LHC-II konnten bei Verwendung von PEG350MME und PEG550MME innerhalb einiger Tage kleine hexagonale Kristalle gezüchtet werden. Die Kristallisationsbedingungen für rekombinantes Lhcb2 und isoliertes LHC-II unterschieden sich wiederum nur in pH-Wert, Salzkonzentration und der Zugabe von DGDG zu der rekombinanten Probe.

Die für die Kristallisation nötigen PEG Konzentrationen reichten jedoch für ein direktes Frieren der Kristalle nicht aus, woraufhin auch unter diesen

Bedingungen zusätzliche Gefrierschutzmittel als Additive getestet wurden. Neben der Wirkung als Gefrierschutzmittel stellte sich dabei für Glycerin ein positiver Effekt auf das Dickenwachstum der Kristalle heraus, und die Kristallisation wurde daher auf Verwendung dieses Additivs optimiert.

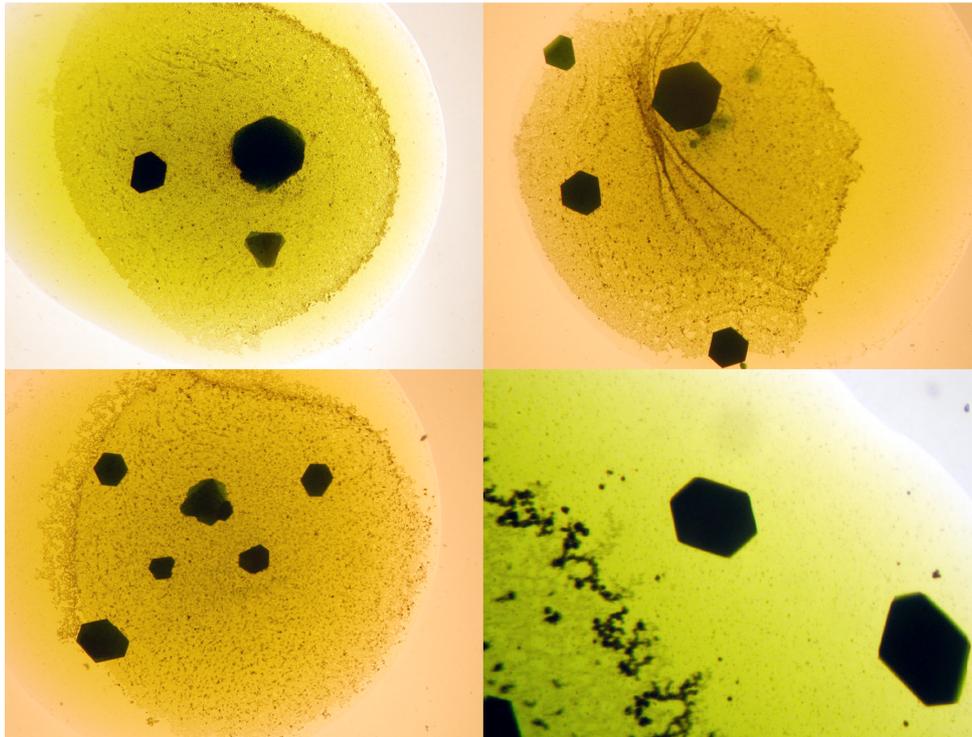
<b>20%Glycerin</b>			<b>Kristalle</b>	<b>Kristalle</b>	
<b>15%Glycerin</b>			<b>Kristalle</b>	<b>Kristalle</b>	
<b>10%Glycerin</b>		<b>Kristalle</b>	<b>Kristalle</b>	<b>Kristalle</b>	
<b>5%Glycerin</b>		<b>Kristalle</b>	<b>Kristalle</b>	<b>Kristalle</b>	
<b>0%Glycerin</b>		<b>Kristalle</b>	<b>Kristalle</b>	<b>Kristalle</b>	
	<b>7.5%</b>	<b>10%</b>	<b>12.5%</b>	<b>15%</b>	<b>20%</b>
	<b>PEG350MME</b>	<b>PEG350MME</b>	<b>PEG350MME</b>	<b>PEG350MME</b>	<b>PEG350MME</b>

**Tabelle 3:** Gefriereigenschaften von unterschiedlichen PEG350MME/Glycerin Mischungen. Die Mischungen wurden ohne Kristall als dünner Film in einer Montierschleife im 100K Stickstoffstrahl gefroren. Eintrübung des Films und Eisringe bei der anschließenden Röntgenbestrahlung zeigten die Bildung von Eis (rot). Blieb der Film klar, trat keine Eisbildung auf (grün). Teilweise kam es bei Röntgenbestrahlung noch zur Bildung von Eisringen (hellgrün) im Diffraktionsbild. Mischungen die in Kristallisationsexperimenten zu Kristallen führten sind beschriftet.

Wie Tabelle 3 zeigt, konnten mit der Kombination von PEG350MME und Glycerin Konzentrationen erreicht werden, die für ein direktes Einfrieren der Kristalle in flüssigem Ethan oder einem 100 K Stickstoffstrahl (Oxford Cryosystems) ausreichen. Bei Verwendung von mehr als 15% Glycerin neigten jedoch viele Kristalle zur Bildung von Multimeren. Dabei legten sich mehrere hexagonale Platten übereinander, was teilweise nur schwer am Lichtmikroskop erkennbar war und erst bei Röntgenbestrahlung sichtbar wurde. Bei Konzentrationen unter 15% konnten dagegen nicht mehr alle Kristalle ohne Eisbildung gefroren werden, weswegen eine hohe Anzahl von Kristallen getestet werden musste.

Während die neuen Kristallisations- und Frierbedingungen für Kristalle aus rekombinantem Lhcb2 keine Verbesserung der Beugungseigenschaften zur Folge hatten, zeigten die Kristalle aus isoliertem LHC-II eine deutliche Verbesserung der möglichen Auflösung. Die Beugungsqualität schwankte

jedoch stark zwischen verschiedenen Kristallen und die meisten waren zu anisotrop um komplette Datensätze hoher Qualität aufzunehmen.

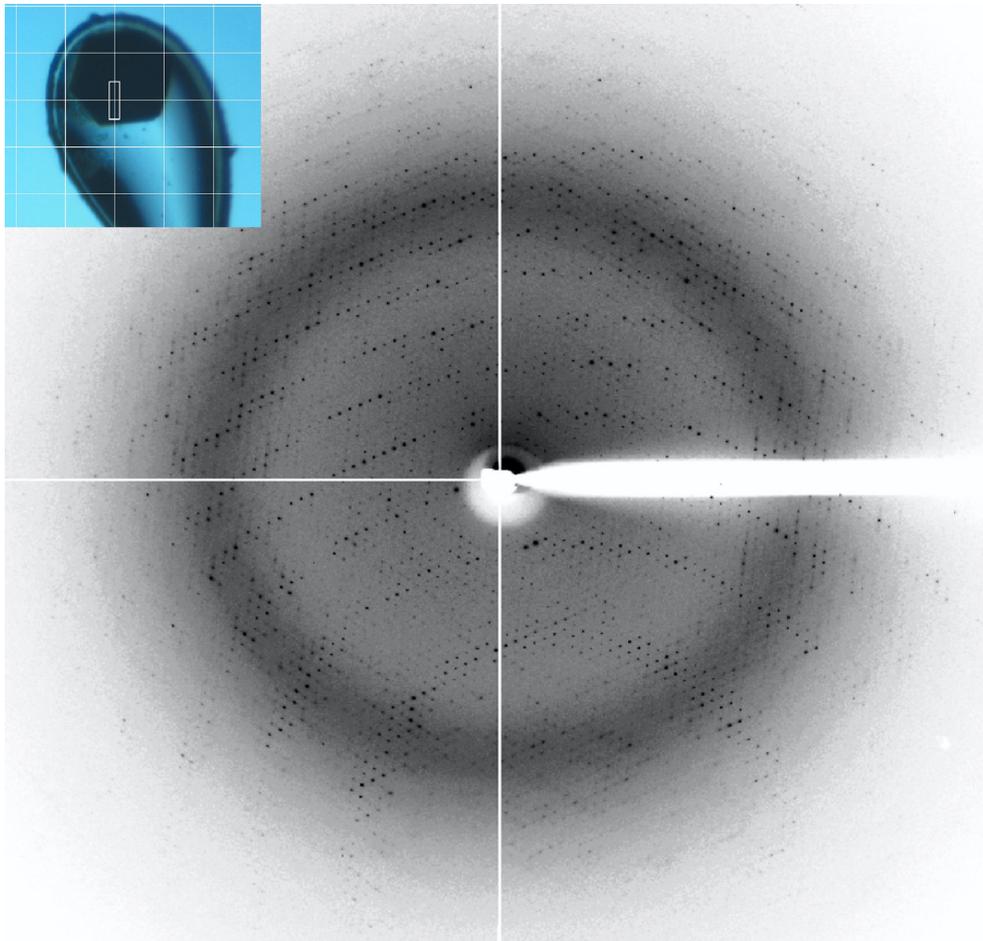


**Abbildung 22:** Eine Auswahl von optimierten Kristallen von nativen LHC-II. Die hier gezeigten Kristalle zeigen stark variierende Beugungseigenschaften auf. Auch wenn Multimere aussortiert werden konnten, war die generelle Qualität der Kristalle nur an ihren Beugungsmustern zu erkennen.

Bei den unter diesen Bedingungen gezüchteten Kristallen (Abbildung 22) handelte es sich um hexagonale Platten mit einer Breite von 200-500  $\mu\text{m}$  und einer Dicke von ca. 20-30  $\mu\text{m}$ , die sich innerhalb von 4-6 Wochen bildeten. Häufig kam es zu einer Stapelung von mehreren hexagonalen Platten. Diese wurden nicht für Diffraktionsexperimente verwendet und konnten mit einiger Erfahrung meist von den einheitlichen Kristallen unterschieden werden. Trotz hexagonaler Form variierten die Längenverhältnisse der Kristallkanten stark und nur selten hatten alle sechs Seiten die gleiche Länge. Eine klare Relation zwischen Beugungsqualität und Morphologie der Kristalle konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Die beiden für die Strukturaufklärung verwendeten Datensätze stammen von Kristallen, welche hinsichtlich ihres niedrigen Grades an Anisotropie und Mosaizität Ausnahmen darstellten. Beide Kristalle wuchsen durch Dampfdiffusion der Proteinlösung (0.9% w/v NG, 4.5 mg/ml Chl) gegen die

Mutterlauge (14% PEG350MME, 50mM Mes pH5.5, 20mM NaCl) im hängenden Tropfen bei 20°C. Die guten Beugungseigenschaften des Kristalls an dem der C2 Datensatz aufgenommen wurde, sind an dessen Beugungsmuster zu erkennen (Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Ein Diffractionsbild des C2 Datensatzes aufgenommen am ID14.1 Strahlengang des ESRF. Der dunkle Ring im Diffractionsmuster wird durch diffuse Beugung von Wasser hervorgerufen und entspricht einer Auflösung von ca. 3.5 Å. Das eingeschobene Bild zeigt einen direkt aus dem Kristallisationstropfen in flüssigen Ethan gefrorenen hexagonalen Kristall in der Gefrierschleife.

Im Beugungsmuster dieses Kristalls sind klare Ringe zu erkennen und die Beugung ist gleichmäßig in alle Richtungen verteilt ohne ein „aussmieren“ der Reflexe. Diese gute Ordnung des Kristalls spiegelt sich auch in den Statistiken des Datensatzes wider.

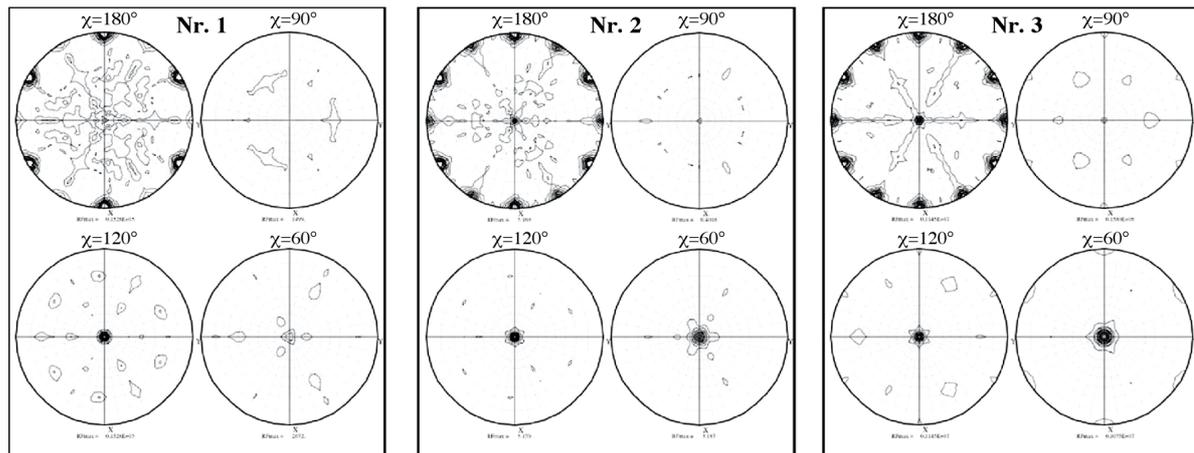
Um Kristallkontakte zu verstärken und damit die Anzahl von Kristallen mit niedriger Anisotropie zu erhöhen, wurden 18 weitere Additive getestet. Da Ionen eine Bedeutung für die Bildung von Granastapeln (Barber 1980) haben, wurde die Kristallisation besonders in Hinblick auf verschiedene Salz

als Additive untersucht. Nur Glycerin hatte jedoch einen positiven Einfluss auf die Kristalldicke und Ordnung.

Eine Erhöhung der Reproduzierbarkeit und gleichzeitige Verringerung der Anisotropie der meisten Kristalle konnte gegen Ende der Arbeit durch kurzes tränken in einer der Mutterlauge ähnlichen Gefrierlösung (20% Peg350MME, 20% Glycerin/, 20mM NaCl, 0.8% NG) und einfrieren in flüssigem Ethan erreicht werden. So behandelte Kristalle zeigten bei Verwendung von Synchrotronstrahlung (SLS, Villingen) noch Reflexe bis 2 Å Auflösung.

### **3.6 Datensammlung und Reduktion**

Wie beschrieben, zeigten die meisten getesteten LHC-II Kristalle stark anisotrope und damit je nach Orientierung zum Röntgenstrahl schwankende Beugung auf. Sehr Anisotrope Kristalle zeigten dabei immer auch eine erhöhte Mosaizität auf. Waren diese Effekte zu stark ausgeprägt, war es nicht möglich eine Indizierung der aufgenommenen Daten vorzunehmen, da die Größe und Orientierung der Einheitszelle nicht mehr eindeutig bestimmt werden konnten. Auch wenn Kristalle mit guter Auflösung beugten, war daher die Interpretation der meisten Beugungsmuster unmöglich. Die Interpretation der Beugungsmuster konnte durch Verwendung des Programms XDS (Kabsch 1988; Kabsch 1993) erleichtert werden, da die Indizierung der Beugungsreflexe in diesem Programm über einen großen Rotationsbereich stattfindet. Dennoch mussten sehr viele Kristalle auf ihre Beugungseigenschaften untersucht werden, bevor die Aufnahme von Datensätzen mit ausreichender Qualität für eine Strukturaufklärung gelang. Insgesamt wurden im Verlauf dieser Arbeit mehr als 500 Kristalle an verschiedenen Messplätzen getestet (DESY, ESRF, SLS) und 15 vollständige Datensätze unter verschiedenen Bedingungen aufgenommen und analysiert. Die getesteten Kristalle waren nicht nur hinsichtlich ihrer Beugungseigenschaften sehr unterschiedlich, sondern konnten auch unterschiedliche Symmetrien und Einheitszellen aufweisen. Sie gehörten entweder der C2 oder der P<sub>3</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub> Raumgruppe an, wobei die P<sub>3</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub> Kristalle in unterschiedlichem Grad auch eine P6<sub>2</sub> Symmetrie aufwiesen.



**Abbildung 24:** Selbst-Rotations-Funktionen dreier Datensätze mit  $P3_121$  Symmetrie.

Dieser variierende Grad an  $P622$  Symmetrie ist in Abbildung 24 anhand der Selbst-Rotations-Funktionen dreier mit  $P3_121$  Symmetrie integrierter Datensätze gezeigt. Gegenüberliegende Signale bei Rotation um  $\chi=180^\circ$  zeigen dabei eine zweizählige, ein Signal bei  $\chi=120^\circ$  eine dreizählige und bei  $\chi=60^\circ$  sechszählige Symmetrie an. Datensatz Nr. 1 zeigt dreizählige Symmetrie, da  $\chi=180^\circ$  drei zweizählige Symmetrieachsen und  $\chi=120^\circ$  ein starkes Signal in der Mitte aufweist. Dieser Datensatz konnte klar der Raumgruppe  $P3_121$  zugeordnet werden und zeigte keine sechszählige Symmetrie. Datensatz Nr. 2 hingegen zeigt drei zusätzliche zweizählige Symmetrieachsen und ein Signal bei  $\chi=60^\circ$ , was deutlich auf sechszählige Symmetrie hinweist. Diese zusätzlichen Signale sind eindeutig schwächer als die Signale, die auch in Datensatz Nr. 1 zu erkennen sind. Tatsächlich ließ sich zwar bedingt sechszählige Symmetrie anwenden, allerdings trat dadurch ein starker Verlust an Datenqualität auf. In Datensatz Nr.3 sind die zusätzlichen Signale annähernd gleichstark wie die schon in Datensatz Nr.1 enthaltenen Signale. Entsprechend zeigt dieser Datensatz bei Anwendung von  $P6$  Symmetrie nur eine geringfügige Verschlechterung. Eine Erklärung für dieses Phänomen lieferte eine Untersuchung auf merohedrale Zwillingsbildung. Das Beugungsbild eines solchen Kristalls erscheint wie das eines Einkristalls, tatsächlich aber enthalten die beobachteten kristallographischen Intensitäten Beiträge beider Zwillingsdomänen. Werden die Intensitäten der zwillingsverwandten Reflexe bei perfekten merohedralen Zwillingen gleich groß, überlagert die Symmetrie des Zwillingsoperators die wahre Laue-Symmetrie, so dass eine höhere scheinbare Symmetrie resultiert.

Die drei Datensätze haben daher alle die Symmetrie  $P3_121$ , wobei die scheinbare  $P622$  Symmetrie durch verschiedene Zwillingsanteile der Datensätze vorgetäuscht wurde. Generell können alle gängigen Methoden der Strukturbestimmung auch mit verzwilligten Daten durchgeführt werden. Die mathematische Korrektur der Daten führt jedoch einen zusätzlichen Fehler ein, welcher ihre Qualität vermindert. Dieser Fehler ist mit  $1/(1-2\alpha)$  proportional zum Zwillingsanteil  $\alpha$ . Bei einem perfekten merohedralen Zwilling mit  $\alpha=0.5$  wird der Fehler daher unendlich groß und eine Bestimmung der Struktur ohne andere Hilfsmittel ist ausgeschlossen. Von den gemessenen Datensätzen der  $P3_121$  Symmetrie zeigten alle bis auf einen eine Verzwilligung. Die Zwillingsanteile reichten von  $\alpha= 0.10$  bis  $0.45$ .

### 3.6.1 Qualität der für die Strukturaufklärung verwendeten Datensätze

Röntgenkristallographische Daten bestehen aus einem Satz von Beugungsreflexen mit Intensitäten und deren Standardabweichungen. Die wichtigste Eigenschaft eines solchen Datensatzes ist die Vollständigkeit. Bei der meist für die Datenaufnahme verwendeten Rotationsmethode hängt die erreichte Vollständigkeit direkt von dem Rotationswinkel ab, um den der Kristall bei der Datenaufnahme gedreht wurde. Der benötigte Rotationswinkel beträgt für einen nativen Datensatz ohne anomales Signal der Friedelpaare je nach Kristallsymmetrie und Orientierung des Kristalls zum Röntgenstrahl zwischen  $30^\circ$  und  $180^\circ$ . Insgesamt sollten Daten mit einer Vollständigkeit von mehr als 90% aufgenommen werden. Da Kristalle aber häufig anisotrop beugen oder Strahlenschaden auftritt, ist in der höchsten Auflösungsschale schon eine Vollständigkeit von 60-70% akzeptabel. Da moderne Verfeinerungsmethoden (*Maximum Likelihood*) jedoch nicht nur auf genaue Intensitäten, sondern auch auf deren Standardabweichungen angewiesen sind, sollten so viele Daten wie möglich verwendet werden, um jede Intensität möglichst mehrmals zu messen und eine hohe Redundanz zu erreichen.

Die globale Datenqualität eines Datensatzes wird normalerweise durch den  $R_{\text{sym}}$  Wert beurteilt. Dieser basiert auf den gemessenen Intensitäten und

beschreibt die durchschnittliche Spannweite der gemessenen Intensität von Symmetrie-äquivalenten Reflektionen.

Der  $R_{\text{sym}}$  ist keine statistisch robuste Größe und stark davon abhängig, wie oft eine Intensität gemessen wurde. Datensätze mit hoher Symmetrie und Redundanz weisen daher tendenziell höhere  $R_{\text{sym}}$  Werte auf. Je nach Symmetrie und Redundanz sollte der  $R_{\text{sym}}$  aller Daten zwischen 0.05-0.20 liegen. In der höchsten Auflösungsschale können Werte von 0.30-0.45 als Richtwert für den  $R_{\text{sym}}$  dienen.

Ein weiterer Indikator für die Qualität von röntgenkristallographischen Daten ist das Signal-zu-Rausch Verhältnis der gemittelten Reflektionen. Dieses wird als Quotient der mittleren Intensität ( $I$ ) und der Standardabweichung ( $\sigma(I)$ ) aller Reflexionen angegeben. Im Gegensatz zum  $R_{\text{sym}}$  wird das Signal-zu-Rausch Verhältnis mit zunehmender Redundanz durch die zusätzliche Mittlung der Intensitäten besser. Für eine Verfeinerung des Modells werden Auflösungsschalen mit einem mittleren Signal-zu-Rausch Verhältnis von mindestens 2 verwendet.

Trotz der Schwierigkeiten mit Anisotropie und Verzwilligung der Kristalle gelang es, Datensätze von ausreichender Qualität für eine Strukturaufklärung zu erhalten. Die Eckdaten der zwei für die Strukturaufklärung verwendeten Datensätze sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

<b>Strahlenquelle</b>	ID14-1, ESRF, Grenoble	X11, DESY, Hamburg
<b>Symmetrie</b>	C2	P3 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Einheitszelle (Å, °)</b>	a=211.4, b=128.0, c=62.0, β=101.8	a=b=127.5, c=180.4
<b>Wellenlänge (Å)</b>	0.934	0.81
<b>Auflösung (Å)</b>	50-2.5	50-3.1
<b>höchste Auflösungsschale (Å)</b>	2.6-2.5	3.2-3.1
<b>Anzahl gemessener Intensitäten</b>	132 425 (9 382)	155 599 (10 959)
<b>Anzahl unabhängiger Reflexe</b>	47 867 (4 370)	30 771 (2 665)
<b>I/σ(I)</b>	8.99 (2.69)	10.43 (3.62)
<b>R<sub>sym</sub></b>	0.079 (0.327)	0.124 (0.381)
<b>Vollständigkeit (%)</b>	85.6 (70.7)	97.9 (94.0)

**Tabelle 4:** Eckdaten der für die Strukturaufklärung verwendeten Datensätze. Zahlen in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

Da beide Datensätze unterschiedliche Symmetrien und Einheitszellen aufwiesen, konnten sie nicht zu einem Datensatz vereinigt werden und mussten zunächst unabhängig voneinander betrachtet werden.

Der erste Datensatz wurde von dem bei weitem besten Kristall aufgenommen. Dieser Kristall mit C2 Symmetrie zeigte nur eine geringe Anisotropie und beugte bis zu einer guten Auflösung. Im Verlauf der Datenaufnahme trat jedoch Strahlenschaden auf und insgesamt konnten nur verwertbare Daten aus einem Rotationsbereich von 150° aufgenommen werden. Dieser Rotationsbereich ergab bei der C2 Symmetrie des Kristalls nur eine Vollständigkeit im gesamten Auflösungsbereich (50-2.5 Å) von 85.6% mit einer Redundanz von 3.0. Die vorhandenen Daten zeigten aber mit einem globalen

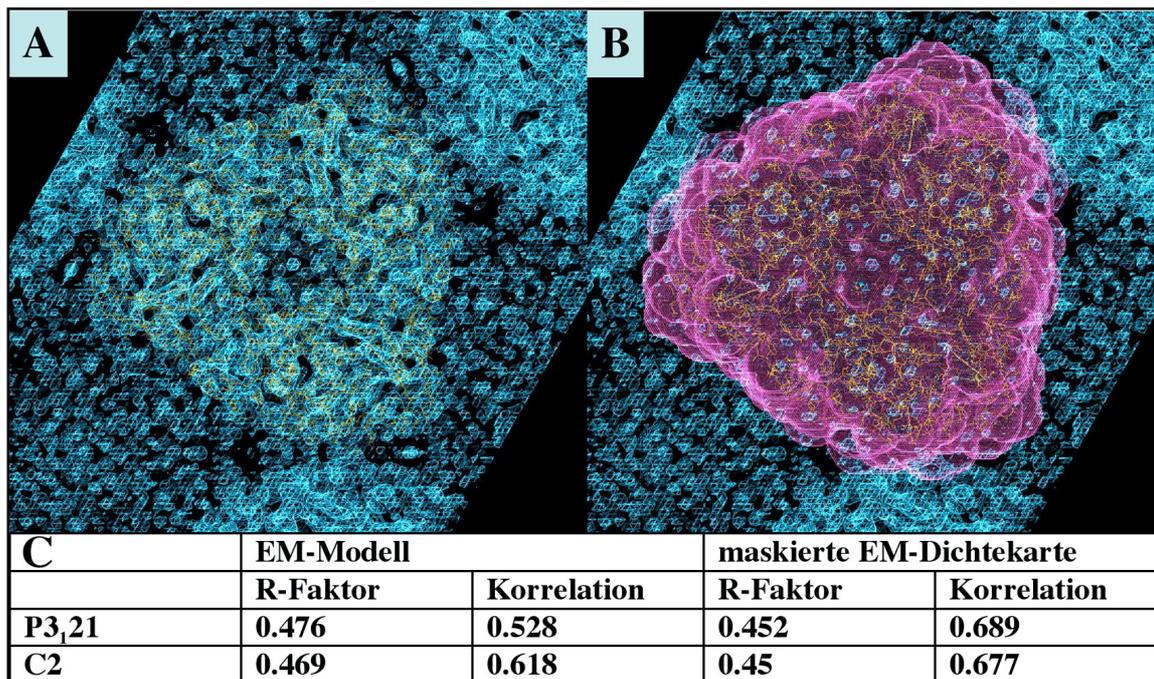
---

$R_{\text{sym}}$  von 0.079 eine hohe Qualität auf und konnten bei einem Signal-zu-Rausch Verhältnis von 2.69 bis zu einer Auflösung von 2.5 Å verwendet werden.

Die relativ niedrige Vollständigkeit und Redundanz des ersten Datensatzes wurden während der Strukturaufklärung durch den zweiten Datensatz komplementiert. Dieser weist im Vergleich zum ersten Datensatz eine geringere Auflösung von 3.1 Å auf. Durch die höhere  $P3_121$  Symmetrie konnten aber schon mit einem Rotationsbereich von 95° fast vollständige Daten (97.9%) mit einer Redundanz von 5 aufgenommen werden. Durch Verwendung dieser zusätzlichen Daten wurde die Qualität der ersten Elektronendichtekarten deutlich verbessert.

### 3.7 Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz

Die Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz basiert auf der Platzierung eines Suchmodells in der Einheitszelle der gemessenen Daten. Hierbei wird durch Rotation und Translation des Suchmodells eine maximale Korrelation mit den gemessenen Datensätzen erstellt und die Packung des Suchmodells in der Einheitszelle des Kristalls bestimmt. Aus der Packung kann anschließend ein Satz der korrespondierenden Phasen errechnet werden, welche als Ausgangspunkt für die weitere Verfeinerung dienen. Die Qualität dieser vorläufigen Phasen hängt jedoch stark von der Ähnlichkeit des verwendeten Suchmodells zur tatsächlichen Struktur ab. Ein weiteres Problem der Methode des molekularen Ersatzes ist eine starke Beeinflussung durch das Suchmodell, die im Verlauf der Verfeinerung sorgfältig verringert werden muss. Um diese Beeinflussung zu umgehen, wurde in dieser Arbeit nicht das vorhandene 3.4 Å Modell des LHC-II der Erbse (Kühlbrandt et al. 1994), sondern die experimentelle Dichtekarte, welche dieses Modell ergeben hatte, für den molekularen Ersatz verwendet (Abbildung 25). Hierfür wurde ein Trimer aus der experimentellen, mittels Cryo-Elektronenmikroskopie erhaltenen Dichtekarte mit einem Radius von 5 Å ausgeschnitten und als Suchmodell verwendet.

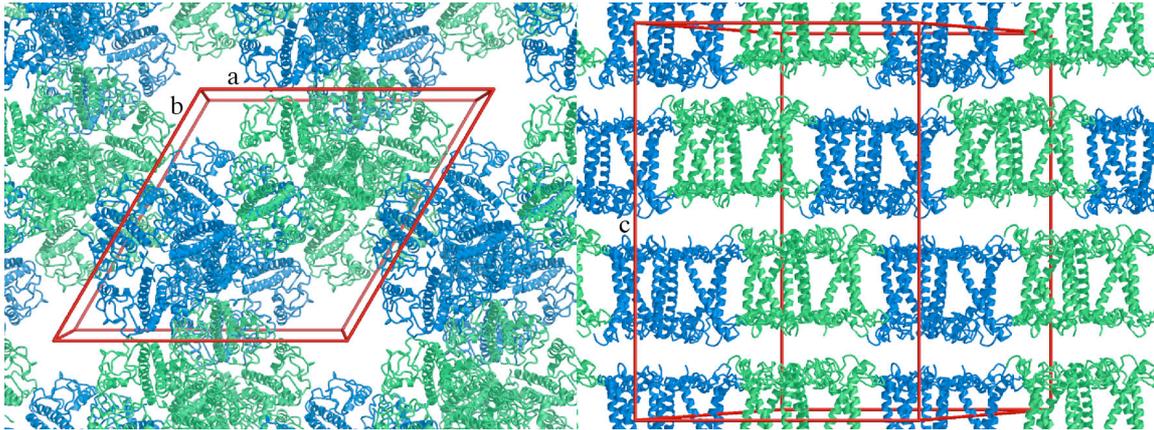


**Abbildung 25:** Phasenbestimmung mittels molekularem Ersatz. A: elektronenmikroskopische Dichtekarte, B: Aus Dichtekarte ausgeschnittenes Suchmodell eines LHC-II Trimers (rot). C: Statistiken der mittels molekularem Ersatz erhaltenen Lösungen.

Wie in Abbildung 25C gezeigt, konnten für beide Datensätze schon bei Verwendung des EM Modells gute Lösungen mit einem Trimer pro asymmetrischer Einheit gefunden werden. Durch die Verwendung der maskierten Dichtekarte konnten jedoch sowohl die R-Faktoren wie auch die Korrelation deutlich verbessert und zusätzlich die sonst unvermeidliche Beeinflussung der Lösung durch das Suchmodell von Anfang an vermieden werden.

### 3.7.1 Kristallpackung verschiedener LHC-II Kristalltypen

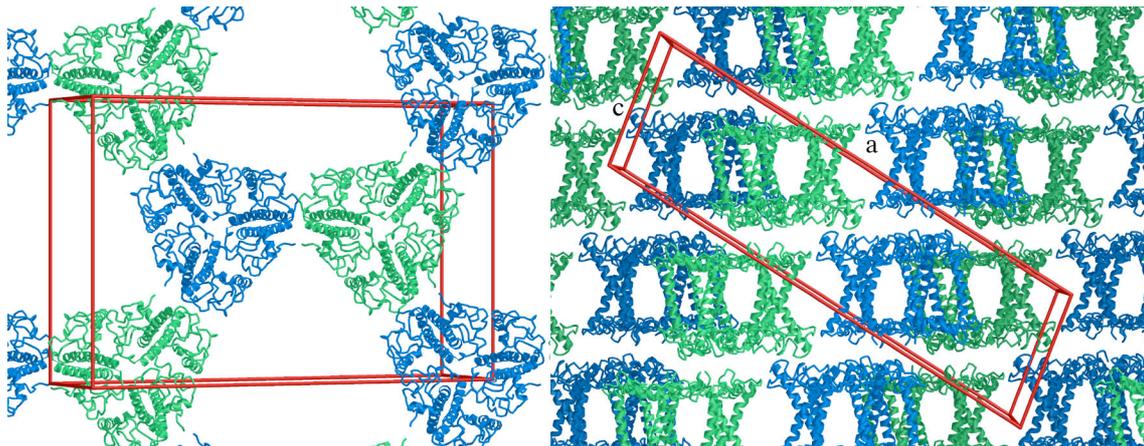
In den 2D Kristallen des LHC-II ist der Komplex zusammen mit Lipiden in einer membranähnlichen Umgebung dicht gepackt (Kühlbrandt und Downing 1989). Diese 2D Kristalle hatten die Symmetrie P3<sub>2</sub>1 und eine Einheitszelle von  $a=b=128.3 \text{ \AA}$ . Daher lag es nahe, dass die 3D Kristalle mit P3<sub>1</sub>21 Symmetrie und der Einheitszelle  $a=b=127.5$ ,  $c=180.4 \text{ \AA}$  eine sehr ähnliche Packung, nur mit einer zusätzlichen Dimension, aufweisen mussten.



**Abbildung 26:** Aufsicht und Seitenansicht der  $P3_121$  Kristallpackung. Die Aufsicht ist zur besseren Darstellung auf zwei und die Seitenansicht auf eine Proteinlage beschränkt. Nebeneinander liegende Trimere sind in dieser Packung immer in „Flip und Flop“ Orientierung eingebaut und sind entsprechend grün und blau eingefärbt. Die Einheitszelle ist als roter Rahmen eingezeichnet.

Tatsächlich zeigte die aus dem molekularem Ersatz erhaltene Packung der 3D Kristalle dieselbe trigonale Anordnung wie in den 2D Kristallen. In dieser Packung sind drei Paare von Trimeren um einen Freiraum herum angeordnet, welcher mit Lipid gefüllt ist. Jede Lage des 3D Kristalls kann daher als kristalline Lipidmembran angesehen werden. In Abbildung 26 entsprechen diese kristallinen Lipidmembranen einer Lage in der Aufsicht. Wie in den 2D Kristallen sind nebeneinander liegende Trimere in „Flip und Flop“ Orientierung eingebaut und zeigen damit jeweils mit einer anderen Seite aus der Ebene hinaus. Die dritte Dimension dieser Kristallpackung wird mit einer Länge von  $\sim 180 \text{ \AA}$  aus 3 Lagen dieser „2D Kristalle“ gebildet. Damit handelte es sich bei den 3D Kristallen mit  $P3_121$  um ein typisches Beispiel für Typ I Membranprotein Kristalle (Michel 1983).

Die Einheitszelle des zur Strukturaufklärung verwendeten C2 Datensatzes ( $a=211.4 \text{ \AA}$ ,  $b=128 \text{ \AA}$ ,  $c=61.9 \text{ \AA}$ ,  $\beta=101.8^\circ$ ) kann auf den ersten Blick nicht mit der Packung des 2D Kristalls in Einklang gebracht werden. Die Lösung des molekularen Ersatzes zeigte jedoch, dass auch diese Kristalle vom Typ I waren und aus Lagen von 2D Kristallen bestanden (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Aufsicht und Seitenansicht der C2 Kristallpackung. Die Aufsicht ist zur besseren Darstellung auf eine und die Seitenansicht auf zwei Proteinlagen beschränkt. Nebeneinander liegende Trimere sind entsprechend ihrer „Flip und Flop“ Orientierung grün und blau eingefärbt. Die Einheitszelle ist als roter Rahmen eingezeichnet.

Allerdings waren die 2D Kristallebenen in Relation zu der Einheitszelle um  $34^\circ$  Grad gedreht. Bei beiden Kristallpackungen handelt es sich daher um Kristalle vom Typ I, die allerdings eine unterschiedliche Stapelung der 2D Kristalle aufwiesen.

### 3.7.2 Kristallkontakte in den verschiedenen 3D Kristallen

Wie beschrieben bestehen die in dieser Arbeit verwendeten 3D Kristalle des LHC-II aus Lagen von 2D Kristallen. Die Kristallkontakte innerhalb einer Kristallebene sind hauptsächlich hydrophober Natur und bilden die Basis für kristalline LHC-II Aggregate (McDonnell und Staehelin 1980) und 2D Kristalle (Lyon und Unwin 1988). Wichtiger Bestandteil dieser hydrophoben Wechselwirkungen sind Interaktionen zwischen Leu164 und Leu166 auf der stromalen Seite eines Trimers mit Leu85, Val90 und Leu113 an der luminalen Seite eines benachbarten Trimers. In den 2D Kristallen oder den einzelnen Lagen der 3D Kristalle befindet sich LHC-II zwar in einer membranähnlichen Lipidumgebung, jedoch kann diese aufgrund der „Flip/Flop“ Orientierung benachbarter Trimere nicht mit der Packung in der Thylakoidmembran übereinstimmen.

Ähnlich wie in der nativen Thylakoidmembran kommen in der Stapelung der 2D Kristalle jedoch auch Kontakte zwischen zwei stromalen Oberflächen zustande. Diese können damit als kleinster möglicher Abstand zwischen stromalen Oberflächen in den Granastapeln der Chloroplasten angesehen werden. In der C2 Kristallform werden diese Kontakte durch polare und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Ser12, Gly13, Gly18 und Pro19 eines Monomers mit derselben Region eines Monomers der nächsten Lage geformt. Der Abstand zwischen beiden Monomeren beträgt ca. 3 Å in der C2 Kristallform, in der P3<sub>1</sub>21 ist zwar dieselbe Region beteiligt, jedoch beträgt der Abstand 3.5-4.5 Å.

Einer der Hauptunterschiede zwischen den beiden Kristallformen sind Kristallkontakte der 3 C-terminalen Lys232 auf der luminalen Oberfläche eines Trimers. Diese bilden in der C2 Form starke Salzbrücken zu Asp20, Glu31 und Glu150 der stromalen Oberfläche zweier Monomere des darunter liegenden Trimers aus. Diese Kontakte fehlen in der P3<sub>1</sub>21 Kristallform und könnten ein Grund für die gute Ordnung und geringe Anisotropie der C2 Kristallform sein.

### 3.8 Verfeinerung und Modellbau

Die mit Hilfe des molekularen Ersatzes gefundene Lösung musste weiter gegen die experimentellen Daten verfeinert werden. Ziel dieser Verfeinerung ist ein Modell, dessen berechnete Struktur Faktoren ( $F_{\text{calc}}$ ) gut mit den experimentellen Struktur Faktoren ( $F_{\text{obs}}$ ) übereinstimmen. Der Unterschied zwischen  $F_{\text{calc}}$  und  $F_{\text{obs}}$  ist als der kristallographische R-Faktor ( $R_{\text{cryst}}$ ) definiert, welcher im Verlauf der Verfeinerung mit Hilfe einer *Maximum-Likelihood* Funktion optimiert wird. Um eine artifizielle, durch ein mathematisch unterbestimmtes System hervorgerufene Lösung auszuschließen und eine gute Übereinstimmung der experimentellen Daten mit der gefundenen Lösung zu garantieren, wird zusätzlich der freie R-Faktor ( $R_{\text{free}}$ ) eingeführt. Dieser wird mit einem Teil aus der Verfeinerung ausgelassener Daten berechnet und liefert so einen wichtigen zusätzlichen Indikator für den Erfolg der Verfeinerung und die Qualität der Struktur.

In der Praxis ist besonders zu Beginn der Strukturlösung neben den R-Faktoren zunächst die Qualität der berechneten Elektronendichte von Bedeutung, da diese entscheidend für einen erfolgreichen Modellbau ist. Schon die erste Berechnung direkt nachdem molekularem Ersatz zeigte eine klar Zusammenhängende  $2F_0$ -Fc Elektronendichte mit deutlichen Beiträgen der experimentellen Daten, z. B. bei den Phytylketten der Chlorophylle. Eine weitere Verbesserung wurde durch eine Dichtemodifikation mittels *sovent-flattening* (Wang 1985) erreicht. Aus einer Reihe von hochauflösenden Kristallstrukturen ist bekannt, dass der Beitrag der Flüssigkeitsmoleküle zur Elektronendichte sehr klein und konstant ist. Der hohe Flüssigkeitsanteil von Proteinkristallen kann daher ausgenutzt werden, um das Signal-zu-Rausch Verhältnis der Elektronendichte zu verbessern. Eine weitere Verbesserung wurde durch eine nichtkristallographische Mittlung der Elektronendichten sehr ähnlicher oder identischer Moleküle erreicht. Hierzu wurden zunächst die mit Hilfe der C2 und P3121 Datensätze errechneten Elektronendichten gemittelt (*multi-crystal averaging*) und anschließend eine weitere Mittlung der Monomere in der asymmetrischen Einheit (*non-crystallographic symmetry*) vorgenommen (DMMULTI (Cowtan 1994)). Die so erzeugte Elektronendichte war in guter Übereinstimmung mit dem elektronenkristallographisch erzeugten Modell des Erbsen LHC-II (Kühlbrandt et al. 1994). Dieses wurde in die Elektronendichte eingepasst und als Startpunkt für die weitere Optimierung und Vervollständigung mit Hilfe des Programms O (Jones und Kjeldgaard 1993) verwendet. Am so vervollständigten Modell wurde eine Verfeinerung (*molecular dynamics* Ansatz (Brünger et al. 1987)) mittels der Programme CNS (Brünger et al. 1998) und BUSTER-TNT (Tronrud 1997; Roversi et al. 2000) vorgenommen.

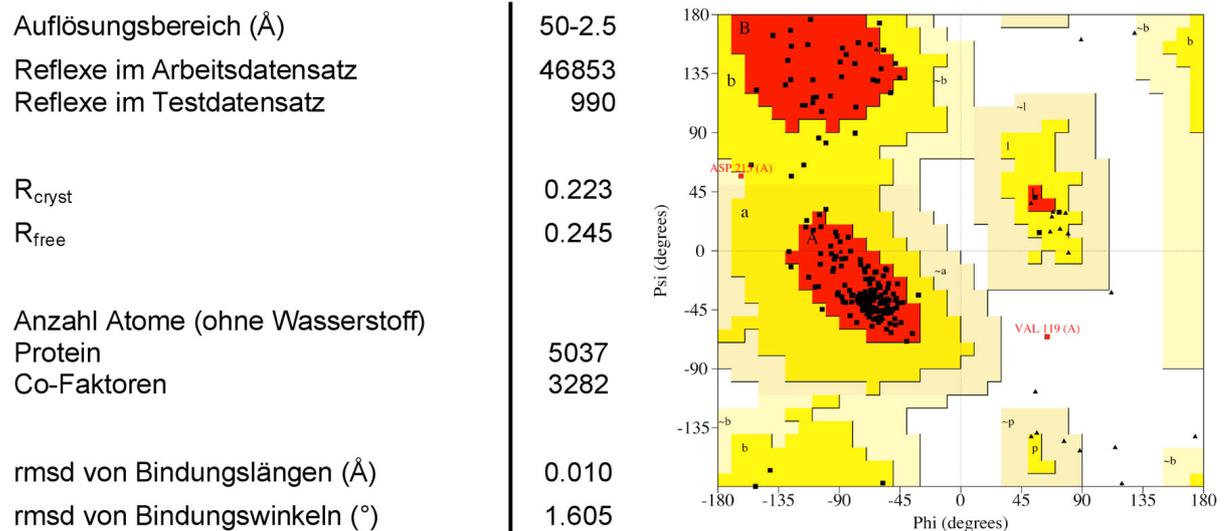
Bei der eigentlichen Verfeinerung werden für jedes Atom des Modells drei Positionskoordinaten und ein B-Faktor verfeinert und an die experimentellen Daten angepasst. Wasserstoffatome haben mit nur einem Elektron nur einen sehr geringen Beitrag zu der Röntgenbeugung und werden daher meist nicht mit berücksichtigt. Dennoch enthält eine asymmetrische Einheit mit dem LHC-II Trimer noch zirka 8000 Atome, was 32000 zu verfeinernden Parametern entspricht. Der hauptsächlich als Verfeinerungsziel verwendete C2 Datensatz enthielt ca. 50000 unabhängige Reflexe, was ein ungünstiges Verhältnis zwischen den zu verfeinernden Parametern und der Zahl der beobachteten

Beugungsreflexe ergibt. Die Anzahl der zu verfeinernden Parameter kann jedoch durch zusätzliche Annahmen eingeschränkt werden. Allgemein bei einer röntgenkristallographischen Strukturaufklärung verwendet werden hierfür bekannte chemische Parameter der Aminosäuren und gruppierte B-Faktoren. Zusätzlich wurde die nichtkristallographische Symmetrie der drei Monomere in der asymmetrischen Einheit für eine Verringerung der Parameter ausgenutzt. Des Weiteren wurden die experimentellen elektronenkristallographischen Phasen als Randbedingung der Verfeinerung verwendet. Das Ergebnis der jeweiligen Verfeinerung wurde wiederum für die Berechnung einer Elektronendichtekarte und Optimierung des Modells verwendet.

Innerhalb mehrerer Zyklen von Verfeinerung und Modellbau konnten die Randbedingungen nacheinander verringert werden. Bei Lockerung der nichtkristallographischen Symmetrie zeigten die Elektronendichten der drei Monomere zwar leichte Unterschiede auf, jedoch lieferten diese keine klaren Hinweise auf ein Heterotrimer. Um ein besseres Verhältnis zwischen verfeinerten Parametern und beobachteten Beugungsreflexen beizubehalten wurde die nichtkristallographische Symmetrie daher zwar gelockert, aber bis zum Ende der Verfeinerung aufrechterhalten.

Zum Abschluss dieser Arbeit zeigten der kristallographische R-Faktor von 0.223 und der freie R-Faktor von 0.245 eine gute Übereinstimmung zwischen Strukturmodell und Daten (Abbildung 28).

## Ergebnisse



**Abbildung 28:** Statistiken der Verfeinerung und Ramachandran-Diagramm der LHC-II Struktur. rmsd (root-mean-square-deviations) sind die mittleren quadratischen Abweichungen, die sich auf ideale Werte beziehen. Die umgrenzten Bereiche beschreiben Kernbereich (rot), erlaubten Bereich (gelb), zulässigen Bereich (beige) und verbotenen Bereich (weiß) der  $\phi/\psi$  Kombinationen des Proteinrückgrats. Glycinreste sind durch Dreiecke, alle anderen Aminosäuren durch Quadrate gekennzeichnet. Bei der Erstellung des Diagramms wurde das Programm PROCHECK benutzt.

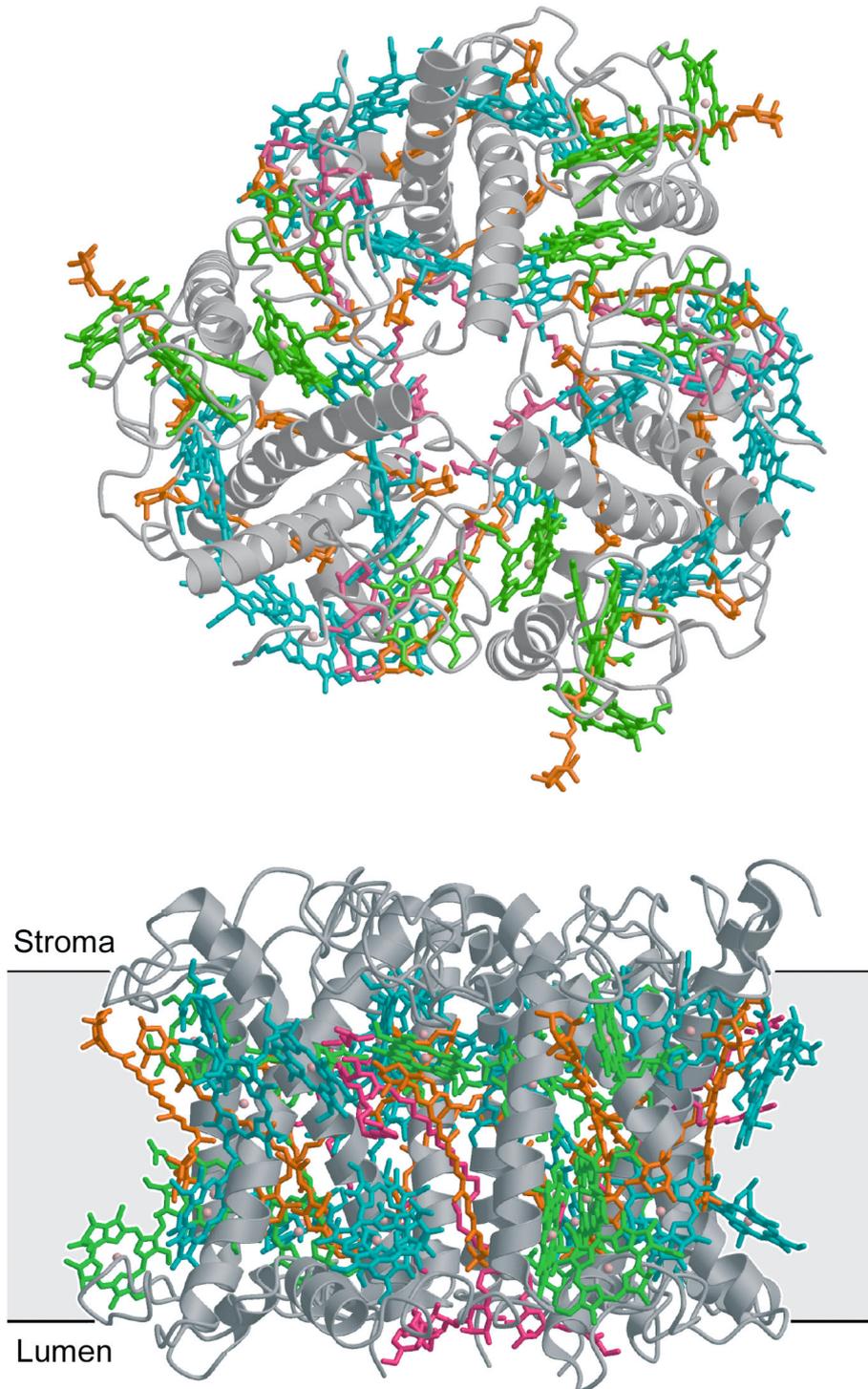
Ein weiterer Indikator für die Qualität der Struktur ist die Auftragung der Rotationswinkel ( $\phi$  und  $\psi$ ) um das  $C_{\alpha}$  Atom des Proteinrückgrats im sogenannten Ramachandran-Diagramm (Ramachandran et al. 1963). Diese Winkel haben in den Sekundärstrukturen eines Polypeptides bestimmte erlaubte Werte, die mit einer Vielzahl von Strukturen hoher Qualität bestimmt wurden. Bei einer gut definierten Struktur weisen mehr als 90% der Aminosäuren solche bevorzugten Winkelverhältnisse auf. Im Ramachandran-Diagramm der röntgenkristallographischen Struktur des LHC-II sind 99.4% Prozent aller Aminosäuren außer Glycin in erlaubten oder favorisierten Regionen. Die einzige Ausnahme ist Valin 119, dessen Carbonyl Sauerstoff jedoch als direkter Koordinationspartner für Chl 14 dient. Die Struktur zeigt damit eine exzellente Geometrie auf.

### **3.9 Struktur des Erbsen LHC-II bei 2.5 Å Auflösung**

#### **3.9.1 Übersicht des LHC-II Pigment/Protein Komplexes**

Bei der röntgenkristallographischen Struktur des LHC-II der Erbse handelt es sich genauer um das Modell eines Lhcb1 Homotrimers. Da dieses auch die bei weitem häufigste LHC-II Spezies ist, wird im Hinblick auf die Struktur innerhalb dieser Arbeit LHC-II als Synonym für Lhcb1 Homotrimere verwendet.

Die neue röntgenkristallographische Struktur des LHC-II der Erbse basiert auf der in der Einleitung beschriebenen, mittels 2D Kristallisation ermittelten Struktur des Erbsen LHC-II (Kühlbrandt et al. 1994). Sie basiert zum Teil auf denselben experimentellen Daten, da die elektronenkristallographisch ermittelte Dichte zur Bestimmung der Phasen und als Einschränkung während der ersten Verfeinerungsschritte verwendet wurde. Durch die röntgenkristallographischen Amplituden mit höherer Auflösung konnte das Strukturmodell jedoch in vielen wichtigen Punkten verbessert und vervollständigt werden. Abbildung 29 zeigt eine Übersicht der verbesserten neuen LHC-II Struktur bei 2.5 Å Auflösung.



**Abbildung 29:** Schematische Darstellung des LHC-II mit Sekundärstruktur des Peptidrückgrats und Co-Faktoren als Stabmodell (Chlorophyll a: Cyan, Chlorophyll b: Grün, Carotinoide: Orange, Lipide: Rosa). Trimer von der Stromaseite der Membran aus betrachtet und Seitenansicht mit stromaler Seite nach oben. Die genaue Position der Membran (Grau) wurde anhand der zweizähligen Symmetrie innerhalb einer Kristallebene bestimmt. Die Membran ist mit einer Dicke von 35 Å eingezeichnet, wodurch der Komplex ~ 13 Å aus der stromalen und ~ 8 Å aus der luminalen Seite der Membran herausragt.

Der Verlauf der Polypeptidkette zeigt eine weitestgehende Übereinstimmung mit dem bestehenden 3.4 Å Modell, jedoch gelang es, die fehlende Schleifenregion (Aminosäuren 100-116) und einen Teil des N-Terminus bis einschließlich Aminosäure 10 anzupassen. Interessanterweise bilden die bis dahin fehlenden Aminosäuren 97-105 eine zusätzliche  $\alpha$ -Helix. Auch die Position der bekannten Pigmente ist in guter Übereinstimmung mit der EM Struktur. Zusätzlich zu diesen konnten jedoch zwei weitere Chlorophylle, ein Neoxanthin und ein Violaxanthin identifiziert werden. Auch gelang die Identifizierung von zwei Lipidmolekülen, die wichtige Positionen innerhalb des Komplexes einnehmen. In dieser Arbeit gelang es jedoch nicht, alle vorhandenen Teile der Struktur anzupassen. So fehlen die ersten 9 Aminosäuren des funktionell interessanten N-Terminus, die zweite Fettsäurekette des DGDG und Teile von 4 der 14 Phytylketten.

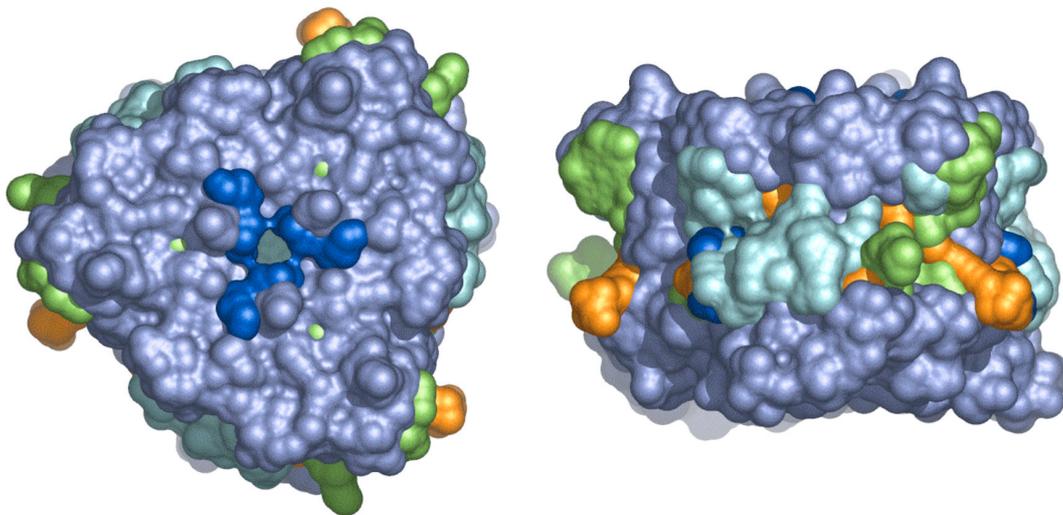
Dagegen gelang es die exakte Orientierung aller Chlorophylle zu bestimmen, wodurch die Bestimmung der relativen Dipolmomente ermöglicht wurde. Durch die höhere Auflösung gelang es außerdem 13 Chlorophylle eindeutig als Chlorophyll a und Chlorophyll b zuzuordnen, wobei es sich bei dem nicht eindeutig zugeordneten Chlorophyll mit höchster Wahrscheinlichkeit um Chlorophyll b handelt. Tabelle 5 zeigt eine neue Nomenklatur der Pigmente und die Chlorophyll/Carotinoid Interaktionen mit niedrigstem Abstand zwischen den beteiligten Pigmenten.

Chl: (Kühlbrandt et al. 1994)	Chl: (Liu et al. 2004)	Chl: diese Arbeit (Standfuss et al. 2005)	Carotinoid	niedrigster interatomarer Abstand der $\pi$ -Systeme [Å]
<b>Chlorophyll a:</b>				
a1	610	Chl 1	Lut 1	3.3
a2	612	Chl 2	Lut 1	3.5
a3	613	Chl 3	Lut 1	5.0
		Chl3	Vio	6.8
a4	602	Chl 4	Lut 2	3.2
a5	603	Chl 5	Lut 2	3.6
a6	604	Chl 6	Lut 2	4.8
		Chl 6	Neo	4.4
b2	611	Chl 7	Lut 1	9.1
b3	614	Chl 8	Lut 1	8.0
		Chl 8	Vio	4.9
<b>Chlorophyll b:</b>				
-	601	Chl 9	Lut 2	8.0
		Chl 9	Vio	4.1
a7	607	Chl 10	Lut 2	5.1
		Chl 10	Neo	4.3
		Chl 10	Vio	6.5
b1	608	Chl 11	Neo	4.3
b5	609	Chl 12	Lut 2	7.8
		Chl 12	Vio	6.2
b6	606	Chl 13	Lut 2	4.9
-	605	Chl 14	Neo	12.3

**Tabelle 5:** Nomenklatur der LHC-II gebundenen Pigmente. Aufgrund der besonderen funktionellen Bedeutung von Chlorophyll/Carotinoid Wechselwirkungen sind die niedrigsten Abstände zwischen den  $\pi$ -Elektronensystemen dieser Pigmente angegeben. In der verwendeten Nomenklatur sind die Chlorophylle von 1-14 durchnummeriert. Chl 1-8 sind Chl a und 9-14 sind Chl b Moleküle. Die zentralen Chl 1-6 entsprechen den Chl a1 bis a6 aus (Kühlbrandt et al. 1994)

### 3.9.2 Oberflächen des LHC-II Komplexes

Der LHC-II Komplex unterscheidet sich von den meisten anderen Proteinen durch die große Anzahl an gebundenen Co-Faktoren (Chlorophylle, Carotinoide und Lipide). Diese machen einen großen Anteil des gesamten Komplexes aus und sind nicht nur funktionell, sondern auch strukturell von entscheidender Bedeutung. Die elektronenkristallographisch ermittelte Struktur (Kühlbrandt et al. 1994) zeigte dies durch eine dichte Packung der Pigmente innerhalb des Proteins. Durch die zusätzlich gefundenen Pigmente und Lipide ist die Packungsdichte in der röntgenkristallographischen Struktur noch höher. Ohne Berücksichtigung der Wasserstoffatome werden in dieser Packung für jedes Cofaktoratom nur 1.5 Proteinatome benötigt. Diese dichte Packung resultiert in einer lokalen Pigmentkonzentration um 300 mM; ein Wert der selbst durch Lösen der Pigmente in organischen Lösungsmitteln nicht zu erreichen ist.

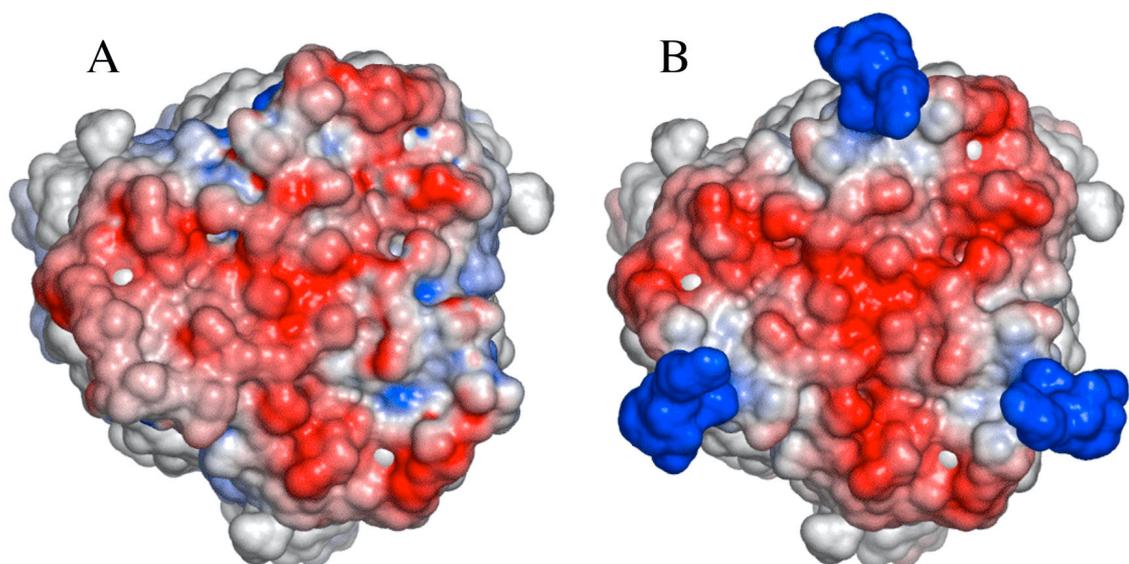


**Abbildung 30:** Oberflächen des LHC-II Komplexes. Trimer von der luminalen Seite aus gesehen und Seitenansicht mit luminaler Seite nach oben. Polypeptid: Blau, Lipid: Dunkelblau, Chl a: Cyan, Chl b: Grün, Carotinoide: Orange

Auffällig ist die Anordnung der hydrophoben Chlorophylle und Carotinoide, die sich zu einem hohen Anteil im Zentrum des Komplexes befinden (Abbildung 30). Die hydrophoben Pigmente werden dabei durch das Protein und die hydrophilen Zuckerreste des DGDG fast völlig gegen die wässrige Umgebung abgeschirmt, sind aber in der Membranebene gut zugänglich. Der

Ersatz defekter Pigmente oder deren regulativer Austausch wird so erleichtert und der Energietransfer zu benachbarten Lichtsammelkomplexen ermöglicht.

Die stromale Oberfläche und insbesondere der N-Terminus von LHC-II sind an der Membraninteraktion in den Granabereichen der Chloroplasten beteiligt. Es ist bekannt, dass Oberflächenladungen und Potentiale dabei eine wichtige Rolle spielen (Barber 1980). Die Ladungsverteilung wurde daher anhand der verbesserten Struktur untersucht (Abbildung 31).



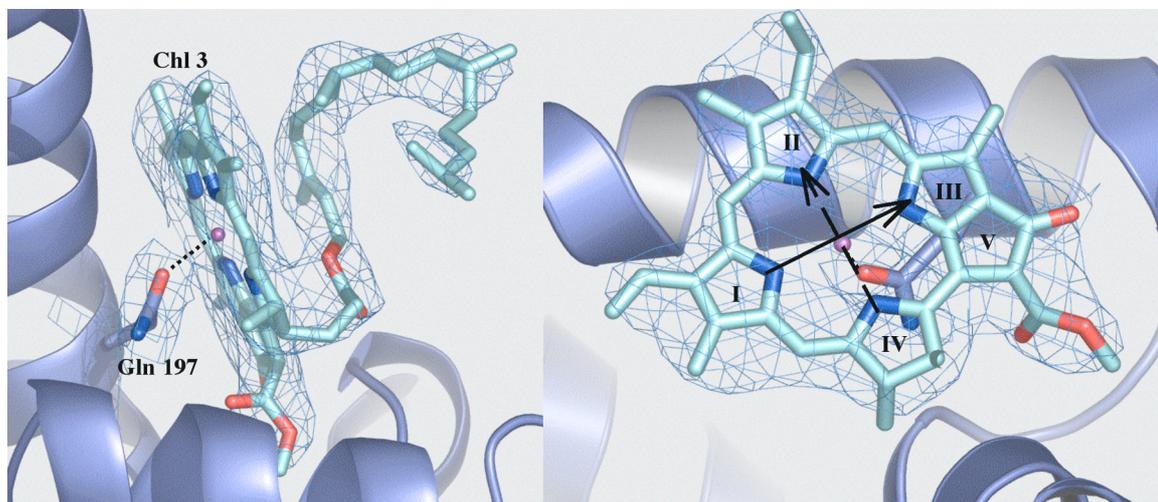
**Abbildung 31:** Oberflächenpotential auf der stromalen Seite des LHC-II Trimers. Negativ geladene Bereiche sind rot und positiv geladene Bereiche blau gefärbt. A: LHC-II der Erbse mit Aminosäuren 10-232. B: LHC-II der Erbse mit modellierten ersten 9 Aminosäuren.

Die stromale Oberfläche des LHC-II zeigt 10 negativ und 8 positiv geladene Aminosäuren. Vier der positiv geladenen Aminosäuren befinden sich jedoch innerhalb der ersten 9 in der Struktur nicht geordneten Aminosäuren und das resultierende Oberflächenpotential ist daher stark negativ. Werden jedoch die ersten 9 Aminosäuren auf Basis einer ähnlichen N-terminalen Sequenz (ribosomales Protein L39E, pdb Kode:1JJ2) modelliert und die Oberflächenpotentiale erneut berechnet, ergibt sich ein zusätzliches stark positives Potential an den drei N-Termini. Diese interessante Ladungsverteilung hilft die Bedeutung von LHC-II bei der Bildung der Granabereiche der Thylakoidmembran zu erklären.

### 3.9.3 Orientierung und Art der Chlorophylle

Nur ein geringer Teil der vom LHC-II gesammelten Lichtenergie wird von den Carotinoiden absorbiert. Der überwiegende Teil stammt von LHC-II gebundenen Chlorophyllen und auch die Energieübertragung innerhalb des Komplexes und auf benachbarte Komplexe, insbesondere dem Reaktionszentrum ist Aufgabe der Chlorophylle.

Essentiell für ein Verständnis des Energietransfers zwischen zwei Chlorophyllen ist die relative Orientierung der Ebene ihrer  $\pi$ -Elektronensysteme. Im bisherigen Strukturmodell des Erbsen LHC-II konnte die Ebene des  $\pi$ -Elektronensystems der meisten Chlorophylle mit guter Genauigkeit bestimmt werden. Da die Seitenketten der Chlorophylle jedoch nicht aufgelöst waren, fehlte die Lage der funktionell ebenso bedeutsamen Dipolmomente in dieser Ebene. Durch die höhere Auflösung des röntgenkristallographischen Modells konnten die meisten Seitenketten klar zugeordnet werden, wodurch eine eindeutige Bestimmung der Dipolmomente aller 14 Chlorophylle ermöglicht wurde.

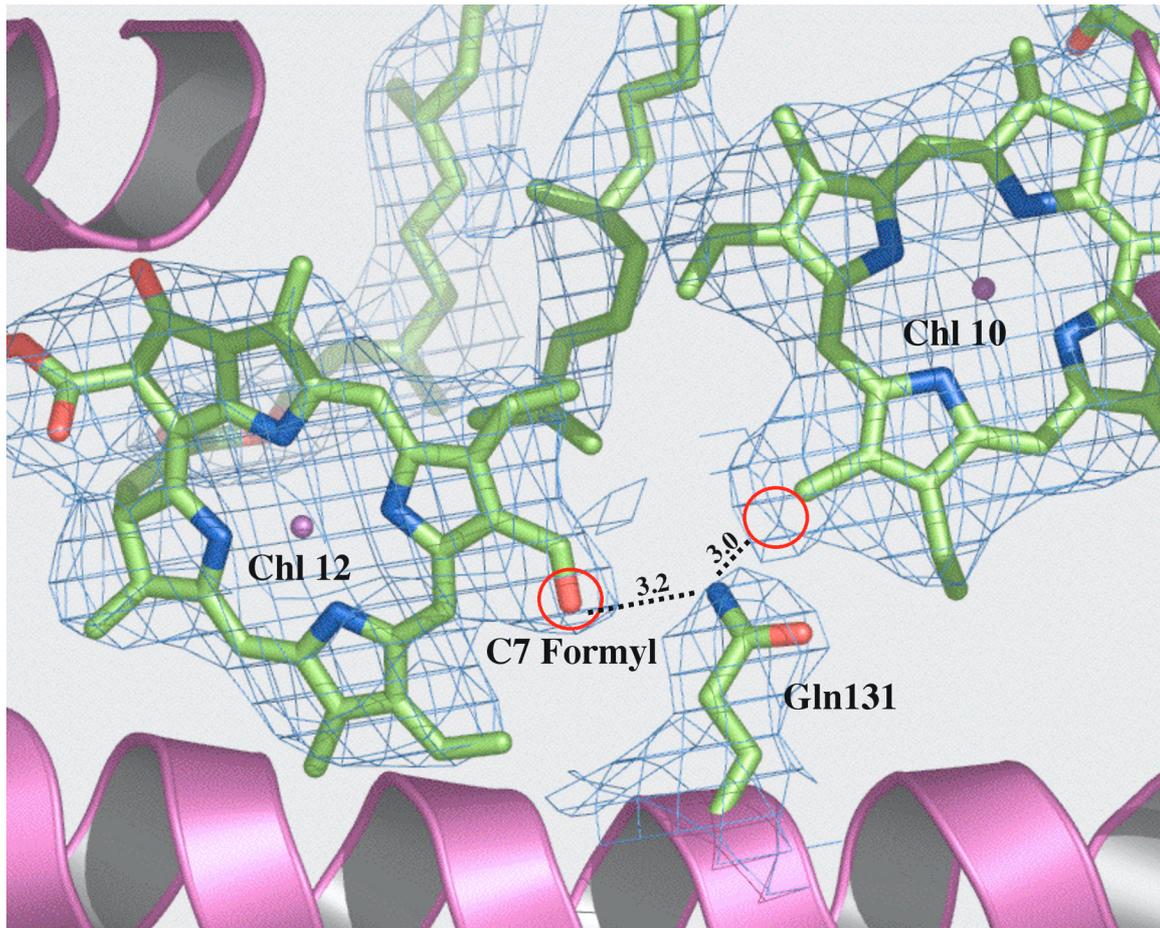


**Abbildung 32:** Bestimmung der Chlorophyll Dipolmomente. Polypeptid als schematische Darstellung der Sekundärstruktur. Chl 3 als Stabmodell und zugehöriger 2Fo-Fc Elektronendichte. Q<sub>x</sub> (gestrichelt) und Q<sub>y</sub> (durchgezogen) Dipolmomente (Petke et al. 1979) sind als Pfeile dargestellt.

In Abbildung 32 ist am Beispiel des Chl 3 die Bestimmung des Q<sub>x</sub> und Q<sub>y</sub> Dipolmoments anhand der Position der Chlorophyll Seitenketten gezeigt. Für Chlorophyll-Moleküle liegt das kurzwellige Q<sub>x</sub> Dipolmoment in der Ebene des  $\pi$ -Elektronensystems entlang der Verbindungslinie zwischen den Pyrrolringen

II und IV, während das langwellige  $Q_y$  Dipolmoment zwischen den Pyrrolringen I und III liegt (Petke et al. 1979). Die 2Fo-Fc Elektronendichte zeigte eine gute Übereinstimmung mit dem flachen Tetrapyrrolring des Chlorophylls und den Seitenketten einschließlich der langen und potentiell flexiblen Phytlykette. Dies legt die Orientierung des Chlorophylls eindeutig fest, wodurch auch die Richtung der Dipolmomente bestimmt werden kann.

Neben Einflüssen der Proteinumgebung hängen die für den Energietransfer wichtigen Absorptions- und Emissionseigenschaften vom Typ des Pigments ab. Von besonderer funktioneller Bedeutung sind dabei die spektralen Unterscheide zwischen Chlorophyll a und Chlorophyll b. Diese werden strukturell durch eine Formylgruppe an Position C7 des Pyrrolrings II hervorgerufen. Dieser Unterschied von einem Sauerstoffatom ist bei einer Auflösung von 2.5 Å nur schwer direkt an der Elektronendichte zu erkennen. Da aber durch die bekannte Orientierung der Chlorophylle die Position des Sauerstoffs eindeutig bekannt ist, ist der Unterschied für die meisten Chlorophylle schon in der 2Fo-Fc Elektronendichtekarte und an der An- bzw. Abwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen für die Formylgruppe erkennbar (Abbildung 33).



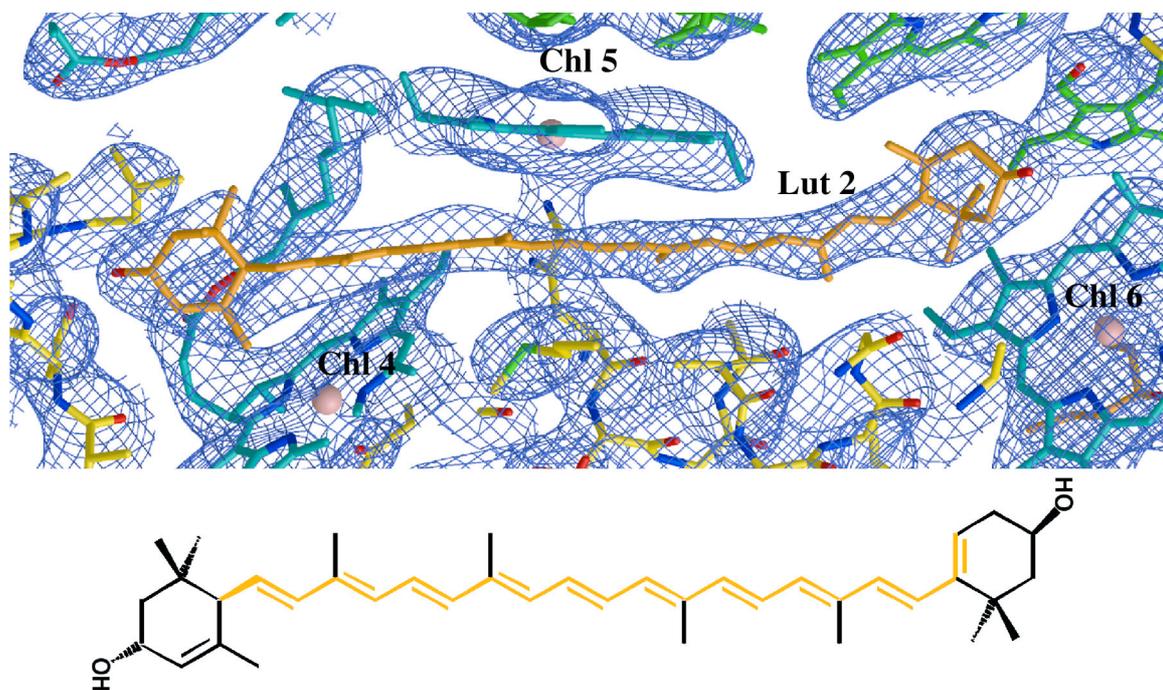
**Abbildung 33:** Unterscheidung von Chlorophyll a und Chlorophyll b. Spezifität der Chlorophyll b Bindetaschen wird durch spezifische Wechselwirkungen (gestrichelte Linie, Abstände in Å) des C7 Formyl Sauerstoff (rote Kreise) hergestellt. Das Sauerstoffatom von Chl b 10 wurde entfernt ist jedoch klar in der 2Fo-Fc Elektronendichte erkennbar.

Eine weitere Absicherung der Zuordnung wurde durch die Verwendung von Fo-Fc Differenzelektronendichtekarten ohne Sauerstoff des Chlorophyll b erreicht. Auf diese Weise gelang es bis auf Chl 9 alle Chlorophylle eindeutig Chlorophyll a oder Chlorophyll b zuzuordnen.

### 3.9.4 Carotinoide in der LHC-II Struktur

Neben dem Energietransfer nehmen die LHC-II gebundenen Carotinoide wichtige schützende und regulatorische Funktionen wahr. So sind die schon in der elektronenkristallographischen Struktur aufgelösten zentralen Luteine essentiell für die Löschung von potentiell gefährlichen Tripletanregungszuständen des Chlorophyll a (Eads et al. 1989; Kühlbrandt

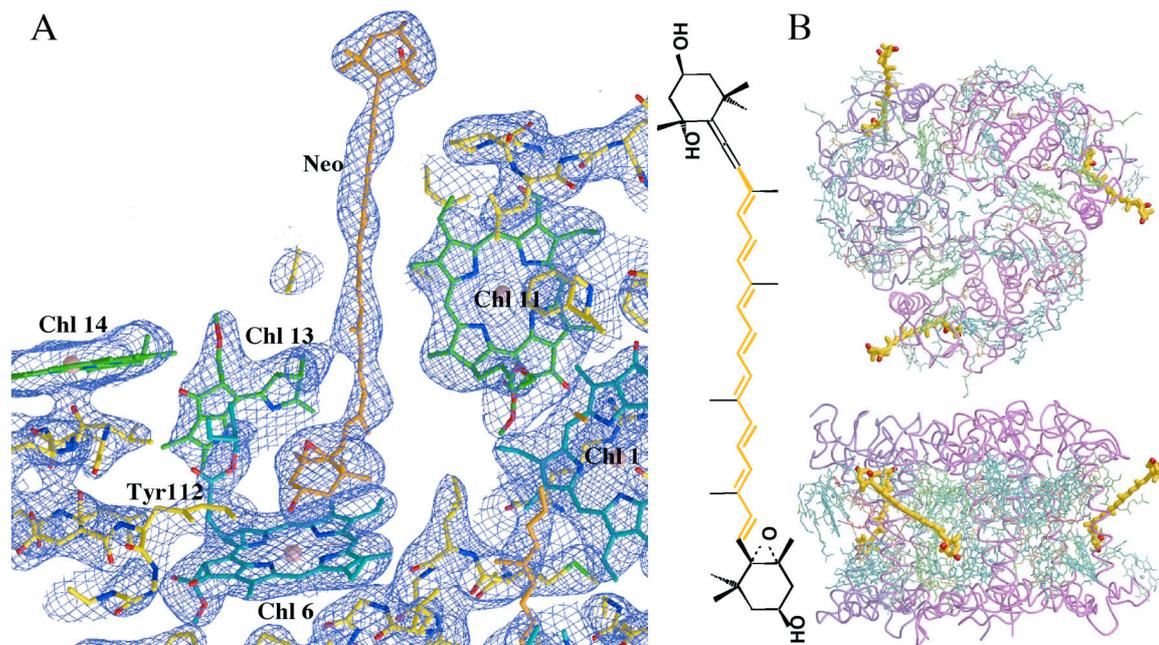
et al. 1994). Zusätzlich zu der genauen Position konnte anhand der Geometrie des Polyen Rückgrats auch die Orientierung der Luteine in der röntgenkristallographischen Struktur bestimmt werden (Abbildung 34). Die Orientierung basiert dabei auf im Verhältnis zueinander unterschiedlich gedrehten Kopfgruppen des Luteins. Die Orientierung war daher für beide Luteine klar anhand der Elektronendichte zu bestimmen.



**Abbildung 34:** Chlorophyll/Carotinoid Interaktionen des Lutein 2. Das Lutein steht in engem Kontakt zu Chl 4-6. Die Ebene des  $\pi$ -Elektronensystems von Chl 5 und dessen  $Q_x$  Dipolmoment laufen parallel zu dem Carotinoid.

Die Luteine sind über polare Wechselwirkungen (Lut 1:Gln197/Pro205/Asp126/Leu164, Lut 2:Trp97/Asp47/Ala49/Thr48) mit dem restlichen Komplex verbunden. Eine Reihe von Chlorophyll a Molekülen befindet sich in Abständen von  $\sim 10$  Å um die Luteine. Zwei besonders interessante Chlorophyll/Lutein Paare stehen über zweizählige Symmetrie miteinander in Beziehung und werden von Chl1/Chl2/Lut1 und Chl4/Chl5/Lut2 gebildet. Die Abstände der  $\pi$ -Elektronensysteme dieser Chlorophylle zu den entsprechenden Luteinen betragen 3.3-3.6 Å und die Chlorophylle stehen daher in engem van der Waals Kontakt zu den Luteinen. Die  $Q_x$  Dipolmomente von Chl 2 und Chl 5 verlaufen des Weiteren exakt parallel zu dem Polyen Rückgrat des jeweiligen Luteins.

Auch für die zwei zusätzlich in der röntgenkristallographischen Struktur aufgelösten Carotinoide werden unterschiedliche Funktionen diskutiert. Die genaue Position und Zuordnung dieser Carotinoide ist daher essentiell für ein besseres Verständnis des LHC-II Komplexes. Das Carotinoid Neoxanthin liegt in Thylakoiden als 9-cis Isomer vor (Takaichi und Mimuro 1998) und verfügt über zwei unterschiedliche Kopfgruppen (Abbildung 35).



**Abbildung 35:** Neoxanthin im LHC-II Komplex. A: Zuordnung der Elektronendichte zu 9-cis Neoxanthin. B: Übersicht des LHC-II Trimers. Neoxanthin ist hervorgehoben.

Strukturell führt die 9-cis Bindung zu einem hakenförmig gebogenen Ende auf einer Seite des Neoxanthins. Dieses Ende war klar in der Elektronendichte erkennbar, weshalb sowohl Typ wie auch Orientierung dieses Carotinoids eindeutig zugeordnet werden konnten. Eine Kopfgruppe des Neoxanthins ist über klar definierte polare Wechselwirkungen zu Tyr112 und einer Keto Gruppe des Chl 13 mit dem restlichen Komplex verbunden. Die andere Kopfgruppe bildet keine spezifischen Wechselwirkungen aus und ragt aus dem Komplex heraus, wodurch ein großer Teil des Neoxanthins in der Thylakoidmembran exponiert liegt.

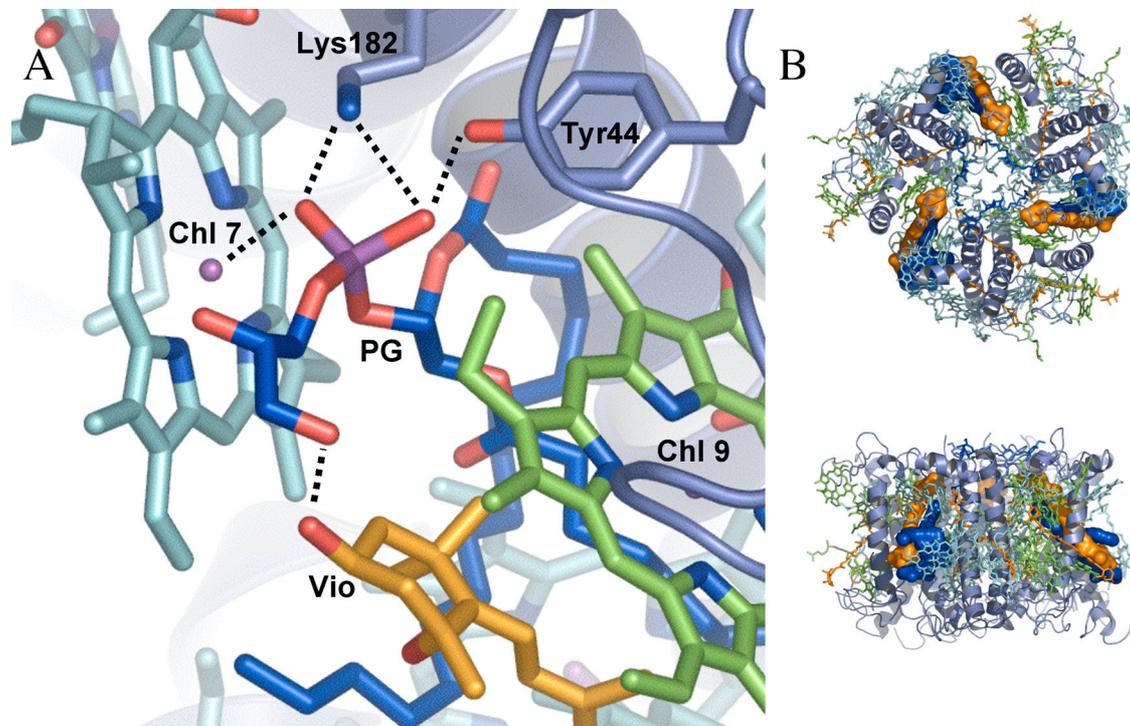
Neben den bereits erwähnten Luteinen und dem Neoxanthin ist auch ein Violaxanthin pro monomerem Komplex zu erwarten (Ruban et al. 1999). Dieses ist jedoch relativ lose gebunden und geht daher häufig bei der Aufreinigung verloren. Violaxanthin wird im Zuge des Xanthophyll Zyklus bei

starkem Lichteinfall zu Zeaxanthin umgewandelt (Farber et al. 1997), welches mit höherer Affinität als Violaxanthin an den LHC-II Komplex bindet (Ruban et al. 1999; Hobe et al. 2000). Bei dem vierten gefundenen Carotinoid könnte es sich demnach um Violaxanthin, Zeaxanthin oder, weniger wahrscheinlich, auch um das Zwischenprodukt Antheraxanthin handeln. Diese drei Xanthophylle unterscheiden sich durch Epoxygruppen an den Kopfgruppen, welche schwer anhand der Elektronendichte zuzuordnen sind. Die Zuordnung der Elektronendichte gelang jedoch anhand der relativen Rotation der Kopfgruppen, welche eine Unterscheidung zwischen Violaxanthin und Zeaxanthin zulassen. Eine Reihe von Chlorophyllen befinden sich in geringem Abstand und guter Orientierung zum konjugierten  $\pi$ -Elektronensystems des Violaxanthins (Frank et al. 1994; Ma et al. 2003) und müssten einen effizienten Energietransfer von und zu dem Viola/Zeaxanthin ermöglichen. Besonders Chl 3, Chl 8, Chl 9, Chl 10 und Chl 12 weisen Abstände zum  $\pi$ -System des Carotinoids unter 7 Å auf und kommen für einen Energietransfer in Frage.

### 3.9.5 Lipide in der LHC-II Struktur

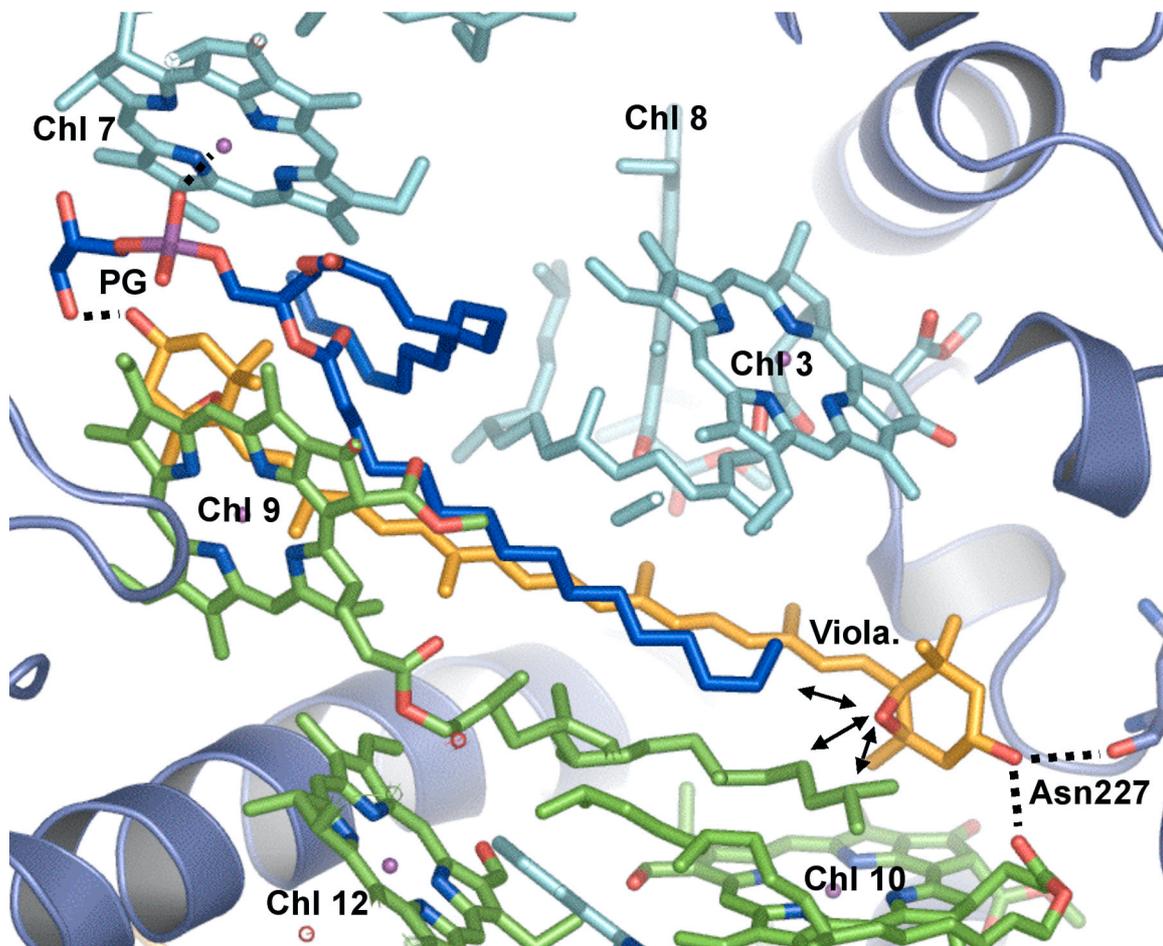
Detaillierte biochemische Untersuchungen haben die Bedeutung von Lipiden für die Struktur und Funktion des LHC-II gezeigt (Nußberger et al. 1993; Hobe et al. 1994; Hobe et al. 1995). Das Lipid DGDG wird für die Bildung von 2D und den meisten 3D Kristallen benötigt, ist aber nur lose an den Komplex gebunden. Die Struktur zeigt ein DGDG Molekül pro Monomer, welches über drei polare Wechselwirkungen an die C $\alpha$ -Carboxygruppen der Aminosäuren 199-201 bindet. Das Lipid ist allerdings nicht gut geordnet und die Position des zweiten Fettsäurerests konnte nicht bestimmt werden. Im Trimer befinden sich drei DGDG Moleküle auf der luminalen Seite und bedecken einen großen Teil des zentralen Hohlraums. Das Innere dieses Hohlraums wird zu einem Teil durch Phytylketten der Chlorophylle ausgekleidet und ist deutlich hydrophober als die wässrige Umgebung außerhalb des Proteins. Der fehlende hydrophobe Fettsäurerest muss daher in den Hohlraum hinein ragen, wodurch diese zum größten Teil ausgefüllt wird.

Das zweite an LHC-II gebundene Lipid Phosphatidyl-Glycerol (PG) hat eine besondere Bedeutung für die Trimerisierung des Komplexes (Nußberger et al. 1993). In der röntgenkristallographischen Struktur ist ein PG pro Monomer gut aufgelöst und fest an den Komplex gebunden.



**Abbildung 36:** Position des Phosphatidyl-Glycerol (PG) und Violaxanthin im LHC-II Komplex. A: Übersicht der polaren Wechselwirkungen (gestrichelte Linien) des PG mit dem restlichen LHC-II Komplex. Polypeptid als schematische Darstellung der Sekundärstruktur mit Ausnahme von Lys182 und Tyr44. Diese Aminosäuren und gebundene Co-Faktoren dargestellt als Stabmodell. B: Übersicht des LHC-II Trimers. PG und Violaxanthin sind durch Oberflächendarstellung hervorgehoben.

Abbildung 36 zeigt die Lokalisierung des Lipids nahe an der Grenze zwischen zwei Monomeren. Mit dem Polypeptid ist das PG über eine Salzbrücke mit Lys 182 und einer Wasserstoffbrücke mit Tyr 44 verbunden. Neben der Stabilisierung des Trimers ist das PG auch an der Bindung zweier Pigmente beteiligt. Ein Sauerstoffatom des PG Phosphatrests bildet den direkten Koordinationspartner für das zentrale Mg des Chl 7, welcher in der elektronenkristallographischen Struktur nicht enthaltenen war. Zusätzlich zur Koordinierung des Chl 7 steht PG in direkter polarer Wechselwirkung mit der Hydroxygruppe des Violaxanthins und ist daher auch an der Bindung dieses Pigments beteiligt.



**Abbildung 37:** Interaktionen zwischen PG, Violaxanthin und dem Rest des LHC-II Komplexes. Co-Faktoren und Asn227 sind als Stabmodell und der Rest des Polypeptids als schematische Sekundärstruktur gezeigt. Polare Wechselwirkungen sind als gestrichelte Linien und potentiell abstoßende Wechselwirkungen als Doppelpfeile dargestellt.

Eine Fettsäurekette des PG läuft annähernd parallel zu der Polyenkette des Carotinoids (Abbildung 37) und bildet zusammen mit der Phytylkette von Chl 9 eine sehr hydrophobe Umgebung um die hydrophile Epoxygruppe des potentiellen Violaxanthins. Besonders der enge van der Waals Kontakt zwischen dem Phytylrest und der Epoxygruppe (Abstand 2.8 Å) würde eine abstoßende Kraft zwischen diesen Gruppen hervorrufen. Das Ende des zweiten Fettsäurerestes befindet sich nur in einem Abstand um 4 Å zu der anderen Epoxygruppe des Violaxanthins und trägt dort zu einer eher hydrophoben Umgebung bei. Interessanterweise unterscheidet sich Zeaxanthin von Violaxanthin gerade in der Abwesenheit dieser beiden Epoxygruppen.

## 4 Diskussion

### 4.1 LHC-II Isoformen

#### 4.1.1 Darstellung von reinen, funktionell intakten LHC-II Isoformen

Die Heterogenität der isoformen Zusammensetzung von LHC-II wurde schon vor längerem erkannt, dennoch weiß man nur verhältnismäßig wenig über ihre funktionelle Bedeutung. Dies ist vor allem auf eine fehlende Methode zur Isolierung von LHC-II Isoformen zurückzuführen. Da eine möglichst homogene Probe auch für strukturelle Untersuchungen von großem Vorteil ist, wurden eine Reihe von Versuchen unternommen, reine LHC-II Isoformen darzustellen.

Als einfachste Methode erscheint dabei die direkte Isolation aus Pflanzenmaterial. Da sich die Isoformen in den meisten anderen Parametern stark gleichen, ist die Auftrennung anhand unterschiedlicher Ladung eine nahe liegende Möglichkeit zur direkten Isolation aus Pflanzenmaterial. Tatsächlich zeigten frühere Versuche mittels Ionenaustauschchromatographie eine Auftrennung der LHC-II Hauptpopulation in mindestens zwei Fraktionen, die aber nicht zufriedenstellend zugeordnet werden konnten (Nußberger 1994; Lamborghini 2002). Eindeutigere Ergebnisse auf analytischer Ebene wurden mittels nativer IEF Gelelektrophorese erzielt (Jackowski et al. 2001; Jackowski und Pielucha 2001). In dieser Arbeit wurde ein der IEF Gelelektrophorese ähnliches, säulenbasiertes Aufreinigungsverfahren getestet. Mit dieser chromatographischen Fokussierung gelang die Auftrennung von nativem LHC-II sowohl analytisch wie auch präparativ in zwei Hauptfraktionen. Die bei der zweiten Fraktion auftretende Schulter im Elutionsprofil deutete allerdings auf eine schlechte Trennung zweier Spezies hin. Des Weiteren kam es durch die extremen pH-Werte zu einer Beschädigung der Komplexe, welche sich in der Chl b Schulter der Fluoreszenzspektren zeigte. Da außerdem eine Zuordnung der Fraktionen zu verschiedenen Isoformen sehr schwierig ist, eigneten sich diese

Präparationen nicht für eine Isolierung und Charakterisierung der reinen LHC-II Isoformen. Für Kristallisationsexperimente ist eine genaue Zuordnung der Fraktionen zunächst nicht unbedingt nötig. Die zwei Hauptfraktionen wurden daher auf ihre Kristallisierbarkeit unter Standardbedingungen getestet, ohne dass eine genaue Zuordnung der Fraktionen erfolgt ist. Trotz Zugabe von zusätzlichem DGDG gelang es nicht, mit den beiden Fraktionen Kristalle zu erzeugen. Auch dies ist wahrscheinlich auf die Beschädigung der Komplexe durch die extremen pH-Werte während der chromatographischen Fokussierung zurückzuführen.

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung von reinen LHC-II Isoformen stellt die genetische Modifikation von Pflanzen dar. Dies ist aber aufgrund der großen Anzahl von LHC-II Genen schwierig und hat in früheren Versuchen mit Histidin markiertem Lhcb1 nur zu einer geringen Ausbeute geführt, da die Expression des veränderten Gens in der Pflanze herunterreguliert wurde (Flachmann und Kühlbrandt 1995). In den letzten Jahren gelang es *Arabidopsis* Lhcb1 und Lhcb2 Deletionsmutanten herzustellen, was zu interessanten Ergebnissen über den Phänotyp der Pflanzen (Andersson et al. 2003) und den Aufbau des PS-II Superkomplexes führte (Ruban et al. 2003). In Zukunft könnten mit ähnlicher Methodik auch reine LHC-II Isoformen in großen Mengen direkt aus Pflanzenmaterial gewonnen werden. Diese wären ideal für zukünftige Kristallisationsexperimente an reinen Isoformen und würde auch die Möglichkeit zur strukturellen Untersuchung von LHC-II Mutanten eröffnen.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit einer anderen Methode zur Herstellung reiner Isoformen, der *in vitro* Faltung von LHC-II. Dies erscheint zunächst schwierig, da LHC-II mit 18 Pigmentmolekülen und mehreren gebundenen, funktionell relevanten Lipiden äußerst komplex ist. In einer Reihe von Arbeiten wurde jedoch gezeigt, dass sich LHC-II in Anwesenheit der richtigen Pigmente mit hoher Effizienz selbst faltet und *in vitro* gefaltetes LHC-II grundsätzlich identisch zu dem aus Pflanzen isolierten Komplex ist (Paulsen et al. 1990; Hobe et al. 1994; Hobe et al. 2003). Die heterologe Expression und anschließende Faltung mit isolierten Pigmenten ist daher eine Alternative zur direkten Auftrennung der LHC-II Isoformen. Aufgrund der nötigen getrennten Aufreinigung von Chlorophyllen, Carotinoiden, Polypeptid

und Lipiden ist diese Methode wesentlich arbeitintensiver als die direkte Aufreinigung von LHC-II aus Pflanzenmaterial. Solche Komplexe können jedoch bei Bedarf relativ leicht durch Mutationen oder durch Rückfaltung mit unterschiedlichen Pigmentmischungen modifiziert werden. In dieser Arbeit konnte sowohl die Faltung im analytischen Maßstab weiterentwickelt, wie auch ein Protokoll zur Faltung von mehreren mg trimeren LHC-II entwickelt werden. Alle drei expremierten LHC-II Isoformen konnten mit vergleichbarer Effizienz zu monomeren Pigment-Protein Komplexen gefaltet werden. Die Anzahl und Art von gebundenen Pigmenten ist ein wichtiger Indikator für die Qualität von rekombinantem LHC-II. Für alle drei Isoformen war die ermittelte Pigmentstoichiometrie vergleichbar zu der mittels HPLC Analyse ermittelten Stoichiometrie von nativem LHC-II (Butler und Kühlbrandt 1988) und der in der Struktur erkennbaren Pigmente. Fluoreszenz-Emissions Spektren sind ein weiterer Indikator für intaktes LHC-II und zeigten für alle gefalteten Isoformen einen vollständigen Energietransfer von Chl b nach Chl a, ohne verbleibende Chl b Emission. Bei allen drei rekombinant hergestellten Isoformen handelte es sich daher um voll funktionsfähiges LHC-II mit allen Pigmenten in der richtigen Position und Orientierung. Zusätzlich zu den Monomeren konnten von den Lhcb1 und Lhcb2 Isoformen auch Trimere in ausreichender Menge und Qualität für eine 3D Kristallisation aus Einschlusskörpern gefaltet werden. Für weiterführende Experimente bezüglich Struktur und Funktion der LHC-II Isoformen, steht damit eine Möglichkeit zur Verfügung, funktionell intakte LHC-II Isoformen in größeren Mengen rekombinant herzustellen. Dies eröffnet die Möglichkeit funktionell interessante Mutanten oder auch Komplexe mit spezifischer Pigmentbesetzung herzustellen und spektroskopisch oder strukturell zu untersuchen. Insbesondere die Charakterisierung von Mutanten denen spezielle Pigmente fehlen oder der Austausch von Violaxanthin zu Zeaxanthin, könnte für die weitere Aufklärung der Funktionen des LHC-II von Bedeutung sein.

#### **4.1.1.1 Interspezies Vergleich der LHC-II Isoformen**

In dieser Arbeit wurden die Lhcb2 und Lhcb3 Isoformen aus *Arabidopsis thaliana* kloniert, expremiert, rückgefaltet und mit dem gut charakterisierten

Lhcb1 der Erbse verglichen. Die Sequenzen des Lhcb1 von Erbse und *Arabidopsis* sind zu 91.8 % identisch und die korrespondierenden Proteinkomplexe sollten daher sehr ähnlich sein. Die Sequenzidentität von Lhcb1 und Lhcb2 von *Arabidopsis* ist im Vergleich dazu mit 66.8 % deutlich geringer. Dies ist ein Beispiel dafür, dass dieselben Isoformen unterschiedlicher Spezies zueinander weit ähnlicher sind als unterschiedliche Isoformen derselben Spezies. Dies wurde in einer Reihe von früheren Vergleichen von LHC-II Genen einer großen Anzahl unterschiedlicher Arten gezeigt (Jansson et al. 1992; Jansson 1994) und führte ursprünglich zu der Zuordnung von LHC-II Genen zu drei Gruppen. Ein Überdecken der funktionellen Charakteristika einzelner Isoformen durch kleine Sequenzunterschiede zwischen Arten ist daher unwahrscheinlich. Tatsächlich waren in unseren Versuchen Lhcb1 der Erbse und Lhcb2 von *Arabidopsis* kaum zu unterscheiden, wohingegen Lhcb3 aus *Arabidopsis* eindeutige Unterschiede zu Lhcb2 derselben Art zeigte.

### 4.1.2 Pigment Organisation der LHC-II Isoformen

Die Art und Anzahl von gebundenen Pigmenten und ihre Anordnung im Pigment-Protein Komplex sind von besonderer Bedeutung für die Funktion von LHC-II. Beide Parameter spiegeln sich in den spektralen Eigenschaften der Komplexe wieder. Da alle Chlorophyll koordinierenden Aminosäuren konserviert und auch die restlichen Sequenzen hoch homolog sind, können für alle LHC-II Isoformen sehr ähnliche biochemische und spektrale Eigenschaften erwartet werden. Tatsächlich zeigten alle drei gefalteten Isoformen typische Eigenschaften von aus der Pflanze isolierten nativen LHC-II. Einige interessante Unterschiede zeigten sich jedoch in der Anzahl der gebundenen Pigmente und in den Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der drei Isoformen. Einer der signifikantesten Unterschiede war die Chl a Absorption der Komplexe, welche wahrscheinlich die unterschiedliche lokale Proteinumgebung einzelner Chlorophyll a Moleküle reflektiert. Die Unterschiede der Absorptionsbande bei 680 nm ist dabei von besonderem Interesse, da diese Chl 2 zugeordnet wurde (Rogl et al. 2002). Die Entfernung dieses Chlorophylls durch Mutation der

---

koordinierenden Aminosäure resultiert in einer Verschiebung des Fluoreszenz-Emissions Signals (Rogl und Kühlbrandt 1999). Die spektralen Unterschiede in Absorption und Emission der Chl 2 Deletionsmutante legen nahe, dass dieses Chlorophyll die Anregungsenergie vom LHC-II auf andere Komplexe überträgt. Interessanterweise zeigt Lhcb3 eine ähnliche Verschiebung der Fluoreszenz-Emission wie diese Mutante. Die Lhcb2 Isoform zeigt zwar keine Verschiebung, jedoch eine deutliche Verbreiterung des Emissionspeaks. Trotz ihrer weitestgehend identischen Pigmentorganisation absorbieren und emittieren damit alle LHC-II Isoformen, und besonders Lhcb3, Licht unterschiedlicher Wellenlänge.

Ein interessanter Unterschied zwischen den Isoformen ist das 470 nm CD-Signal von Lhcb3 Monomeren. Aus Pflanzen isoliertes trimeres LHC-II wie auch Lhcb1 und Lhcb2 Trimere zeigen ein zwar stärkeres doch ähnliches Signal bei 472 nm. Dieses Signal wurde auf paarweise Interaktion von Chlorophyllen verschiedener Monomere im Trimer zurückgeführt (Hobe et al. 1994). Aufgrund der Wellenlänge des Signals ist dabei höchst wahrscheinlich Chlorophyll b beteiligt. Mögliche Kandidaten wären Chl b 9 und Chl b 12, da diese die einzigen Chlorophyll b Moleküle mit starker Kopplung zwischen Monomeren innerhalb eines Trimers sind (Liu et al. 2004). Da Lhcb3 keine stabilen Homotrimere bildet, könnte das 470 nm Signal dieser Isoform auf den Verlust eines dieser Chlorophylle zurückzuführen sein. Dies ist in Übereinstimmung mit der niedrigeren Absorption um 470 nm und dem in der HPLC Analyse gezeigten Verlustes eines Chlorophyll b Moleküls in dieser Isoform. Das zusätzliche negative Signal bei 470 nm in Lhcb3 Monomeren könnte daher auf den Verlust von Chl b 9 oder Chl b 12 zurückzuführen sein.

#### **4.1.3 Homo- und Heterotrimere der LHC-II Isoformen**

In der Thylakoidmembran liegt LHC-II hauptsächlich als Trimer vor. Native LHC-II Trimere sind allerdings keine homogene Population, sondern bestehen aus Homo- und Heterotrimeren der drei genetisch konservierten LHC-II Isoformen (Jansson 1994; Jackowski et al. 2001). Der evolutive Vorteil für die Variabilität des LHC-II ist wahrscheinlich die Adaption des Komplexes an spezielle Funktionen in Lichtsammlung, Energietransfer und Regulation der

Photosynthese. Für die Erforschung der möglichen Isoform Kombinationen und deren Funktionen stellen gefaltete, monomere LHC-II Isoformen ein gutes Ausgangsmaterial dar. Die Versuche hinsichtlich der Trimerbildung zeigen klar, dass Lhcb1, Lhcb2 und eine Mischung von beiden Trimere mit vergleichbarer Effizienz bilden. Da in der Gelelektrophorese jedoch nicht zwischen Lhcb1 und Lhcb2 unterschieden werden konnte, fehlt ein direkter Beweis für die Bildung von Lhcb1/Lhcb2 Heterotrimeren. Da aber sowohl Lhcb1 wie auch Lhcb2 Heterotrimere mit dem deutlich unterschiedlichen Lhcb3 bilden, sollten sich auch Lhcb1/Lhcb2 Heterotrimere unter diesen Bedingungen bilden. Ein Lhcb2 Homotrimer wurde bis heute nicht in Thylakoidmembranen gefunden. Der Hohe Grad an Übereinstimmung zwischen Lhcb1 und Lhcb2 und die Leichtigkeit mit der Lhcb2 Homotrimere *in vitro* bildet, sprechen allerdings für ein *in vivo* Vorkommen von Lhcb2 Homotrimeren. Bei Wachstum unter normalen Lichtbedingungen exprimieren Pflanzen deutlich mehr Lhcb1 als Lhcb2 (Walters und Horton 1999). Bestehen keine Unterschiede in der Effizienz der Trimerbildung würde diese Verteilung zu einer Mehrheit von Lhcb1 Homotrimeren, einigen Lhcb1/Lhcb2 Heterotrimeren und einer kleinen Anzahl von Lhcb2 Homotrimeren führen. Diese geringe Menge könnte erklären warum Lhcb2 Homotrimere bei *in vivo* Untersuchungen nicht gefunden wurden, würde jedoch eine spezielle Funktion dieser Trimere nicht ausschließen.

Auch wenn alle bekannten für die Trimerbildung nötigen Aminosäuren in der Lhcb3 Sequenz konserviert sind, konnte diese Isoform als einzige keine stabilen Homotrimere bilden. Diese Arbeit zeigt jedoch eindeutig, dass Lhcb3 stabile Heterotrimere sowohl mit Lhcb1, wie auch mit Lhcb2 bildet. Diese Heterotrimere zerfielen auch nicht während Dichtegradientenzentrifugation und nativer Gelelektrophorese und sind daher von vergleichbarer Stabilität wie Lhcb1 und Lhcb2 Homotrimere. Da Lhcb1 und Lhcb2 nicht unterscheidbar waren, konnte mit diesen Experimenten ein Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 Heterotrimer nicht nachgewiesen werden. Gerade die Ähnlichkeit von Lhcb1 und Lhcb2 in macht aber die Bildung eines Heterotrimers welches alle drei Isoformen enthält sehr wahrscheinlich.

Diese Arbeit gibt daher Hinweise oder zeigt direkt die Bildung von stabilen LHC-II Trimeren in allen möglichen Kombinationen, mit der einzigen

---

Ausnahme des Lhcb3 Homotrimeren. Die Funktion der Lhcb3 Isoform ist daher wahrscheinlich abhängig von der Anwesenheit der anderen Isoformen im heterotrimeren LHC-II.

#### 4.1.4 Mögliche Funktionen der LHC-II Isoformen

Wie die vielfältigen Rollen von LHC-II in der Photosynthese vermuten lassen, sind LHC-II Komplexe in allen Pflanzen hoch konserviert. Unter normalen Bedingungen ist Lhcb1 die bei weitem häufigste Isoform. In *Arabidopsis thaliana* wurde z.B. ein Verhältnis von grob 6:2:1 für Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 gefunden (Jackowski et al. 2001). Dieses Verhältnis ist allerdings nur ein Richtwert, der stark von den jeweiligen Wachstumsbedingungen abhängt. Besonders die Expression von Lhcb2 kann bei geringer Lichteinstrahlung um einen Faktor von 2-3 zunehmen (Walters und Horton 1999). Diese Bedingungen würden zu einer Zunahme von Lhcb2 Homo- und Heterotrimeren führen, da Lhcb1 und Lhcb2 in Bezug auf ihre Trimerbildung nicht zu unterscheiden sind. Da Lhcb2 hauptsächlich in der peripheren LHC-II Subpopulation vorkommt (Larsson et al. 1987), würde dies zu einer Vergrößerung der peripheren Antenne und damit der gesammelten Lichtmenge führen. Dieser einfache Mechanismus würde eine Anpassung der Photosynthese an limitierende Lichtbedingungen ermöglichen und wäre nur von dem Expressionslevel der Lhcb2 Isoform abhängig.

Die Anpassung der Antenne über den Expressionslevel ist ein langsamer Prozess und ist daher nur in relativ langen Zeitabschnitten von Stunden oder Tagen effektiv. Eine schnellere Anpassung an variable Lichtbedingungen wird durch Phosphorylierung der peripheren LHC-II Subpopulation gesteuert (Bennett 1991). Sowohl Lhcb1 wie auch Lhcb2 besitzen N-terminale Phosphorylierungsstellen, jedoch gibt es Hinweise, dass Lhcb2 dreimal schneller phosphoryliert wird als Lhcb1 (Islam 1987; Jansson und Gustafsson 1990). Damit ist Lhcb2 nicht nur an der Lichtadaption im Zeitbereich von Stunden oder Tagen, sondern auch an der schnellen Lichtadaption der Photosynthese beteiligt.

In früheren Arbeiten wurde vorgeschlagen, dass nur Lhcb1/Lhcb2 Heterotrimere mit PS-I assoziieren können und sich Lhcb2, auf Grund des möglichen Energietransfers zu PS-I von Lhcb1 unterscheiden muss. Der Unterschied sollte sich in unterschiedlichen spektralen Eigenschaften und einem zusätzlichen Chlorophyll a äußern (Walters und Horton 1999). Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern allerdings keine Bestätigung dieser These. Es konnten keine Unterschiede in der Pigmentbindung von Lhcb1 und Lhcb2 festgestellt werden und die gefundenen spektroskopischen Unterschiede sind zu klein, um einen speziellen Energietransferweg von Lhcb2 zum PS-I zu erklären. Da Lhcb1 und Lhcb2 in Pigmentbindung, spektroskopischen Eigenschaften und Trimerbildung weitestgehend identisch sind, scheint die funktionelle Relevanz von Lhcb2 hauptsächlich in der unterschiedlichen Position in der Lichtantenne, der unterschiedlichen Phosphorylierungsrate und damit der Regulation der Photosynthese sowohl in kurzen wie auch langen Zeiträumen zu liegen.

Im Gegensatz zur vergleichsweise gut verstandenen Funktion von Lhcb2, ist über Lhcb3 nur sehr wenig bekannt. Der Anteil dieser Isoform am gesamten LHC-II ist geringer als der von Lhcb1 oder Lhcb2. Sein Molekulargewicht ist niedriger, was hauptsächlich auf die fehlende N-terminale Phosphorylierungsstelle zurückzuführen ist. Die Lhcb3 Isoform nimmt daher wahrscheinlich nicht an dem durch Phosphorylierung gesteuerten Ausgleich von Anregungsenergie zwischen PS-I und PS-II teil. Auch an anderen Mechanismen der Lichtadaptation ist Lhcb3 wahrscheinlich nicht beteiligt, da genetisch modifizierte Pflanzen denen Lhcb1 und Lhcb2, aber nicht die Lhcb3 Isoform fehlt, ein deutlich schlechteres Wachstum unter den variablen Lichtbedingungen auf freiem Feld aufweisen (Andersson et al. 2003). Die biochemischen und spektralen Eigenschaften von Lhcb3 unterscheiden sich signifikant von denen der anderen Isoformen. Das Absorptionsspektrum zeigt eine klare Rotverschiebung der langwelligen Chlorophyll a Moleküle, die sich auch in einer Rotverschiebung der Emissionswellenlänge widerspiegelt. Damit eignet sich Lhcb3 zur Aufnahme und Weiterleitung von Lichtenergie von und zu anderen Komplexen. Da Lhcb3 außerdem keine Homotrimere bildet und zur inneren LHC-II Subpopulation gehört, könnten Lhcb3 Heterotrimere an der Weiterleitung von Lichtenergie von der Haupt Lhcb1/Lhcb2 Antenne zum PS-II Reaktionszentrum beteiligt sein.

## 4.2 Kristallisation und Strukturbestimmung von LHC-II

### 4.2.1 Kristallformen von LHC-II

In Vergleich zu der großen Anzahl von Kristallen löslicher Proteine ist die Anzahl der beschriebenen Kristalle aus Membranproteinen immer noch sehr gering. Doch auch wenn der erste Schritt einer erfolgreichen Kristallisation von Membranproteinen erfolgt ist, sind diese häufig nicht von ausreichender Qualität, um eine Strukturbestimmung zu ermöglichen. Auch unter Verwendung von Synchrotronstrahlung beugen Membranproteinkristalle häufig nur bis zu einer niedrigen Auflösung oder zeigen extrem hohe Anisotropie und Mosaizität. Die Optimierung vorhandener Kristalle kann anschließend mehrere Jahre beanspruchen. Die 3D Kristalle von LHC-II sind hierfür ein gutes Beispiel. Die ersten 3D Kristalle von LHC-II wurden schon vor 17 Jahren beschrieben (Kühlbrandt 1987). Hierbei handelte es sich um zwei verschiedene Kristallformen, die bei ähnlichen Bedingungen und sogar im selben Tropfen auftreten konnten. Eine dieser Kristallformen bestand aus sphärischen Vesikeln, welche jedoch nur bis zu niedriger Auflösung beugten. Bei der anderen Kristallform handelte es sich um kleine hexagonale Platten. Diese sind morphologisch ähnlich zu den in dieser Arbeit beschriebenen Kristallen, jedoch wesentlich kleiner und dünner und damit nicht für eine Strukturaufklärung geeignet. Dennoch blieben sie, auch nachdem verschiedene andere Detergenzien für die Kristallisation getestet wurden die besten verfügbaren Kristalle und wurden weiter optimiert. Besonders die Größe und Dicke der hexagonalen Platten konnte soweit verbessert werden, dass sie für moderne Synchrotronstrahlungsquellen ausreichten und eine Datenaufnahme bis 3.2 Å erlaubten (Lamborghini 2002). Die Qualität dieser Daten war jedoch für eine Strukturaufklärung nicht ausreichend und die Kristalle mussten weiter optimiert werden um röntgenkristallographische Daten von besserer Qualität zu erhalten.

#### 4.2.2 Verbesserung der hexagonalen LHC-II Kristalle

Prinzipiell gibt es eine Reihe von Ansatzpunkten die Beugungseigenschaften von Kristallen zu verbessern. Während dieser Arbeit wurden drei Möglichkeiten verwendet: I) eine optimierte Aufreinigung, II) eine verbesserte Kristallisation und III) schonende Frierbedingungen.

Keiner dieser Ansätze alleine konnte die Qualität der Kristalle entscheidend verbessern. So konnte mit der im Vergleich zum nativen Komplex in Bezug auf die Isoformen sehr viel homogeneren rekombinanten Probe zwar reproduzierbar Kristalle erzeugt werden, jedoch führte dies nicht zu der erhofften Verbesserung der Beugungseigenschaften. Mögliche Ursachen für die schlechtere Beugung der Kristalle aus rekombinantem Protein könnten Mikroheterogenitäten aufgrund der Faltung, schwer zu kontrollierende Unterschiede in der Lipidzusammensetzung oder die Histidin Markierung sein. Auch Unterschiede in der Pigmentzusammensetzung könnten eine Rolle spielen. So enthielt das rekombinante LHC-II nur geringe Mengen an Violaxanthin und das nach dem präparativen Protokoll gefaltete LHC-II zeigte ein niedrigeres Chl a/b Verhältnis. Diese schwer zu vermeidenden Mikroinhomogenitäten könnten die Bildung von hochgeordneten Kristallen aus dem rekombinantem LHC-II verhindert haben.

Neben der Heterogenität aufgrund der unterschiedlichen Isoformen kann LHC-II auch mehrere posttranslationale Modifikationen enthalten. Die funktional bedeutsamsten sind die Phosphorylierung des N-Terminus und die unterschiedliche Besetzung der Bindestellen mit Violaxanthin oder Zeaxanthin. Alle diese Parameter sind zu einem gewissen Maße von den Wachstumsbedingungen der Pflanzen abhängig und die Erbsen wurden daher in einem Wachstumsraum unter kontrollierten Bedingungen gezüchtet. Außerdem wurde der Einfluss unterschiedlicher Beleuchtung während des Wachstums der Pflanzen auf die Kristallisation untersucht. In einem Helligkeitsbereich von 2000 bis 20000 Lux wurde kein reproduzierbarer Einfluss auf die Kristallisation festgestellt. Eine Erhöhung der Reproduzierbarkeit der Kristallisation von nativem LHC-II konnte jedoch durch eine optimierte Aufreinigung aus Erbsenblättern erreicht werden. So wurde die Aufreinigung möglichst bei diffusem Licht durchgeführt, um eine direkte

---

Lichteinstrahlung auf die Komplexe weitestgehend zu vermeiden. Auch wurde auf eine gleichmäßige Kühlung der Präparationen geachtet. Eine schonende Aufreinigung ist auch im Hinblick auf die Besetzung des Komplexes mit Violaxanthin von Bedeutung, da dieses Carotinoid nur relativ schwach an den Komplex gebunden ist und leicht bei der Aufreinigung verloren geht (Ruban et al. 1999). Die zur Kristallisation verwendeten LHC-II Präparationen zeigten nur ca. 0.5 Violaxanthin Moleküle pro Monomer. Während der Verfeinerung der Struktur zeigte Violaxanthin jedoch dieselbe Besetzung wie die anderen Carotinoide. Dies deutet auf eine selektive Kristallisation von Komplexen mit Violaxanthin hin. Eine Möglichkeit die Kristalle weiter zu verbessern könnte daher die Zugabe von Violaxanthin oder dem auch in funktioneller Hinsicht sehr interessanten Zeaxanthin zu den Kristallisationsansätzen sein.

Als essentiell für eine reproduzierbare Kristallisation stellte sich im Verlauf der Versuche die Konzentration der Probe mittels Ultrazentrifugation heraus, was vermutlich auf ein verändertes Protein/Detergenz Verhältnis zurückzuführen ist. Dies zeigte sich auch bei der Optimierung der Kristallisationsbedingungen, bei der das genaue Protein/Detergenz Verhältnis einer der wichtigsten Parameter war.

Neben der geringen Auflösung lag das Hauptproblem der ursprünglichen Kristalle in der teils extremen Anisotropie und Mosaizität der Beugung. Beide Parameter waren bei den hexagonalen Kristallen korreliert, d.h. Kristalle mit hoher Anisotropie zeigten immer auch eine hohe Mosaizität und schienen daher eine gemeinsame Ursache zu haben. Tränkung von Kristallen in Gefrierschutzmitteln und schlechte Frierbedingungen können für schlechte Beugung, aber speziell auch für Anisotropie und Mosaizität verantwortlich sein (Garman und Schneider 1997; Walker et al. 1998). Als eine mögliche Ursache für die unzureichenden Beugungseigenschaften der Kristalle erschien daher die Behandlung mit dem ursprünglich als Gefrierschutzmittel verwendeten Dimethyl Sulfoxid (DMSO) (Lamborghini 2002). Insbesondere da DMSO auch ein Lösungsmittel für organische Substanzen ist und schon eine kurze Tränkung in 50% DMSO alle Pigmente aus LHC-II Kristallen herauslöst. Die Kristallisationsbedingungen wurden daher zunächst hauptsächlich unter dem Gesichtspunkt optimiert, die Kristalle ohne zusätzliches Tränken in DMSO oder anderen Gefrierschutzmitteln direkt aus

dem Tropfen zu frieren. Einfaches Zufügen von Gefrierschutzmitteln zu den Kristallisationsbedingungen reichte jedoch nicht aus, da bei den zum Einfrieren nötigen Konzentrationen keine Kristalle mehr wuchsen. Erst die Kombination von PEG350MME mit Glycerin reichte für ein direktes Frieren in flüssigem Ethan, aber nicht in flüssigem Stickstoff aus. Die unter diesen Bedingungen erhaltenen Kristalle waren im Vergleich zu den unter den ursprünglichen Bedingungen gewachsenen Kristallen deutlich dicker. Dies wirkte positiv auf die Anisotropie und hatte eine höhere Auflösung zur Folge.

Die ursprünglichen hexagonalen Kristalle hatten  $P6_322$  Symmetrie, eine  $c$  Achse von  $132 \text{ \AA}$  und bestanden aus 2 Lagen von 2D Kristallen pro Einheitszelle (Lamborghini 2002). Die in dieser Arbeit erzeugten  $P3_121$  Kristalle waren äußerlich sehr ähnlich zu diesen Kristallen. Bei hohem Zwillingsanteil zeigten sie auch  $P622$  Symmetrie, hatten allerdings eine  $c$  Achse von  $\sim 180 \text{ \AA}$ , die aus 3 Lagen von 2D Kristallen bestand. In den Kristallen mit  $C2$  Symmetrie wurde das trigonale/hexagonale System durch eine relative Verschiebung der 2D Kristallschichten aufgebrochen. Zusätzlich zeigt diese Kristallform starke Salzbrücken zwischen den 2D Schichten, was ein Grund für die niedrige Anisotropie dieser Kristalle sein dürfte. Neben den zur Strukturbestimmung verwendeten Kristallformen traten im Verlauf der Arbeit noch eine Reihe von anderen Formen mit  $C2$  Symmetrie auf, die sich voneinander durch den  $\beta$  Winkel und die  $c$  Achse der Einheitszelle unterschieden. Auch wenn aufgrund der hohen Anisotropie und Mosaizität eine detaillierte Untersuchung dieser Kristalle nicht durchgeführt wurde, handelte es sich wahrscheinlich um weitere Variationen der Schichtung von 2D Kristallen. Alle beschriebenen Kristallformen waren morphologisch sehr ähnlich und zeigten eine Typ I Packung aus den gleichen 2D Kristallen. Die größten Unterschiede zwischen ihnen bestanden in der Dicke und der Art der Schichtung. Diese unterschiedlichen Kristallformen traten bei sehr ähnlichen Kristallisationsbedingungen auf. Dies deutet auf zahlreiche verschiedene, ähnlich starke Wechselwirkungen zwischen den Lagen der 2D Kristalle hin. Das verbesserte Einfrieren beseitigte den osmotischen Schock durch das Gefrierschutzmittel und erhöhte dadurch die Ausbeute an gut geordneten Kristallen, jedoch war dies nur eine Ursache für die schlechten Beugungseigenschaften der ursprünglichen Kristalle. Die besseren Beugungseigenschaften der für die  $P3121$  und  $C2$  Datensätze verwendeten

---

Kristalle sind eher auf eine unterschiedliche Kristallpackung zurückzuführen. Die wahrscheinlichste Ursache dafür ist das verwendete Glycerin, da dieses auch einen Effekt auf die Dicke der Kristalle hatte. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde versucht die Stapelung der 2D Kristalle kontrolliert zu beeinflussen und dadurch die Qualität der Kristalle zu erhöhen. Dies wurde durch Variation der Glycerinkonzentration und durch die Zugabe oder Tränkung der Kristalle in anderen Additiven versucht. Da LHC-II in Granathylakoiden gestapelt vorliegt und Ionen einen Einfluss auf diese Stapelung haben (Barber 1980) wurde eine Reihe unterschiedlicher Salze getestet. Von allen Additiven und Salzen zeigte jedoch nur Glycerin einen positiven Effekt auf die Dicke und damit wahrscheinlich auch auf die Packung der Kristalle. Glycerin wirkt wie ein kleines PEG und kann die Hydrathülle von Proteinen beeinflussen. Kleine Änderungen in der Hydrathülle könnten wiederum die Schichtung der stark geladenen LHC-II Oberflächen im Typ I 3D Kristall erleichtern und damit zu der verringerten Anisotropie dieser Kristalle beigetragen haben.

Gegen Ende der Arbeit beugten fast alle optimierten Kristalle bei Verwendung von Synchrotronstrahlungsquellen bis mindestens 2.8 Å. Dennoch war nur ca. jeder fünfzigste Kristall von ausreichender Qualität für die Sammlung brauchbarer Daten. Dies lag an der meist immer noch starken Ausprägung von Anisotropie, Mosaizität und Verzwillingung der Kristalle. Im Zuge dieser Arbeit gelang es daher zwar nicht vollständig, reproduzierbare Kristalle von konstanter Qualität zu erzeugen. Jedoch gelang es durch wiederholtes Optimieren der Aufreinigung, der Kristallisations- und der Frierbedingungen die Qualität der Kristalle soweit zu erhöhen, dass Daten von hinreichender Qualität und einer für Membranproteine guten Auflösung gesammelt werden konnten. Dabei wurden bis auf die grundlegende Aufreinigung und das verwendete Detergenz alle bei einer Kristallisation zu beachtenden Parameter verändert und optimiert.

### 4.2.3 Kristallisierte LHC-II Isoform

Auch wenn die genaue Zusammensetzung des aus Erbsenblättern isolierten LHC-II nicht bekannt ist, besteht dieses aus einer Mischung von Homo- und Heterotrimeren der drei LHC-II Isoformen. Durch die Auftrennung mittels chromatographischer Fokussierung konnte eine deutliche Heterogenität gezeigt werden, die allerdings nicht unbedingt auf die Isoformen, sondern auch auf unterschiedliche Lipidzusammensetzungen zurückzuführen sein könnte. Die SDS Gelelektrophorese zeigt, dass die Präparation des Erbsen LHC-II zu mehr als 90% aus Polypeptiden mit demselben Migrationsverhalten besteht. Ein Vergleich mit den rekombinanten LHC-II Isoformen von *Arabidopsis* legt eine Mischung aus Lhcb1 und Lhcb2 in dieser Bande nahe. Da aus Pflanzen isoliertes LHC-II 70-90% Lhcb1 enthält (Jansson 1994; Jackowski et al. 2001) sollte der Großteil dieser Bande auf Lhcb1 zurückzuführen sein. Die restlichen zwei Banden machen weniger als 10% Prozent des gesamten Proteins aus und konnten nicht klar zugeordnet werden. Bei diesen handelt es sich jedoch wahrscheinlich um Lhcb2 und Lhcb3, obwohl auch Verunreinigungen durch andere Proteine nicht ausgeschlossen werden können. In einem Helligkeitsbereich von 2000 bis 20000 Lux konnte kein reproduzierbarer Einfluss auf die Kristallisation festgestellt werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass in der Probe nur die vorherrschende Lhcb1 Isoform kristallisiert und die durch variierende Lichtverhältnisse hervorgerufenen Unterschiede im Verhältnis der Isoformen kaum eine Rolle bei der Kristallisation spielt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch kleine Mengen an Lhcb2 und Lhcb3 in dem Kristall eingebaut sind. Die Kristalle können jedoch keine geordnet vorliegenden Heterotrimere enthalten, da die Elektronendichte klar dem Lhcb1 zugeordnet werden konnte. Auch können die röntgenkristallographischen Daten gut mit einem Lhcb1 Homotrimer erklärt werden, wie die R-Faktoren der fertigen Struktur zeigen.

#### 4.2.4 Strukturbestimmung des nativen LHC-II

Die Struktur des LHC-II der Erbse wurde durch Kombination zweier röntgenkristallographischer Datensätze mit elektronenkristallographischen Phasen und Amplituden gelöst. Die Phasenbestimmung der röntgenkristallographischen Daten gelang dabei durch molekularen Ersatz mit der EM-Dichte (Kühlbrandt et al. 1994) als Suchmodell. Die Statistiken des molekularen Ersatzes sind außerordentlich gut und zeigen die hohe Qualität des verwendeten Suchmodells und der erhaltenen Phasen. Die Verwendung einer Dichtekarte als Suchmodell ist allerdings kein Standardverfahren und in dieser Arbeit wurde erstmals eine auf 2D Kristallographie basierende EM-Dichte als Suchmodell verwendet. Dieses Verfahren bedeutet zusätzlichen Aufwand, da die Dichte zunächst erstellt und vor Verwendung als Suchmodell eine asymmetrische Einheit ausgeschnitten werden muss. Aufgrund der leichteren Handhabung werden bei einem molekularen Ersatz daher meist die aus einer Datenbank abrufbaren und direkt verwendbaren Koordinaten eines Strukturmodells verwendet. Diese beinhalten aufgrund des manuellen Modellbaus jedoch immer eine Interpretation der ursprünglichen kristallographischen Daten. Da eine Interpretation nicht besser sein kann als die ursprünglichen Daten, sollte durch die Verwendung einer Dichtekarte als Suchmodell die Qualität der erhaltenen Phasen erhöht und der Einfluss auf die Lösung des molekularen Ersatzes verringert werden. Der zusätzliche Aufwand bei Verwendung einer Dichtekarte lohnt sich insbesondere dann, wenn die Qualität der gemessenen Amplituden problematisch ist, sich das Suchmodell von der zu lösenden Struktur nur wenig unterscheidet oder nur ein anhand von Daten niedriger Auflösung erstelltes unvollständiges Modell vorliegt.

Bei der Strukturaufklärung des LHC-II stellte vor allem die Unvollständigkeit des EM-Modells ein Problem dar. Dieses beruht auf elektronenmikroskopischen Daten bis 3.4 Å in der Ebene des 2D Kristalls. Aufgrund der elektronenmikroskopischen Datenaufnahme fehlt jedoch ein kegelförmiger Bereich senkrecht zu dieser Ebene und auch die vorhandenen Daten in dieser Richtung weisen mit 4.9 Å eine niedrigere Auflösung auf. Die aus elektronenmikroskopischen Daten errechnete Dichte hat zwar durch die direkte Bestimmung der Phasen eine für diese Auflösung gute Qualität,

erlaubte jedoch nur den Bau eines Modells mit ca. 6000 der zu erwartenden ca. 8000 Atome (ohne Wasserstoff) eines LHC-II Trimers. In der ursprünglichen Dichtekarte sind Beiträge der fehlenden Atome zwar vorhanden, diese reichten beim Modellbau aber nicht für eine eindeutige Interpretation aus. Auch wenn die Verwendung des EM-Modells für den molekularen Ersatz schon befriedigende Werte ergab, konnte durch die Verwendung der Dichtekarte nicht nur die Statistik verbessert, sondern auch diese nicht in die Interpretation des Modells eingegangenen Daten genutzt werden. Diese zusätzlichen Daten fließen mit in die Lösung des molekularen Ersatzes ein und ergaben in Kombination mit den röntgenkristallographischen Datensätzen eine verbesserte Elektronendichtekarte.

Ähnlich wie die EM-Dichte hat auch der C2 Datensatz aufgrund von Strahlenschaden und der niedrigeren Symmetrie nur eine relativ geringe Vollständigkeit von 86%. Der P3<sub>1</sub>21 Datensatz mit hoher Vollständigkeit (98%), jedoch nur einer Auflösung von 3.1 Å wurde daher verwendet, um die Datenbasis durch Mittlung der Elektronendichten zu verbessern. Dies führte zu einer weiteren Verbesserung der für den Modellbau verwendeten Elektronendichtekarte. Da diese gemittelte Dichtekarte teils auf experimentellen elektronenmikroskopischen Daten basierte, konnte die Phaseninformation aus dieser Lösung extrahiert werden und als Randbedingung während der ersten Schritte der Verfeinerung verwendet werden. Damit wurden Beiträge beider Datensätze und auch der elektronenmikroskopischen Phasen in die Strukturaufklärung einbezogen und die verfügbaren Daten optimal genutzt. Als Vorlage für den weiteren Modellbau diente das EM-Modell des LHC-II. Im Verlauf der Verfeinerung konnte dieses Ursprungsmodell optimiert und um mehr als 2500 Atome erweitert werden, wodurch viele interessante und funktionell wichtige Bereiche des Komplexes aufgedeckt wurden.

## 4.3 Struktur und Funktion des LHC-II

### 4.3.1 Bedeutung des Lipids PG

Neben dem Lipid DGDG bindet LHC-II auch ein PG pro Monomer. Dieses fest an den Komplex gebundene Lipid hat eine besondere Bedeutung für die Trimerisierung des Komplexes (Nußberger et al. 1993). So kann mit einem enzymatischen Verdau des PGs der Komplex monomerisiert werden, wobei jedoch interessanterweise keine Änderung der Pigmentstoichiometrie entdeckt wurde (Nußberger 1994). Weiterführende Mutationsanalysen an rekombinatem Lhcb1 legten die Bedeutung der Aminosäuren W16-R21 für die Bindung des PGs nahe (Hobe et al. 1995). Die Bedeutung des PGs für die Trimerisierung kann anhand der Position nahe den Monomergrenzflächen erklärt werden. In der neuen Struktur sind jedoch keine der postulierten Aminosäuren direkt an der Bindung des PG beteiligt und die beobachtete Verhinderung der Trimerisierung der Mutanten wird demzufolge offenbar durch globale Effekte auf den Komplex verhindert.

Neben der Stabilisierung des Trimers ist das PG auch an der Bindung zweier Pigmente beteiligt. Es liefert den Koordinationspartner für das zentrale Mg im Chl 7, was neben einem Chlorophyll im Photosystem I der Cyanobakterien (Fromme et al. 2001) das zweite Beispiel eines direkt von einem Lipid koordinierten Chlorophylls ist. Zusätzlich ist das PG direkt an der Bindung des Violaxanthins beteiligt. Mittels PG Verdau monomerisierte Komplexe sind daher nur bedingt für funktionelle Untersuchungen verwendbar, da diese Pigmente leicht verloren gehen könnten. Neben der polaren Wechselwirkung mit einer Hydroxygruppe verläuft ein Fettsäurerest parallel zum Rückgrat des Violaxanthins und ist damit wichtiger Bestandteil der hydrophoben Bindetasche dieses Carotinoids. In der Struktur wurde dieser Rest der Trans- $\Delta^3$ -hexadecensäure zugeordnet, da LHC-II Trimere eine hohe Affinität für PG mit dieser Fettsäure aufweisen (Trémolières 1991). Die enge Interaktion zwischen dem PG Fettsäurerest und Violaxanthin könnte ein Grund für die Affinität von LHC-II zu PG mit diesem spezifischen Fettsäurerest sein.

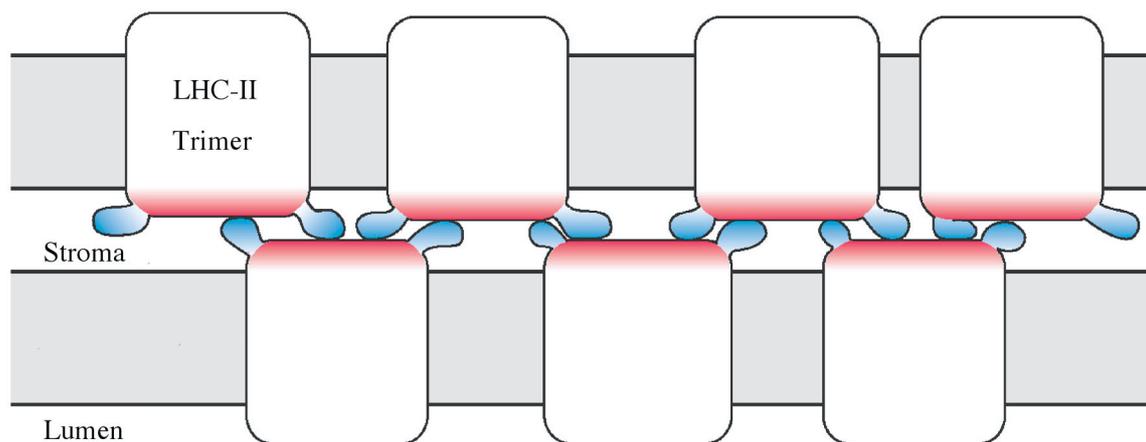
### 4.3.2 Bedeutung von LHC-II für die Bildung von Granastapeln

Durch die Bildung der Grana in den Chloroplasten wird die Thylakoidmembran in zwei Bereiche aufgeteilt. Dies ist von funktioneller Bedeutung für die Photosynthese, da es zu einer räumlichen Trennung der zwei Photosysteme führt. Das PS-II ist in den Grana lokalisiert und seine Lichtantenne LHC-II stellt einen Großteil des Proteins in den Granabereichen, der bis zu 70% der lokalen Chlorophylle bindet (Peter und Thornber 1991).

Zur Bildung von Grana kommt es durch eine Faltung der Thylakoidmembran, wobei zwei übereinander liegende Membranen jeweils mit ihrer stromalen Seite in Kontakt treten. Die stromalen Oberflächen des LHC-II und besonders dessen N-Terminus sind von Bedeutung für die Granastapelung (Steinback et al. 1979). *Arabidopsis* Mutanten, denen ein Großteil des LHC-II fehlt, bilden zwar Grana, jedoch unterscheiden sich diese deutlich von nativen Granastapeln (Andersson et al. 2003). Diese modifizierten Grana werden wahrscheinlich unter Beteiligung der Lhcb5 und Lhcb6 Komplexe gebildet, welche in den mutierten Pflanzen deutlich stärker expremiert werden und die Funktion von LHC-II übernehmen könnten.

Die dichte Packung von Protein und Lipiden in den 2D Kristalllagen des 3D Kristalls kann als eine membranähnliche Umgebung angesehen werden. Die „Flip und Flop“ Orientierung des LHC-II in dieser Umgebung erzeugt eine zweizählige Symmetrie, aus der sich die genaue Position der Lipidmembran ergibt. Aus einer so positionierten Membran von 35 Å Durchmesser ragt der LHC-II Komplex auf der luminalen Seite ~ 8 Å und auf der stromalen Seite ~ 13 Å heraus. In der Packung beider hexagonalen LHC-II Kristallformen sind spezifische Kontakte zwischen zwei stromalen Oberflächen vorhanden. Die minimalen Abstände zwischen beiden Oberflächen betragen je nach Kristallform 3-5 Å und können als kleinster möglicher Abstand zwischen den stromalen LHC-II Oberflächen in der Thylakoidmembran angesehen werden. Der minimale Abstand zwischen den Lipid-Kopfgruppen zweier Thylakoidmembranen in dichtgepackten Granabereichen würde damit ~ 30 Å ( $2 \times 13 \text{ Å} + 4 \text{ Å}$ ) betragen, was etwas unter dem geschätzten Wert von ~40 Å für diesen Abstand liegt (Allen und Forsberg 2001). Dies ist von Interesse, da insbesondere die Ladungen und Oberflächenpotentiale der Proteine in der

Thylakoidmembran von Bedeutung für die Bildung von Granastapeln sind (Barber 1980). Die stromale Oberfläche des LHC-II ist im Wesentlichen flach und zeigt ein charakteristisches Ladungsprofil mit stark negativem Oberflächenpotential. Die zusätzlich zur Struktur modellierten N-Termini sind dagegen positiv geladen und wahrscheinlich flexibel, da sie in der Struktur nicht geordnet sind. Dieses charakteristische Ladungsprofil des LHC-II könnte, wie in Abbildung 38 schematisch gezeigt, als molekularer Klebstoff zwischen den Granastapeln dienen.



**Abbildung 38:** Beteiligung von LHC-II an der Bildung von Granastapeln. Die positiven Ladungen (blau) der flexiblen LHC-II N-Termini treten mit der flachen negativ geladenen (rot) stromalen Oberfläche des gegenüberliegenden Komplexes in unspezifischen Kontakt. Abbildung aus Standfuss et al. 2004

Dabei treten die positiven Ladungen der N-Termini unspezifisch mit den negativen Ladungen des gegenüberliegenden Trimers in Kontakt. Die resultierende elektrostatische Anziehungskraft zwischen den Membranen hilft die Granastapel zu bilden und zu stabilisieren.

Auch zur Aufklärung eines weiteren Regulationsmechanismus der Photosynthese könnte dieses Modell beitragen. Kommt es in natürlicher Umgebung zu Variationen in der Intensität, Qualität oder spektralen Zusammensetzung des Lichts, muss die Anregung von PS-I und PS-II aufeinander abgestimmt werden. Dieser Prozess ist als Zustandsänderung (*state transition*) der Thylakoidmembran bekannt und wird durch Phosphorylierung des LHC-II N-Terminus gesteuert. Als Reaktion auf die Phosphorylierung wandert LHC-II aus den PS-II haltigen Granabereichen in die ungestapelten Bereiche der Thylakoidmembran, wo es dann als Lichtantenne des PS-I dient (Zusammenfassungen in: (Allen und Forsberg

2001; Allen und Race 2002)). Vorgeschlagen wurden zwei mögliche Mechanismen für die Abwanderung des LHC-II. Bei dem ersten Mechanismus führt die Phosphorylierung zu einer Strukturänderung des LHC-II, welche die Affinität zu PS-II erniedrigt und zu PS-I erhöht (Allen 1990). Damit die relative Affinität zu den Photosystemen einen Einfluss auf die Verteilung des LHC-II zwischen gestapelten und ungestapelten Membranbereichen hat, wird bei diesem Mechanismus vorausgesetzt, dass LHC-II relativ frei in der Membran diffundieren kann. Dies ist nur schwer mit dem Modell der Granastapelung durch elektrostatische Wechselwirkungen in Einklang zu bringen und auch der in der Struktur ungeordnete N-Terminus spricht gegen diese These.

Im zweiten vorgeschlagenen Mechanismus spielen elektrostatische Wechselwirkungen die entscheidende Rolle. Bei diesem Mechanismus wird die Abwanderung des LHC-II nicht durch eine Strukturänderung, sondern durch elektrostatische Abstoßung der durch die Phosphorylierung eingeführten negativen Ladungen hervorgerufen. Diese abstoßenden elektrostatischen Kräfte sollen zu einer teilweisen Entstapelung der Thylakoidmembranen führen und dadurch die Abwanderung des LHC-II erlauben (Arntzen 1978; Barber 1980). Die Struktur des LHC-II und die Verteilung der Oberflächenpotentiale sind starke Hinweise für die Beteiligung von elektrostatischen Kräften bei der Verteilung von LHC-II zwischen den Reaktionszentren. Die zusätzliche negative Ladung durch Phosphorylierung führt dabei aber eher zu einer Abschwächung der bereits vorhandenen Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen N-Terminus und negativ geladener stromaler Oberfläche des LHC-II. Dieser Mechanismus wäre ohne eine Strukturänderung des N-Terminus möglich und könnte eine Abwanderung des LHC-II aus den Randbereichen der Grana erklären.

### **4.3.3 Bedeutung der Struktur für den Energietransfer innerhalb des LHC-II**

Die wichtigste Funktion des LHC-II ist das Sammeln und Weiterleiten von Lichtenergie zu den Reaktionszentren. Dies stellt den Reaktionszentren mehr Lichtenergie zu Verfügung und bietet gleichzeitig die Möglichkeit der Regulation, da die übertragene Energie durch die variable Lichtantenne an die jeweils vorherrschenden Bedingungen angepasst werden kann.

Der Hauptteil der vom LHC-II Komplex gesammelten und weitergeleiteten Energie stammt von Chlorophyllen, wie anhand des von Chlorophyll dominierten LHC-II Spektrums deutlich wird. Der überwiegende Teil des Energietransfers zwischen den Chlorophyllen erfolgt dabei mittels resonantem Anregungsenergietransfer, dem sogenannten Förstertransfer. Dabei gibt das Donor-Pigment seine Anregung durch Dipol-Dipol Wechselwirkung an ein Akzeptor-Pigment weiter, ohne dass dabei Strahlung emittiert oder absorbiert wird (Förster 1948; Förster 1949). Die Transfer-Wahrscheinlichkeit hängt beim Förster Mechanismus von der sechsten Potenz des Abstands zwischen den Dipolen des Donors und Akzeptors ab. Im bisherigen Strukturmodell des Erbsen LHC-II konnten die Abstände zwischen 12 Chlorophyllen bestimmt werden. Die röntgenkristallographische Struktur zeigt zwei weitere am Energietransfer teilnehmende Chlorophylle und erhöht die Genauigkeit der Abstandsbestimmung für eine zukünftige Modellierung des Energietransfers im LHC-II.

Die relative Orientierung der am Förstertransfer beteiligten Dipole ist ein weiterer wichtiger Parameter für die Berechnung der Transfer-Wahrscheinlichkeit. In der elektronenkristallographischen Struktur konnten die Dipolmomente der Chlorophylle nicht bestimmt werden, da die Seitenketten nicht aufgelöst waren. Durch die höhere Auflösung des röntgenkristallographischen Modells konnten die meisten Seitenketten klar zugeordnet werden und die Orientierung der Chlorophylle ist damit eindeutig festgelegt. Dies erlaubte die genaue Zuordnung der Dipolmomente aller Chlorophylle und damit eines wichtigen Parameters für eine Berechnung des Energietransfers innerhalb des LHC-II.

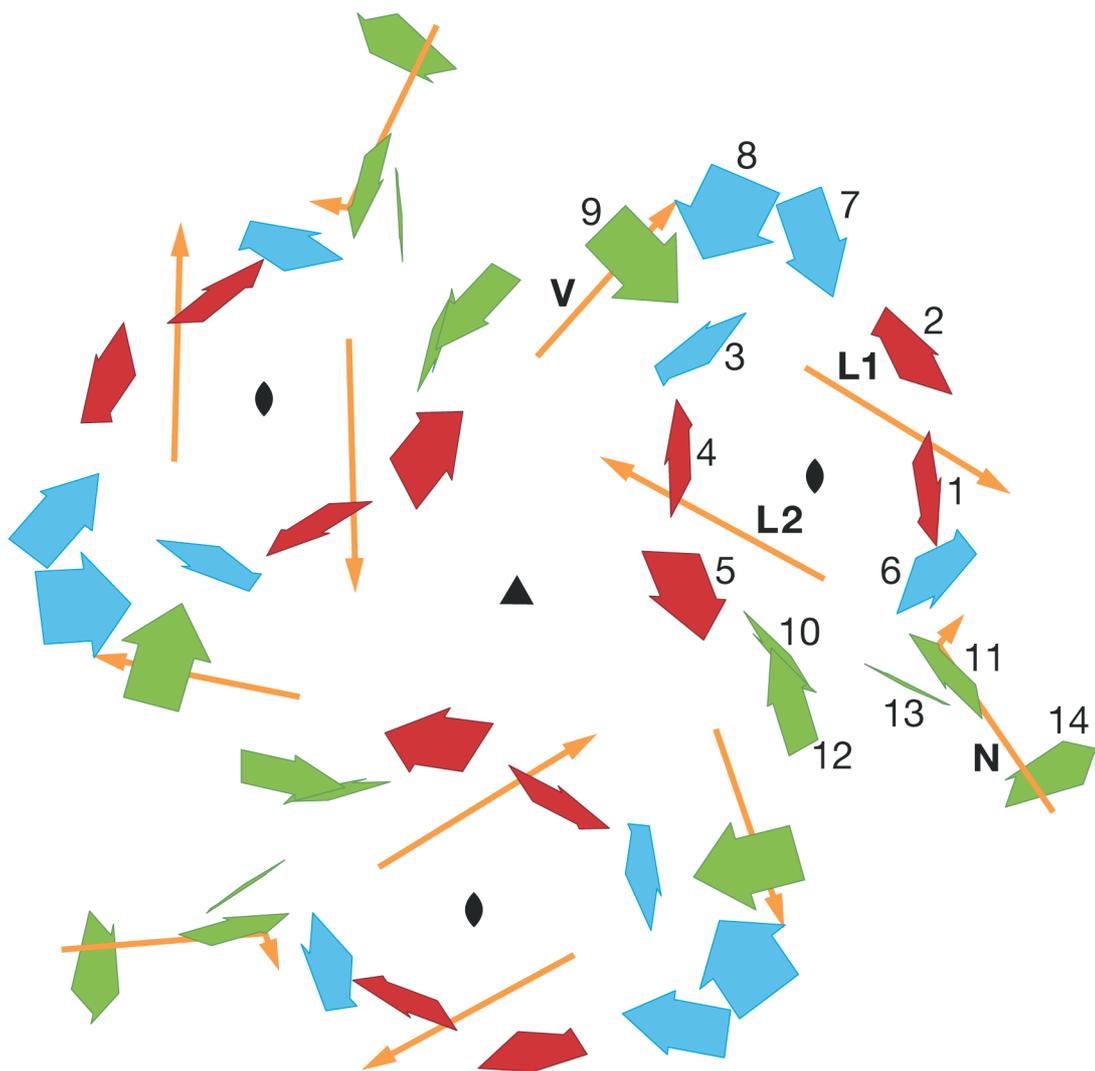
Weitere Voraussetzung für einen effizienten Förstertransfer ist neben dem Abstand und der Orientierung der Partner, ein spektraler Überlapp zwischen dem Emissionsspektrum des Donors und dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Neben der Proteinumgebung hängen die für den Energietransfer wichtigen Absorptions- und Emissionseigenschaften vom Typ des Chlorophylls ab. So sind sowohl Absorption wie auch Emission des Chlorophyll b soweit zu niedrigeren Wellenlängen verschoben, dass Energietransfer normalerweise nur von Chlorophyll b nach Chlorophyll a und nicht umgekehrt stattfindet. In der elektronenkristallographischen Struktur wurde die Zuordnung der Chlorophylle alleine aufgrund von funktionellen Überlegungen durchgeführt. In einer Reihe weiterführender Arbeiten wurde versucht die Identität der Chlorophylle durch Mutation der bekannten Koordinationspartner und anschließende HPLC Analyse des Chlorophyllgehalts zu bestätigen (Remelli et al. 1999; Rogl und Kühlbrandt 1999; Yang et al. 1999). Die Ergebnisse dieser Arbeiten widersprechen sich allerdings teilweise und eine eindeutige Zuordnung konnte daher mit rein biochemischen Methoden nicht erreicht werden, ist aber essentiell für ein Verständnis des Energietransfers innerhalb des LHC-II. In der in dieser Arbeit erstellten Struktur des LHC-II konnten durch die Orientierung der Chlorophylle, die für eine Spezifität der Bindetaschen nötigen Wechselwirkungen und der Verwendung von 2Fo-Fc/Fo-Fc Differenzelektronendichtekarten 13 der 14 Chlorophylle eindeutig Chlorophyll a oder Chlorophyll b zugeordnet werden. Bei dem verbleibenden Chl 9 handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Chlorophyll b, da sich sonst ein unphysiologisches Chl a/b Verhältnis von 1.8 ergeben würde. Jedoch sind keine spezifischen Bindepartner für das C7 Formyl des Chl 9 vorhanden. Eine gemischte Besetzung dieser Bindetasche kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Die genauen spektralen Eigenschaften der Chlorophylle sind von der Polarität ihrer Umgebung abhängig. Die Proteinumgebung hat daher einen Einfluss auf die genauen Absorptionseigenschaften eines Pigments, weshalb innerhalb des LHC-II Komplexes Pigmente gleichen Typs bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren. Für drei Chlorophyll a (Chl 2, Chl 5, Chl 8) und für eine Chlorophyll b (Chl 13) wurde die genaue Absorptionswellenlänge mittels Lhcb1 Deletionsmutanten bestimmt und mit Hilfe dieser Referenzpunkte das

vollständige LHC-II Spektrum angepasst (Rogl et al. 2002). Die Anpassung basierte jedoch auf der Annahme von 12 Chlorophyllen pro Monomer und der ungenauen biochemischen Bestimmung von Chlorophyll a und Chlorophyll b. In der hochaufgelösten LHC-II Struktur sind die Protein/Pigment Wechselwirkungen mit hoher Genauigkeit definiert und können nun für eine bessere Berechnung der Absorptionseigenschaften jedes Pigments verwendet werden.

Auch die Carotinoide Lutein und Violaxanthin können Lichtenergie auf Chlorophylle übertragen (Peterman et al. 1997; Peterman et al. 1997). Das von diesen Carotinoiden absorbierte Licht hat damit einen Anteil an der vom LHC-II Komplex gesammelten und weitergeleiteten Lichtenergie. Die spektralen Eigenschaften der Carotinoide sind gut bekannt (Peterman et al. 1997; Ruban et al. 2000). Die Position der Luteine ist in der elektronenkristallographischen Struktur enthalten und die Position des Neoxanthins ist aus Mutationsanalysen (Croce et al. 1999; Rogl 2000) und Linear-Dichroismus Spektroskopie (Croce et al. 1999) ebenfalls recht genau bekannt. Die röntgenkristallographische Struktur ist in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen und zeigt zusätzlich die Orientierung der Carotinoide Lutein und Neoxanthin und die Position des Violaxanthins.

Durch die röntgenkristallographische Struktur sind damit die wesentlichen für ein Verständnis des LHC-II Energietransfers nötigen Parameter mit guter Genauigkeit bekannt und können in einer Abbildung zusammengefasst werden (Abbildung 39).



**Abbildung 39:** Schematische Darstellung der Orientierung der Chlorophylle und Carotinoide im LHC-II Trimer. Die  $Q_y$  Dipolmomente der Chlorophylle sind als Pfeile in der Ebene der Tetrapyrrolringe dargestellt. Chl a Moleküle mit niedrigem Energielevel sind rot und die restlichen Chl a Moleküle cyan gefärbt. Chl b Moleküle sind grün dargestellt. Carotinoide sind als gelbe Pfeile in Richtung der C1-C24 Kohlenstoffatome gezeigt. Die dreizählige Symmetrie des Trimers und die lokale zweizählige Symmetrie, welche die Pigmente Lut1, Chl 1-3 mit Lut2, Chl4-6 in Beziehung setzt, sind markiert. Abbildung aus Standfuss et al. 2005.

Bei den vergleichbaren, jedoch insgesamt deutlich weniger komplexen bakteriellen LH1 und LH2 Lichtsammelantennen folgten auf die Strukturen mit atomarer Auflösung (McDermott et al. 1995; Köpke et al. 1996) eine Vielzahl von spektroskopischen und theoretischen Arbeiten. Diese mündeten in ein sehr detailliertes Verständnis des Energietransfers innerhalb und zwischen diesen Komplexen. (Zusammenfassungen in: (van Grondelle et al. 1997; van Grondelle und Novoderezhkin 2001; Law et al. 2004)). Durch das atomare Modell der röntgenkristallographischen Struktur sind die

wesentlichen für die Modellierung eines Energietransfers nötigen Parameter nun auch für den LHC-II Komplex bekannt oder können theoretisch erschlossen werden. Als Referenz für die theoretische Modellierung können eine Vielzahl spektroskopischer Ergebnisse dienen (Kleima et al. 1997; Peterman 1997; Gradinaru et al. 1998; Barzda et al. 2000; Palacios et al. 2003). Besonders die experimentell bestimmten Absorptionswellenlängen einiger Chlorophylle (Rogl et al. 2002) werden sich als wichtige Referenzpunkte erweisen, da gerade diese Parameter nur schwierig zu berechnen sind. Dennoch handelt es sich bei LHC-II auch im Vergleich zum LH2 um ein äußerst komplexes Molekül mit einer Vielzahl verschiedener Pigment-Pigment und Pigment-Protein Wechselwirkungen, wodurch eine zukünftige detaillierte Modellierung aller Energietransferprozesse zu einer großen Herausforderung wird. Einige generelle Aussagen über den Verlauf des Energietransfers im LHC-II sind jedoch auch ohne detaillierte Modellierung möglich. So ist im Hinblick auf den Lutein-Chlorophyll Energietransfer die Anordnung von Chl 2 zu Lut 1 und Chl 5 zu Lut 2 interessant. Bei beiden Chlorophyllen läuft das  $Q_x$  Dipolmoment nahezu parallel zu dem entsprechenden Lutein. Dies und die geringen Abstände von 4-5 Å zwischen den  $\pi$ -Systemen ergeben eine optimale Konfiguration für einen Energietransfer von den Chlorophyllen zu den Luteinen nach dem Dexter Mechanismus, welcher im Gegensatz zum Förster Mechanismus hauptsächlich von kurzen Abständen und genauer Orientierung abhängt (Polivka und Sundström 2004). Von den bekannten und den modellierten Absorptionswellenlängen aller Chlorophylle haben Chl 1, Chl 2, Chl 4 und Chl 5 die niedrigsten Energien (Rogl et al. 2002), was auch auf ihre Nähe zu den Luteinen zurückzuführen ist. Chl 1 und Chl 2 befinden sich zusätzlich in der Peripherie des Komplexes und zeigen mit 15-20 ps die längste Anregungszeit aller Chlorophylle (Prof. van Grondelle, persönliche Mitteilung). Chl 1 und Chl 2 sind daher gute Kandidaten für die Übertragung der vom LHC-II gesammelten Anregungsenergie zu benachbarten Protein/Pigment Komplexen.

#### **4.3.4 Schützende und regulative Funktionen der Carotinoide**

Im Vergleich zum bakteriellen Lichtsammlersystem ist LHC-II nicht nur aufgrund seines unsymmetrischeren Aufbaus, sondern auch aufgrund der höheren Anzahl unterschiedlicher Pigmente wesentlich komplexer. Besonders die vier LHC-II bindenden Carotinoide (Lutein, Neoxanthin, Violaxanthin, Zeaxanthin) tragen zu dieser Komplexität bei und sind neben dem Sammeln von Lichtenergie an einer Reihe von schützenden und regulativen Prozessen beteiligt. Die wichtigsten dieser Prozesse sind: I) Löschung von Triplettanregungszuständen der Chlorophylle II) direktes Entfernen von Singlett-Sauerstoff und Sauerstoffradikalen und III) Regulation der Auslastung der Reaktionszentren mittels nicht-photochemischer Eliminierung von Anregungsenergie (NPQ, *non-photochemical quenching*) Die Bedeutung der röntgenkristallographischen LHC-II Struktur für diese Prozesse wird im folgenden diskutiert.

##### **4.3.4.1 Bedeutung der Carotinoide für die Löschung von Triplettanregungszuständen**

Bei dem bisher vereinfachend als Energietransfer bezeichneten Prozess handelt es sich um die Übertragung von Singlettanregungszuständen zwischen den Pigmenten. Chlorophylle können jedoch auch direkt zu Triplettzuständen angeregt werden und auch die spontane Umwandlung von Singlett- zu Triplettzuständen ist möglich. Triplettanregungen von Chlorophyllen können mit bestimmter Wahrscheinlichkeit mittels Triplett-Singlett Transfer auf Sauerstoff übertragen werden. Der so angeregte Singlettsauerstoff ist äußerst reaktiv und kann zu einer Beschädigung des photosynthetischen Apparates führen. Eine wichtige schützende Funktion der Carotinoide besteht darin, die Triplettanregungen der Chlorophylle aufzunehmen und in harmlose Wärme umzuwandeln (Siefermann-Harms 1987). Im Falle des Chlorophyll b wird Anregungsenergie schnell (0.1-0.6 ps) auf Chlorophyll a übertragen, so dass diese so gut wie nicht im Triplettzustand vorliegen. Chlorophyll a Moleküle verweilen jedoch mit bis zu 20 ps deutlich länger im angeregten Zustand, weshalb sie auch mit höherer

Wahrscheinlichkeit Tripletanregungen aufweisen. Von den an den LHC-II Komplex gebundenen Carotinoiden können Lutein, Violaxanthin und Zeaxanthin Tripletanregungen aufnehmen (Peterman et al. 1997) und tatsächlich haben die meisten Chlorophyll a Moleküle einen maximalen Abstand von 5 Å zu diesen Carotinoiden, wodurch Tripletanregungen sofort nach ihrem Entstehen effizient abgeleitet werden können. Auch einige Chlorophyll b Moleküle (besonders Chl 9, Chl 10) befinden sich in engem Kontakt zu diesen Carotinoiden, was eine zusätzliche Sicherheit gewährleistet. Prinzipiell reichen für einen effizienten Schutz aber schon einige wenige Chlorophylle in günstiger Position zu den Carotinoiden aus. Dies ist deshalb ausreichend, weil Tripletzustände von Chlorophyllen nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit auf Sauerstoff übertragen werden. Zwischen Chlorophyllen werden Tripletanregungen weit effizienter übertragen, weshalb mit hoher Wahrscheinlichkeit die Anregung ein Chlorophyll in günstiger Position zu den Carotinoiden erreicht, bevor es zur Bildung von Singlett Sauerstoff kommt. Ähnlich wie bei den Überlegungen zum Energietransfer ist in diesem Kontext die Anordnung von Chl 2 zu Lut 1 und Chl 5 zu Lut 2 interessant. Denn in dieser Anordnung ist neben dem Energietransfer vom Carotinoid zum Chlorophyll auch ein effizienter Triplettransfer vom Chlorophyll zu den Luteinen möglich (Polivka und Sundström 2004). Auch aufgrund ihrer niedrigen Absorptionswellenlängen können Chl 2 und Chl 5 daher als Energiesenken dienen, welche die Tripletanregungen anderer Chlorophylle auffangen und schnell an die Luteine weiterleiten, wo sie in Wärme umgewandelt werden. Dieser Mechanismus kann demnach Chlorophyll Tripletanregungen, die nicht sofort von nahe gelegenen Carotinoiden gelöscht werden, entschärfen und liefert damit eine weitere zusätzliche Absicherung des LHC-II gegen die Bildung von Singlett Sauerstoff.

#### **4.3.4.2 Funktionelle Bedeutung des Neoxanthins**

Im Gegensatz zu den anderen am LHC-II gebundenen Carotinoiden ist die Funktion des Neoxanthins unklar. Neoxanthin zeigt nur eine geringe Effizienz des Singlett Energietransfers zu den Chlorophyllen und scheint auch nicht an der Tripletlöschung teilzunehmen (Peterman et al. 1997). Faltungsexperimente mit definierten Pigmentmischungen zeigten die hohe

Spezifität der Neoxanthin Bindetasche und legen eine Rolle des Neoxanthins als Fänger von Singlett Sauerstoff nahe (Croce et al. 1999). Innerhalb des Komplexes sollte die Bildung von Singlett Sauerstoff durch das von den anderen Carotinoiden durchgeführte Triplettquenching effizient verhindert werden. Singlett Sauerstoff kann jedoch auch außerhalb des Komplexes in der Membran entstehen. Singlett Sauerstoff kann des Weiteren frei in der Membran diffundieren, so dass er nicht nur in der unmittelbaren Umgebung zu Schäden führt. Das aus dem Komplex herausragende Neoxanthin könnte demnach potentiell gefährlichen Singlett Sauerstoff außerhalb des Komplexes abfangen und so einen zusätzlichen Schutzmechanismus liefern. Offen bleibt aber die Frage warum Singlett Sauerstoff speziell mit Neoxanthin reagieren sollte, da eine direkte Eliminierung von Singlett Sauerstoff ohne oxidative Reaktion nur an Carotinoiden mit mindestens 9 konjugierten Doppelbindungen stattfindet (Holzwarth 1999). Als weitere auf der exponierten Position des Neoxanthins beruhende Funktion wäre auch eine Interaktion mit benachbarten Komplexen denkbar. Insgesamt bleibt die genaue Rolle des Neoxanthins jedoch ungeklärt.

### **4.3.4.3 Bedeutung von Viola/Zeaxanthin für die nicht-photochemische Eliminierung von Anregungsenergie (NPQ)**

Die Absorption von Lichtenergie ist bei der Photosynthese unabdinglich, eine übermäßige Lichtabsorption kann jedoch zur Bildung von toxischen Substanzen wie z.B. Singlett Sauerstoff führen, weshalb die Photosynthese immer eine Gratwanderung zwischen Verhungern und Verbrennen darstellt. Grüne Pflanzen benötigen deshalb effektive Mechanismen um den photosynthetischen Apparat an veränderte Lichtbedingungen anzupassen. Neben den auf Expression und Phosphorylierung von LHC-II beruhenden Regulationsmechanismen benötigt die Pflanze auch Mechanismen die schnell reagieren, wenn z.B. ein Blatt vom Schatten ins volle Sonnenlicht gerät. Eine der ersten Schutzmechanismen in diesem Kontext ist die nicht-photochemische Eliminierung (NPQ, *non-photochemical quenching*) der Anregungsenergie (Demmig-Adams 1990). Diese findet, zumindest zum Teil, über den als Xanthophyll Zyklus bekannten Prozess statt, bei dem

Violaxanthin über Antheraxanthin zu Zeaxanthin umgewandelt wird (Gilmore und Yamamoto 1992; Horton und Ruban 1992; Pfundel und Bilger 1994). Der exakte Mechanismus und der genaue Ort des NPQ und des Xanthophyll Zyklus ist bisher nicht eindeutig bekannt. Aus Deletionsmutanten ist bekannt, dass Pflanzen denen der PsbS oder der größte Teil der LHC-II Komplexe fehlt eine Reduzierung des NPQ aufweisen (Li et al. 2000; Andersson et al. 2003) und beide Komplexe scheinen daher am NPQ beteiligt zu sein. Im Falle des PsbS wird jedoch die Bindung von Xanthophyllen kontrovers diskutiert (Aspinall-O'Dea et al. 2002; Dominici et al. 2002) und auch ein NPQ Mechanismus ohne Bindung von Xanthophyllen wurde vorgeschlagen (Giovanni et al. 2004). In der Struktur des LHC-II konnte das vierte Carotinoid klar als Violaxanthin identifiziert werden und LHC-II scheint daher sowohl am NPQ, wie auch am Xanthophyll Zyklus teilzunehmen. Neben LHC-II (Lhcb1-3) binden auch die minoren LHCs Lhcb4 und Lhcb5 (Peter und Thornber 1991; Ruban et al. 1994; Sandona et al. 1998) zumindest Violaxanthin. Nur LHC-II bindet Violaxanthin jedoch reversibel und zeigt hohe Affinität zu Zeaxanthin (Farber et al. 1997; Ruban et al. 1999). Auch liegt der LHC-II Komplex im Vergleich zu den minoren LHCs im klaren Überschuss vor und ist daher der wohl wichtigste am Xanthophyll Zyklus beteiligte Komplex in Pflanzen Thylakoiden. Auf die Bedeutung der LHC-II Struktur für diesen dritten auf LHC-II basierten Regulationsprozess wird im Folgenden eingegangen.

#### **4.3.4.4 Bedeutung von DGDG und Strukturänderungen des LHC-II für die nicht-photochemische Eliminierung von Anregungsenergie (NPQ)**

Kurz vor Abschluss dieser Arbeit wurde die Struktur von LHC-II aus Spinat mit 2.72 Å Auflösung röntgenkristallographisch bestimmt (Liu et al. 2004). Die dafür verwendeten Kristalle unterscheiden sich in Aufbau, Kristallisationsbedingungen und Beugungseigenschaften von den Typ I Kristallen, welche in dieser Arbeit verwendet wurden. Auch die Bestimmung der Phasen wurde auf unterschiedlichen Wegen erreicht. Während die Phasen in Liu et al. mittels Einfachem Isomorphen Ersatz (SIR) ermittelt

wurden, stammen die Phasen für die Struktur des LHC-II der Erbse aus elektronenmikroskopischen Daten. Beide Strukturen entstanden damit nicht nur weitestgehend zeitlich parallel, sondern auch methodisch unabhängig voneinander. Trotz der unterschiedlichen Methodik sind beide Strukturen von vergleichbarer, guter Qualität und aufgrund der 89% Homologie beider Polypeptide auch sehr ähnlich zueinander. Die vorliegende Arbeit beinhaltet jedoch nicht nur eine unabhängige Strukturbestimmung, sondern auch eine unabhängige Analyse der Struktur/Funktionsbeziehungen des LHC-II. Die wichtigsten Unterschiede und Gemeinsamkeiten der beiden Strukturen sind besonders im Hinblick auf die nicht-photochemische Eliminierung von Anregungsenergie von Bedeutung und werden im Folgenden in diesem Kontext diskutiert.

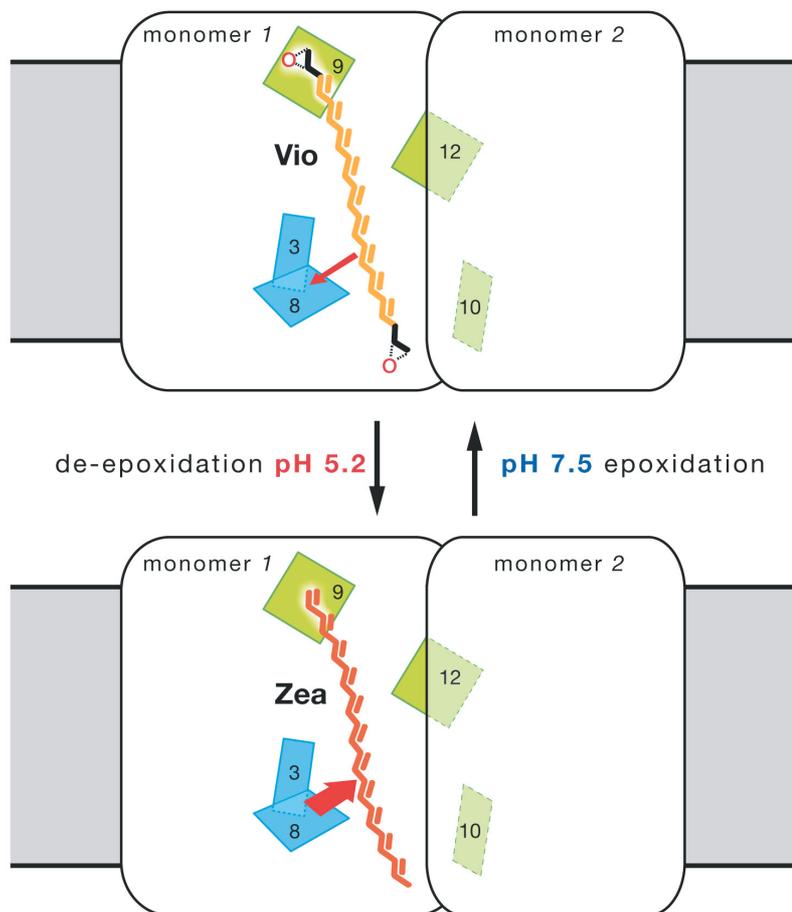
Als wichtigstes Ergebnis der Analyse des LHC-II aus Spinat wurde eine NPQ Mechanismus postuliert (Liu et al. 2004). In diesem soll LHC-II auf niedrige luminale pH-Werte mit einer Strukturänderung reagieren. Die pH Änderung soll spezielle Salzbrücken auftrennen und damit die Position von Helix 5 verändern. Dies soll wiederum zwei Chlorophylle (Chl 3 und Chl 8) und gebundene Xanthophylle in eine Anregungsenergie eliminierende Position bringen. Die zur Aufklärung des LHC-II aus Spinat verwendeten ikosahedralen Kristalle bilden sich bei einem pH-Wert von 7.5, was dem stromalen pH entspricht. Das Lumen des Chloroplasten hat einen je nach Beleuchtung und Aktivität des photosynthetischen Apparats schwankenden pH-Wert. Der saure Bereich dieser Schwankung liegt bei ca. 5.0, was nahe an dem zur Züchtung der hexagonalen Kristalle verwendeten pH-Wert von 5.5 liegt. Die Strukturen, die mit beiden Kristalltypen unabhängig voneinander gelöst wurden, zeigen jedoch nur eine mittlere Abweichung der C $\alpha$  Atome von 0.35 Å auf, was eine nahezu identische Faltung der Polypeptidkette bedeutet. Auch die an den regulativen Salzbrücken beteiligten Aminosäuren (Glu 94, Asp 111, Glu 207 und Asp 211) liegen in beiden Strukturen in nahezu derselben Konformation vor. Unsere Ergebnisse machen eine Strukturänderung des LHC-II als Anpassung an den luminalen pH-Wert daher unwahrscheinlich.

Der NPQ Mechanismus aus Liu et al. beinhaltet zwar eine Eliminierung der Energie durch spezielle Chlorophylle, jedoch sind auch die Xanthophyll Zyklus Carotinoide am NPQ beteiligt. Das Violaxanthin soll dabei innerhalb des Komplexes zu Zeaxanthin de-epoxidiert werden. Als Ort der De-Epoxidierung wurde der zentrale Hohlraum an der luminalen Seite des Trimers vorgeschlagen. In der vorliegenden Arbeit konnte ein zusätzliches DGDG Molekül pro Monomer lokalisiert werden. Dieses DGDG füllt den zentralen Hohlraum auf der luminalen Seite des Trimers fast völlig aus und macht diesen als Ort der De-Epoxidierung unwahrscheinlich. Auch ist in beiden Strukturen nur eine Kopfgruppe des Violaxanthins in der Nähe des Hohlrums positioniert. Das Violaxanthin müsste sich daher für eine vollständige De-Epoxidierung beider Kopfgruppen innerhalb des Komplexes umdrehen, was ebenfalls unwahrscheinlich ist.

Für das in Liu et al. postulierte Modell des NPQ ist ein zusätzliches DGDG Molekül essentiell. Dieses vermittelt in der ikosahedralen Kristallform einen Kristallkontakt zwischen den Trimeren und soll die Eliminierung der Anregungsenergie von einem Trimer auf das nächste ermöglichen. In der Struktur des Erbsen LHC-II fehlt dieses DGDG vollständig. Dies ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Kristallpackung zurückzuführen, die an dieser Position keine durch DGDG vermittelten Kontakte benötigt. Dies und der unphysiologische Winkel zwischen den durch DGDG verbundenen Trimeren in der ikosahedralen Kristallpackung legen nahe, dass DGDG in dieser Konformation keine tragende Rolle in einem wichtigen physiologischen Prozess spielen kann. Dies wird auch dadurch gestützt, dass für die Kristallisation des Spinat LHC-II zusätzlich DGDG bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml zugegeben werden musste.

#### 4.3.4.5 NPQ ohne Strukturänderung des LHC-II

Die Kenntnis der röntgenkristallographischen Strukturen des LHC-II erlaubt nun ein einfaches und elegantes Modell der nicht-photochemischen Eliminierung von Anregungsenergie für das kein DGDG vermittelter Trimerkontakt und keine Strukturänderungen benötigt werden.



**Abbildung 40:** NPQ Mechanismus ohne Strukturänderung des LHC-II. Tetrapyrrolebenen der Chlorophylle sind als Quadrate (Chl a, cyan; Chl b, grün) dargestellt. Violaxanthin (orange) und Zeaxanthin (rot) sind mit ihren konjugierten  $\pi$ -Systemen eingezeichnet. Energietransferprozesse sind als rote Pfeile eingezeichnet. Abbildung aus Standfuss et al. 2005

Im normalen Zustand wird Anregungsenergie innerhalb des LHC-II Komplexes schnell weitergeleitet. Violaxanthin dient in diesem Zustand sowohl als Lichtsammler wie auch als Triplettquencher (Peterman et al. 1997;

Peterman et al. 1997). Für einen effizienten Energietransfer kommen dafür besonders die Chl a 3 und 8 sowie die Chl b 9 und 12 in Frage, da sie in Abständen um 5 Å und guter Orientierung zu den neun konjugierten  $\pi$ -Doppelbindungen des Violaxanthins sind. Violaxanthin unterscheidet sich von Zeaxanthin durch zwei Epoxygruppen an beiden Enden. Sein  $\pi$ -System ist damit um 2 konjugierte Doppelbindungen länger und hat ein deutlich niedrigeres Energieniveau, wodurch es nicht nur Triplett-, sondern auch Singlettzustände der Chlorophylle aufnehmen kann (Frank et al. 1994; Ma et al. 2003). Ein anstelle des Violaxanthin gebundenes Zeaxanthin kann aufgrund dieser Eigenschaft Energie von den umgebenen Chlorophyllen aufnehmen und als Wärme ableiten. Wie dieser Prozess genau stattfindet und inwieweit sich die Energieniveaus der beiden Xanthophylle unterscheiden, ist von der Proteinumgebung, dem Abstand und der Orientierung der beteiligten Pigmente abhängig. Durch die röntgenkristallographische Struktur sind diese Parameter nun mit hoher Genauigkeit, zumindest für Violaxanthin, bekannt. Die Beteiligung dieses Xanthophylls an Transfer und Löschung von Anregungsenergie ist daher berechenbar. Auch die Besetzung der Bindetasche mit Zeaxanthin und die daraus resultierenden Energietransferprozesse können in zukünftigen Arbeiten modelliert werden, um die Löschung von LHC-II gesammelter Anregungsenergie durch Zeaxanthin zu bestätigen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch eine spektroskopische oder strukturelle Charakterisierung von gefalteten oder nativen LHC-II Komplexen mit gebundenem Zeaxanthin.

Der Xanthophyll Zyklus wird von der Aktivität der Violaxanthin De-Epoxidase reguliert. Dieses Enzym ist auf der luminalen Seite der Thylakoidmembran lokalisiert und hat ein pH Optimum von 5.2 (Demmig-Adams 1990; Pfundel und Bilger 1994; Hieber et al. 2000). Wenn die Photosyntheserate innerhalb des Chloroplasten zunimmt, fällt der pH-Wert im Lumen und die De-Epoxidase wird aktiviert. Das aktivierte Enzym konvertiert nun einen Pool von freiem Violaxanthin über Antheraxanthin zu Zeaxanthin. Das Violaxanthin zeigt aufgrund der zusätzlichen Epoxy Gruppen eine deutlich niedrigere Affinität zum LHC-II als Zeaxanthin. In der Struktur ist dies an der hydrophoben Umgebung ohne spezifischen, kompensierenden Bindepartner für die Epoxygruppe des Violaxanthins zu erkennen. Besonders die Fettsäuren des PG und der Phytylest von Chl 9 sorgen für eine hydrophobe

Abstoßung der eher hydrophilen Epoxygruppe und können für die experimentell nachgewiesene (Ruban et al. 1999) höhere Bindeaffinität des Zeaxanthins zum LHC-II verantwortlich sein. Das durch die De-Epoxydase erzeugte Zeaxanthin ersetzt aufgrund seiner höheren Affinität Violaxanthin in der Bindetasche. Dieser Austausch ist Anhand der Struktur nachzuvollziehen und erfordert keine oder nur eine sehr geringe Strukturänderung des LHC-II, da die Hälfte des Violaxanthins gegenüber der Lipidmembran exponiert und die andere Hälfte Teil der Grenzfläche zwischen zwei Monomeren ist. Wenn Violaxanthin durch Zeaxanthin ersetzt wird, dient letzteres zur Eliminierung überschüssiger Anregungsenergie, die dann wie beschrieben als Wärme abgeleitet wird.

Die so reduzierte Photosyntheserate führt zu einer Erhöhung des pH-Wertes im Lumen, was die Menge an Zeaxanthin im freien Carotinoidpool verringert. Die LHC-II Komplexe binden nun wieder überwiegend Violaxanthin und erfüllen damit die Funktion einer Lichtsammelantenne. Auf diese Weise kann die Effektivität des LHC-II über die Zusammensetzung des freien Carotinoidpools mit der jeweils benötigten Photosyntheserate gekoppelt werden. Dieser einfache aber effektive Mechanismus zur Optimierung und Schutz des Photosyntheseapparates ermöglicht eine schnelle Reaktion auf sich ändernde Lichtbedingungen und benötigt keine Strukturänderungen des LHC-II oder anderer Lichtsammelkomplexe.

## 5 Anhang

### 5.1 Zusammenfassung

#### 5.1.1 Zusammenfassung in deutscher Sprache

Die bei der Photosynthese verwendete Lichtenergie wird zu einem großen Anteil von Lichtsammlersystemen bereitgestellt. In der pflanzlichen Photosynthese wird unterschieden zwischen Lichtsammlersystem I (*light harvesting complex I*, LHC-I), assoziiert mit Photosystem I (PS-I) und Lichtsammlersystem II (*light harvesting complex II*, LHC-II), assoziiert mit Photosystem II (PS-II). LHC-II ist der häufigste Protein-Pigment Komplex der Chloroplasten und bindet bis zu 50% aller Chlorophylle in der Thylakoidmembran.

Der Protein-Pigment Komplex LHC-II hat vier, teils miteinander verwandte Funktionen in der Photosynthese. I) Die Sammlung und Weiterleitung von Lichtenergie, II) Stabilisierung der Granastapel, III) Ausgleich der Anregungsenergie von PS-I und PS-II, IV) Schutz der Photosynthese vor Überanregung mittels nichtphotochemischer Eliminierung von Anregungsenergie (NPQ).

In der Pflanze bildet LHC-II Trimere in verschiedenen Kombinationen dreier Isoformen (Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3), wobei Lhcb1 mit 70-90% den Hauptteil des LHC-II stellt. Jedes Monomer bindet 8 verschiedene Co-Faktoren in unterschiedlichen Mengen, die ca. 30% seiner Masse ausmachen. Die drei Isoformen des LHC-II sind in allen Pflanzen stark konserviert. Die funktionelle Bedeutung der Isoformen ist jedoch weitestgehend unklar. Dies liegt vor allem an der schwierigen Isolierung reiner Isoformen aus Pflanzenmaterial. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden deshalb alle drei Isoformen rekombinant hergestellt und mit getrennt isolierten Lipiden und photosynthetischen Pigmenten in ihre native Form gefaltet. Die anschließende biochemische und spektroskopische Charakterisierung zeigte einen hohen Grad an Homologie zwischen den drei Isoformen, wobei Lhcb3 die größten Unterschiede aufwies

(Standfuss und Kühlbrandt 2004). Die wahrscheinlichsten Funktionen für Lhcb1 und Lhcb2 ist die Anpassung der Photosynthese an variierende Lichtbedingungen. LHC-II Heterotrimere mit Lhcb3 Anteil könnten an der Weiterleitung von Lichtenergie von der Haupt Lhcb1/Lhcb2 Antenne zum PS-II Reaktionszentrum beteiligt sein.

Für die Erforschung des LHC-II war das mittels Cryo-Elektronenmikroskopie an 2D Kristallen erstellte atomare Modell des Komplexes von enormer Bedeutung. Ein tiefes Verständnis der Funktionen des LHC-II benötigt jedoch eine Struktur von höherer Auflösung, welche mit 2D Kristallen nur schwer zu erreichen ist. Im Verlauf der Arbeit wurden deshalb mehr als 100000 3D Kristallisationsexperimente durchgeführt, wodurch die Kristallisation von aus Erbsenblättern isoliertem und *in vitro* gefaltetem LHC-II gelang. Die 3D Kristalle aus nativem Material zeigten einen für die röntgenkristallographische Strukturaufklärung ausreichenden Ordnungsgrad und führten zu einer Struktur des LHC-II bei 2.5 Å Auflösung (Standfuss et al., eingereicht).

Die Struktur zeigt 223 der 232 Aminosäuren und die Position und Orientierung von 4 Carotinoiden (2 Luteine, 1 Neoxanthin und 1 Violaxanthin), 14 Chlorophyllen (8 Chl a und 6 Chl b) und zwei Lipiden (PG und DGDG) pro Monomer. Diese Informationen sind essentiell für das Verständnis des Energietransfers innerhalb des LHC-II und zu den Photoreaktionszentren und sollten zusammen mit der großen Anzahl von spektroskopischen Untersuchungen eine zukünftige detaillierte Modellierung dieser ultraschnellen und extrem effizienten Energietransfer Prozesse ermöglichen.

Auf Basis der Ladungsverteilung der stromalen Seite des Komplexes konnte ein Modell für die Beteiligung des LHC-II an der Stapelung von Grana in Chloroplasten erstellt werden. Dieses liefert außerdem eine plausible Erklärung für den mittels Phosphorylierung des N-Terminus gesteuerten Ausgleich von Anregungsenergie zwischen PS-I und PS-II.

Die 2.5 Å Struktur des LHC-II zeigt schließlich einen einfachen aber effektiven Mechanismus zur Optimierung und Schutz des Photosyntheseapparates mittels NPQ. Dieser benötigt keine Strukturänderungen des LHC-II oder der restlichen Lichtsammelantenne und beruht auf der reversiblen Bindung der Xanthophylle Violaxanthin und Zeaxanthin an LHC-II.

Diese Arbeit liefert damit Beiträge zu allen Funktionen des LHC-II Komplexes und hilft damit grundlegende Regulationsmechanismen und die Bereitstellung von solarer Energie für die pflanzliche Photosynthese zu verstehen.

### 5.1.2 Abstract in English

Light energy for photosynthesis is mainly collected by light harvesting systems. In plant photosynthesis these are the light-harvesting-complex I (LHC-I) and the light-harvesting-complex II (LHC-II) associated with photosystems (PS) I and II, respectively. LHC-II is the most abundant pigment-protein complex in plant chloroplasts and binds about 50% of all chlorophyll in the thylakoid membrane.

The protein-pigment complex LHC-II has four distinct but related roles in plant photosynthesis. I) Optimal positioning of pigment molecules for light harvesting and transfer of excitation energy to the reaction centers. II) Separating different parts of the photosynthetic apparatus by maintaining and stabilizing thylakoid grana. III) Balancing of excitation energy flow to the reaction centers of PS-I and PS-II through a mechanism regulated by phosphorylation of the LHC-II N-terminus, IV) Prevention of photosystem overexcitation through a process called non-photochemical quenching (NPQ).

LHC-II forms trimers in different combinations of three isoforms (Lhcb1, Lhcb2 and Lhcb3), of which Lhcb1 with 70-90% is the most abundant. Each monomer binds 8 different kinds of co-factors accounting for about 30% of its mass. The LHC-II isoforms are highly conserved among different species and therefore they are expected to have distinct functional roles. So far, studies of the LHC-II complex have been carried out either with LHC-II preparations isolated from plants containing all isoforms or with recombinant Lhcb1 produced *in vitro* from its components. A detailed understanding of the functional implications of LHC-II heterogeneity, however, depends on the availability of pure LHC-II isoforms in the amounts necessary for spectroscopic and biochemical investigations.

In the first part of this thesis, all three LHC-II isoforms were produced by *in vitro* folding of functional complexes from bacterially expressed polypeptide, pigments and lipids. On these complexes a biochemical and spectroscopic characterization has been performed (Standfuss and Kühlbrandt 2004). Our results indicate a high degree of similarity between all isoforms. However

Lhcb3 shows significant differences with respect to pigment organization, trimer formation and spectroscopic properties. It can be concluded that the main role of Lhcb1 and Lhcb2 is in the adaptation of photosynthesis to different light regimes. The most likely role of Lhcb3 is that Lhcb3-containing LHC-II trimers function as intermediaries in excitation energy transfer from the main Lhcb1/Lhcb2 antenna to the PS-II core.

Electron microscopy (EM) and electron diffraction of two-dimensional (2D) crystals yielded the first atomic model of LHC-II, revealing the position of 12 chlorophylls and two carotenoids and thus providing crucial information for our present understanding of the complex. A full understanding of the LHC-II functions requires a structure at higher resolution, for which the 2D membrane crystals were not sufficiently well ordered. Therefore more than 100000 crystallization experiments were performed resulting in 3D crystals of native LHC-II isolated from pea seedlings and LHC-II folded *in vitro* from inclusion bodies and pigments. Crystals obtained from the native complex were sufficiently well ordered for x-ray crystallography and resulted in a LHC-II structure at 2.5 Å resolution (Standfuss et al., submitted).

The structure shows 223 of the 232 aminoacids and the position and orientation of 4 carotenoids (2 luteins, 1 neoxanthin and 1 violaxanthin), 14 chlorophylls (8 Chl a and 6 Chl b) and two lipids (PG and DGDG) per monomer. In combination with available spectroscopic data this information will allow a detailed understanding of the ultrafast and extremely efficient energy transfer inside LHC-II and from the complex to the photosystems.

Based on the charge distribution on the stromal side of LHC-II a model for grana membrane appression could be proposed. This model furthermore explains how phosphorylation of the LHC-II N-terminus can control the distribution of excitation energy between PS-II and PS-I.

Finally the structure suggests an easy but effective mechanism for optimizing and protecting the photosynthetic apparatus via non-photochemical quenching (NPQ). This NPQ mechanism does not involve structural changes of LHC-II nor the remaining Light-harvesting antennae and is based on the reversible binding of the xanthophylls violaxanthin and neoxanthin to the LHC-II complex.

This thesis therefore contributes significantly to our knowledge of all known functions of LHC-II and helps to understand fundamental regulation mechanisms and the supply of solar energy for plant photosynthesis.

## 5.2 Sequenzvergleich von Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3

```

Lhcb1pea RKSATTKKVASSGSPWYGPDRVKYLGPFSGESPSYLTGEFPGDYGWDTAGLSADPETFSK 60
Lhcb1ara RKTVAKPKGPS-GSPWYGSDRVKYLGPFSGESPSYLTGEFPGDYGWDTAGLSADPETFAR 59
Lhcb2ara RRTVKS----TPQSIWYGPDRPKYLGPFSSENTPSYLTGEYPGDYGWDTAGLSADPETFAK 56
Lhcb3ara -----GNDLWYGPDRVKYLGPFSVQTPSYLTGEFPGDYGWDTAGLSADPEAFK 49
          .  ***.* *  *****  :*****:*****:*****:*.::
          1          2

Lhcb1pea NRELEVIHSRWAMLGALGCVFPELLSRNG-VKFGEAVWFKAGSQIFSEGGLDYLGNPSLV 119
Lhcb1ara NRELEVIHSRWAMLGALGCVFPELLARNG-VKFGEAVWFKAGSQIFSDGGLDYLGNPSLV 118
Lhcb2ara NRELEVIHSRWAMLGALGCTFPEILSKNG-VKFGEAVWFKAGSQIFSEGGLDYLGNPNLI 115
Lhcb3ara NRALEVIHGRWAMLGAFGCITPEVLQKVVRFDFKEPVWFKAGSQIFSEGGLDYLGNPNLV 109
          ** *****.*****: **  *:* :  *. * *.*****:*****.*:
          3

Lhcb1pea HAQSILAIWATQVILMGAVEGYRIAG-GPLGE----VVDPLYPGG-SFDPLGLAD-DPEA 172
Lhcb1ara HAQSILAIWATQVILMGAVEGYRVAGNGPLGE----AEDLLYPGG-SFDPLGLAT-DPEA 172
Lhcb2ara HAQSILAIWAVQVVLMGFIEGYRIGG-GPLGEKVNPGTDVGYPGGLWFDPLGWGSGSPAK 174
Lhcb3ara HAQSILAVLGFQVILMGLVEGFRINGLDGVE----GND-LYPGGQYFDPLGLAD-DPVT 163
          *****: . **:* ** :**:*: * . :** * **** ***** . .*
          4          5

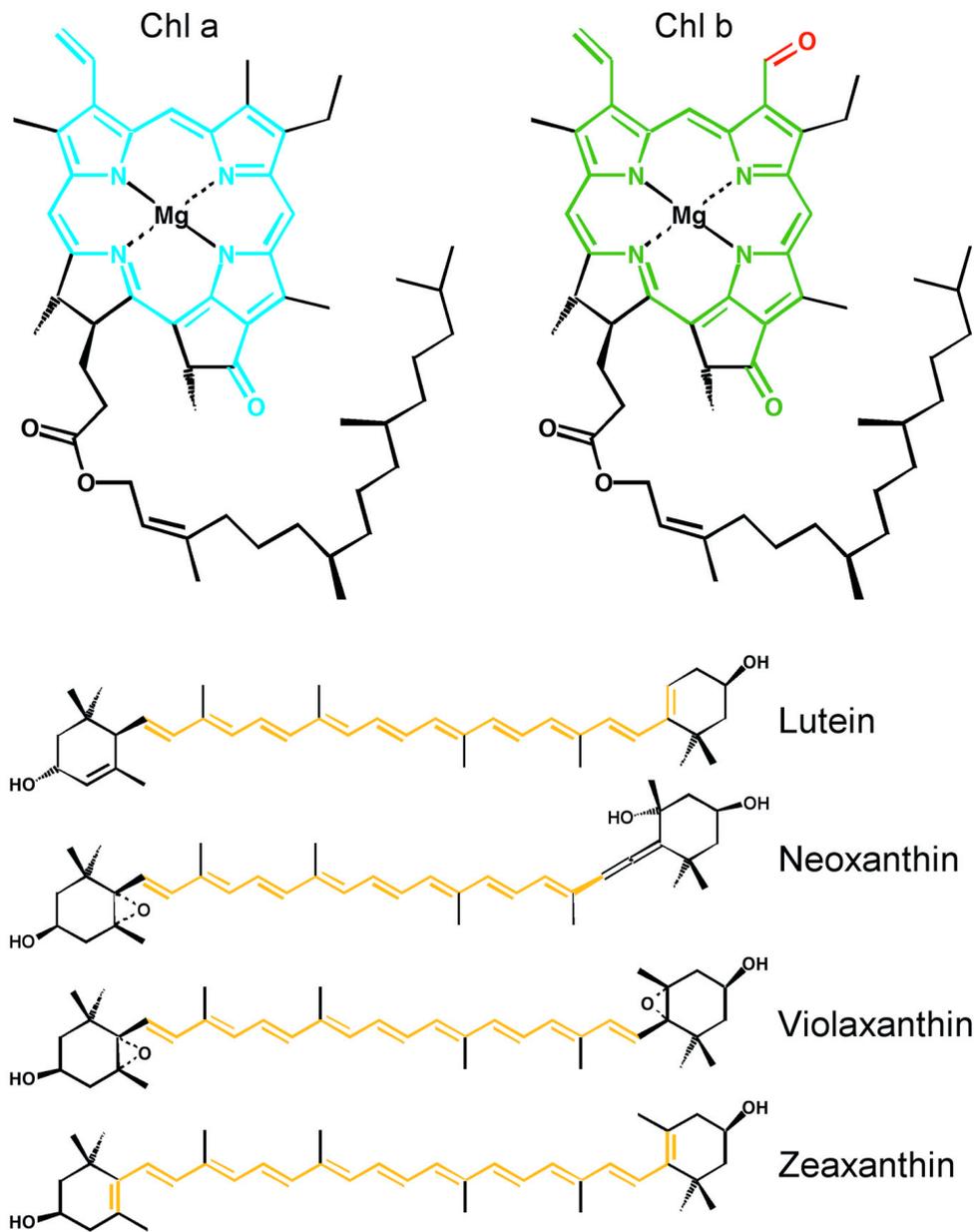
Lhcb1pea FAELKVKELKNGRLAMFSMFGFFVQAIVTGKGPLENLADHLSDPVNNNAWSYATNFVPGK 232
Lhcb1ara FAELKVKELKNGRLAMFSMFGFFVQAIVTGKGPIENLADHLADPVNNNAWAFATNFVPGK 232
Lhcb2ara LKELRTKEIKNGRLAMLAVMGAWFQHIYTGTGPIDNLF AHLADPG--HATIFAA-FTPK- 230
Lhcb3ara FAELKVKELKNGRLAMFSMFGFFVQAIVTGKGPLENLLDHLDNPVANNAWAFATKFAPGA 223
          : **:.**:******:..:* :.* * **.***:* ** :* :* :*: *.*

```

**Abbildung 41:** Vergleich der Proteinsequenzen von Lhcb1-3 aus *Arabidopsis thaliana* und Lhcb1 der Erbse (*Pisum sativum*). Konservierte Chlorophyll Liganden sind grün, an der Trimerbildung beteiligte Aminosäuren sind dunkelblau und die Hauptphosphorylierungsstelle ist rot gefärbt. Die  $\alpha$ -helikalen Bereiche sind entsprechend der in dieser Arbeit erstellten Struktur hellblau gefärbt und der Sequenz folgend nummeriert.

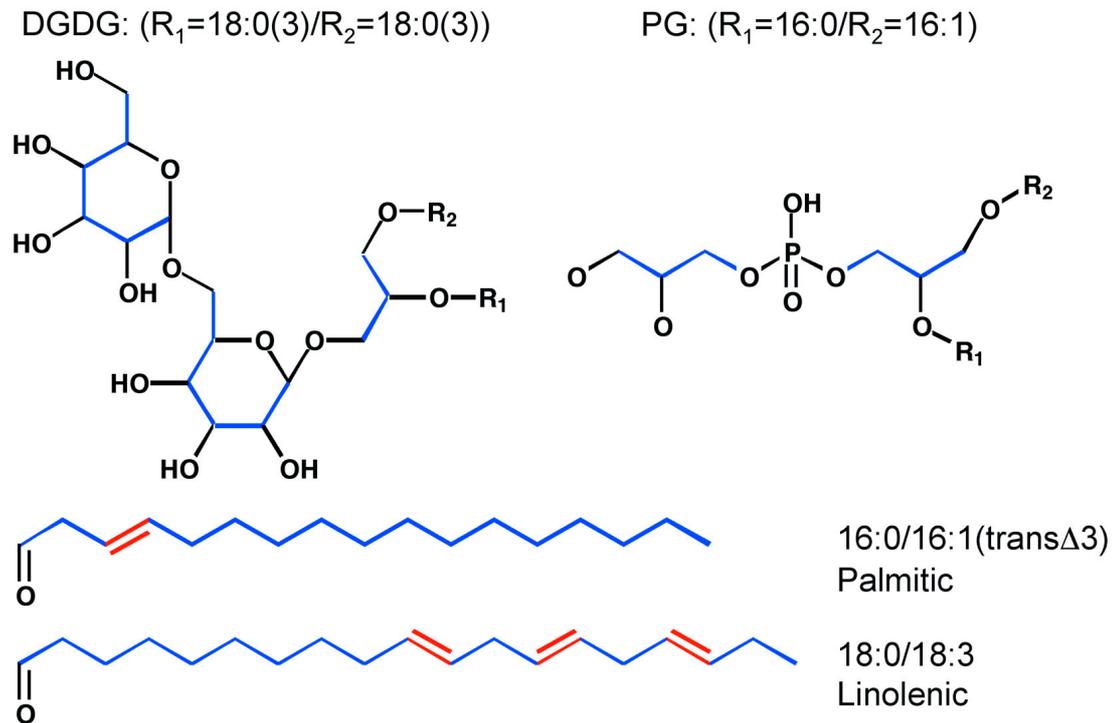
## 5.2.1 LHC-II gebundene Co-Faktoren

### 5.2.1.1 photosynthetische Pigmente des LHC-II



**Abbildung 42:** Photosynthetische Pigmente des LHC-II. Konjugierte  $\pi$ -Systeme farblich hervorgehoben (Chl a: Cyan, Chl b: Grün, Carotinoide: Orange).

## 5.2.1.2 Lipide der LHC-II Struktur



**Abbildung 43:** In LHC-II Struktur aufgelöste Lipide. Die Fettsäuren des DGDG sind nicht komplett geordnet. Über 90% der Fettsäuren des DGDG in der Thylakoidmembran haben jedoch eine Länge von 18 C-Atomen (blau) und variierende Sättigungsgrade (rot) (Gunstone et al. 1995).

## Abkürzungsverzeichnis

CD	Circulardichroismus
Chl	Chlorophyll
DDM	Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside
DGDG	Digalactosyl diacyl glycerol
DME	Dimethylether
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid
EM	Elektronenmikroskopie
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie)
IPTG	Isopropylthiogalactosid
K	Kelvin
LHC	Light harvesting complex
MGDG	Monogalactosyl diacyl glycerol
MME	Monomethylether
NG	n-Nonyl- $\beta$ -D-glucoside
O.D.	Optische Dichte
OG	n-Octyl- $\beta$ -D-glucoside
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PC	Phosphatidyl choline
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylene glycol
PG	Phosphatidyl glycerol
R.T.	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulphate (Natriumdodecylsulfat)
SQDG	Sulphoquinovosyl diacyl glycerol
Tris	Tris -(hydroxymethyl)-aminomethan
Tricine	N-tris-(2-hydroxyethyl)piperazine-N-(2-ethanesulfonicacid)
TX-100	Triton X-100

### 5.3 Danksagung

Im Verlauf dieser Arbeit waren insbesondere bei der Strukturbestimmung des LHC-II große Schwierigkeiten zu überwinden, und der letztendliche Erfolg wäre ohne die Beiträge einer großen Anzahl von Leuten nicht möglich gewesen.

Zuerst bedanke ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Prof. Werner Kühlbrandt, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die konstruktiven Besprechungen der Arbeitsergebnisse. Insbesondere für die Interpretation der LHC-II Struktur hat sich seine langjährige Erfahrung in der Photosyntheseforschung als unentbehrlich erwiesen.

Nicht genug würdigen kann ich die Beiträge von Dr. Anke Terwisscha van Scheltinga, welche mich im letzten Jahr meiner Arbeit begleitete. Sie hat einen Großteil der Verfeinerung und des Modellbaus übernommen und sich gleichzeitig als großartige Lehrerin erwiesen. Mein Dank gilt ihr aber nicht nur für diese fruchtbare Zusammenarbeit, sondern im besonderen Maße auch für die entspannte freundschaftliche Atmosphäre die dabei herrschte.

Eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg des Projekts war die Unterstützung von Heidi Betz. Vielen Dank für die Motivation, die gute Laune und die hervorragende Hilfe im Labor.

Danken möchte ich auch Dr. David Parcej für seine Beratung bei der Klonierung der Isoformen und der präparativen Säulenfaltung.

Ein weiterer Dank geht an das Labor von Herrn Prof. Paulsen für die Erlaubnis zur Messung der Tieftemperaturspektren und der HPLC Analyse. Des Weiteren geht mein Dank an Dr. Stefan Hobe, Stefanie Storf und Dr. Wolfgang Rühle für die Einweisung in die Geräte.

Neben den bisher genannten, haben die Wissenschaftler an den Synchrotronmessplätzen mit Rat und Tat nicht unerheblich zum Erfolg der Datensammlung beigetragen.

Herrn Prof. Ludwig danke ich für die Rolle des offiziellen Betreuers an der Frankfurter Universität.

Für die Kaffeepausen an der frischen Luft die nicht selten in Diskussionen über Probleme und Möglichkeiten der einzelnen Projekte mündeten, möchte ich mich bei Sander Smits, Dr. Christine Ziegler, Dr. Ian Collinson und Prof. Claudia Büchel bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an Dr. Özkan Yildiz und Mirko Lotz für das Korrekturlesen und die gemeinsame Zeit im Labor.

Entscheidend für den Erfolg einer Arbeit ist in großem Maße die Umgebung in der sie entsteht. Daher möchte ich allen Mitarbeitern des MPI für Biophysik für die Bereitstellung einer nicht nur funktionellen, sondern auch stimulierenden Arbeitsumgebung danken.

Leider sind vollständige Listen eher selten und daher danke ich allen die ich vergessen habe.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Familie und besonders bei meinem Vater für die bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen und ihr Vertrauen in mich.

## 5.4 Wissenschaftlicher Werdegang

### Studium der Biologie

- 11/1995 - 05/1997      Johannes Gutenberg Universität Mainz, Grundstudium
- 07/1998 - 10/1998      Max-Planck Institut für Biophysik Frankfurt am Main  
Praktikum bei Dr. Karen William  
*Strukturbestimmung von NhaA durch Elektronenmikroskopie an Kristallen in Negativfärbung*
- 05/1997 - 09/1999      Johannes Gutenberg Universität Mainz, Hauptstudium  
Prüfungsfächer: Immunologie, Genetik, Biophysik
- 09/1999 – 5/2000      Max-Planck Institut für Biophysik Frankfurt am Main  
Diplomarbeit bei Prof. Kühlbrandt,  
*Untersuchungen zur Stabilisierung des Trimers von rekombinatem Light-Harvesting-Complex II (LHC-II)*

### Promotion (Biochemie)

- 06/2000-12/2004      Max-Planck Institut für Biophysik Frankfurt am Main  
betreut von Prof. W. Kühlbrandt

### mit Aufenthalten

- an der freien Universität Amsterdam, Holland
- an der Universität Basel, Schweiz
- am Deutschen Elektronen Synchrotron, Hamburg,
- an der European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, Frankreich
- an der Swiss Light Source, Villingen, Schweiz

**Publikationen:**

Palacios, M. A., J. Standfuss, M. Vengris, B. Oort, I. H. M. Stokkum, W. Kühlbrandt, H. Amerongen and R. Grondelle (2005). "A comparison of the three isoforms of the light harvesting complex II using transient absorption and time-resolved fluorescence measurements." Biochemistry, eingereicht

Standfuss, J. and W. Kühlbrandt (2004). "The three isoforms of the light-harvesting complex II: spectroscopic features, trimer formation and functional roles." J. Biol. Chem. **279**: 36884-36891.

Standfuss, J., A. C. Terwisscha v. Scheltinga, M. Lamborghini and W. Kühlbrandt (2005). "Mechanisms of photoprotection and non-photochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution." EMBO, eingereicht

---

## 5.5 Literaturverzeichnis

- Allen, C. F. and P. Good (1971). "Acyl Lipids in Photosynthetic Systems." Meth. Enzymol. **23**: 523-547.
- Allen, J. F. (1990). "How does protein phosphorylation control protein-protein interactions in the photosynthetic membrane." Current Research in Photosynthesis **2**: 915-918.
- Allen, J. F. and J. Forsberg (2001). "Molecular recognition in thylakoid structure and function." Trends in Plant Science **6**: 317-325.
- Allen, J. F. and H. L. Race (2002). "Will the real LHC II kinase please step forward?" Science's Stake [Electronic Resource]: Signal Transduction Knowledge Environment **155**: 22.
- Andersson, J., M. Wentworth, R. G. Walters, C. A. Howard, A. V. Ruban, P. Horton and S. Jansson (2003). "Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II - effects on photosynthesis, grana stacking and fitness." Plant J **35**(3): 350-361.
- Andersson, J., M. Wentworth, R. G. Walters, C. A. Howard, A. V. Ruban, P. Horton and S. Jansson (2003). "Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II - effects on photosynthesis, grana stacking and fitness." Plant J. **35**: 350-361.
- Arndt, U. W. and A. J. Wonacott (1977). The rotation method in crystallography. Amsterdam, Nort-Holland.
- Arntzen, C. J. (1978). "Dynamic structural features of chloroplast lamellae." Current Topics in Bioenergetics **8**: 111-160.
- Aspinall-O'Dea, M., M. Wentworth, A. Pascal, B. Robert, A. V. Ruban and P. Horton (2002). "In vitro reconstitution of the activated zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**: 16331-5.
- Barber, J. (1980). "An explanation for the relationship between salt-induced thylakoid stacking and the chlorophyll fluorescence changes associated with changes in spillover of energy from photosystem II to photosystem I." FEBS **118**: 1-10.
- Barber, J. (1980). "Membrane surface charges and potentials in relation to photosynthesis." Biochim. et Biophys. Acta. **594**: 253-308.
- Barber, J. and W. Kühlbrandt (1999). "Photosystem II." Current Opinion in Structural Biology **9**: 469-475.
- Barzda, V., M. Vengris, L. Valkunas, R. van Grondelle and H. van Amerongen (2000). "Generation of fluorescence quenchers from the triplet states of chlorophylls in the major light-harvesting complex II from green plants." Biochemistry **39**(34): 10468-77.
- Bassi, R., F. Rigoni, R. Barbato and G. M. Giacometti (1988). "Light-harvesting chlorophyll a/b proteins (LHCII) populations in phosphorylated membranes." Biochem. Biophys. Acta **936**: 29-38.
- Ben-Shem, A., F. Frolov and N. Nelson (2003). "Crystal structure of plant photosystem I." Nature **426**: 630-635.
- Bennett, J. (1991). "Protein Phosphorylation in Green Plant Chloroplasts." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **42**(1): 281-311.
- Boekema, E. J., H. van Roon, J. F. L. van Breemen and J. P. Dekker (1999). "Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes." Eur. J. Biochem. **266**: 444-452.

- Breyton, C., W. Haase, T. A. Rapoport, W. Kühlbrandt and I. Collinson (2002). "Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG." Nature **418**: 662-664.
- Brünger, A. T., P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J.-S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson and G. L. Warren (1998). "Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination." Acta Cryst. D **54**: 905-921.
- Brünger, A. T., J. Kuriyan and M. Karplus (1987). "Crystallographic R-factor refinement by molecular dynamics." Science **235**: 458-460.
- Burke, J. J., C. L. Ditto and C. J. Arntzen (1978). "Involvement of the light-harvesting complex in cation regulation of excitation energy distribution in chloroplasts." Archives of Biochemistry & Biophysics **187**(1): 252-63.
- Butler, P. J. G. and W. Kühlbrandt (1988). "Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex from chloroplast membranes." Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. **85**: 3797-3801.
- Cashmore, A. R. (1984). "Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a light-harvesting chlorophyll a/b binding polypeptide." Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. **81**: 2960-2964.
- Chapman, D. J. and J. Barber (1987). "Polar Lipids of Chloroplast Membranes." Meth. Enzymol. **148**: 294-319.
- Cowtan, K. (1994). "Joint CCP4 and ESF-EACBM." Newsletter on Protein Crystallography **31**: 34-38.
- Croce, R., R. Remelli, C. Varotto, J. Breton and R. Bassi (1999). "The neoxanthin binding site of the major light harvesting complex (LHCII) from higher plants." FEBS Letters **456**(1): 1-6.
- Croce, R., S. Weiss and R. Bassi (1999). "Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants." Journal of Biological Chemistry **274**(42): 29613-23.
- Dauter, Z. (1999). "Data-collection strategies." Acta Cryst. Section D Biol Cryst **D55**: 1703-1717.
- Davies, D. R. and D. M. Segal (1971). "Protein crystallization: micro techniques involving vapor diffusion." Meth. Enzymol. **22**: 344-358.
- Deisenhofer, J., O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel (1985). "X-ray structure analysis at 3Å resolution of a membrane protein complex: folding of the protein subunits in the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*." Nature **318**: 618-624.
- Demmig-Adams (1990). "Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin."
- Dilly-Hartwig, H., J. F. Allen, H. Paulsen and H. L. Race (1998). "Truncated recombinant light harvesting complex II proteins are substrates for a protein kinase associated with photosystem II core complexes." FEBS Letters **435**(1): 101-4.
- Dominici, P., S. Caffarri, F. Armenante, S. Ceoldo, M. Crimi and R. Bassi (2002). "Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant." J. Biol. Chem. **277**: 22750-22758.
- Eads, D. D., E. W. Castner, R. S. Alberte, L. Mets and G. R. Fleming (1989). "Observation of Energy Transfer in a Photosynthetic Membrane: Chlorophyll b to Chlorophyll a transfer in LHC." J. Phys. Chem. **93**: 8271-8275.
- Esnouf, R. M. (1997). "An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities." J. Mol. Graphics Mod. **15**: 132-134.

- Essen, L.-O., R. Siegert, W. D. Lehmann and D. Oesterhelt (1998). "Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex." *PNAS* **95**: 11673-11678.
- Farber, A., A. J. Young, A. V. Ruban, P. Horton and P. Jahns (1997). "Dynamics of Xanthophyll-Cycle Activity in Different Antenna Subcomplexes in the Photosynthetic Membranes of Higher Plants (The Relationship between Zeaxanthin Conversion and Nonphotochemical Fluorescence Quenching)." *Plant Physiol.* **115**(4): 1609-1618.
- Flachmann, R. and W. Kühlbrandt (1995). "Accumulation of plant antenna complexes is regulated by post-transcriptional mechanisms in tobacco." *Plant Cell* **7**(2): 149-60.
- Förster, V. T. (1948). "Intermolecular energy transfer and fluorescence." *Ann. Phys.* **2**: 55-75.
- Förster, V. T. (1949). "Experimentelle und theoretische Untersuchung des zwischenmolekularen Uebergangs von Elektronenanregungsenergie." *Zeitschrift für Naturforschung* **4**: 321-327.
- Frank, H. A., A. Cua, V. Chynwat, A. J. Young, D. Gosztola and M. R. Wasielewski (1994). "Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis." *Photosynth Res* **41**: 389-395.
- Fromme, P., P. Jordan and N. Krauß (2001). "Structure of photosystem I." *Biophys. Biochem. Acta* **1507**: 5-31.
- Garman, E. F. and T. Schneider (1997). "Macromolecular Cryocrystallography." *J. Appl. Cryst.* **30**: 211-237.
- Gilmore, A. M. and H. Y. Yamamoto (1992). "Dark induction of zeaxanthin-dependent nonphotochemical fluorescence quenching mediated by ATP." *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **89**: 1899-1903.
- Giovanni, F., J. N. Giles, L. Dall'Osto, P. Joliot, F. A. Wollman and R. Bassi (2004). "A zeaxanthin-independent nonphotochemical quenching mechanism localized in the photosystem II core complex." *PNAS* **101**: 12375-12380.
- Gradinaru, C. C., S. Ozdemir, D. Gulen, I. H. van Stokkum, R. van Grondelle and H. van Amerongen (1998). "The flow of excitation energy in LHCII monomers: implications for the structural model of the major plant antenna." *Biophysical Journal* **75**(6): 3064-77.
- Green, B. J. and E. Pichersky (1994). "Hypothesis for the evolution of three-helix Chl a/b and Chl a/c light-harvesting antenna proteins from two-helix and four helix ancestors." *Photosynth Res* **39**: 149-162.
- Green, B. R. and W. Kühlbrandt (1995). "Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII." *Photosynth Res* **44**: 139-18.
- Gunstone, F. D., L. J. Harwood and B. F. Padley (1995). *The Lipid Handbook*, Chapman & Hall.
- Henderson, R., J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann and K. H. Downing (1990). "A Model for the Structure of Bacteriorhodopsin Based on High Resolution Electron Cryo-Microscopy." *J Mol Biol* **213**: 899-929.
- Hieber, A. D., R. C. Bugos and H. Y. Yamamoto (2000). "Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase." *Biochim Biophys Acta.* **1482**: 84-91.
- Hobe, S., H. Fey, H. Rogl and H. Paulsen (2003). "Determination of relative chlorophyll binding affinities in the major light-harvesting chlorophyll a/b complex." *Journal of Biological Chemistry* **278**(8): 5912-9.
- Hobe, S., R. Forster, J. Klingler and H. Paulsen (1995). "N-proximal sequence motif in light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting chlorophyll a/b complex." *Biochemistry* **34**(32): 10224-8.

- Hobe, S., H. Niemeier, A. Bender and H. Paulsen (2000). "Carotenoid binding sites in LHCIIb. Relative affinities towards major xanthophylls of higher plants." European Journal of Biochemistry **267**(2): 616-24.
- Hobe, S., S. Prytulla, W. Kühlbrandt and H. Paulsen (1994). "Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll a/b complex." EMBO Journal **13**(15): 3423-9.
- Holzwarth, R. A. (1999). Die primären Prozesse der Photosynthese. Photosynthese. H. P. D. Stuttgart, Thieme Verlag: 1-20.
- Horton, P. and A. V. Ruban (1992). "Regulation of photosystem II." Photosynth Res **34**: 375-385.
- Hunte, C., J. Koepke, C. Lange, T. Roßmanith and H. Michel (2000). "Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc1 complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment." Structure **8**: 669-684.
- Iseri, E. and D. Gulen (2001). "Chlorophyll transition dipole moment orientations and pathways for flow of excitation energy among the chlorophylls of the major plant antenna, LHCII." European Biophysics Journal **30**(5): 344-53.
- Islam, K. (1987). "The rate and extend of phosphorylation of the two light-harvesting chlorophyll a/b binding protein complex (LHC II) polypeptides in isolated spinach thylakoids." Biochem. Biophys. Acta **893**: 333-341.
- Jackowski, G., K. Kacprzak and S. Jansson (2001). "Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll a/b protein complex of Photosystem II (LHC II)." Biochim. Biophys. Acta **1504**(2-3): 340-345.
- Jackowski, G. and K. Pielucha (2001). "Heterogeneity of the main light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II (LHCII) at the level of trimeric subunits." Journal of Photochemistry & Photobiology. B Biology **64**(1): 45-54.
- Jansson, S. (1994). "The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins." Biochim. Biophys. Acta **1184**: 1-19.
- Jansson, S. (1999). "A guide to the LHC genes and their relatives in Arabidopsis." trends in plant science **4**: 1360-1385.
- Jansson, S. and P. Gustafsson (1990). "Type I and type II genes for the chlorophyll a/b-binding protein in the gymnosperm *Pinus sylvestris* (Scots pine): cDNA cloning and sequence analysis." Plant Molecular Biology 1990 Mar;14(3):287-96 **14**(3): 287-96.
- Jansson, S., E. Pichersky, R. Bassi, B. R. Green, M. Ikeuchi, A. Melis, D. J. Simpson, M. D. Spangfort, L. A. Staehelin and J. P. Thornber (1992). "A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll a/b binding proteins of higher plants." Plant Mol Biol Rep **10**: 242-253.
- Jansson, S., E. Selstam and P. Gustafsson (1990). "The rapidly phosphorylated 25 kDa polypeptide of the light-harvesting complex of photosystem II is encoded by the type 2 cab-II genes." Biochimica et Biophysica Acta **2**: 110-4.
- Jones, T. A. and M. Kjeldgaard (1993). O-The Manual. Uppsala, Sweden, Uppsala University.
- Jones, T. A., J.-Y. Zou, S. W. Cowan and M. Kjeldgaard (1991). "Improved methods for building protein models in electron-density maps and the location of errors in these models." Acta Cryst. A **47**: 110-119.
- Jordan, P., P. Fromme, H.-T. Witt, O. Klukas, W. Saenger and N. Krauß (2001). "Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution." Nature **411**: 909-917.
- Kabsch, W. (1988). "Automatic indexing of rotation diffraction patterns." J. Appl. Cryst. **21**: 67-71.
- Kabsch, W. (1993). "Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants." J. Appl. Cryst. **26**: 795-800.

- Kleima, F. J., C. C. Gradinaru, F. Calkoen, I. H. van Stokkum, R. van Grondelle and H. van Amerongen (1997). "Energy transfer in LHCII monomers at 77K studied by sub-picosecond transient absorption spectroscopy." Biochemistry **36**(49): 15262-8.
- Kleywegt, G. J. and T. A. Jones (1999). "Software for handling macromolecular envelopes." Acta Cryst. D **55**: 941-944.
- Köpke, J., X. Hu, C. Muenke, K. Schulten and H. Michel (1996). "The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800-850) from *Rhodospirillum rubrum*." Structure **4**(5): 581-97.
- Kühlbrandt, W. (1987). "Three-dimensional crystals of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex from pea chloroplasts." J. Mol. Biol. **194**: 757-762.
- Kühlbrandt, W. (1994). "Structure and function of the plant light-harvesting complex, LHC II." Current Opinion in Structural Biology **4**: 519-528.
- Kühlbrandt, W. and K. H. Downing (1989). "Two-dimensional structure of plant light-harvesting complex at 3.7 Å resolution by electron crystallography." Journal of Molecular Biology **207**(4): 823-8.
- Kühlbrandt, W., T. Thaler and E. Wehrli (1983). "The structure of membrane crystals of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex." J. Cell Biol. **96**: 1414-1424.
- Kühlbrandt, W. and D. N. Wang (1991). "Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography." Nature **350**(6314): 130-4.
- Kühlbrandt, W., D. N. Wang and Y. Fujiyoshi (1994). "Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography." Nature **367**(6464): 614-21.
- Kuo, A., J. M. Gulbis, J. F. Antcliff, T. Rahman, E. D. Lowe, J. Zimmer, J. Cuthbertson, F. M. Ashcroft, T. Ezaki and D. A. Doyle (2003). "Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state." Science **300**: 1922-6.
- Lamborghini, M. (2002). Three dimensional structure of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex from plant chloroplasts. Max-Planck-Institut für Biophysik. Frankfurt am Main, Johann Wolfgang Goethe-Universität.
- Lancaster, C. R. D., A. Kröger, M. Auer and H. Michel (1999). "Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution." Nature **402**: 377 - 385.
- Landau, E. M. and J. P. Rosenbusch (1996). "Lipidic cubic phases: A novel concept for the crystallization of membrane proteins." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 14532-14535.
- Lange, C., J. H. Nett, B. L. Trumpower and H. C. (2001). "Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc1 complex structure." EMBO J **23**: 6591-600.
- Larsson, U. K. and B. Andersson (1985). "Different degrees of phosphorylation and lateral mobility of two polypeptides belonging to the light-harvesting complex of Photosystem II." Biochem. Biophys. Acta **809**: 396-402.
- Larsson, U. K., C. Sundby and B. Andersson (1987). "Characterization of two different subpopulations of spinach light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex (LHC II): Polypeptide composition, phosphorylation pattern and association with photosystem II." Biochem. Biophys. Acta **894**: 59-68.
- Law, C., A. Roszak, J. Southall, A. Gardiner, N. Isaacs and R. Cogdell (2004). "The structure and function of bacterial light-harvesting complexes." Mol Membr Biol **21**: 183-91.
- Li, X.-P., O. Björkman, C. Shih, A. R. Grossman, M. Rosenquist, S. Jansson and K. K. Niyogi (2000). "A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting." Nature **403**: 391 - 395.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). "Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes." Meth. Enzymol. **148**: 350-382.

- Liu, Z., H. Yan, K. Wang, T. Kuang, J. Zhang, L. Gui, X. An and W. Chang (2004). "Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution." Nature **428**: 287-292.
- Lyon, M. K. and P. N. T. Unwin (1988). "Two-dimensional structure of the light-harvesting chlorophyll a/b complex by cryoelectron microscopy." The Journal of Cell Biology **106**: 1515-1523.
- Ma, Y. Z., N. E. Holt, X. P. Li, K. K. Niyogi and G. R. Fleming (2003). "Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting." PNAS **100**: 4377-4382.
- Marone, P. A., P. Thiyagarajan, A. M. Wagner and D. M. Tiede (1999). "Effect of detergent alkyl chain length on crystallization of a detergent-solubilized membrane protein: correlation of protein-detergent particle size and particle-particle interaction with crystallization of the photosynthetic reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*." Journal of Crystal Growth **207**: 214-225.
- McAuley, K. E., P. K. Fyfe, J. P. Ridge, N. W. Isaacs, R. J. Cogdell and M. R. Jones (1999). "Structural details of an interaction between cardiolipin and an integral membrane protein." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(26): 14706-11.
- McDermott, G., S. M. Prince and A. A. Freer (1995). "Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria." Nature **374**: 517-521.
- McDermott, G., S. M. Prince, A. A. Freer, A. M. Hawthornthwaite-Lawless, M. Z. Papiz, R. J. Cogdell and N. W. Isaacs (1995). "Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria." Nature **374**: 517-521.
- McDonnel, A. and L. A. Staehelin (1980). "Adhesion between liposomes mediated by the chlorophyll a/b light-harvesting complex isolated from chloroplast membranes." Journal of Cell Biology **84**(1): 40-56.
- Michel, H. (1983). "Crystallization of membrane proteins." TIBS **8**: 56-59.
- Morrissey, P. J., R. E. Glick and A. Melis (1989). "Supramolecular assembly and function of subunits associated with the chlorophyll a/b light harvesting complex II (LHCII) in soybean chloroplasts." Plant Cell Physiol **30**: 335-344.
- Murata, K., K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J. B. Heymann, A. Engel and Y. Fujiyoshi (2000). "Structural determinants of water permeation through aquaporin-1." Nature **407**(6804): 599-605.
- Murshudov, G. N., A. A. Vagin and E. J. Dodson (1997). "Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method." Acta Cryst. **D53**: 240-255.
- Nicholls, A., K. Sharp and B. Honig (1991). "PROTEINS." Structure, Function and Genetics **11**: 281ff.
- Nußberger, S. (1994). Untersuchungen zur oligomeren Struktur des Lichtsammlerkomplexes der Pflanze. EMBL. Heidelberg, dissertation am Lehrstuhl für Biophysik der TU München.
- Nußberger, S., K. Dorr, D. N. Wang and W. Kühlbrandt (1993). "Lipid-protein interactions in crystals of plant light-harvesting complex." Journal of Molecular Biology **234**(2): 347-56.
- Palacios, M. A., R. N. Frese, C. C. Gradinaru, I. H. van Stokkum, L. L. Premvardhan, P. Horton, A. V. Ruban, R. van Grondelle and H. van Amerongen (2003). "Stark spectroscopy of the light-harvesting complex II in different oligomerisation states." Biochimica et Biophysica Acta: 18.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto and M. Miyano (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." Science **289**(5480): 739-45.

- Paulsen, H., B. Finkenzeller and N. Kuhlein (1993). "Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein." European Journal of Biochemistry **215**(3): 809-16.
- Paulsen, H., U. Rumler and W. Rudiger (1990). "Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein overexpressed in *Escherischia Coli*." Planta **181**: 204-211.
- Pearlman, D. A., D. A. Case, J. W. Caldwell, W. R. Ross, T. E. Cheatham, S. DeBolt, D. Ferguson, G. Seibel and P. Kollman (1995). "AMBER, a computer program for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to elucidate the structures and energies of molecules." Comp. Phys. Commun. **91**: 1-41.
- Pebay-Peyroula, E., G. Rummel, J. P. Rosenbusch and E. M. Landau (1997). "X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 Angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases." Science **277**: 1676-1681.
- Peter, G. F. and J. P. Thornber (1991). "Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins." Journal of Biological Chemistry **266**(25): 16745-54.
- Peterman, E. J., C. C. Gradinaru, F. Calkoen, J. C. Borst, R. van Grondelle and H. van Amerongen (1997). "Xanthophylls in light-harvesting complex II of higher plants: light harvesting and triplet quenching." Biochemistry **36**(40): 12208-15.
- Peterman, E. J. G., R. Monshouwer, I. H. M. van Stokkum, R. van Grondelle and H. van Amerongen (1997). "Ultrafast singlet excitation transfer from carotenoids to chlorophylls via different pathways in light-harvesting complex II of higher plants." Chem. Phys. Lett. **264**: 279-284.
- Peterman, E. J. G. P., T. Vangrondelle, R. Vanamerongen, H. (1997). "Electron-phonon coupling and vibronic fine-structure of light-harvesting complex-ii of green plants - temperature-dependent absorption and high-resolution fluorescence spectroscopy." Journal of Physical Chemistry B **101**: 4448-4457.
- Petke, J. D., M. Maggiora, L. Shipman and R. E. Christofferson (1979). "Stereochemical properties of photosynthetic and related systems--V. *ab initio* configuration interaction calculations on the ground and lower excited singlet and triplet states of ethyl chlorophyllide a and ethyl pheophorbide a." Photochem. Photobiol. **30**: 203-223.
- Pfundel, E. and W. Bilger (1994). "Regulation and possible function of the violaxanthin cycle." Photosynth Res **42**: 89-109.
- Pichersky, E. and S. Jansson (1996). The Light-Harvesting Chlorophyll a/b binding Polypeptides and their Genes in Angiosperm and Gymnosperm Species. Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions. **28**: 507-521.
- Polivka, T. and V. Sundström (2004). "Ultrafast dynamics of carotenoid excited states-from solution to natural and artificial systems." Chem. Rev. **104**: 2021-2071.
- Porra, R. J., W. A. Thompons and P. E. Kriedemann (1989). "Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standarts by atomic absorption spectroscopy." Biochim. Biophys. Acta **975**: 384- 394.
- Prasad, B. V., M. E. Hardy, T. Dokland, J. Bella, M. G. Rossmann and M. K. Estes (1999). "X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid." Science **286**: 287-290.
- Ramachandran, G. N., C. Ramakrishnan and V. Sasisekharan (1963). "Stereochemistry of Polypeptide Chain Configurations." J Mol Biol **7**: 95-103.
- Remelli, R., C. Varotto, D. Sandona, R. Croce and R. Bassi (1999). "Chlorophyll binding to monomeric light-harvesting complex. A mutation analysis of chromophore-binding residues." Journal of Biological Chemistry **274**(47): 33510-21.

- Rogl, H. (2000). Struktur und Funktion des Lichtsammelkomplexes LHC-II der Höheren Pflanzen. Max-Planck-Institut für Biophysik. Frankfurt am Main, Johann Wolfgang Goethe-Universität.
- Rogl, H., K. Kosemund, W. Kühlbrandt and I. Collinson (1998). "Refolding of *E. coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography." FEBS Letters **432**: 21-26.
- Rogl, H. and W. Kühlbrandt (1999). "Mutant trimers of light-harvesting complex II exhibit altered pigment content and spectroscopic features." Biochemistry **38**(49): 16214-22.
- Rogl, H., R. Schodel, H. Lokstein, W. Kühlbrandt and A. Schubert (2002). "Assignment of spectral substructures to pigment-binding sites in higher plant light-harvesting complex LHC-II." Biochemistry **41**(7): 2281-7.
- Roughan, P. G. and R. D. Batt (1968). "Quantitative Analysis of Sulfolipid (Sulfoquinovosyl Diglyceride) and Galactolipids (Monogalactosyl and Digalactosyl Diglycerides) in Plant Tissues." Anal. Biochem. **22**: 74-88.
- Roversi, P., E. Blanc, C. Vonrhein, G. Evans and G. Bricogne (2000). "Modelling prior distributions of atoms for macromolecular refinement and completion." Acta Cryst. D **56**: 1313-1323.
- Ruban, A. V., P. J. Lee, M. Mark Wentworth, A. J. Young and P. Horton (1999). "Determination of the Stoichiometry and Strength of Binding of Xanthophylls to the Photosystem II Light Harvesting Complexes." J. Biol. Chem. **274**: 10458-10465.
- Ruban, A. V., A. A. Pascal and B. Robert (2000). "Xanthophylls of the major photosynthetic light-harvesting complex of plants: identification, conformation and dynamics." FEBS Letters **477**(3): 181-5.
- Ruban, A. V., M. Wentworth, A. E. Yakushevskaya, J. Andersson, P. J. Lee, W. Keegstra, J. P. Dekker, E. J. Boekema, S. Jansson and P. Horton (2003). "Plants lacking the main light-harvesting complex retain photosystem II macro-organization." Nature **421**(6923): 648-52.
- Ruban, A. V., A. J. Young, A. Pascal and P. Horton (1994). "The Effects of Illumination on the Xanthophyll Composition of the Photosystem II Light-Harvesting Complexes of Spinach Thylakoid Membranes." Plant Physiol. **104**: 227-234.
- Sandona, D., R. Croce, A. Pagano, M. Crimi and R. Bassi (1998). "Higher plants light harvesting proteins. Structure and function as revealed by mutation analysis of either protein or chromophore moieties." Biochimica et Biophysica Acta: 10.
- Schägger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal. Biochem. **166**: 368-379.
- Schmid, V. H. R., K. V. Cammarata, B. U. Bruns and G. W. Schmidt (1997). "In vitro reconstitution of the photosystem I light-harvesting complex LHCl-730: Heterodimerization is required for antenna pigment organization." PNAS **94**: 7667-7672.
- Siefermann-Harms, D. (1987). "The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes." Physiol. Plant **69**: 561-568.
- Simpson, D. J. and J. Knoetzel (1996). Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions. Advances in Photosynthesis. Dordrecht, The Netherlands: 493-506.
- Sprague, S. G. and L. A. Staehelin (1987). "Isolation and Reconstitution of Thylakoid Lipids." Meth. Enzymol. **148**: 319-327.
- Standfuss, J. and W. Kühlbrandt (2004). "The three isoforms of the light-harvesting complex II: spectroscopic features, trimer formation and functional roles." J. Biol. Chem. **279**: 36884-36891.

- Standfuss, J., A. C. Terwisscha v. Scheltinga, M. Lamborghini and W. Kühlbrandt (2005). "Mechanisms of photoprotection and non-photochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution."
- Steinback, K. E., J. J. Burke and C. J. Arntzen (1979). "Evidence for the role of surface-exposed segments of the light-harvesting complex in cation-mediated control of chloroplast structure and function." *Archives of Biochemistry & Biophysics* **195**(2): 546-57.
- Stroebel, D., Y. Choquet, J.-L. Popot and D. Picot (2003). "An Atypical Haem in the Cytochrome B6F Complex." *Nature* **426**: 413-418.
- Takaichi, S. and M. Mimuro (1998). "Distribution and Geometric Isomerism of Neoxanthin in Oxygenic Phototrophs: 9'-Cis, a Sole Molecular Form." *Plant Cell Physiol.* **39**: 968-977.
- Thornber, J. P., G. F. Peter, D. T. Morishige, S. Gomez, S. Anandan, B. A. Welty, A. G. Lee, C. A. Kerfeld, T. Takeuchi and S. Preiss (1993). "Light harvesting in photosystems I and II." *Biochemical Society Transactions* **21**: 15-18.
- Trémolières, A. (1991). "Lipid-protein interactions in relation to light energy distribution in photosynthetic membrane of eukaryotic organisms. Role of trans-  $\Delta^3$  -hexadecenoic acid-containing phosphatidylglycerol." *Trends Photochem Photobiol* **2**: 13-32.
- Tremolieres, A., P. Dainese and R. Bassi (1994). "Heterogenous lipid distribution among chlorophyll-binding proteins of photosystem II in maize mesophyll chloroplasts." *European Journal of Biochemistry* **221**(2): 721-30.
- Tribe, C., R. Audebert and J. L. Popot (1996). "Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions." *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **93**: 15047-15050.
- Tronrud, D. E. (1997). "The TNT refinement package." *Meth. Enzymol.* **277**: 306-319.
- Vagin, A. and A. Teplyakov (1997). "MOLREP: an automated program for molecular replacement." *J. Appl. Cryst.* **30**: 1022-1025.
- van Amerongen, H. and J. P. Dekker (2003). Light-Harvesting in Photosystem II. *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis*. R. B. Green and W. W. Parson, Kluwer Academic Publishers: 219-251.
- van den Berg, B., W. M. J. Clemons, I. Collinson, Y. Modis, E. Hartmann, S. C. Harrison and T. A. Rapoport (2004). "X-ray structure of a protein-conducting channel." *Nature* **427**: 36-44.
- van Grondelle, R., R. Monshouwer and L. Valkunas (1997). "Photosynthetic light-harvesting." *Pure and Applied Chemistry* **69**: 1211-1218.
- van Grondelle, R. and V. Novoderezhkin (2001). "Dynamics of excitation energy transfer in the LH1 and LH2 light-harvesting complexes of photosynthetic bacteria." *Biochemistry* **40**(50): 15057-68.
- Vonck, J., T. K. von Nidda, T. Meier, U. Matthey, D. J. Mills, W. Kühlbrandt and P. Dimroth (2003). "Molecular architecture of the undecameric rotor of a bacterial Na<sup>+</sup>-ATP synthase." *J. Mol. Biol.*
- Walker, J. L., O. P. Moreno and H. Hope (1998). "Cryocrystallography: effect of cooling medium on sample cooling rate." *J. Appl. Cryst.* **31**: 954-956.
- Walters, R. G. and P. Horton (1999). "Structural and functional heterogeneity in the major light-harvesting complexes of higher plants." *Photosynth. Res.* **61**: 77-90.
- Wang, B.-C. (1985). "Resolution of Phase Ambiguity in Macromolecular Crystallography." *Methods Enzymol.* **115**: 90-112.
- Wang, J., J. A. Hartling and J. M. Flanagan (1997). "The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis." *Cell* **91**: 447-456.
- Williams, K. (2000). "Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA." *Nature* **403**(6765): 112-5.

- Yang, C., K. Kosemund, C. Cornet and H. Paulsen (1999). "Exchange of Pigment-Binding Amino Acids in Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein." Biochemistry **38**(49): 16205-16213.
- Zhou, Y., J. H. Morais-Cabral, A. Kaufman and R. MacKinnon (2001). "Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution." Nature **414**: 43 - 48.
- Zouni, A., H.-T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauß, W. Saenger and P. Orth (2001). "Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution." Nature **409**: 739-743.