

**Einzelmolekülspektroskopische Studien
an Farbstoff-markierten Chlorophyll-a/b-
Lichtsammlerkomplexen und Untersuchungen
zur Integration der Komplexe in
elektrochemische Solarzellen**

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Manuel Lion

geb. am 9. September 1973 in Jugenheim a. d. Bergstraße

Mainz (2005)

1.	Einleitung	1
1.1	Elektrochemische Solarzellen	1
1.1.1	Die Grätzel-Zelle	2
1.1.2	Aktuelle Tendenzen bei der Weiterentwicklung elektrochemischer Solarzellen	4
1.1.3	Integration von Proteinen in Biosensoren und elektrochemische Solarzellen	6
1.2	Der Hauptlichtsammelkomplex des Photosystems II (LHCII)	7
1.2.1	Struktur des LHCII	7
1.2.2	Energietransfer innerhalb des LHCII und auf einen Akzeptor	9
1.2.3	Bedeutung des N-Terminus des LHCII für die Oligomerisierung des Komplexes und die Regulation der Photosynthese	11
1.2.4	<i>In vitro</i> -Rekonstitution und Modifizierung des LHCII	12
1.3	Zielsetzung der Arbeit	13
2.	Materialien und Methoden	14
2.1	Materialien	14
2.1.1	Geräte	14
2.1.2	Chemikalien	18
2.1.2.1	Gase	18
2.1.2.2	Lösungsmittel	18
2.1.2.3	Farbstoffe	18
2.1.2.4	Weitere Chemikalien	18
2.1.3	Proteine	19
2.2	Anzucht von Pflanzen	20
2.2.1	Erbsenpflanzen	20
2.2.2	Etiolierte Roggenkeimlinge	20
2.3	Pigmente und Pigmentderivate	20
2.3.1	Isolierung von Pigmenttotalextrakt aus Erbse	21
2.3.2	Bestimmung der Chl-Konzentration	21
2.3.3	Bestimmung der Pigmentzusammensetzung über analytische HPLC	21
2.3.4	Herstellung von Chlorophyllase-Pulver aus Roggenkeimlingen	22
2.3.5	Hydrolyse von Chl a zu Chlid a	22

2.4	Native LHCII-Monomere und Trimere	22
2.4.1	Isolierung von nativen LHCII-Trimeren aus Erbse	23
2.4.2	Monomerisierung von nativen LHCII-Trimeren	24
2.4.3	Aufreinigung von LHCII-Monomeren und Trimeren	24
2.4.3.1	Schwach denaturierende PAGE	24
2.4.3.2	Saccharose-Dichtegradientenultrazentrifugation	25
2.4.4	Entfernung von Saccharose aus dem LHCII-Ansatz	26
2.4.4.1	Dialyse	26
2.4.4.2	Gelfiltration	26
2.5	Klonierung der Lhcb1-Mutante S106C,V229C	27
2.5.1	Restriktion	27
2.5.2	Aufreinigung der DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	28
2.5.3	Ligation	29
2.5.4	Transformation	29
2.5.5	Plasmidpräparation	30
2.5.6	Bestimmung der DNA-Konzentration	30
2.5.7	Sequenzierung	30
2.6	Gewinnung von Lhcb1-Apoprotein	31
2.6.1	Überexpression von Lhcb1-Apoprotein in <i>E. coli</i>	31
2.6.2	Isolierung der Lhcb1-Einschlusskörper	32
2.6.3	Bestimmung der Apoprotein-Konzentration	32
2.6.4	Analytische SDS-PAGE	33
2.7	Farbstoffmarkierte Apoproteine	34
2.7.1	Aliquotierung von Farbstoffen	34
2.7.2	Markierung von Proteinen mit Farbstoff	34
2.7.2.1	Kopplung von SH-reaktiven Farbstoffen an Cystein	35
2.7.2.2	Kopplung von aminoreaktiven Farbstoffen an den N-Terminus	35
2.7.3	Aufreinigung des markierten Proteins	35
2.7.3.1	Fällung der Proteine	36
2.7.3.2	Präparative SDS-PAGE	36
2.7.4	Aufkonzentrieren des markiertem Lhcb1	37
2.8	Rekombinanter LHCII	37
2.8.1	Rekonstitution des Lhcb1 durch Detergenswechsel	37
2.8.2	Trimerisierung von rekombinanten LHCII-Monomeren	38
2.8.3	Bestimmung der LHCII-Konzentration	39

2.9	Spektroskopische Charakterisierung von LHCII und Farbstoffen	39
2.9.1	Absorptionsspektroskopie	39
2.9.2	CD-Spektroskopie	40
2.9.3	Fluoreszenzspektroskopie	40
2.9.4	Bestimmung des Energietransfers zwischen LHCII und Farbstoffen	41
2.9.4.1	Fluoreszenzmessung für die Energietransferberechnung	41
2.9.4.2	Dekonvolution des LHCII-Farbstoff-Spektrums	42
2.9.4.3	Löschung der Donorfluoreszenz	43
2.9.4.4	Sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz	44
2.9.4.5	Försterkritischer Abstand R_0	45
2.10	Einzelmolekülspektroskopie	46
2.11	Elektrochemische Solarzellen	47
2.11.1	Beschichtung von ITO-Glas mit Halbleitern	47
2.11.1.1	Standardrezept zur Herstellung von TiO_2 -Anoden	47
2.11.1.2	Herstellung von TiO_2 -Elektroden nach Smestad	48
2.11.1.3	TiO_2 -Solgel-Elektroden	48
2.11.1.4	Adsorption von TiO_2 aus einer TiCl_4 -Lösung	49
2.11.1.5	SnO_2 -Solgel-Elektroden	49
2.11.1.6	Elektroden aus gefälltem SnO_2	50
2.11.1.7	Elektroden aus SnO_2 -Pulver	50
2.11.2	Kathoden für elektrochemische Zellen	50
2.11.3	Elektrolytssysteme für elektrochemische Zellen	51
2.11.3.1	Iodid-Iod-Elektrolyte	51
2.11.3.2	Benzochinon-Benzohydrochinon-Elektrolyte	51
2.12	Adsorption von Farbstoffen und LHCII an Halbleiteranoden	52
2.12.1	Adsorption von Farbstoffen	52
2.12.2	Adsorption von LHCII	53
2.13	Spektroskopische Charakterisierung der elektrochemischen Zellen	53
2.13.1	Absorptions- und Fluoreszenzspektren	53
2.13.2	Wirkungsspektren	54
2.13.3	Bestimmung des IPCE-Wertes	55

3.	Ergebnisse	57
3.1	Vorversuche zur einzelmolekülspektroskopischen Untersuchung der Dynamik des N-Terminus des LHCII	57
3.1.1	Auswahl eines Farbstoffes für die Energietransfermessungen mit LHCII	57
3.1.2	Einfluss von Detergentien auf das Fluoreszenzenz-Hintergrundsignal	59
3.1.3	Farbstoff-markiertes BSA und WSCP als Referenzen für die Energietransfermessung	61
3.1.4	Einzelmolekülspektroskopische Messungen an LHCII-Tetramethylrhodamin	61
3.1.5	Herstellung eines Lhcb1-Klones für die orientierte Bindung von Monomeren an Oberflächen	63
3.2	Versuche zur Integration von Lichtsammlerkomplexen in eine elektrochemische Solarzelle	64
3.2.1	Festlegung von Standards zum Vergleich der Wirkungsspektren verschiedener elektrochemischer Solarzellen	64
3.2.1.1	Der IPCE-Wert	64
3.2.1.2	Die Normierung bezüglich des Halbleiter-Maximums	66
3.2.2	Herstellung und Charakterisierung verschiedener Halbleiterelektroden	68
3.2.2.1	Titandioxidelektroden	68
3.2.2.1.1	TiO ₂ -Solgel-Elektroden	68
3.2.2.1.2	Versuche zur Optimierung der TiO ₂ -Oberfläche durch Adsorption von TiO ₂ aus einer TiCl ₄ -Lösung	69
3.2.2.2	Zinndioxidelektroden	70
3.2.2.2.1	SnO ₂ -Solgel-Elektroden	70
3.2.2.2.2	SnO ₂ -Elektroden aus gefälltem SnO ₂	71
3.2.2.2.3	SnO ₂ -Elektroden aus SnO ₂ -Pulver	72
3.2.3	Einfluss verschiedener Elektrolytsysteme auf die Eigenschaften der Solarzellen	72
3.2.3.1	Elektrolyte aus Iodid und Iod in organischen Lösungsmitteln	72
3.2.3.2	Quasifeste Elektrolytsysteme aus Iodid und Iod in einer Gelmatrix	75
3.2.3.2.1	Acrylamid als Gelmatrix	75
3.2.3.2.2	Agarose als Gelmatrix	75
3.2.3.3	Kalziumchlorid als Elektronentransporter im Elektrolyt	77
3.2.3.4	Benzochinon und Benzohydrochinon als Elektrolytkomponenten	77
3.2.4	Einfluss verschiedener Kathodenmaterialien auf die elektrochemischen Eigenschaften der Solarzellen	78
3.2.4.1	Graphit als Kathodenmaterial	79
3.2.4.2	Gold als Kathodenmaterial	80

3.2.5	Einpolymerisieren von LHCII in Halbleiterelektroden	81
3.2.6	Adsorption von LHCII an Halbleiterelektroden	82
3.2.6.1	Adsorption von LHCII an Titandioxid	82
3.2.6.1.1	Quantifizierung der LHCII-Adsorption	82
3.2.6.1.2	Stabilisierung der Pigment-Protein-Komplexe durch Glycerin	83
3.2.6.1.3	Einfluss des amphiphilen Peptids A ₆ K auf die LHCII-Adsorption und Stabilität	85
3.2.6.2	Adsorption von LHCII an Zinndioxid	86
3.2.6.2.1	Adsorption von LHCII an SnO ₂ -Solgelelektroden	86
3.2.6.2.2	Adsorption von LHCII an durch SnO ₂ -Fällung hergestellte Elektroden	86
3.2.7	Photostabilität des LHCII	88
3.2.7.1	Vergleich der Photostabilität von Monomeren und Trimeren in Lösung und nach Immobilisierung auf Halbleiterelektroden	88
3.2.7.2	Versuche zur Verbesserung der Photostabilität der Komplexe	90
3.2.8	Einpolymerisieren von Farbstoffen in Halbleiterelektroden	91
3.2.9	Adsorption von Farbstoffen an TiO ₂ -Elektroden und Elektroneninjektion	92
3.2.9.1	Vergleich der untersuchten Farbstoffe hinsichtlich der Adsorption an TiO ₂ und Elektroneninjektion in den Halbleiter	92
3.2.9.2	Beeinflussung der Elektroneninjektion durch Saccharosedichtegradientenlösung	95
3.2.9.3	Abhängigkeit der Farbstoffadsorption an TiO ₂ von der Glycerinkonzentration	97
3.2.9.4	Einfluss des verwendeten Puffers auf die Farbstoffadsorption an TiO ₂	98
3.2.9.5	Abhängigkeit der Farbstoffadsorption vom verwendeten Detergens	99
3.2.9.6	Abhängigkeit der Farbstoffadsorption und Elektroneninjektion von zweiwertigen Kationen	100
3.2.10	Adsorption von Farbstoffen an SnO ₂ -Elektroden und Elektroneninjektion	101
3.2.11	Koadsorption von LHCII und Farbstoff an Halbleitern und Energietransfer	102
3.2.11.1	Adsorption von LHCII-Farbstoff-Konstrukten an Titandioxid	103
3.2.11.2	Koadsorption von LHCII und Farbstoffen an TiO ₂	104
3.2.11.3	Koadsorption von LHCII und Farbstoffen an SnO ₂	107
3.2.12	Einfluss der Elektrolytkomponenten auf Energietransfer und Fluoreszenz von LHCII und Farbstoff	109
3.2.12.1	Löschung der LHCII- und Farbstofffluoreszenz in Lösung	109
3.2.12.2	Löschung der Fluoreszenz von immobilisiertem LHCII und Farbstoff	111
3.2.12.3	Einfluss des Elektrolyts auf den Energietransfer von LHCII auf einen Akzeptorfarbstoff	112
3.2.13	Wirkungsspektren von Zellen mit Farbstoff und LHCII	114
3.2.14	Übersicht über die optimalen Konfigurationen für Zellen mit LHCII und Akzeptorfarbstoffen	116

4.	Diskussion	117
4.1	Einzelmolekülspektroskopische Untersuchung der Dynamik des N-Terminus von LHCII	117
4.1.1	Tetramethylrhodamin als Donorfarbstoff für Energietransfermessungen	117
4.1.2	Mögliche Einflüsse der Kopplung von Protein und Farbstoff auf die Konformation der Bindungspartner	118
4.1.3	Immobilisierung des markierten LHCII und Insertion in Liposomen	119
4.2	Versuche zur Integration von LHCII in eine elektrochemische Solarzelle	120
4.2.1	Vergleich der Wirkungsspektren von elektrochemischen Zellen	121
4.2.1.1	Niedriger Photostrom und IPCE-Wert	121
4.2.1.2	Bezug der Elektroneninjektion auf das Halbleitermaximum	122
4.2.2	Komponenten der elektrochemischen Zellen	123
4.2.2.1	Halbleiterelektroden	123
4.2.2.2	Elektrolytsysteme	125
4.2.2.3	Kathodenmaterialien	127
4.2.3	Adsorption von Farbstoffen an TiO ₂ und Elektroneninjektion in den Halbleiter	127
4.2.4	Einfluss adsorbierter Substanzen auf die Farbstoffadsorption und die Elektroneninjektion	129
4.2.4.1	Einfluss von Wasser und Sauerstoff	129
4.2.4.2	Beeinflussung durch adsorbierte Metalle	130
4.2.4.3	Einflüsse von Puffern und Detergentien	132
4.2.5	Adsorption von LHCII an Halbleiterelektroden	133
4.2.5.1	Maximale Belegungsdichte der Komplexe auf den Halbleiteroberflächen	134
4.2.5.2	Spektroskopische Eigenschaften der immobilisierten Lichtsammler-komplexe	136
4.2.5.3	Vergleich der Adsorption von nativem und rekombinantem LHCII	137
4.2.5.4	Koadsorption von LHCII mit positiv geladenen Peptiden	138
4.2.6	Stabilität der immobilisierten Komplexe	138
4.2.6.1	Konformative Stabilität	139
4.2.6.2	Photostabilität	140
4.2.7	Gemeinsame Immobilisierung von LHCII und Farbstoffen	142
4.2.8	Energietransfer von LHCII auf Akzeptorfarbstoffe	144
4.2.9	Integrierbarkeit von LHCII in eine elektrochemische Solarzelle	145
5.	Zusammenfassung	147
6.	Literaturverzeichnis	149

Anhang

Sequenz der LHCII-Mutante S106C,V229C	159
Auflistung der verwendeten Farbstoffe	160
Abkürzungen	162

1. Einleitung

1. Einleitung

Jedes Jahr treffen $3 \cdot 10^{24}$ Joules Sonnenenergie auf die Erde auf. Das entspricht der 10000fachen Menge des momentanen weltweiten Energieverbrauchs. Den ersten Schritt zur Nutzung dieser Energiequelle unternahm Edmond Becquerel im Jahre 1839. Er beobachtete einen Stromfluss bei der Beleuchtung von Metallhalogenid-haltigen Lösungen in die er zwei Platinelektroden eintauchte (Grätzel, 2001).

Die erste Halbleiterzelle wurde 45 Jahre später von Charles Fritts entwickelt, der auf ein Metallblech eine dünne Selenschicht auftrug und diese mit einem Goldblatt belegte (Grober, 2004). Weitere Versuche mit Halbleiter-Solarzellen führten im Jahre 1930 zur Vorstellung eines Solarenergie-betriebenen Elektromotors durch die Firma Siemens. Der Wirkungsgrad dieser ersten Solarzellen war jedoch sehr gering. Erst in den 50er Jahren gelang an den Bell Laboratories der Durchbruch mit Solarzellen auf der Basis des Halbleiters Silizium. 1954 stellten die Forscher eine Siliziumsolarzelle mit einem Wirkungsgrad von 6 % der Öffentlichkeit vor (Grober, 2004).

Aufgrund der hohen Produktionskosten, bedingt durch den Energieaufwand bei der Herstellung von hochreinem Silizium, lagen die Hauptanwendungsgebiete von Solarzellen über lange Zeit in der Raumfahrt, sowie in der Stromversorgung von elektrischen Kleingeräten, wie Armbanduhren oder Taschenrechnern. Der breite Strommarkt wurde in zunehmendem Maße von der zur gleichen Zeit aufgekommenen Atomenergie bedient, die ein wesentlich günstigeres Kosten/Nutzen-Verhältnis aufwies. Erst durch die Energiekrise im Jahre 1973 und die Reaktorkatastrophe von Tschernobyl 1986 kam es zu einem Umdenken und zu einer verstärkten Förderung der Nutzung regenerativer Energiequellen (Grober, 2004).

1.1 Elektrochemische Solarzellen

Ein wesentlicher Nachteil von Siliziumsolarzellen liegt neben den hohen Herstellungskosten in der Beschränkung des Wirkungsgrades durch Ladungsrekombinationen innerhalb des Halbleiters. Unter Laborbedingungen liegt der Wirkungsgrad von monokristallinen Siliziumsolarzellen heute bei 24 % (Shell Deutschland, 2001). Höhere Wirkungsgrade von bis zu 37 % (Luther, 2003) werden nur mit sog. Tandemzellen erreicht, in denen zwei Zellen aus unterschiedlichen Halbleitermaterialien hintereinander geschaltet werden.

Ein Schwerpunkt der Solarforschung liegt daher heute in der Suche nach alternativen Konzepten zur Nutzung der Sonnenenergie, die zu einer weiteren Erhöhung des Wirkungsgrades oder zu einer Verringerung der Herstellungskosten führen könnten. Eine kostengünstige Alternative zur Siliziumsolarzelle könnten dabei elektrochemische Solarzellen darstellen, die sich an der photosynthetischen Ladungstrennung und der Photographie orientieren.

1. Einleitung

1.1.1 Die Grätzel-Zelle

Der Durchbruch auf dem Weg zur Entwicklung von elektrochemischen Solarzellen gelang Anfang der 1990er Jahre mit der Erfindung der sog. Grätzel-Zelle (O'Regan und Grätzel, 1991). Dieser Solarzellentyp basiert auf dem schon 1883 von Vogel entdeckten Effekt, dass Silberhalogenide durch Farbstoffmoleküle sensibilisiert werden können und sich der photosensitive Bereich des Materials auf diese Weise zu längeren Wellenlängen ausdehnen lässt (Grätzel, 2001).

Die Funktionsweise der Grätzel-Zelle lässt sich am besten anhand einer schematischen Darstellung des Aufbaus (Abb. 1.1) erklären.

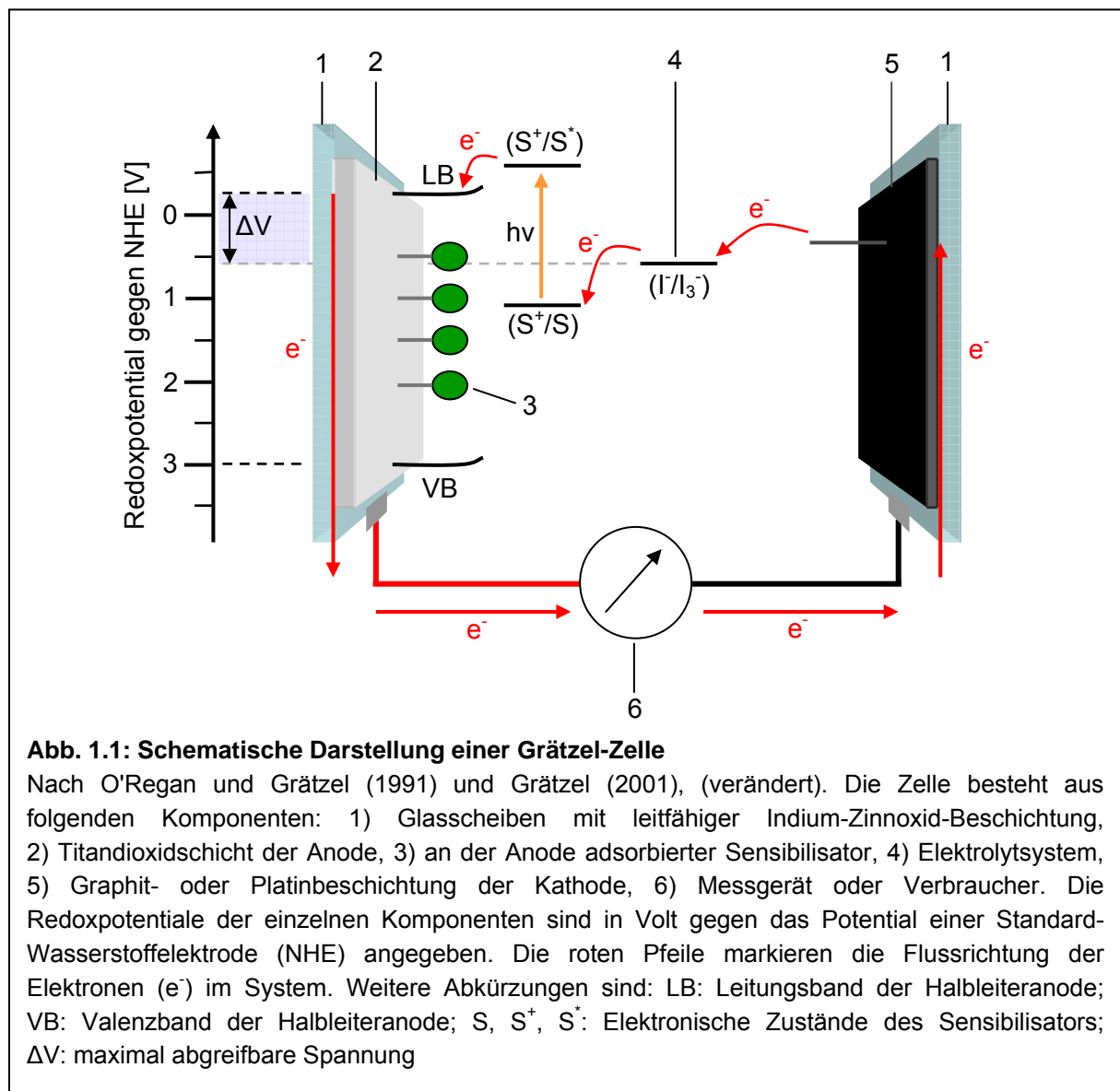


Abb. 1.1: Schematische Darstellung einer Grätzel-Zelle

Nach O'Regan und Grätzel (1991) und Grätzel (2001), (verändert). Die Zelle besteht aus folgenden Komponenten: 1) Glasscheiben mit leitfähiger Indium-Zinnoxid-Beschichtung, 2) Titandioxidschicht der Anode, 3) an der Anode adsorbierte Sensibilisator, 4) Elektrolytssystem, 5) Graphit- oder Platinbeschichtung der Kathode, 6) Messgerät oder Verbraucher. Die Redoxpotentiale der einzelnen Komponenten sind in Volt gegen das Potential einer Standard-Wasserstoffelektrode (NHE) angegeben. Die roten Pfeile markieren die Flussrichtung der Elektronen (e^-) im System. Weitere Abkürzungen sind: LB: Leitungsband der Halbleiteranode; VB: Valenzband der Halbleiteranode; S, S^+ , S^* : Elektronische Zustände des Sensibilisators; ΔV : maximal abgreifbare Spannung

Die Grätzel-Zelle besteht aus zwei Elektroden, einer Halbleiteranode, an der Sensibilisatorfarbstoff-Moleküle adsorbiert sind, und einer Graphit- oder Platinkathode. Als Substrat für die Elektroden werden meist Glasscheiben verwendet, die mit einer leitfähigen Indium-Zinnoxidschicht belegt sind.

1. Einleitung

Die Ladungstrennung findet an der Grenzfläche zwischen der Halbleiteranode und dem adsorbierten Farbstoff statt. Durch Absorption von Sonnenlicht wird der Sensibilisator (S) in einen angeregten Zustand (S^*) überführt, aus dem er ein Elektron in das Leitungsband (LB) der Anode übertragen kann. Das freigesetzte Elektron wird schnell über das Leitungsband des Halbleiters und die Indium-Zinnoxidschicht des Glassubstrats abgeleitet. Das entstandene Sensibilisator-Radikalkation (S^+) wird durch ein Elektron aus einer Iodid/Triiodid-Elektrolytlösung (I^-/I_3^- , vgl. 2.11.3.1) regeneriert, die sich zwischen der Anode und der Kathode befindet. Wird der Stromkreis zwischen den Elektroden geschlossen, kann der Elektrolyt wiederum durch die, über die Kathode zurückfließenden, Elektronen regeneriert werden.

In den Solarzellen des Grätzel-Zelltyps werden im Allgemeinen Titandioxid oder Zinndioxid als Anodenmaterialien eingesetzt. Diese Halbleiter kommen in verschiedenen Kristallformen, Rutil, Anatas und Brookit, vor, welche auch die Bandlücke des Halbleiters, d.h. die Potentialdifferenz zwischen Valenz- und Leitungsband, beeinflussen. In der meist verwendeten Anatasform beträgt die Größe der Bandlücke von TiO_2 3,2 eV (vgl. Abb. 1.1), die Bandlücke von SnO_2 ist 3,8 eV breit. Im Gegensatz zu kristallinem Silizium, dessen Bandabstand nur 1,2 eV beträgt, lassen sich Elektronenübergänge in TiO_2 und SnO_2 daher nur durch UV-Licht anregen. Erst durch den Einsatz von Sensibilisatorfarbstoffen kann auch der sichtbare Bereich des Sonnenlichts zur Stromgewinnung genutzt werden. Die bisher beste spektrale Ausnutzung des Sonnenlichts wurde durch einen komplexen, „black dye“ genannten, Sensibilisator erreicht, der aus verschiedenen Ruthenium(II)-terpyridin-Derivaten zusammengesetzt war (Nazeeruddin *et al.*, 2001). Dieser Farbstoff absorbierte Licht über den gesamten Bereich von 400 nm bis 900 nm und ermöglichte die Herstellung einer elektrochemischen Solarzelle mit einem Wirkungsgrad von 10,4 %.

Außer durch die spektroskopischen Eigenschaften des Sensibilisators wird der Wirkungsgrad von elektrochemischen Solarzellen auch stark durch die Größe der absorbierenden Oberfläche beeinflusst. Im Falle von TiO_2 und SnO_2 werden die Elektroden aus kolloidalen Partikeln hergestellt, die nach einem Sinterprozess einen Schwamm-artigen leitfähigen Film ausbilden. Durch die große Porosität des Materials wird eine Oberflächenvergrößerung um einen Faktor von 1100 gegenüber der sichtbaren Oberfläche erreicht (Nazeeruddin *et al.*, 1993). Auf eine hohe Materialreinheit, wie sie für die Fabrikation von Siliziumsolarzellen notwendig ist, kann bei den Elektroden der Grätzel-Zelle verzichtet werden, wodurch Herstellungsprozess deutlich kostengünstiger ist.

Der Schlüssel zur Rentabilität von elektrochemischen Solarzellen liegt damit nicht in der Höhe des Wirkungsgrades (10 – 11 %), der nach wie vor deutlich niedriger ist, als bei Siliziumsolarzellen (24 %, Grätzel, 2001), sondern in den geringeren Produktionskosten. Außerdem ist es möglich, basierend auf dem Prinzip der Grätzel-Zelle, eine große Variationsbreite an verschiedenen Solarzell-Typen herzustellen, die sich für vielfältige Anwendungsbereiche eignen.

1. Einleitung

1.1.2 Aktuelle Tendenzen bei der Weiterentwicklung elektrochemischer Solarzellen

Ein entscheidender Nachteil der ersten Grätzel-Zellen gegenüber den Siliziumsolarzellen lag in ihrer beschränkten Haltbarkeit. Neben einer möglichen photooxidativen Schädigung des verwendeten Sensibilisator-Farbstoffes wurde die Beständigkeit der Zellen vor allem durch den Einsatz von flüssigen Elektrolytsystemen begrenzt, die bei Ermüdung der verwendeten Dichtungsmaterialien austreten oder verdunsten konnten.

Einen Schwerpunkt der Forschung in den letzten Jahren bildete daher die Entwicklung von Zellen mit festen Elektrolytsystemen, wobei verschiedene Ansätze gewählt wurden. Am viel versprechendsten erscheinen die Verwendung von Kupferiodid als festem Elektrolyten, der auf der farbstoffbelegten Halbleiterelektrode aufgetrocknet wird (Tennakone *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 2003; Sirimanne und Soga, 2003), sowie der Einsatz von organischen Lochleitern (Hagen *et al.*, 1997; Bach *et al.*, 1998; Cervini *et al.*, 2003). In anderen Arbeiten wurden organische Polymere als Matrix für ein I^-/I_3^- -Elektrolytsystem untersucht (Kaneko *et al.*, 2002; Matsumoto *et al.*, 2001; Kubo *et al.*, 2003). Bei diesen Zellen kam es jedoch, ähnlich wie bei Zellen mit flüssigem Elektrolyten, zur Verdunstung der Elektrolyt-komponenten. Des Weiteren war die maximale Stromproduktion dieser Zellen geringer, da die Diffusion der Iodid- und Triiodidkomponenten in der Gelmatrix gegenüber flüssigen Systemen deutlich verlangsamt war (Kubo *et al.*, 2003).

Ein weiterer Kernpunkt der Forschung, neben der Erhöhung der Lebensdauer von elektrochemischen Solarzellen, ist die Erschließung von neuen Anwendungsbereichen für Farbstoff-sensibilisierte Solarzellen. Ein wichtiger Schritt liegt hierbei in der Entwicklung flexibler Zellen, in denen, anstelle des Indium-Zinnoxid-beschichteten Glases, ein Kunststofffilm als Elektrodensubstrat eingesetzt wird (Sommerling *et al.*, 1998; Haque *et al.*, 2003). Der Wirkungsgrad dieser flexiblen Zellen liegt schon jetzt bei 5,3 % (Haque *et al.*, 2003), wodurch sich vielfältige Einsatzbereiche für diesen Zelltyp eröffnen.

Ein weiteres Anwendungsgebiet für elektrochemische Solarzellen könnte in der photokatalytischen Spaltung von Wasser und der Gewinnung von molekularem Wasserstoff liegen. Die Modelle für eine effiziente Wasserspaltung orientieren sich dabei stark an der Photosynthese höherer Pflanzen. Linkous und Slattery stellten 2000 ein Modell aus zwei Halbzellen zur Wasserspaltung und Synthese von Wasserstoff vor. In getrennten Versuchen konnten die Autoren die initiale Spaltung von Wasser in Sauerstoff und Protonen durch Ditridecyl-Perrylen und die Synthese von Wasserstoff an einer Kupfer-Phthalocyanin-Elektrode beobachten. Eine alternative zu dem System aus zwei Zellen mit Farbstoff-sensibilisierten Solarzellen stellt eine 1999 von M. Grätzel entwickelte Tandemzelle dar, die aus einer Wolframoxidzelle (vgl. Santato *et al.*, 2001) und einer Zelle mit Farbstoff-sensibilisierter TiO_2 -Elektrode besteht, die hintereinander geschaltet werden (Abb. 1.2.A).

1. Einleitung

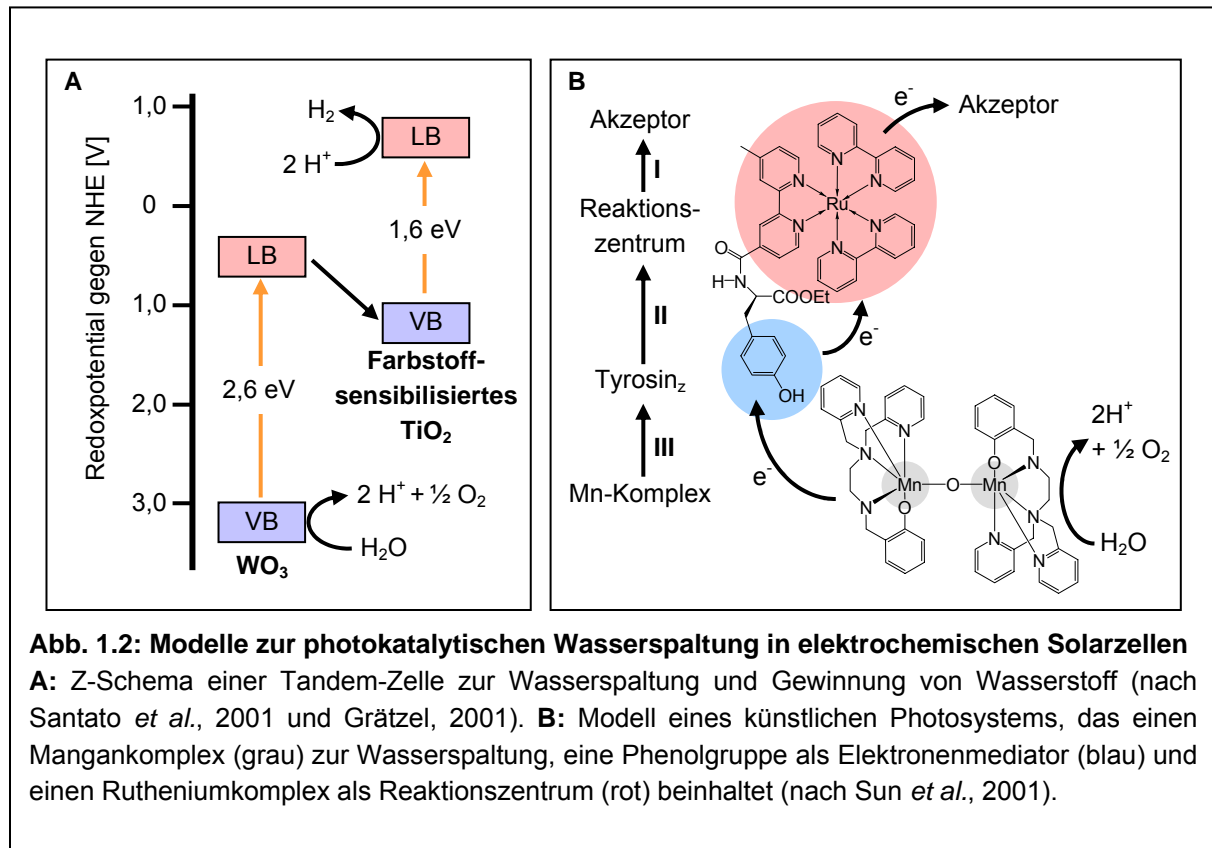


Abb. 1.2: Modelle zur photokatalytischen Wasserspaltung in elektrochemischen Solarzellen

A: Z-Schema einer Tandem-Zelle zur Wasserspaltung und Gewinnung von Wasserstoff (nach Santato *et al.*, 2001 und Grätzel, 2001). **B:** Modell eines künstlichen Photosystems, das einen Mangankomplex (grau) zur Wasserspaltung, eine Phenolgruppe als Elektronenmediator (blau) und einen Rutheniumkomplex als Reaktionszentrum (rot) beinhaltet (nach Sun *et al.*, 2001).

Der Vorteil dieses Modells besteht darin, dass die beiden Halbzellen unterschiedliche Anteile des sichtbaren Lichts ausnutzen. Die Wolframtrioxid-Zelle absorbiert in erster Linie die blauen Anteile des Sonnenlichts. Die Wasserspaltung wird durch Elektronenlücken im Valenzband katalysiert, die bei Elektronenübergängen innerhalb des Halbleiters entstehen. Die im Leitungsband befindlichen Elektronen der ersten Zelle werden zur zweiten Zelle weitergeleitet, die den grünen und roten Teil des sichtbaren Lichts absorbiert. Nach erneuter Anregung können die Leitungsbandelektronen auf Protonen übertragen werden, wobei molekularer Wasserstoff entsteht. Da die Halbzellen komplementäre Anteile des Sonnenlichts absorbieren, können sie direkt übereinander gelegt werden, was eine deutliche Platzersparnis bedeutet. Der Wirkungsgrad von solchen Systemen liegt bei 4,5 %.

Eine Möglichkeit zur Erhöhung des Wirkungsgrades bei der Wasserspaltung könnte in einer noch weiter gehenden Nachahmung der Photosynthese bestehen. Ein Beispiel hierfür ist ein von Sun *et al.* (2001) entwickeltes Modell eines künstlichen Photosystems II (Abb. 1.2.B). Dieses Photosystem besteht aus einem Reaktionszentrum aus einem Ruthenium tris-bipyridyl-Komplex, einem Phenolrest, der kovalent mit dem Reaktionszentrum verbunden ist und dem Tyrosin₂ des Photosystems II entspricht, und einem Mangan-Komplex, der die Wasserspaltung katalysieren soll. Die Redoxpotentiale der einzelnen Komponenten der Anordnung ähneln dabei den Redoxpotentialen der äquivalenten Bestandteile des natürlichen Photosystems. Eine Wasserspaltung am Mangan-Komplex des Systems konnte von den Autoren zwar noch nicht beobachtet werden, sollte aber nach einer weiteren Modifizierung des Systems möglich sein (Sun *et al.*, 2001).

1. Einleitung

1.1.3 Integration von Proteinen in Biosensoren und elektrochemische Solarzellen

Eine Alternative zur Nachahmung natürlicher Vorgänge stellt die Integration von Proteinkomplexen in elektrochemische Zellen dar. Erste Versuche hierzu wurden bereits vor der Entwicklung der Grätzel-Zelle durchgeführt. So beschrieben Cuendet und Grätzel 1984 die Adsorption von Photosystem I und Photosystem II an Titandioxidpartikel. Die Aktivität von Photosystem II konnte nach der Immobilisierung durch die Oxidation von 2,6-Dichlorophenol-indophenol (DCPIP) in der Gegenwart von 1,5-Diphenyl-Carbohydrazid (DPC) nachgewiesen werden, was erste Hinweise darauf gab, dass die funktionelle Verknüpfung von Proteinkomplexen mit einem Halbleiter möglich war. Tatsächlich konnten Zhao *et al.* (2002), nach dem Einbetten von Reaktionszentren von *Rhodobacter sphaeroides* in eine Al_2O_3 -Gelmatrix, eine Übertragung von Elektronen von den photosynthetischen Reaktionszentren auf den Halbleiter beobachten. Eine erste funktionelle Solarzelle mit natürlichen Photosystemen wurde kürzlich von Das *et al.* (2004) vorgestellt. Die Autoren immobilisierten das pflanzliche Photosystem I sowie das Reaktionszentrum von *Rhodobacter sphaeroides* über eine His_6 -Funktion auf einer Nickel-NTA-funktionalisierten Goldelektrode und betteten die Komplexe anschließend in eine Matrix aus organischen Halbleitern ein. Den Gegenpart zur Goldelektrode bildete eine Silberschicht, die auf die Halbleiter aufgebracht wurde. In den Photosystem I-Zellen erfolgte der Elektronentransfer vom Photosystem zur Goldelektrode, in den Zellen mit den bakteriellen Reaktionszentren konnte ein umgekehrter Elektronentransport in Richtung der Silberelektrode beobachtet werden. Der Wirkungsgrad der Zelle mit dem bakteriellen Reaktionszentrum lag unter Kurzschlussbedingungen bei 12 %, die Autoren erwarten jedoch, dass durch ähnliche Systeme auch Wirkungsgrade von über 20 % erreicht werden können.

Ein weiteres Anwendungsgebiet, das auf der Integration von Proteinen in elektrochemische Zellen beruht, liegt in der Entwicklung von Biosensoren. Hierbei versucht man, die hohe Spezifität von Proteinen für Substrate und Effektoren zu nutzen. Erste Versuche mit Cytochrom *c* (Topoglidis *et al.*, 1998) zeigten, dass der Proteinkomplex in funktionellem Zustand an TiO_2 adsorbiert werden konnte. Dabei konnten auch Veränderungen der Absorption der adsorbierten Komplexe in Abhängigkeit vom Oxidationsgrad des Eisenatoms im Cytochrom beobachtet werden. Versuche zur funktionellen Immobilisierung von Hämoglobin (Topoglidis *et al.*, 2000) führten schließlich zur Entwicklung eines Biosensor-Modells, in dem TiO_2 -immobilisiertes Hämoglobin zur Detektion von Stickstoffmonoxid benutzt wurde (Topoglidis *et al.*, 2001). Die Detektion erfolgte dabei über den Farbumschlag bei der Reaktion des Sauerstoff-beladenen Häms mit Stickstoffmonoxid. Der Oxidationsgrad des Häms konnte in dieser Messzelle durch Übertragung von Elektronen vom Titandioxid reguliert werden, was die Regeneration des Proteinkomplexes und damit die Messung der Stickstoffmonoxid-Umsatzrate und -Konzentration ermöglichte.

Auch die hier vorliegende Arbeit beschäftigte sich in weiten Teilen mit dem Einsatz von Proteinkomplexen in elektrochemischen Zellen. Basierend auf dem Prinzip der Grätzel-Zelle wurde die Möglichkeit der Integration von pflanzlichen Lichtsammlerproteinen in eine Solarzelle untersucht. Innerhalb dieses Solarzellenmodells sollten die Lichtsammlerkomplexe das Sonnenlicht absorbieren und die Energie auf einen Sensibilisatorfarbstoff übertragen, welcher in der Folge ein Elektron in das Leitungsband einer Halbleiterelektrode überträgt (siehe auch 1.3).

1. Einleitung

1.2 Der Hauptlichtsammelkomplex des Photosystems II (LHCII)

Die Lichtenergie zur photochemischen Ladungstrennung wird in höheren Pflanzen hauptsächlich von Antennenstrukturen, den sog. Lichtsammelkomplexen, zur Verfügung gestellt. Diese Komplexe sind aufgrund gebundener Pigmente in der Lage, den sichtbaren Anteil des Sonnenlichts zu absorbieren und die so gewonnene Energie nahezu vollständig an die Reaktionszentren der Photosysteme weiterzuleiten, wo sie in ein elektrochemisches Potential umgewandelt wird.

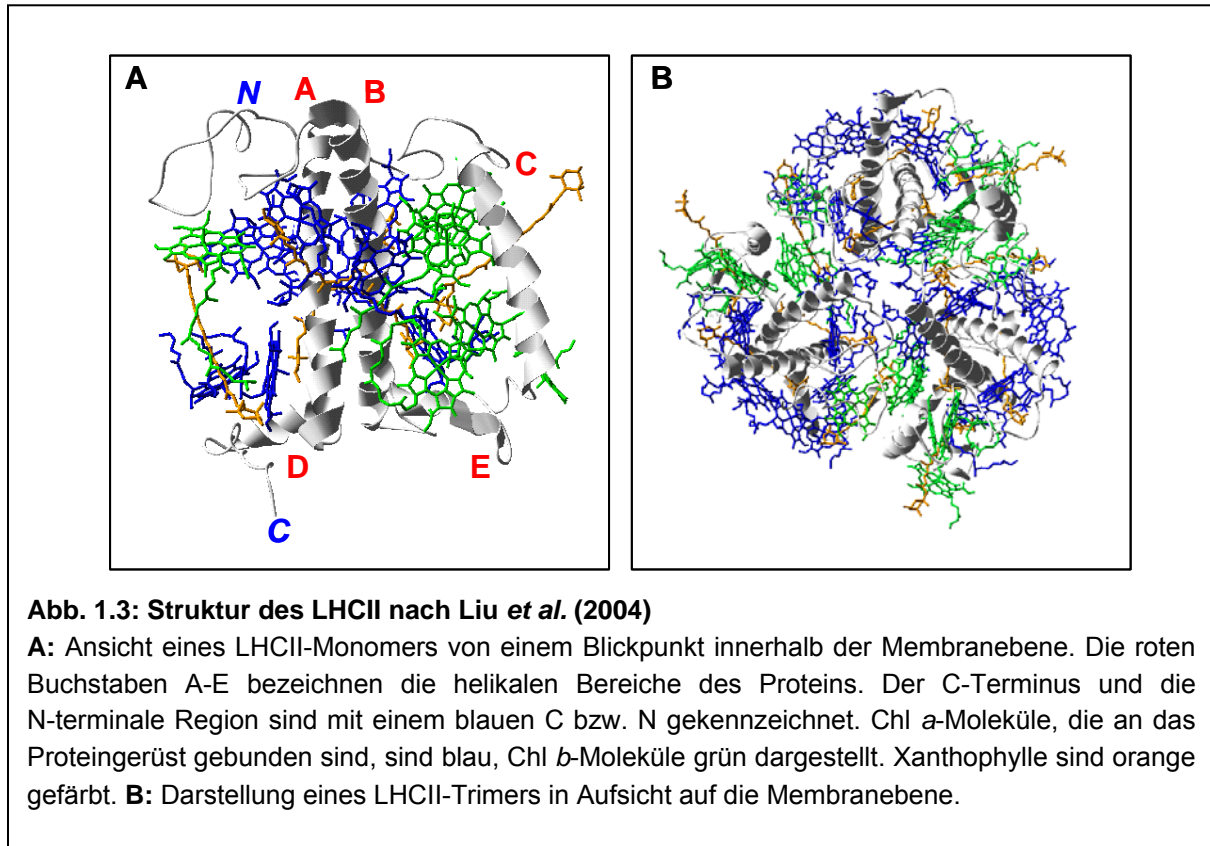
Das in der Natur am häufigsten vorkommende Antennenprotein ist der Hauptlichtsammelkomplex des Photosystems II (Light harvesting complex II, LHCII). In der Pflanze liegt der LHCII, der sich aus den kernkodierten Proteinen Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 zusammensetzt (Jansson, 1994), meist als Trimer vor (siehe Abb. 1.3.B). Die Proteine Lhcb1, Lhcb2 und Lhcb3 weisen eine hohe Sequenzhomologie von 85 % (Lhcb1 und Lhcb2) bzw. 70 % (Lhcb3) auf (Pichersky und Jansson, 1996) und können sowohl als Homo- als auch als Heterotrimere vorkommen (Jansson, 1994; Jackowski *et al.*, 2001). In der höhermolekularen Organisation des Photosystems II sind mindestens zwei bis vier dieser Trimere mit dem dimeren Photosystem II-Kernkomplex und seinen inneren Antennen assoziiert (Boekema *et al.*, 1999; Yakushevskaya *et al.*, 2001).

1.2.1 Struktur des LHCII

Weite Teile der Struktur des LHCII konnten 1994 von Kühlbrandt *et al.* durch elektronenkristallographische Messungen an zweidimensionalen Kristallen aufgeklärt werden. Die Auflösung dieser Messungen betrug 3,4 Å in der Membranebene und ermöglichte die Bestimmung von etwa 80 % der Proteinstruktur.

Durch röntgenkristallographische Untersuchungen an dreidimensionalen LHCII-Kristallen wurde die Auflösung auf 2,72 Å verbessert (Liu *et al.*, 2004). Etwa 97 % der Struktur des Komplexes wurden auf diese Weise sichtbar gemacht (Abb. 1.3).

1. Einleitung



Neben drei membrandurchspannenden Helices, A, B und C, weist das LHCII-Monomer (Abb. 1.3.A) zwei amphiphile Helices, D und E, auf, die auf der luminalen Seite auf der Thylakoidmembran aufliegen. Die Helices A und B sind gegenüber der Membranebene um 32° geneigt und bilden eine Superhelix-artige Struktur im Zentrum des Proteins.

An dieses Proteingerüst sind pro Monomer 14 Chlorophylle (Chl), 8 Chl *a* und 6 Chl *b*, sowie 4 Xanthophylle gebunden. Die Chlorophylle sind in zwei Ebenen, einer stromalen und einer luminalen, angeordnet (siehe auch Abb. 1.4). Durch die hohe Auflösung der Messungen von Liu *et al.* (2004) war eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Pigmente möglich. Demnach befinden sich die Chl *a*-Moleküle in erster Linie im Zentrum des Monomers, nahe den Helices A und B, die Chl *b* sind eher in den peripheren Regionen des Proteins gebunden. Die Zuordnung der Chl-Bindungsstellen deckte sich weitgehend mit früheren Daten, die auf Punktmutationen einzelner Chl-Bindungsstellen beruhten (Rogl und Kühlbrandt, 1999; Remelli *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999; Hobe *et al.*, 2003), wobei Yang *et al.* und Hobe *et al.* zeigen konnten, dass einige der Chl-Bindungsstellen nicht ausschließlich Chl *a* oder Chl *b* binden, sondern lediglich eine Präferenz für eines der Chl aufweisen. Neben der Zuordnung der Chl-Bindungsstellen konnte auch die Lage der Xanthophylle durch die Struktur von Liu *et al.* (2004) eindeutig geklärt werden. Zwei Luteine, die mit den zentralen Helices A und B assoziiert sind, wurden schon durch Kühlbrandt *et al.* (1994) identifiziert. Neben den Luteinen wurden nun zwei weitere Xanthophyll-Bindestellen gefunden, die mit einem Neoxanthin, an Helix C, und einem variablen Xanthophyll, das dem Xanthophyllzyklus zugeordnet wurde, besetzt sind.

1. Einleitung

1.2.2 Energietransfer innerhalb des LHCII und auf einen Akzeptor

Für die Funktion des LHCII als Lichtantenne des Photosystems II ist der Transfer von Anregungsenergie zwischen den Pigmenten des Komplexes und vom Komplex auf einen Akzeptor von entscheidender Bedeutung. Für den Energietransfer zwischen den Pigmenten des LHCII werden zwei verschiedene Transfermechanismen, der Resonanzenergietransfer (RET, oder Förster-Transfer; Förster, 1948) sowie die Ausbildung von Excimeren nach dem Dexter-Mechanismus, diskutiert, wobei wahrscheinlich der RET die dominierende Form der Energieweiterleitung darstellt.

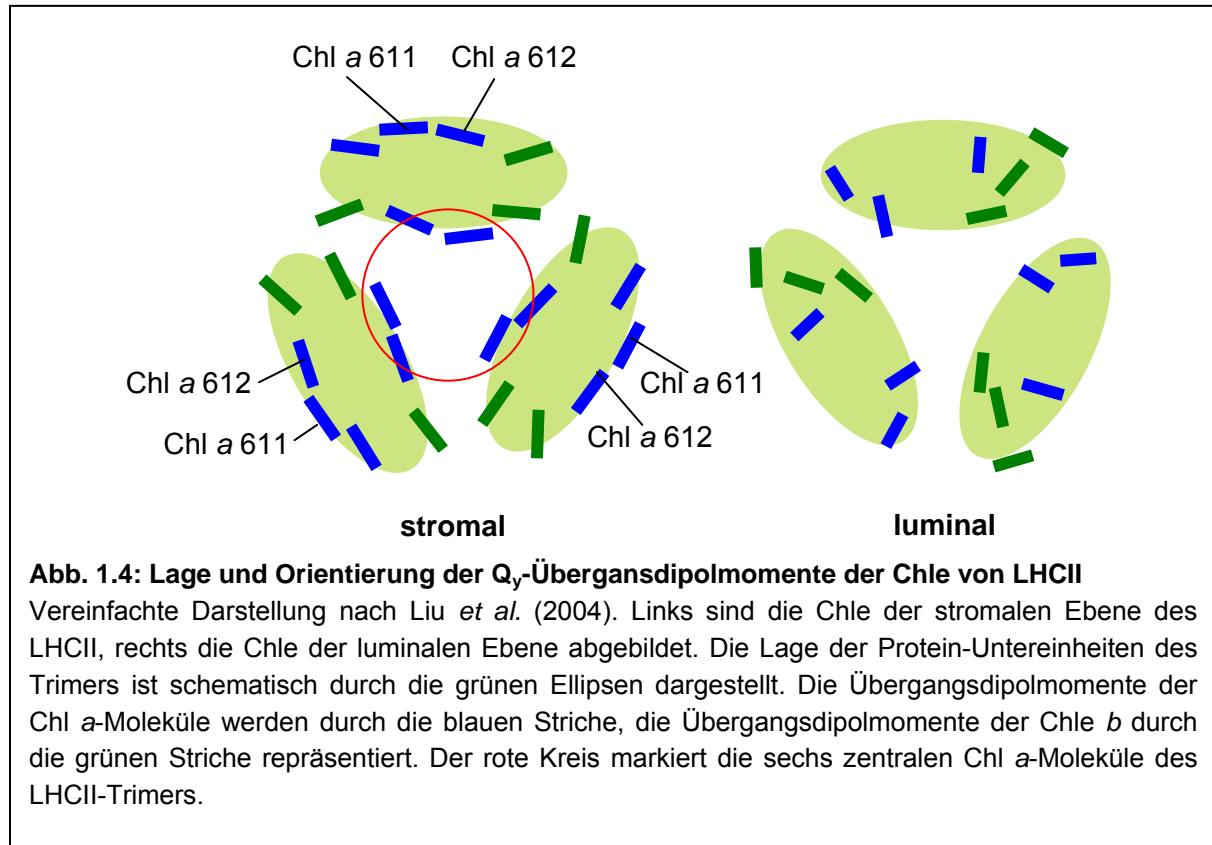
Der RET beruht auf einer Interaktion zwischen den Dipolmomenten zweier Moleküle. Das angeregte Donormolekül kann dabei als mechanischer Oszillator betrachtet werden, der in einem Akzeptormolekül eine Resonanz hervorruft. Für die effiziente Übertragung der Anregungsenergie müssen Donor und Akzeptor nicht in direktem Kontakt stehen. Die Transfereffizienz und Transferrate sind jedoch proportional zur sechsten Potenz des Abstands zwischen den beteiligten Molekülen. Weitere wichtige Voraussetzungen für den Energietransfer zwischen zwei Molekülen sind eine ähnliche Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor und die Überlappung der Fluoreszenz des Donors mit der Absorption des Akzeptors. Da ein Teil der Anregungsenergie eines Moleküls durch innere Umwandlung direkt nach der Anregung verloren geht, erfolgt der Energietransfer meist entlang eines Energiegefälles von Molekülen, die bei kürzeren Wellenlängen absorbieren, zu Molekülen, deren Absorption im längerwelligen Bereich liegt. Die Anregungsenergie wird bei dem RET vollständig vom Donor auf den Akzeptor übertragen.

Im Falle des Dexter-Transfers kommt es zu einem Austausch von Elektronen zwischen Donor und Akzeptor, wobei die Anregungsenergie über beide Moleküle delokalisiert vorliegt. Um eine solche Delokalisation der Elektronen zu ermöglichen, müssen Donor und Akzeptor in direktem Kontakt stehen, d.h. die Elektronenorbitale beider Moleküle müssen überlappen. Die Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor spielt hier, im Gegensatz zum RET, keine Rolle.

Im LHCII wird die Anregungsenergie zunächst von den Xanthophyllen auf die Chl, bzw. von Chl *b* auf Chl *a* übertragen. Anschließend findet ein Transfer der Energie zwischen den Chl *a*-Molekülen statt.

Kleima *et al.* (1997) fanden für den Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* kurze Halbwertszeiten von einigen hundert Femtosekunden. Van Amerongen und van Grondelle (2001) gingen, aufgrund der von ihnen berechneten Kopplungsstärken zwischen den Molekülen, von einer starken Lokalisation der Anregung auf Chl *a* oder Chl *b* aus, was für einen Energietransfer nach dem Förster-Mechanismus sprach. Für den Energietransfer zwischen den Chl *a*-Molekülen wurden sowohl sehr schnelle Zeiten von wenigen hundert Femtosekunden als auch langsame Zeiten von einigen Picosekunden gefunden (Visser *et al.*, 1996; Kleima *et al.*, 1997; Gradinaru *et al.*, 1998). Auch hier war eine Modellierung des Energietransfers nach der Förster-Gleichung möglich, eine Delokalisation der Anregungsenergie konnte für die schnellen Transferprozesse jedoch nicht ausgeschlossen werden (van Amerongen und van Grondelle, 2001).

1. Einleitung



Liu *et al.* (2004) schlossen aus den Strukturdaten des LHCII (Abb. 1.2), dass die, eher in Gruppen angeordneten, Pigmente in der luminalen Ebene des Komplexes in erster Linie die Aufgabe der Absorption von Sonnenlicht erfüllen, während die sechs zentralen Chl *a* in der stromalen Ebene (Abb. 1.2, roter Kreis) auch den schnellen Energietransfer zwischen den Untereinheiten eines Trimers bewerkstelligen. Des Weiteren folgerten Liu *et al.* (2004), dass die Anregungsenergie des LHCII schnell auf die peripheren Chl *a*-Moleküle 611 und 612 fokussiert wird, welche die Energie zu einem Akzeptor außerhalb des Komplexes weiterleiten.

Die These der Fokussierung der Anregungsenergie des LHCII auf ein einzelnes Chl pro Monomer oder ein Chl-Paar mit ähnlicher Orientierung der Übergangsdipolmomente wird auch durch Fluoreszenz-polarimetrische Messungen an einzelnen LHCII-Molekülen gestützt (Tietz *et al.*, 2000; Tietz, 2000; Gerken *et al.*, 2001; Wolf-Klein, 2001). Die Autoren beobachteten an immobilisierten LHCII-Monomeren eine starke Polarisation der emittierten Fluoreszenz, die auf einen einzelnen Fluorophor schließen ließ. LHCII-Trimere zeigten dagegen zunächst nur eine geringe Polarisation der Fluoreszenz, die jedoch nach dem Ausbleichen einzelner Chl des Komplexes zunahm. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Anregung eines LHCII-Trimers von mehreren Chl durch Emission von Fluoreszenz abgebaut wird, wobei sich die Polarisationen der Emission der einzelnen Pigmente aufheben.

1. Einleitung

1.2.3 Bedeutung des N-Terminus des LHCII für die Oligomerisierung des Komplexes und die Regulation der Photosynthese

Wie unter 1.2.1 beschrieben, konnten aufgrund der kristallographischen Messungen von Liu *et al.* (2004) weite Teile der Struktur des LHCII dargestellt werden. Eine vollständige Auflösung der N-terminalen Region des Komplexes war jedoch nicht möglich. Der Aminoterminus wurde im vorliegenden Strukturmodell (Abb. 1.3) erst ab Aminosäure 14 angegeben. Die Struktur und Dynamik des N-Terminus des LHCII ist von besonderem Interesse, da dieser Bereich für die Oligomerisierung des LHCII, sowie für die Regulation der Photosynthese von Bedeutung ist.

Hobe *et al.* (1995) konnten zeigen, dass eine, in der Nähe des N-Terminus gelegene, sechs Aminosäuren lange Sequenz (Tryptophan¹⁶-Tyrosin¹⁷-X-X-X-Arginin²¹) für die Trimerisierung des LHCII essentiell ist. Die Deletion des Motivs, sowie Aminosäureaustausche innerhalb der Sequenz, führten zu einem Verlust der Fähigkeit zur Ausbildung von Trimeren. Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass, neben möglichen direkten Interaktionen der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Arginin mit der benachbarten Untereinheit des Trimers, auch eine indirekte Verbindung zwischen den Untereinheiten besteht, die durch ein Phosphatidylglycerin (PG) vermittelt wird. Nußberger *et al.* (1993) zeigten, dass PG durch Behandlung mit Detergentien nicht vollständig aus den LHCII-Trimeren entfernt werden kann und dass die Spaltung der Lipide durch Phospholipase mit einem Zerfall der Trimere in ihre Untereinheiten einhergeht. Liu *et al.* (2004) wiesen drei PG-Moleküle pro LHCII-Trimer nach, die an den Grenzflächen zwischen den einzelnen Untereinheiten liegen. Dabei weisen die Strukturdaten darauf hin, dass das Tryptophan¹⁶ des N-terminalen Trimerisierungsmotivs an der Bindung des Lipids beteiligt ist (vgl. Bender, 2004).

Zu einer geregelten Monomerisierung bzw. Oligomerisierung von LHCII kommt es auch bei einem, als „state transition“ bezeichneten, reversiblen Prozess, über den reguliert wird, welcher Anteil der Anregungsenergie den Reaktionszentren der beiden Photosysteme zur Verfügung steht. Wird das Photosystem II stärker angeregt als das Photosystem I, so kann es ausgehend vom Photosystem I zu einem „Elektronenstau“ in der Elektronentransportkette kommen. Nach der Theorie wird durch diesen Stau am Cytochrom b_6/f -Komplex eine Kinase aktiviert, welche das Threonin⁵ oder das Threonin⁶ am N-Terminus des LHCII phosphoryliert (Allen, 1992). In Folge der Phosphorylierung kommt es möglicherweise zur Monomerisierung des LHCII. Einzelne LHCII-Monomere diffundieren lateral durch die Thylakoidmembran zum Photosystem I und erhöhen die Antennenfläche des Photosystems (Allen und Forsberg, 2000; Kruse, 2001). Im Zusammenhang mit der Phosphorylierung des LHCII wird auch diskutiert, ob es bei hohen Lichtintensitäten zu einer Konformationsänderung des N-Terminus des LHCII kommt, welche die Zugänglichkeit der Threonine für die Kinase erhöht (Zer *et al.*, 1999; Ohad *et al.*, 2001).

1. Einleitung

1.2.4 *In vitro*-Rekonstitution und Modifizierung des LHCII

Neben der Gewinnung von nativen Komplexen aus Pflanzenmaterial, kann das Lhcb1-Apoprotein auch in *Echerichia coli* überexprimiert und anschließend mit Pigmenten rekonstituiert werden (Paulsen *et al.*, 1990). Eine Methode zur Faltung des Komplexes durch Veränderung der Detergensumgebung ist unter 2.8.1 ausführlich dargestellt. Die spektroskopischen Eigenschaften der *in vitro* rückgefalteten Komplexe sind nahezu identisch mit denen des nativen LHCII (Paulsen *et al.*, 1990). Auch in kristallographischen Untersuchungen der rekonstituierten LHCII-Trimere konnten keine Abweichungen von der nativen Form des Protein-Pigment-Komplexes gefunden werden (Hobe *et al.*, 1994).

Durch die Überexpression des Proteins in Bakterien eröffnen sich zahlreiche Möglichkeiten der Modifizierung der Aminosäuresequenz des LHCII auf DNA-Ebene. So ermöglichen die Einführung eines His₆-Motivs (Rogl *et al.*, 1998) oder eines Strep-Tags (Skerra und Schmidt, 2000) eine orientierte Bindung des Komplexes an funktionalisierte Oberflächen. Auch die Affinität des Proteins zu TiO₂-Oberflächen konnte durch das Einfügen von zusätzlichen positiven Ladungen in Form von Lys₆- (Wolf-Klein, 2001) und His₆-Motiven (Berens, 2005) erhöht werden. Durch den Austausch einzelner Aminosäuren konnten singuläre Cysteine an unterschiedlichen Positionen der Aminosäuresequenz eingesetzt werden, die eine gezielte kovalente Modifikation des Proteins an den jeweiligen Stellen ermöglichen (Huschenbett, 2001; Horn und Paulsen, 2004).

Auch in dieser Arbeit wurden Lhcb1-Klone verwendet, die ein singuläres Cystein zur kovalenten Kopplung von Farbstoffen und His₆- bzw. Lys₆-Motive zur orientierten Immobilisierung an Oberflächen trugen. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Mutanten ist in Abschnitt 2.1.3 zu finden.

1. Einleitung

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigte sich mit zwei unterschiedlichen Themenkomplexen, in deren Mittelpunkt die Funktion des LHCII als effiziente Lichtantenne und die Bedeutung des Komplexes für die Regulation der Lichtreaktion der Photosynthese standen.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Konformation des N-Terminus des LHCII, der wie erwähnt von entscheidender Bedeutung für die Oligomerisierung des Komplexes und die Regulation der Energieverteilung zwischen den Photosystemen ist (siehe 1.2.3), starr ist, oder dynamischen Veränderungen unterliegt. Als Marker für mögliche Konformationsänderungen sollte der Energietransfer zwischen den Chlen des LHCII und einem N-terminal gekoppelten Farbstoff dienen. Gemeinsam mit der AG Wrachtrup des 3. Physikalischen Instituts der Universität Stuttgart sollte eine Methode zur konfokalmikroskopischen Bestimmung des Energietransfers an einzelnen farbstoffmarkierten Komplexen in Lösung entwickelt werden. Die Effizienz des Energietransfers sollte anhand der Chl- und Farbstofffluoreszenz der einzelnen LHCII ermittelt werden, die durch den Fokus der Messapparatur diffundierten. Mögliche Unterschiede in der Konformation sollten durch statistische Auswertung der Energietransferwerte sichtbar gemacht werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand darin, zu untersuchen, in wieweit pflanzliche Lichtsammelkomplexe als Antenne in elektrochemischen Solarzellen eingesetzt werden können. Hierzu sollte versucht werden, den LHCII in eine Zelle des Grätzel-Typs zu integrieren. Voraussetzungen für die erfolgreiche Integration des Komplexes waren die Immobilisierung des LHCII und eines Akzeptorfarbstoffes auf der Halbleiteranode der Zelle, eine ausreichende Energieübertragung von den Chlen des Komplexes auf den Akzeptor, sowie eine Elektronenübertragung vom Farbstoff auf den Halbleiter unter Bedingungen, die nicht zur Denaturierung des Proteins führten. Schließlich sollte die strukturelle Stabilität und Photostabilität der immobilisierten Komplexe untersucht und, soweit möglich, durch Optimierung der Protein-Umgebungsparameter verbessert werden.

2. Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Autoklav

Dampfsterilisator Varioklav Typ 500 E (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim)

Digitalkamera

Camedia C-3040ZOOM (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg)

Digitalmultimeter

Autoranging Microvolt DMM (Keithley, Cleveland, Ohio, USA)

1906 Computing Multimeter (Thurlby Thandar Instruments Ltd., Huntingdon, U.K.)

Eismaschine

Ice Flaker gel-o-mat Typ GB 1555 A (ELGE Eismaschinen, Lippstadt)

Gelelektrophorese

Präparative PAGE

Von Biorad, Hercules, USA

Mini Prep Cell, Gelsäule mit 13cm Länge und 7mm Innendurchmesser

Stromquelle: Power PAC 3000

Peristaltikpumpe: Econo Pump, Model EP-1

Fraktionensammler: Fraction collector, Model 2128

Analytische PAGE

Midget-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Laufkammern Model SE 250 (Hoefer, Pharmacia Biotec, Inc. San Francisco, CA, USA)

Spannungsgeräte

Electrophoresis Power Supply EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

Electrophoresis Power Supply Typ E501 (Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen)

Microcomputer Electrophoresis Power Supply E714 (Consort NV, Turnhout, Belgien)

PowerPac 300 (Bio-Rad, München)

Schüttler

Phero-Shaker (Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen)

Geldokumentation

VersaDoc™ Imaging System Model 3000, Software: Quantity One (Bio-Rad, München)

ScanJet 4c (Hewlett Packard Instruments GmbH, Böblingen)

2. Material und Methoden

Geltrockner

Slab Gel Dryer 2003 (LKB Produkter AB, Bromma, Schweden)

Vakuum-Pumpe Model RV5 (Edwards High Vacuum International, Crawley, England)

Kältefalle Typ KF-2-60 (Bachofer GmbH, Reutlingen)

HPLC

Von Jasco Labor- und Daten Technik GmbH (Groß-Umstadt)

Gradientenmischer: LG-1580-04 Quaternay Gradient Unit

Pumpe: PU-1580 Intelligent Pump

Degasser: DG-1580-53, 3-Line Degasser

Detektor: MD-1515 UV/VIS-Intelligent Multiwavelength-Detector

Software: Jasco-PDA, BORWIN; Version 1.5

Säule: Chromolith Speed ROD, RP 18e-50-4,6, Merck, Darmstadt

Kulturschüttler

Certomat R/H (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen)

Magnetrührer

Oberflächen Temperatur Heizplatte IKAMAG[®] RCT (IKA[®]-Labortechnik, Staufen)

Kontaktthermometer MR 3001 K (Heidolph, Kelheim)

Mikrowelle

Typ HF 1610 (Siemens Elektrogeräte GmbH, München)

Mixer

Heavy Duty Blender Model 37BL28 (Waring Commercial, New Hartford, CT, USA)

Muffelofen

Muffelofen (ELE International, Hemel, U.K.)

PCR-Gerät

Primus 25 (MWG-Biotech, Ebersberg)

pH-Meter

inoLab pH Level 2 (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim)

Quantenmessgeräte

Quantum/Radiometer/Photometer Model LI-250 Light Meter (LI-COR[®], Lincoln, NE, USA)

Quantensensor (Eigenbau, Fachbereich Biologie, Mainz)

Reinstwasseranlage

OPTILAB-Standard, MemCab 1 (0.2 µm) (MembraPure, Bodenheim)

Rotationsvorrichtungen

Kulturenrad Typ Rotator (Bachofer GmbH, Reutlingen)

Typ RZR 50 (Heidolph, Kelheim)

2. Material und Methoden

Spektroskopie

Photometer

Spectrophotometer V-550 UV/VIS (Jasco Labor- und Daten Technik GmbH, Groß-Umstadt)

UV-VIS Scanning Spectrophotometer UV-2101PC (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Multi Purpose Spectrophotometer MPS 2000 (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Microtiterplatten-Photometer

SPECTRAMaxPLUS, Software : SOFTmaxPRO® (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)

UV-Mikrotiterplatten Flat Bottom (Greiner/VWR International GmbH, Darmstadt)

VIS-Mikrotiterplatten: Microtest Plate 96-Well Flat Bottom (Sarstedt, Nürnberg)

CD-Spektrometer

CD-Spektropolarimeter J-810-S (Jasco Labor- und Daten Technik GmbH, Groß-Umstadt)

Peltier-Element: Model CDF-426S/426L

Software: Spectra Manager, Version 1.6

Fluoreszenzspektrometer

Fluoromax-2 und Fluoromax-3 (Jobin Yvon, Spex, Grasbrunn)

Software: Datamax Software Version 2.24/Grams 32

Kühlung: Digital Thermostat Ministat Compatible Control (Huber Kältemaschinen Bau GmbH, Offenburg-Elgersweiler, Deutschland)

Refraktometer

Handrefraktometer (A. Krüss Optronic, Hamburg)

Sterilbank

Laminar Flow Typ HLF H (SLEE Semiconductor Technik GmbH, Mainz)

Ultraschallbad

Sonorex Super RK 102 H (Bandelin electronic, Berlin)

UV-Lampe

Typ HL-6-KM, 254/312 nm (Bachofer GmbH Reutlingen)

Vakuum-Trocknungsanlage

Vacuum Concentrator (Bachofer GmbH, Reutlingen)

Vakuum-Pumpe Model RV5 (Edwards High Vacuum International, Crawley, England)

Kältefalle Typ KF-2-60 (Bachofer GmbH, Reutlingen)

Vortex

Vortex Genie 2™ (Bachofer GmbH, Reutlingen)

MS2 Minishaker (IKA®-Labortechnik, Staufen)

REAX 2000 (Heidolph, Kelheim)

2. Material und Methoden

Waagen

Analytik A 200 S (Sartorius GmbH, Göttingen)
BP 2100 S (Sartorius GmbH, Göttingen)
Typ L 610 (Sartorius GmbH, Göttingen)
Model GT 2100 (OHAUS® Corp., Florham Park, NJ, USA)

Wärmeschränke

Typ B 50 (Mettler, Schwabach)
Typ BE 400 (Mettler, Schwabach)
Typ U 30 (Mettler, Schwabach)

Wasserkocher

HB 4basic (IKA®-Labortechnik, Staufen)

Zellpresse

French Pressure Cell Press, SLM Aminco (SLM Instruments Inc., Rochester, NY, USA)

Zentrifugen

Tischzentrifuge

Mikro 12-24, Rotor: 2029 (Hettich, Tuttlingen)

Kühlzentrifugen

J2-HS, Rotoren: JLA-10.500, JA-20 (Beckman Instruments GmbH, München)
Mikro 22R, Rotoren: 1015, 1195 (Hettich, Tuttlingen)
Universal 30 RF, Rotoren: 1412, 1414 (Hettich, Tuttlingen)

Ultrazentrifugen

Ultracentrifuge Optima™ LE-80K und Optima™ XL-100K (Beckman, München)
Centrikon T-1065 und Centrikon T-2060 (Kontron Instruments, Neufahrn)
Rotoren: SW 60 TI, SW 41 TI, Centrifuge Tubes Polyallomer (Beckman, München)

2. Material und Methoden

2.1.2 Chemikalien

2.1.2.1 Gase

Zum Trocknen von Pigmenten und Farbstoffen, sowie als Oxidationsschutz während der Aufnahme von CD-Spektren wurde Stickstoff 5.0 von Messer-Griesheim (Darmstadt) verwendet.

2.1.2.2 Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden von Merck (Darmstadt) und Riedel-de Haën (Seelze) bezogen.

Aceton wurde zur Entfernung von Verunreinigungen vor der Verwendung bei Normaldruck destilliert. Nach Gebrauch wurde das Aceton zweimal redestilliert und konnte anschließend erneut verwendet werden.

Diethylether wurde zur Entfernung von Peroxiden vor der Verwendung zwei Stunden lang unter Rückfluss mit KOH gekocht und anschließend destilliert.

2.1.2.3 Farbstoffe

Eine ausführliche Auflistung der verwendeten Farbstoffe mit Hersteller und spektroskopischen Eigenschaften ist in Anhang dieser Arbeit zu finden.

2.1.2.4 Weitere Chemikalien

Soweit im Text keine anderen Angaben gemacht wurden, wurden alle Chemikalien in p. A.-Qualität von folgenden Herstellern bezogen:

- Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
- BIOMOL Feinchemikalien GmbH (Hamburg)
- Boehringer (Mannheim)
- GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg)
- Macherey-Nagel (Düren)
- Merck (Darmstadt)
- MobiTec (Göttingen)
- New England BioLabs Inc. (Frankfurt)
- PeQLab Biotechnologie (Erlangen)
- Riedel-de Haën Laborchemikalien GmbH + Co. KG (Seelze)
- Carl Roth GmbH + Co. (Karlsruhe)
- Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim).
- VWR International GmbH (Frankfurt)

2. Material und Methoden

2.1.3 Proteine

Lhcb1-Klone		
Klon	Charakterisierung	Herstellung
D7f.3	Sequenz entspricht dem murenen Lhcb1-Wildtyp-Protein	Dilly-Hartwig (1998)
C3.2h	Lhcb1-Mutante mit His ₆ -Motif am C-Terminus	Kosemund (1999)
S3Ch	Lhcb1-Mutante mit singularem Cystein an Position 3 nahe des N-Terminus und His ₆ -Motiv am C-Terminus	Huschenbett (2001)
Lys6	Lhcb1-Mutante mit N-terminalem Lysin ₆ -Motif und singularem Cystein an Position 14 nahe des N-Terminus	Wolf-Klein (2001)
S106Ch	Lhcb1-Mutante mit singularem Cystein an Position 106 (luminale Schleife) und His ₆ -Motif nahe des N-Terminus;	Storf (2001)
V229C	Lhcb1-Mutante mit singularem Cystein an Position 229 nahe des C-Terminus	Huschenbett (2001)
S106C,V229C	Lhcb1-Mutante mit Cysteinen an den Positionen 106 (luminale Schleife) und 229 (nahe des C-Terminus);	Diese Arbeit; siehe 2.5

Andere Proteine		
Protein	Charakterisierung	Herstellung/Bezug
Natives LHCII	Native LHCII-Trimere aus <i>Pisum sativum</i>	Diese Arbeit; siehe 2.4)
WSCP-his	WSCP mit N-terminalem His ₆ -Motif	Schmidt (2003)
BSA	Standard Grade, lyophilisiert	Serva (Heidelberg)

2. Material und Methoden

2.2 Anzucht von Pflanzen

In dieser Arbeit wurden sowohl junge Erbsenpflanzen (*Pisum sativum*), als auch etiolierte Roggenkeimlinge (*Sécale céréale*) angezogen. Aus den Erbsen wurde nativer LHCI (siehe 2.4.1) und Pigmenttotalextrakt (siehe 2.3.1) isoliert. Die Roggenkeimlinge wurden zur Herstellung von Chlorophyllasepulver (siehe 2.3.4) verwendet, das die Hydrolyse von Chl zu Chlid katalysierte (siehe 2.4.5).

2.2.1 Erbsenpflanzen

Die Erbsenpflanzen wurden in Pflanzschalen auf Vermikulit (Dämmstoff-Fabrik Klein GmbH, Zellertal) angezogen. Pro Pflanzschale wurden zwei Hände voll Erbsensaatgut (Raiffeisen, Worms) benötigt. Das Saatgut wurde über Nacht unter Belüftung mit Druckluft gequollen, auf dem feuchten Vermikulit verteilt und mit einer dünnen Vermikulitschicht bedeckt. Die Erbsen wurden direkt nach der Aussaat, später alle zwei bis drei Tage mit Leitungswasser gegossen. Nach zehn bis zwölf Tagen unter Dauerbeleuchtung (Leuchtstoffröhren: Cool White L 36 W / 20, Osram GmbH, München) bei einer Temperatur von 20°C bis 24°C wurden die Pflanzen geerntet und direkt weiterverarbeitet.

2.2.2 Etiolierte Roggenkeimlinge

Die Roggensamen (Raiffeisen, Worms) wurden eine Stunde lang unter Belüftung mit Druckluft gequollen und dicht auf feuchtem Vermikulit (Dämmstoff-Fabrik Klein GmbH, Zellertal) ausgesät. Die Anzucht der Keimlinge erfolgte im Dunkeln bei ca. 22°C. Nach sieben Tagen wurden die etiolierten Keimlinge unter schwachem Grünlicht geerntet, portioniert, in Aluminiumfolie verpackt und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Keimlinge konnte bis zu zwei Monaten bei -20°C, über längere Zeiträume bei -80°C erfolgen.

2.3 Pigmente und Pigmentderivate

Für die Rekonstitution von Lhcb1 (siehe 2.8.1) wurde im Allgemeinen Pigmenttotalextrakt aus Erbse (siehe 2.3.1) verwendet. Chlid a wurde aus reinem Chl a hergestellt, das von R. Horn zur Verfügung gestellt wurde.

2. Material und Methoden

2.3.1 Isolierung von Pigmenttotalextrakt aus Erbse

Zur Isolierung von Pigmenten aus Erbsen mussten die Erbsen zunächst aufgeschlossen werden. Hierfür wurde Erbsen-Blattmaterial (siehe 2.2.1) mit 1 l 25 mM Tris(HCl), 1 mM DTT, 330 mM Sorbitol (4°C) pro Pflanzschale in einem vorgekühlten Mixer zerkleinert (10 Intervalle à 10 sec., Stufe Medium, Heavy Duty Blender Model 37BL28, Waring Commercial, New Hartford, CT, USA). Die Erbsenmasse wurde durch 3 Lagen Baumwollgaze filtriert und für 5 min bei 8000 g und 4°C (10000 upm, JLA 10500 Rotor, Beckman, München) abzentrifugiert.

Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit 400 ml Aceton resuspendiert. Die Suspension wurde ein weiteres Mal für 5 min bei 8000 g zentrifugiert (10000 upm, JLA 10500 Rotor, Beckman, München), worauf sich die Pigmente im Überstand befanden.

Der Überstand wurde in einen Scheidetrichter überführt und mit Diethylether überschichtet. Durch sanftes schütteln wurde der Pigmentextrakt in die Etherphase überführt. Die pigmenthaltige Etherphase wurde mehrmals mit H₂O_{dest} gewaschen und im Rotationsverdampfer (VV2000, Heidolph Elektro, Kehlheim) eingetrocknet.

Schließlich wurde der Totalextrakt in Aceton für Pigmente aufgenommen, quantifiziert (siehe 2.3.2) und aliquotiert. Die Pigmentaliquots wurden unter Stickstoff getrocknet und bei -20°C gelagert. Die Pigmentzusammensetzung wurde mittels analytischer HPLC bestimmt (siehe 2.3.3).

2.3.2 Bestimmung der Chl-Konzentration

Die Chl-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (Porra *et al.*, 1989). Für die Messung wurde die pigmenthaltige Probe in 80 % Aceton aufgenommen. Eventuell enthaltene Proteine wurden durch Zentrifugation (13000 upm, Tischzentrifuge) entfernt.

Anschließend wurde bei 646,6 nm und 663,6 nm die Absorption der Pigmente gemessen. Aus den Werten wurde nach folgenden Gleichungen die Chl-Konzentration berechnet:

$$\begin{aligned}\text{Chl } a \text{ [mg/ml]} &= 12,25 \cdot A_{663,6} - 2,55 \cdot A_{646,6} \\ \text{Chl } b \text{ [mg/ml]} &= 20,31 \cdot A_{646,6} - 4,91 \cdot A_{663,6} \\ \text{Chl}_{\text{gesamt}} &= \text{Chl } a + \text{Chl } b\end{aligned}\tag{I}$$

2.3.3 Bestimmung der Pigmentzusammensetzung über analytische HPLC

Die Zusammensetzung des Pigmenttotalextraktes wurde durch Auftrennung mittels analytischer HPLC (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt) bestimmt. Auch die Derivatisierungszustände einzelner Pigmente konnten mit dieser Methode unterschieden werden.

Zur Auftrennung wurde eine Reversed-Phase-Säule (Chromolith SpeedROD RP-18e 50x4,6m) und ein linearer Wasser-Aceton-Gradient verwendet. Der Pigmentextrakt wurde in 70 % Aceton auf die HPLC aufgetragen. Nach der Auftrennung konnten die einzelnen Pigmente mittels bestehender Standards für Retentionszeit und Extinktion identifiziert und quantifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.3.4 Herstellung von Chlorophyllasepulver aus Roggenkeimlingen

Die Präparation des Chlorophyllasepulvers erfolgte nach N. Shalygo (persönliche Mitteilung). Für die Hydrolyse von 10 mg Chl zu Chlid wurden ca. 200 Roggensprossen benötigt.

Die Roggenkeimlinge wurden unter flüssigem Stickstoff mit $\frac{1}{2}$ Teelöffel Seesand und etwas Aceton (100 %, für Pigmente) zu einem feinen Brei zermörsert. Anschließend wurde der Brei in eine vorgekühlte Porzellanfritte mit Filterpapier transferiert. Die Pigmente wurden durch vier- bis fünfmaliges Spülen mit Aceton ausgewaschen, wobei die Flüssigkeit konstant über eine Saugflasche mit angeschlossener Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurde. Im Anschluss an die Waschprozedur wurde das Roggenpulver, das nun eine grau-braune Färbung aufwies, in eine Petrischale überführt. Restliches Aceton wurde für 15 min unter einem Abzug verdampft.

Das Chlorophyllasepulver wurde direkt nach der Herstellung zur Hydrolyse von Chl eingesetzt (siehe 2.3.5).

2.3.5 Hydrolyse von Chl a zu Chlid a

Chl a wurde durch Inkubation mit Chlorophyllase-haltigem Roggenpulver zu Chlid a hydrolysiert. Hierfür wurden mindestens drei Teelöffel Chlorophyllasepulver (siehe 2.3.4) in 50 ml 50 mM Tris (HCl) pH 8,0 suspendiert. Nach der Zugabe von 10 mg Chl a in 50 ml 100 % Aceton wurde der Hydrolyseansatz für 90 min bei 30°C bis 35°C unter konstantem Schütteln im Dunkeln inkubiert.

Zur Überprüfung des Hydrolyseergebnisses wurden 100 μ l des Ansatzes zu 100 μ l eines 9:1-Gemisches aus Aceton und 0,1 M NH_4OH gegeben. Nach Versetzen der Probe mit 100 μ l Hexan sammelte sich das nicht umgesetzte Chl a in der Hexanphase (oben), während das Chlid a in der wässrigen Acetonphase (unten) verblieb. Waren augenscheinlich weniger als 50 % des Chls umgesetzt, wurde der Hydrolyseansatz weiter inkubiert.

Ansonsten wurde der Reaktionsansatz zentrifugiert, um das Chlorophyllasepulver zu entfernen und der acetonische Überstand in einen Scheidetrichter überführt. Das nicht umgesetzte Chl wurde durch fünf- bis achtmaliges Waschen der Acetonphase mit je 100 ml Hexan entfernt. Anschließend wurde die Acetonphase mit etwas gesättigter KH_2PO_4^- -Lösung auf einen pH-Wert zwischen 5,8 und 5,9 eingestellt und mit Diethylether überschichtet. Durch vorsichtiges Schütteln wurde das Chlid a in die Etherphase überführt. Nach dem Ablassen der Acetonphase wurde die Etherphase mehrmals mit KH_2PO_4^- -haltigem Wasser pH 5,8 bis 5,9 gewaschen und im Rotationsverdampfer getrocknet. Die Ausbeute der Umsetzung konnte analog zur Quantifizierung von Chl bestimmt werden, da Chlid und Chl in der Absorption nicht unterscheiden (siehe 2.3.2).

2.4 Native LHCII-Monomere und Trimere

Nativer LHCII wurde in dieser Arbeit benötigt, um die Adsorption der Komplexe an Halbleiteroberflächen (siehe 2.12.2) und den Energietransfer von den Chlen des LHCII auf einen Akzeptorfarbstoff (siehe 2.9.4) zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.4.1 Isolierung von nativen LHCII-Trimeren aus Erbse

Die Aufreinigung von nativen LHCII-Trimeren aus Erbse erfolgte nach Nußberger *et al.* (1993). Um die Komplexe während der Aufreinigung zu schonen, wurden ausschließlich auf 4°C gekühlte Lösungen verwendet. Die Arbeiten wurden im abgedunkelten Raum durchgeführt. Zwischen den Arbeitsschritten wurden die Proben auf Eis gelagert.

Zunächst wurden die Thylakoide aus den Pflanzen extrahiert. Hierfür wurden die frisch geernteten Erbsenpflanzen (siehe 2.2.1) mit 1 l 50 mM Tricine (NaOH) pH 7,8, 0,4 M Sorbitol pro Anzuchtschale in einem Mixer (10 Intervalle à 10 sec., Stufe Medium, Heavy Duty Blender Model 37BL28, Waring Commercial, New Hartford, CT, USA) homogenisiert. Das Homogenat wurde durch 3 Lagen Baumwollgaze filtriert und für 5 min bei 5000 g und 4°C (6500 upm, JLA 10500 Rotor, Beckman, München) abzentrifugiert. Da sich die Thylakoide im Pellet befanden wurde der Überstand vorsichtig dekantiert.

Das Pellet wurde mit etwas 50 mM Tricine(NaOH) pH 7,8, 5 mM EDTA, 50 mM Sorbitol resuspendiert und erneut bei 10000 g zentrifugiert (12000 upm, JA 20 Rotor, Beckmann, München). Anschließend wurden die Thylakoide mit etwas H₂O_{dest} resuspendiert. Die Chl-Konzentration wurde bestimmt (siehe 2.3.2) und durch Verdünnen des Ansatzes mit H₂O_{dest} auf 0,8 mg/ml eingestellt. Für die spätere Kontrolle der Aufreinigung wurden 100 µl der Thylakoidsuspension (Aliquot A1) abgenommen und bei -20°C eingefroren.

Die Thylakoide wurden mit 5 % Triton X-100 auf eine Tritonkonzentration von 0,7 % (w/v) eingestellt und durch 30minütiges Rühren (Raumtemperatur, dunkel) solubilisiert. Danach wurde der Ansatz für 40 min bei 30000 g und 4°C zentrifugiert (19500 upm, JA 20 Rotor, Beckmann, München).

Der Roh-LHCII befand sich nun im Überstand, wurde in ein frisches Gefäß überführt und mit 1 M KCl und 1M MgCl₂ auf 100 mM KCl und 20 mM MgCl₂ eingestellt. Unter sanftem Rühren (Raumtemperatur, dunkel) über mindestens 10 min wurde der LHCII gefällt. In offenen Zentrifugenröhrchen (Beckmann, München) wurden je 30 ml 0,5 M Saccharose vorgelegt. Auf die Saccharosekissen wurden je 9 ml LHCII-Suspension aufgetragen. Bei 10000 g und 4°C wurde der LHCII durch die Saccharosekissen pelletiert (12000 upm, JA 20 Rotor, Beckmann, München).

Im Folgenden wurden bereits beschriebene Arbeitsschritte der Aufreinigung in leicht veränderter Weise wiederholt.

Die Pellets wurden mit wenig 50 mM Tricine(NaOH) pH 7,8, 100 mM Sorbitol resuspendiert. Die Chl-Konzentration wurde bestimmt und auf 0,8 mg/ml eingestellt und ein Aliquot (A2) wurde für die spätere Analyse abgenommen. Der LHCII wurde mit 5 % Triton X-100 auf ein Detergens zu Chl-Verhältnis von 10:1 eingestellt, unter rühren resuspendiert, und mit KCl und MgCl₂ erneut gefällt. Im Anschluss an die Fällung wurde die Suspension für 10 min bei 30000 g und 4°C über 0,5 M Saccharosekissen zentrifugiert (19500 upm, JA 20 Rotor, Beckmann, München).

Das Pellet wurde in wenig 50 mM Tricine(NaOH) pH 7,8 aufgenommen. Nochmals wurde die Chl-Konzentration bestimmt und auf 0,8 mg/ml eingestellt und ein Aliquot (A3) gezogen. Das Chl *a* zu Chl *b*-Verhältnis sollte an dieser Stelle bei etwa 1,3:1 liegen. War das Verhältnis deutlich höher, so musste der LHCII erneut mit Triton X-100 resuspendiert, und die letzten Arbeitsschritte wiederholt werden.

2. Material und Methoden

Lag das Chl *a* zu Chl *b*-Verhältnis im erwarteten Bereich, so wurde das restliche Detergens aus der LHCII-Suspension entfernt. Hierfür wurde der LHCII ein letztes Mal, wie beschrieben, mit KCl und MgCl₂ gefällt und bei 10000 g und 4°C für 10 min über 0,5 M Saccharosekissen zentrifugiert (12000 upm, JA 20 Rotor, Beckmann, München).

Der LHCII wurde mit H₂O_{dest} resuspendiert. Nach der Bestimmung der Chl-Konzentration wurde der LHCII aliquotiert und abzentrifugiert. Schließlich wurden die Überstände abgenommen und die LHCII-Pellets bei -20°C gelagert.

Eines der Aliquots (A4) wurde mit den Aliquots A1 bis A3 auf ein schwach denaturierendes Gel (siehe 2.4.3.2) aufgetragen, um die Aufreinigung zu überprüfen.

2.4.2 Monomerisierung von nativen LHCII-Trimeren

Native LHCII-Trimere wurden nach Nußberger *et al.* (1993) durch Inkubation in 1 % OG monomerisiert. Hierfür wurde ein LHCII-Aliquot (siehe 2.4.1), das einer Chl-Menge von 200 µg entsprach, in 100 µl 1 % OG solubilisiert und für 2 – 3 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Trimere, Monomere und freie Pigmente konnten im Anschluss an die Inkubation durch Saccharose-Dichtegradientenultrazentrifugation (siehe 2.4.3.2) getrennt werden. Die Monomerisierung wurde durch Aufnahme von CD-Spektren (siehe 2.9.2), die Intaktheit der Komplexe durch Fluoreszenzspektren (siehe 2.9.3) überprüft.

2.4.3 Aufreinigung von LHCII-Monomeren und Trimeren

Nach der Monomerisierung von nativem LHCII (siehe 2.4.2) oder der Rekonstitution von rekombinantem Lhcb1 (siehe 2.8.1) mussten die Komplexe weiter aufgereinigt werden.

Im analytischen Maßstab diente die schwach denaturierende PAGE zur Auftrennung von Trimeren, Monomeren und freien Pigmenten. Zur präparativen Aufreinigung wurde die Saccharose-Dichtegradientenultrazentrifugation eingesetzt.

2.4.3.1 Schwach denaturierende PAGE

Bei der schwach denaturierenden PAGE handelte es sich um eine Variante der SDS-PAGE nach Laemmli (1970) (siehe auch 2.6.4). Wie bei der SDS-PAGE wurden die Proteine zunächst in einem Sammelgel fokussiert und anschließend über ein Trenngel aufgetrennt. Im Gegensatz zur Methode nach Laemmli erfolgte die gerichtete Diffusion im elektrischen Feld jedoch ausschließlich aufgrund der Eigenladung der Proteine.

2. Material und Methoden

Für die Auftrennung von LHCII-Monomeren und Trimeren wurde ein 10 %iges Acrylamidgel verwendet, das sich wie folgt zusammensetzt:

Sammelgel:

4,5 % Polyacrylamid
(Acrylamid/Bisacrylamid = 30/1)
10 % Glycerin
130 mM Tris(HCl) pH 6,8
0,05 % APS
0,05 % TEMED

Trenngel:

10 % Polyacrylamid
(Acrylamid/Bisacrylamid = 30/1)
10 % Glycerin
400 mM Tris(HCl) pH 8,8
0,07 % APS
0,05 % TEMED

Die Gele wurden in einer vertikalen Gießkammer in Chargen à 10 Stk. gegossen. Das Trenngel war 5 – 5,5 cm, das Sammelgel 1,5 – 2 cm hoch. Als Laufpuffer diente 12 mM Tris, 48 mM Glycin, 0,15 % Deriphat.

Im Allgemeinen wurde in jede Geltasche eine LHCII-Menge eingesetzt, die 10 µg Chlorophyll entsprach. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde jede Probe durch Zugabe von 1/10 Volumen 80 % Glycerin beschwert.

Um ein Denaturieren der Komplexe weitgehend zu verhindern, wurde der Lauf bei 4°C (Wasserkühlung durchgeführt). Während des Einlaufens der Proteine in das Gel wurde eine Spannung von 40 V angelegt, danach wurde die Spannung auf 100 V erhöht.

2.4.3.2 Saccharose-Dichtegradientenultrazentrifugation

Für die Auftrennung von LHCII mittels Dichtegradientenultrazentrifugation wurden kontinuierliche Saccharose-Gradienten verwendet. Sollten ausschließlich Monomere aufgetrennt werden, so enthielt die Gradientenlösung 0,4 M Saccharose, für die Trennung von Trimeren und Monomeren wurde 0,5 M Saccharose eingesetzt.

LHCII-Ansätze zur Belegung von Halbleiterelektroden wurden bei pH 6 aufgetrennt. Ansonsten wurde ein pH-Wert von 7,8 eingestellt. Insgesamt setzte sich die Gradientenlösung wie folgt zusammen:

5 mM NaP (pH 6,0 oder pH 7,8)
0,1 % LM
0,4 M bzw. 0,5 M Saccharose

Für die Zentrifugation wurden SW60-Polycarbonat-Röhrchen (Beckmann, München) verwendet, in die jeweils 4 ml Gradientenlösung gefüllt wurden. Zur Ausbildung eines linearen Saccharose-Gradienten wurden die Röhrchen zweimal eingefroren und aufgetaut.

Bei Standardaufreinigungen wurde auf jeden Gradienten eine LHCII-Menge aufgetragen, die 100 µg Chlorophyll entsprach. Die Zentrifugation wurde über 16 h bei 54000 upm und 4°C durchgeführt (SW60Ti-Rotor, Beckmann, München). Nach der Zentrifugation konnten die komplexhaltigen Gradientenbanden über eine Kanüle abgesaugt werden.

2. Material und Methoden

2.4.4 Entfernung von Saccharose aus dem LHCII-Ansatz

Versuche zur Adsorption von LHCII an Farbstoff-TiO₂-Elektroden, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigten, dass sich die in der LHCII-Auftragslösung enthaltene Saccharose negativ auf die Adsorption des Farbstoffes an den Halbleiter auswirkte (siehe 3.2.9.2). Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen die Saccharose nach der Dichtegradientenzentrifugation aus der LHCII-Lösung entfernt. Die Entfernung der Saccharose erfolgte durch Dialyse oder Gelfiltration.

2.4.4.1 Dialyse

Zur Dialyse wurden 4 – 5 ml LHCII in Dichtegradientenlösung (siehe 2.4.3.2) in einen autoklavierten Dialyseschlauch (Filtertyp: weiß, 0.025µm, Durchmesser: 47 mm, Millipore, Eschborn) gegeben. Die LHCII-Probe wurde zweimal für je 24 h bei 4°C gegen 1 l 5 mM NaP pH 6,0 dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Saccharosekonzentration in einem Refraktometer (A. Krüss Optronic, Hamburg) bestimmt und die Intaktheit der Komplexe fluorenszenzspektroskopisch überprüft (siehe 2.9.3).

2.4.4.2 Gelfiltration

Im Vergleich zur Dialyse erwies sich die Gelfiltration als schonendere Methode zur Entfernung von Saccharose aus der LHCII-Auftragslösung.

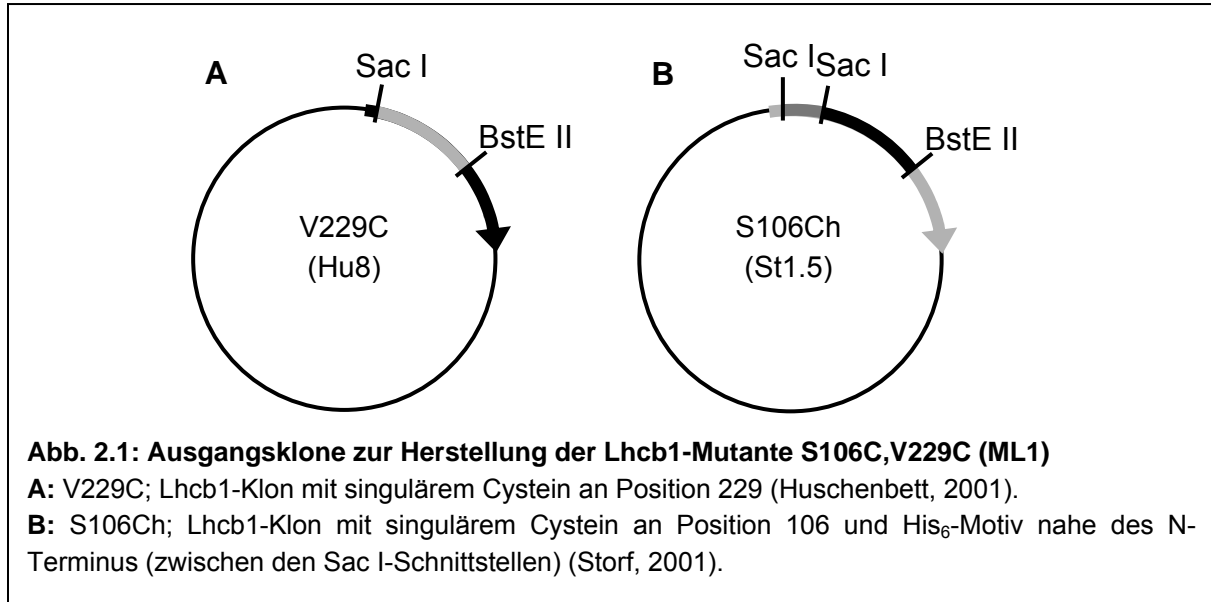
Die Gelfiltration wurde bei 4°C mit Sephadex® G-25 Fine (Ausschluss 5 kDa, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) Säulen (Poly-Prep® Chromatography Columns, Bio-Rad, München) durchgeführt. Das Säulenvolumen betrug jeweils 6 ml. Als Puffer für die Gelfiltration wurde 5 mM NaP pH 6,0, 0,05 % LM verwendet. Vor dem Auftragen des LHCII wurden die Säulen mit 2 Säulenvolumen des Puffers equilibriert. Auf jede Säule wurden 2 – 2,5 ml LHCII in Dichtegradientenlösung (siehe 2.4.3.2) aufgetragen und mit weiteren 5 ml des Puffers eluiert.

Nach der Gelfiltration wurde die Saccharosekonzentration refraktometrisch bestimmt und die Intaktheit der Komplexe durch Fluoreszenzspektren überprüft (siehe 2.9.3). Das Säulenmaterial wurde durch spülen mit je 2 Säulenvolumen des Puffers und H₂O_{bidest} und anschließendes Autoklavieren in H₂O_{bidest} regeneriert.

2. Material und Methoden

2.5 Klonierung der Lhcb1-Mutante S106C,V229C

Die Klonierung der Lhcb1-Mutante S106C,V229C (ML1) erfolgte ausgehend von den Lhcb1-Klonen V229C (Huschenbett, 2001) und S106C (Storf, 2001). Beide Klone lagen im pDS12-RBSII,Sph1-Vektor vor (Abb. 2.1).



Beide Plasmide wurden mit Sac I und BstE II restringiert (siehe 2.5.1). Nach der Aufreinigung der DNA (siehe 2.5.2) wurde das 3857 bp große Produkt der V229C-Restriktion (Vektor) mit dem 388 bp großen Produkt der S106C-Restriktion (Insert) ligiert (siehe 2.5.3).

Mit dem so hergestellten Plasmid wurden kompetente Zellen des *Escherichia coli*- (*E. coli*-) Stammes JM101 transformiert (siehe 2.5.4). Im Anschluss an die Transformation konnten Plasmide aus den Zelle isoliert (siehe 2.5.5) und der Erfolg der Klonierung durch Sequenzierung des Inserts (siehe 2.5.7) überprüft werden.

2.5.1 Restriktion

Die Restriktion der Plasmide erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden beide Plasmide durch Verdau mit Sac I linearisiert. Die Sac I-Restriktionsansätze hatten ein Gesamtvolumen von je 30 µl und setzten sich wie folgt zusammen:

DNA	5µg	
NEB4-Puffer	1x	3 µl 10fach
BSA	100 µg/ml	3 µl 1 mg/ml
Sac I	20 U	1 µl 20 U/µl Stamm
H ₂ O _{bidest}		ad 30 µl

Die Restriktion erfolgte für 2 h bei 37°C und wurde anschließend durch einen Hitzeschock von 20 min bei 65°C abgestoppt. Die Linearisierung der Plasmide wurde durch eine analytische Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 2.5.2).

2. Material und Methoden

Für die Restriktion mit BstE II wurden zu dem Ansätzen aus der ersten Restriktion jeweils 1,5 µl BstE II (20 U/µl) gegeben. Der Restriktionsansatz wurde 2 h lang bei 60°C inkubiert. Im Anschluss an die Restriktionen wurden die Produkte über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (siehe 2.5.2).

2.5.2 Aufreinigung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese basiert auf der gerichteten Diffusion negativ geladener DNA in einem elektrischen Feld. Nach der Linearisierung der DNA, z.B. durch Restriktion eines Plasmids, erfolgt die Auftrennung ausschließlich nach der Größe der DNA-Moleküle.

In dieser Arbeit wurden sowohl analytische Agarose-Gelelektrophoresen, zur Überprüfung der Restriktionen, als auch präparative Elektrophoresen, zur Aufreinigung der Restriktionsprodukte, durchgeführt. Analytische und präparative Elektrophorese unterschieden sich dabei ausschließlich durch die aufgetragene DNA-Menge. In die analytische Elektrophorese wurden 200 ng bis 1 µg DNA pro Tasche eingesetzt, bei der präparativen Elektrophorese wurde stets 1 µg DNA pro Tasche aufgetragen.

Für alle im Rahmen der Klonierung von S106C,V229C durchgeführten Elektrophoresen wurden 1 %ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung von 10 Gelen wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer (0,089 M Tris, 0,089 M Borsäure, 0,05 M EDTA) aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C wurde die Agarose gleichmäßig auf 10 Glasplatten verteilt, die sich in einer mit Kämmen versehenen Gießkammer befanden. Die fertigen Agarosegele wurden nach dem Auspolymerisieren bei 4°C gelagert.

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/10 Volumen 10x Minigel-Auftragspuffer (50 mM Tris(HCl) pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylencyanol, 50 % Glycerin) versetzt. Der Lauf fand in einer Kammer mit 1x TBE-Puffer und 0,3 mg/ml Ethidiumbromid statt. Während des Einlaufens der Proben in das Gel wurde eine Spannung von 150 V angelegt, danach wurde die Spannung auf 200 V erhöht.

Aufgrund der Fluoreszenz des Ethidiumbromids konnten die DNA-Banden in den analytischen Gelen mit einem VersaDoc™ Imaging System (Model 3000, Filter 520LP UV Trans, Bio-Rad, München) visualisiert und quantifiziert werden (QuantityOne Software, Bio-Rad, München). Die DNA-Banden in präparativen Gelen wurden unter einer UV-Lampe (Typ HL-6-KM, 254/312 nm, Bachofer GmbH, Reutlingen) sichtbar gemacht, markiert und ausgeschnitten.

Aus den ausgeschnittenen Gelstücken wurde die DNA mit Hilfe des NucleoTrap® Extraction Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers isoliert und konnte anschließend in die Ligation eingesetzt werden.

2. Material und Methoden

2.5.3 Ligation

Nach der Aufreinigung aus den präparativen Agarosegelen wurde das Insert aus dem S106C-Klon mit Hilfe der T4-DNA-Ligase in den Vektor des V229C-Klons ligiert.

Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:2 in die Ligation eingesetzt, was einer Menge von 83 ng Vektor und 17ng Insert entsprach. Der gesamte Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

83 ng	V229C-Vektor
17 ng	S106C-Insert
1 µl	10x T4-DNA-Ligasepuffer (enthält 10 mM ATP, NEB, Frankfurt)
Ad. 10 µl	H ₂ O _{bidest}
0,8 µl	T4-DNA-Ligase (400 U/µl, NEB, Frankfurt)

Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Insert verwendet. Ligationsansatz und Kontrolle wurden für 4 h bei 14°C in einem Wasserbad inkubiert und direkt im Anschluss in die Transformation eingesetzt.

2.5.4 Transformation

Für die Transformation wurden *E. coli*-Zellen des Stammes JM101, Genotyp [F'traD36 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 / Δ(lac-proAB) glnV thi] (NEB, Frankfurt), verwendet, die bereits transformationskompetent (Inkubation mit CaCl₂ auf Eis) waren.

Vor der Transformation wurden 50 µl kompetente Zellen für 15 min auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden 5 µl des Ligationsansatzes, bzw. der Kontrolle, (siehe 2.5.3) gegeben. Anschließend wurden Zellen und DNA durch vorsichtiges anschnippen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert, wodurch die Aufnahme der Plasmide durch die Zellen ermöglicht wurde. Um die Bakterienmembranen zu schließen wurde der Ansatz für 5 min auf Raumtemperatur erwärmt.

Nach der Transformation wurde zu den Zellen je 250 µl steriles LB-Medium (1 % [w/v] Trypton, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 1 % [w/v] NaCl, pH 7,5) gegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C im Drehrad inkubiert. Schließlich wurden je 50 µl bzw. 100 µl des Transformationsansatzes und der Kontrolle auf LB-Amp-Platten (1 % [w/v] Trypton, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 1 % [w/v] NaCl, pH 7,5, 1,5 % [w/v] Agar, 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Am nächsten Tag konnten von den Platten einzelne Kolonien gepickt, und der Erfolg der Transformation durch Überexpression des Genproduktes (siehe 2.6.1) überprüft werden. Außerdem wurden Plasmide aus den transformierten Zellen isoliert (siehe 2.5.5) und die Sequenz der Mutante analysiert (siehe 2.5.7).

2. Material und Methoden

2.5.5 Plasmidpräparation

Für die Isolierung der DNA wurden 100 ml Bakterien-Flüssigkultur verwendet. Dafür wurde eine transformierte Kolonie gepickt, in 100 ml LB-Amp-Medium (1 % [w/v] Trypton, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 1 % [w/v] NaCl, pH 7,5, 100 µg/ml Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37°C im Drehrad inkubiert.

Die Plasmidpräparation wurde mit dem Extraktionskit Nucleobond® AX 100 (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch Lyse der Bakterien mit NaOH und SDS wurde die DNA freigesetzt. Danach wurde das Lysat angesäuert, um Zellreste und chromosomale DNA zu präzipitieren. Die verbliebenen Plasmide wurden weiter über Anionen-Austauschersäulen aufgereinigt und mit Isopropanol gefällt. Schließlich wurde das DNA-Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und in H₂O_{bidest} aufgenommen.

Die so gewonnenen Plasmide konnten in die Sequenzierung (siehe 2.5.7) eingesetzt oder zur langfristigen Lagerung Lyophilisiert werden.

2.5.6 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (Modus: PreRead, PathCheck, SPECTRAMaxPLUS, Software : SOFTmaxPRO®, Molecular Devices, Sunnyvale, California) bestimmt. Für eine Dreifachbestimmung wurden 3x 150 µl DNA in H₂O_{bidest} in einer Mikrotiterplatte (Greiner/VWR International GmbH, Darmstadt) vermessen.

Die DNA-Konzentration wurde von der Software ausgehend von einer Standardkonzentration von 38,1 µg/ml (in H₂O) bei OD_{260 nm} = 1 ermittelt. Der Aufreinigungsgrad der DNA war ausreichend, wenn das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ ≥ 1,8 war.

2.5.7 Sequenzierung

Nach der Klonierung musste die Sequenz der Lhcb1-Mutante durch Sequenzierung der DNA überprüft werden. Die Sequenzierung wurde nach Sanger (1975) mittels PCR durchgeführt. Ausgehend von einem Primer wurden von einer *Taq*-DNA-Polymerase Kopien der DNA erzeugt. Neben *deoxy*-Nukleotiden (*d*NTP) wurden *dideoxy*-Nukleotide (*dd*NTP) in die Reaktion eingesetzt, was zu zufälligen Abbrüchen der Synthese führte. Durch die zufälligen Kettenabbrüche entstanden, während der Polymerasereaktion, DNA-Fragmente jeder Länge, die anschließend über eine Gelelektrophorese aufgetrennt werden konnten. Die Detektion der Fragmente erfolgte über unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe, die an die vier verschiedenen *dd*NTPs gekoppelt waren. Die Sequenz der DNA wurde aus den Fragmentlängen und der Fluoreszenz der vier Farbstoffe ermittelt.

2. Material und Methoden

Für die Sequenzierung wurde das Big Dye V3.1-Kit der Firma GENterprise (Mainz) verwendet. Der Sequenzierungsansatz hatte ein Volumen von 10 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

170 – 350 ng	Plasmid DNA
1 µl	DS23+ Primer (10 pmol/µl)
2 µl	Big Dye-Premix 3.1 (enthält <i>Taq</i> -Polymerase, <i>d</i> NTPs, <i>dd</i> NTPs) (GENterprise, Mainz)
2 µl	Sequenzing Buffer 3.1 (GENterprise, Mainz)
Ad 10 µl	H ₂ O _{bidest}

Der Ansatz wurde gemischt, kurz anzentrifugiert und in einen Thermocycler (Primus 25, MWG-Biotech, Ebersberg) gestellt. Für die Sequenzierung wurde das PCR-Programm 5 verwendet:

Denaturierung	96°C, 10 sec
Annealing, Polymerisation	55°C, 4 min
35 Zyklen	
Danach	4°C, unbegrenzt

Die Elektrophoretische Auftrennung der Fragmente und Erstellung der Sequenz wurde von der Firma GENterprise (Mainz) durchgeführt. Dabei wurde die Chromas Software (Version 1.45, C. McCarthy, Griffith University, Southport, Queensland, Australia) zur Editierung der Sequenz verwendet.

2.6 Gewinnung von Lhcb1-Apoprotein

rekombinanter Lhcb1 wurde in *E. coli*-Zellen des Stammes JM101 (NEB, Frankfurt) überexprimiert. Nach der Überexpression lag das Protein in Form von Einschlusskörpern vor und konnte durch Aufbrechen der Zellen isoliert werden.

2.6.1 Überexpression von Lhcb1-Apoprotein in *E. coli*

Transformierte JM101-Zellen (NEB, Frankfurt) wurden als Dauerkultur bei -80°C oder ausplattiert bei 4°C gelagert.

Vor der Überexpression des Lhcb1 mussten die Zellen zunächst vermehrt werden. Hierfür wurde etwas gefrorene Dauerkultur oder je eine Kolonie von der LB-Amp-Platte (siehe 2.5.4) mit einer Impföse abgenommen und in 4 LB-Amp-Vorkulturen (1 % [w/v] Trypton, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 1 % [w/v] NaCl, pH 7,5, 100 µg/ml Ampicillin) à 5 ml überführt. Die Vorkulturen wurden über Nacht bei 37°C im Drehrad inkubiert und anschließend zu 400 ml LB-Amp-Medium in einem 2 l Erlenmeyerkolben gegeben. Die Hauptkultur wurde für eine Stunde in einem Inkubationsschüttler bei 37°C und 210 upm geschüttelt.

Danach wurde durch Zugabe von 400 µl IPTG (Applichem, Darmstadt) die Überexpression induziert. Nach weiteren 4 h bei 37°C und 210 upm konnte mit der Isolierung des überexprimierten (siehe 2.6.2) Proteins begonnen werden.

2. Material und Methoden

2.6.2 Isolierung der Lhcb1-Einschlusskörper

Vor der Isolierung der Einschlusskörper wurden die Bakterien (siehe 2.6.1) für 5 min bei 8000 upm und 4°C abzentrifugiert (JLA 10500 Rotor, Beckman, München). Das Pellet wurde in 30 ml H₂O_{dest}, 24 mg DTT, 110 µl DNase I (1 mg/ml) resuspendiert (Ultraschall) und bis zum Aufschließen der Zellen auf Eis gelagert.

Der Zellaufschluss erfolgte in einer Zellpresse (French Pressure Cell Press, SLM Aminco, SLM Instruments Inc., Rochester, NY, USA). In der Zelle wurden die Bakterien unter einen Druck von 1200 psi gesetzt. Beim Ablassen der Bakteriensuspension kam es durch den plötzlichen Druckabfall zum Aufplatzen der Zellen. Um eine optimale Proteinausbeute zu erhalten, wurde die Aufschlussprozedur zweimal durchgeführt.

Die aufgebrochenen Zellen wurden für 5 min bei 9000 upm und 4°C (JA-20 Rotor, Beckman, München) pelletiert. In zwei Waschschrritten mit Detergens-haltigen Puffern wurden die Zellreste und bakteriellen Proteine selektiv gelöst und konnten so von den Einschlusskörpern getrennt werden. Zunächst wurde das Bakterienpellet in 7 ml Detergenspuffer (20 mM Tris(HCl) pH 7,5, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Desoxycholsäure, 1 % Triton X-100, 10 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert und erneut für 5 min bei 9000 upm und 4°C (JA-20 Rotor, Beckman, München) abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 7 ml Tritonpuffer (20 mM Tris(HCl) pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100) aufgenommen und über Nacht bei 4°C (Drehrad) gewaschen.

Am nächsten Tag wurden die Einschlusskörper erneut abzentrifugiert (9000 upm, 4°C, JA-20 Rotor, Beckman, München), mit 7 ml 20 mM Tris pH 7,5 gewaschen und schließlich in 1 ml 20 mM Tris pH 7,5 aufgenommen.

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.6.3) und der Überprüfung der Aufreinigung mittels SDS-PAGE (siehe 2.6.4) wurde das Lhcb1-Apoprotein bei -20°C gelagert.

2.6.3 Bestimmung der Apoprotein-Konzentration

Die Konzentration der Lhcb1- und WSCP-Apoproteine wurde photometrisch über die Absorption der aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan) bei 280 nm bestimmt.

Die Proteine wurden für die Messung in A₂₈₀-Puffer (10 mM Tris(HCl) pH 6,8, 2 % SDS, 1 mM β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Da SDS und β-Mercaptoethanol im UV-Bereich stark absorbieren, erfolgte die Messung stets gegen eine Referenz mit gleicher A₂₈₀-Pufferkonzentration.

Um die Proteine vollständig zu denaturieren, wurden drei Proteinproben und zwei Referenzen für 2 min gekocht. Anschließend wurden Absorptionsspektren der Proben im Bereich zwischen 190 nm und 350 nm aufgenommen.

2. Material und Methoden

Obwohl sich die Extinktion einzelner Lhcb1-Klone aufgrund der Sequenzunterschiede leicht unterscheiden konnte, wurde die Konzentration aller Klone mit dem Extinktionskoeffizient für das native Apoprotein bestimmt. Die Proteinkonzentrationen wurden aus den folgenden Standards errechnet:

WSCP:	$A_{280} = 1$	→	$c = 0,79 \text{ mg/ml}$
Lhcb1:	$A_{280} = 0,19$	→	$c = 0,1 \text{ mg/ml}$

2.6.4 Analytische SDS-PAGE

Die Reinheit isolierter Lhcb1-Einschlusskörper (siehe 2.6.1) und die Markierungsausbeute nach der Kopplung von Farbstoffen an Lhcb1 (siehe 2.7.2) wurden über SDS-Gelelektrophoresen nach Laemmli (1970) ermittelt.

Die verwendeten Polyacrylamidgele bestanden aus zwei Teilen, Sammel- und Trenngel. Während des Laufes wurden die Proben zunächst im Sammelgel fokussiert und anschließend im Trenngel aufgetrennt. Sammel- und Trenngel waren wie folgt zusammengesetzt:

<u>Sammelgel:</u>	<u>Trenngel:</u>
4,5 % Polyacrylamid	15 % Polyacrylamid
(Acrylamid/Bisacrylamid = 30/1)	(Acrylamid/Bisacrylamid = 30/1)
10 % Glycerin	10 % Glycerin
130 mM Tris(HCl) pH 6,8	400 mM Tris(HCl) pH 8,8
0,05 % APS	0,07 % APS
0,05 % TEMED	0,05 % TEMED

Wie bei den Gelen für die schwach denaturierende Elektrophorese (siehe 2.4.3.1), war das Trenngel 5 – 5,5 cm und das Sammelgel 1,5 – 2 cm hoch. Als Laufpuffer wurde 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % [w/v] SDS, 0,5 mM EDTA verwendet.

Sollte die Aufreinigung von überexprimiertem Lhcb1 überprüft werden, wurden 5 µg Protein in jede Geltasche eingesetzt, für die Auftrennung von markiertem Lhcb1 wurde 1 µg pro erwarteter Proteinbande aufgetragen. Die Proben wurden vor der Beladung des Gels mit 1/3 Volumen 3-4x Sparmix (100 mM Tris(HCl) pH 6,8, 4 % SDS, 24 % Glycerin, 1,4 M β-Mercaptoethanol, 0,4 mM Bromphenolblau) versetzt und für 2 min gekocht (Wasserbad: HB 4basic, IKA®-Labortechnik, Staufen). Als Referenz wurde der SDS 7-Proteinmarker (Dalton Marker VII-L für PAGE, Sigma-Aldrich, Steinheim) aufgetragen. Der Lauf wurde mit einer Spannung von 80 V gestartet. Nach dem Einlaufen der Proben in das Gel wurde die Spannung auf 200 V erhöht.

Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel für mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung (0.175 % Coomassie® Brilliant Blue G 250, 50 % [v/v] EtOH, 7 % [v/v] Essigsäure) gefärbt. Zur Entfernung von überschüssigem Farbstoff wurde das Gel zunächst für 30 – 45 min im ersten Entfärber (10 % [v/v] EtOH, 7 % [v/v] Essigsäure), anschließend über Nacht im zweiten Entfärber (10 % [v/v] Essigsäure) inkubiert. Während des gesamten Färbe- und Entfärbeprozesses wurde das Gel langsam geschüttelt (Phero-Shaker, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen). Außerdem wurde das Gel zwischen den einzelnen Schritten gründlich mit Wasser gespült.

2. Material und Methoden

Nach dem Anfärben der Proteinbanden konnte das Gel zur Auswertung eingescannt (ScanJet 4c, Hewlett Packard Instruments GmbH, Böblingen) und zwischen zwei Lagen Einmachhaut (Alba Einmach-Haut, Gehring & Neumeier GmbH + Co. KG, Bielefeld) vakuumgetrocknet werden (Slab Gel Dryer 2003, LKB Produkter AB, Bromma, Schweden; Vakuum-Pumpe Model RV5, Edwards High Vacuum International, Crawley, England; Kältefalle Typ KF-2-60, Bachofer GmbH, Reutlingen).

2.7 Farbstoffmarkierte Apoproteine

Farbstoffmarkiertes LHCII wurde sowohl für einzelmolekülspektroskopische Messungen der Dynamik des N-Terminus, als auch zur Adsorption der LHCII-Farbstoff-Konstrukte an Halbleiter benötigt. Dabei konnte der Farbstoff entweder über eine SH-reaktive Gruppe an das singuläre Cystein eines Lhcb1-Klons oder über eine aminofunktionale Gruppe direkt an den N-Terminus des Proteins gekoppelt werden.

Neben LHCII wurden bei den Einzelmolekülmessungen auch markiertes WSCP und BSA als Referenzen vermessen. Dafür wurde Tetramethylrhodamin 5-Maleimid an ein oder mehrere Cysteine der Proteine gebunden.

2.7.1 Aliquotierung von Farbstoffen

Um eine Oxidation der funktionellen Gruppe oder ein Ausbleichen zu verhindern, wurden die Farbstoffe stets im abgedunkelten Raum mit wasserfreien Lösungsmitteln aliquotiert.

Zunächst wurde eine Spatelspitze des Farbstoffpulvers in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß oder Glasgefäß überführt. Hydrophobe Rylene Farbstoffe wurden mit Aceton für Pigmente, alle anderen Farbstoffe in wasserfreiem MeOH aufgenommen. Nach dem Lösen wurden die Farbstoffe zunächst auf Eis gestellt. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt, so dass die Farbstoffe in entsprechende Aliquots aufgeteilt und unter N₂ getrocknet werden konnten. Die Lagerung der Farbstoffe erfolgte bei -20°C.

2.7.2 Markierung von Proteinen mit Farbstoff

Die Markierung von Lhcb1 fand in dieser Arbeit stets vor der Rekonstitution des Apoproteins statt. Für die Kopplung an die N-terminale Aminogruppe wurden Farbstoffe mit N-Hydroxysuccinimid-Funktion (NHS) verwendet. Das Cystein von Lhcb1 wurde mit Maleimid- oder Iodacetamid-Farbstoffen markiert.

2. Material und Methoden

2.7.2.1 Kopplung von SH-reaktiven Farbstoffen an Cystein

Für die Markierung des singulären Cysteins von Lhcb1 wurde ein 25facher Farbstoff/Protein-Überschuss eingesetzt.

In einem typischen Markierungsansatz wurden 100 µg Lhcb1-Apoprotein markiert. Hierfür wurde die entsprechende Menge Lhcb1-Einschlusskörper in 10 µl 1% SDS aufgenommen und für 2 min gekocht (Wasserbad: HB 4basic, IKA®-Labortechnik, Staufen). Das denaturierte Protein wurde anschließend mit 100 mM NaP pH 7,0, 10 % OG und H₂O_{dest} auf eine Konzentration von 10 mM NaP pH 7,0, 1 % OG und 0,1 % SDS eingestellt.

Der Markierungsansatz wurde mit 2 µl 100 mM TCEP für 15 min bei 37°C reduziert und anschließend zu 100 nmol trockenem Farbstoff gegeben. Nach gründlichem Mischen von Protein und Farbstoff erfolgte die Markierung über 2 h bei 37°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte das markierte Protein direkt aufgereinigt (siehe 2.7.3) oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren werden.

Die Markierung von WSCP und BSA erfolgten auf die gleiche Weise, wie die Kopplung von Farbstoffen an LHCII. Da WSCP jedoch 2 und BSA mehr als 20 Cysteine aufweist, wurden Farbstoff und Protein equimolar eingesetzt, um eine einfache Markierung zu erreichen.

2.7.2.2 Kopplung von aminoreaktiven Farbstoffen an den N-Terminus

Wie bei der Markierung des Cysteins (siehe 2.7.2.1) wurde auch für die Markierung der N-terminalen Aminogruppe ein 25facher Farbstoff/Protein-Überschuss verwendet.

100 µg Lhcb1-Einschlusskörper wurden in 10 µl 1 % SDS aufgenommen, für 2 min gekocht und mit 100 mM NaP pH 7,35, 10 % OG und H₂O_{dest} auf eine Konzentration von 10 mM NaP pH 7,35, 1 % OG, 0,1 % SDS eingestellt. Der Ansatz wurde zu 100 nmol trockenem Farbstoff gegeben, gut gemischt und für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde das markierte Protein bei -20°C eingefroren oder direkt aufgereinigt (siehe 2.7.3)

2.7.3 Aufreinigung des markierten Proteins

Die Markierung von Proteinen mit Farbstoffen war im Allgemeinen nicht vollständig. Bei der Reaktion von Lhcb1 mit einem 25fachen Farbstoffüberschuss wurden Markierungsausbeuten von ca. 80 % erreicht. Nach der Kopplung von Farbstoffen an WSCP und BSA, für die Farbstoff und Protein in gleichen Mengen eingesetzt wurden, lag der Anteil des markierten Proteins deutlich niedriger.

Zur Trennung des Proteins von überschüssigem Farbstoff wurden das Protein gefällt und anschließend gewaschen. Sollte auch das markierte vom unmarkierten Protein getrennt werden, wurde der Ansatz über eine präparative SDS-PAGE aufgereinigt.

2. Material und Methoden

2.7.3.1 Fällung der Proteine

Zur Fällung des Proteins wurde der Markierungsansatz (1 Volumen) mit 0,1 Volumen 100 mM Essigsäure und 2,3 Volumen Aceton p.A. versetzt. Die Fällung erfolgte für 2 – 3 h oder über Nacht bei -20°C. Anschließend wurde das Protein für 20 min bei 14000 upm und 4°C abzentrifugiert (Rotor 1412, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen). Das Pellet wurde zweimal in 70 % EtOH resuspendiert (Ultraschall) und erneut abzentrifugiert. Schließlich wurde das Protein mit 100 % EtOH überschichtet und pelletiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und für die Rekonstitution (siehe 2.8) in 100 mM Tris(HCl) pH 9,0 und 2 % SDS aufgenommen.

2.7.3.2 Präparative SDS-PAGE

Die Trennung von markiertem und unmarkiertem Lhcb1 erfolgte über eine SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) mit einer zylinderförmigen Gelsäule (Mini Prep Cell, Gelsäule mit 13 cm Länge und 7 mm Innendurchmesser, BioRad, München).

Das Gel bestand aus einem 8 – 8,5 cm hohen Trenngel und einem 1 – 1,5 cm hohen Sammelgel, die sich wie folgt zusammensetzten:

Sammelgel:

4,7 % Polyacrylamid
(Acrylamid/Bisacrylamid = 30/1)
130 mM Tris(HCl) pH 6,8
0,045 % APS
0,045 % TEMED

Trenngel:

15 % Polyacrylamid
(Acrylamid/Bisacrylamid = 30/1)
410 mM Tris(HCl) pH 8,8
0,06 % APS
0,04 % TEMED

Während der Polymerisation des Trenngels wurde die Gelsäule in ein gekühltes Wasserbad (4 – 10°C, 2500 ml Becherglas) gestellt, da sich das Gel stark erwärmte und sich leicht Blasen in der Gelmatrix ausbildeten.

Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 50 mM Tris, 384 mM Glycin, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS verwendet. Auf das Gel konnte eine Proteinmenge von 100 – 200 µg aufgetragen werden, die mit 1/3 Volumen Sparmix (100 mM Tris pH 6,8, 4 % SDS, 24 % Glycerin, 1,4 M β-Mercaptoethanol) beschwert wurde. Bei höheren Proteinmengen reichte die Trennleistung der Elektrophorese nicht aus, um markiertes und unmarkiertes Lhcb1 zu trennen.

Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Stromstärke von 5 mA durchgeführt, wobei die Spannung auf maximal 300 V begrenzt wurde (Power PAC 3000, BioRad, München). Der gesamte Gellauf dauerte 19 h 24 min und wurde bei 10°C durchgeführt. Das Eluat wurde über eine Peristaltikpumpe (Econo Pump EP-1, BioRad, München) mit einer Flussrate von 40 µl/min abgesaugt und zu einem Fraktionensammler (Fraction Collector 2128, BioRad, München) geleitet. Nach 300 min Laufzeit wurde die Sammlung des Eluats gestartet (Time Frame Methode). 288 Fraktionen à 3 min wurden in drei 96-Well-Mikrotiterplatten (Microtest Plate 96-Well Flat Bottom, Sarstedt, Nürnberg) gesammelt.

2. Material und Methoden

Nach Beendigung des Laufs wurde die Absorption der Fraktionen im Absorptionsmaximum des jeweiligen Farbstoffes gemessen (SPECTRAMaxPLUS, Software : SOFTmaxPRO[®], Molecular Devices, Sunnyvale, California) und ein Elutionsprofil der Elektrophorese erstellt. Von jeder 5. – 10. farbstoffhaltigen Fraktion wurden 50 µl abgenommen, unter Vakuum auf 20 µl eingeeengt und auf eine analytische SDS-PAGE aufgetragen (siehe 2.6.4). Mit Hilfe des gefärbten SDS-Gels konnte festgestellt werden, in welchen Fraktionen ausschließlich markiertes Lhcb1 vorlag. Die entsprechenden Fraktionen wurde vereinigt und vor der Rekonstitution des Proteins aufkonzentriert (siehe 2.7.4).

2.7.4 Aufkonzentrieren des markierten Lhcb1

Nach der präparativen SDS-PAGE lag das markierte Lhcb1 (20 – 100 µg) in einem Volumen von 3 – 4 ml vor und musste daher vor der Rekonstitution aufkonzentriert werden. Hierfür wurde das markierte Protein in Zentrifugensatz mit 30 kDa Ausschluss (centricon[®] 3 microconcentrator, Amicon Beverly, MA, USA) überführt und bei 3000 g und Raumtemperatur (Rotor 1414, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) auf 30 µl eingeeengt. Um das in der Probe enthaltene SDS teilweise zu entfernen wurde das Protein noch zweimal mit je 1 ml 100 mM Tris(HCl) verdünnt und bei 3000 g auf 30 µl eingeeengt. Schließlich wurde die Proteinlösung mit 10 µl 10 % SDS versetzt, kurz gevortext und durch Zentrifugation für 3 min bei 1500 g in den Deckel des Zentrifugensatz überführt. Die Proteinlösung wurde mit 100 mM Tris(HCl) pH 9,0 auf 50 µl aufgefüllt und konnte bis zur Rekonstitution (siehe 2.8) bei -20°C eingefroren werden.

2.8 Rekombinanter LHCII

Neben nativem LHCII aus Erbse wurde auch rekombinanter LHCII verwendet. Das Lhcb1-Apoprotein wurde in *E. coli* überexprimiert (siehe 2.6.1) und mit Pigmenttotalextrakt aus Erbse (siehe 2.3.1) rekonstituiert.

2.8.1 Rekonstitution des Lhcb1 durch Detergenswechsel

Die Faltung von rekombinantem Lhcb1 erfolgte nach der Detergenswechsel-Methode (Paulsen *et al.*, 1993). Das denaturierte Apoprotein wurde in SDS vorgelegt und mit Pigmenten versetzt. Anschließend wurde das mildere Detergens OG zugegeben, was zur Ausbildung von SDS-OG-Mischmicellen führte. Die Entfernung des SDS durch Fällung vollendete den Detergenswechsel, der die Faltung des Lhcb1 induzierte.

2. Material und Methoden

Für die Rekonstitution wurde das Lhcb1-Apoprotein in einer Konzentration von 0,4 mg/ml in 100 mM Tris pH 9, 0,2 % SDS vorgelegt. Die Größe des Proteinansatzes (1 Volumen) spielte dabei keine Rolle, so lange eine schnelle Durchmischung während der Zugabe der Pigmente ermöglicht wurde. Zur vollständigen Denaturierung wurde das Protein für 2 min gekocht (Wasserbad: HB 4basic, IKA[®]-Labortechnik, Staufen) und mit 0,05 Volumen 1 M β -Mercaptoethanol versetzt. Zu dem denaturierten Protein wurde unter vortexen 1/10 Volumen 10 μ g/ μ l Pigmenttotalextrakt gegeben. Der Rekonstitutionsansatz wurde für weitere 30 s gevortext und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um das Eindringen der Pigmente in die Protein-Detergens-Micellen zu gewährleisten. Die Zugabe von 0,143 Volumen 10 % OG und die folgende Inkubation für weitere 5 min bei Raumtemperatur führten zur Ausbildung von SDS-OG-Mischmicellen. Das SDS wurde nach Zugabe von 0,143 Volumen 2 M KCl für 10 min auf Eis gefällt und durch fünfminütige Zentrifugation bei 12000 upm und 4°C (Rotor 1412, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) aus dem Rekonstitutionsansatz entfernt.

Die gefalteten LHCII-Monomere konnten über eine Dichtegradientenzentrifugation (siehe 2.4.3.2) von den freien Pigmenten getrennt, oder wenn sie ein His₆-Motiv aufwiesen, über eine Nickelsäule trimerisiert werden (siehe 2.8.2).

2.8.2 Trimerisierung von rekombinanten LHCII-Monomeren

Die Rekonstitution und Trimerisierung von rekombinantem Lhcb1 auf einer Ni-Sepharose-säule wurde 1998 von Rogl *et al.* beschrieben. Die in dieser Arbeit benutzte Methode zur Trimerisierung von LHCII basierte auf der Vorgehensweise von Rogl, wobei die Rekonstitution des Lhcb1 nicht auf der Nickelsäule, sondern in einem separaten Schritt, in Lösung erfolgte (siehe 2.8.1). Die Trimerisierung der Komplexe wurde in einem abgedunkelten Raum bei 4°C durchgeführt.

Für die Immobilisierung von LHCII mit His₆-Motiv wurde Sepharose verwendet, die mit Nitrilotriessigsäure (NTA) funktionalisiert war (Chelating Sepharose[™] Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Je 300 μ l des aufgeschwemmten Materials wurden in Säulen (Poly-Prep[®], Bio-Rad, München) gefüllt. Nach dem Abtropfen der überschüssigen Flüssigkeit betrug das Säulenvolumen ca. 250 μ l. Auf jede Säule wurden 0,4 ml 0,1 M NiCl₂ aufgetragen. Während die Flüssigkeit durch die Säule lief, wurden die Ni-Ionen über drei Koordinationsstellen durch NTA komplexiert. Überschüssiges NiCl₂ wurde mit 3 – 5 Volumen 50 mM Tris(HCl) pH 7,5 von der Säule gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 1 Volumen OG-Puffer (100 mM Tris(HCl) pH 9,0, 1 % OG) equilibriert.

Die Bindungskapazität der Ni-Sepharose lag bei etwa 1 μ g Protein pro μ l Säulenmaterial. Daher wurden auf die Säulen je 250 μ g LHCII-Rekonstitutionsansatz aufgetragen. Komplexlösung und Säulenmaterial wurden vorsichtig durchmischt und für 30 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit abgelassen. Die Säule wurde mit 1 Volumen OG-Puffer und 2 Volumen TX-Puffer (100 mM Tris pH 7,5, 0,05 % Triton X-100, 0,1 mg/ml Phosphatidylglycerol (PG)) gespült. Die Elution der Komplexe erfolgte durch Auftragen von 1 ml Eluat-Puffer (10 mM Tris(HCl) pH 7,5, 0,05 % Triton X-100, 0,1 mg/ml PG, 300 mM Imidazol). Sobald sich das Eluat grün färbte, wurden die Komplexe aufgefangen. Bei der Abnahme der Färbung wurde die Elution abgebrochen.

2. Material und Methoden

Im Allgemeinen konnten pro Säule 300 – 400 µl Komplexe eluiert werden. Durch anschließende Saccharose-Dichtegradientenultrazentrifugation wurden Trimere, Monomere und freie Pigmente getrennt (siehe 2.4.3.2).

Nach der Trimerisierung wurde die Ni-Sepharose für eine erneute Verwendung regeneriert. Mit 2 Volumen 0,4 M Imidazol, 2 % SDS wurden Pigmente und Proteine von der Säule gewaschen. Nach der Entfernung des Imidazol-SDS-Gemisches durch Spülen mit 1 Volumen H₂O_{dest}, wurden die Ni-Ionen mit 0,5 M EDTA entfernt. Das EDTA wurde ebenfalls mit 1 Volumen H₂O_{dest} von der Säule gewaschen. Zur Entfernung von eventuell noch vorhandenen wasserunlöslichen Verunreinigungen (Lipide, Pigmente) wurde ein Wasser-EtOH-Gradient verwendet. In 20 %-Schritten (je 1 Volumen) wurde die EtOH-Konzentration von 0 % auf 100% erhöht und anschließend wieder auf 20 % abgesenkt. Die regenerierte Sepharose wurde in 20 % EtOH bei 4°C gelagert.

2.8.3 Bestimmung der LHCII-Konzentration

Waren in einer LHCII-Lösung nur wenige freie Pigmente vorhanden, z.B. nach einer Dichtegradientenultrazentrifugation, so konnte die Konzentration der Komplexe photometrisch über die Absorption der gebundenen Chle bestimmt werden.

Hierfür wurde im Bereich zwischen 350 nm und 800 nm ein Absorptionsspektrum der LHCII-Lösung aufgenommen. Die Konzentration wurde nach Butler und Kühlbrandt (1988) aus der Absorption der LHCII-Monomere bei 670 nm ($\epsilon_{670} = 546000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ermittelt. Zur Bestimmung der Trimerkonzentration wurde der Wert durch drei geteilt.

2.9 Spektroskopische Charakterisierung von LHCII und Farbstoffen

Die Charakterisierung von LHCII und Farbstoffen erfolgte hauptsächlich mit Hilfe von verschiedener spektroskopischer Methoden. Im Folgenden werden die spektroskopischen Messungen an LHCII- und Farbstofflösungen dargestellt.

Absorptions- und Fluoreszenzmessungen an LHCII- und Farbstoff-Elektroden werden unter 2.13 beschrieben.

2.9.1 Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektroskopie diente hauptsächlich zur Ermittlung der Konzentration von Proteinen, Pigmenten und Farbstoffen in Lösung. Zur Bestimmung der Apoprotein-Konzentration wurden Spektren im UV-Bereich aufgenommen (siehe 2.6.3). Farbstoffe, Pigmente und LHCII wurden im sichtbaren Bereich des Lichts (VIS) detektiert.

2. Material und Methoden

Für die Messungen wurden zwei verschiedene Photometer, das Modell V-550 UV/VIS von Jasco Labor- und Daten Technik GmbH (Groß-Umstadt) und das UV-VIS Scanning Spectrophotometer UV-2101PC von Shimadzu (Kyoto, Japan), verwendet. Die Messungen wurden mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Jasco-Photometer:

Detektionsmodus: Absorption
Scangeschwindigkeit: quick, 400 nm/min
Increment: 1 nm
Spaltbreite: 1nm

Shimadzu-Photometer:

Detektionsmodus: Absorption
Scangeschwindigkeit: medium
Increment: 1 nm
Spaltbreite: 1nm

Die Chlorophyllbestimmung nach Porra *et al.* (1989, siehe 2.3.2) wurde am Jasco-Photometer im Fixed-Wavelength-Modus durchgeführt.

2.9.2 CD-Spektroskopie

Zur Charakterisierung von nativen LHCII-Trimeren und Monomeren nach einer Monomerisierung wurden die Ziklardichroismus-Spektren (CD-Spektren) der Komplexe aufgenommen. Excitonische Wechselwirkungen zwischen den Pigmenten der Lichtsammelkomplexe schlugen sich in charakteristischen VIS-CD-Signalen nieder, über die Monomere und Trimere unterschieden werden konnten. Die Spektren wurden an einem J-810-S CD-Spektrometer von Jasco Labor- und Daten Technik GmbH (Groß-Umstadt) mit folgenden Einstellungen aufgenommen:

Temperatur:	4°C (Peltier-Element: CDF-426S/426L)
N ₂ -Fluss:	2 l/min
Wellenlängenbereich:	350 – 750 nm
Scangeschwindigkeit:	50 nm/min
Sensitivität:	100 mdeg
Increment:	0,5 nm
Spaltbreite:	4 nm
Integrationszeit:	4 s

2.9.3 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektroskopie wurde zur Bestimmung des Energietransfers zwischen LHCII und einem Farbstoff (siehe 2.9.4), sowie zur Überprüfung der Intaktheit der Komplexe eingesetzt. Außerdem wurden die verwendeten Farbstoffe hinsichtlich ihrer Fluoreszenz charakterisiert. Für die Aufnahme von Fluoreszenz-Emissionsspektren wurde LHCII in der Regel bei den Wellenlängen 410 nm oder 460 nm angeregt. Bei 410 nm absorbierten hauptsächlich die Chl *a* der Komplexe, bei 460 nm wurden in erster Linie Chl *b* und Xanthophylle angeregt. Die Emission wurde zwischen 600 nm und 850 nm detektiert. Bei der Aufnahme von Excitationsspektren erfolgte die Anregung zwischen 350 nm und 730 nm, die Emission wurde bei 740 nm detektiert.

2. Material und Methoden

Die Einstellungen, die bei der Aufnahme von Farbstoff-Fluoreszenzspektren verwendet wurden, hingen von den spektroskopischen Eigenschaften des jeweiligen Farbstoffes ab. Alle Messungen an LHCII und Farbstoffen wurden jedoch mit folgenden Parametern durchgeführt:

Integrationszeit:	0,1 s
Increment:	1 nm
Spaltbreite:	Excitation: 3 nm Emission: 3 nm
Detektorsensitivität:	Lamp Level 2
Korrekturen:	S/R X mcorrect (optional)

Für die Messungen wurden Fluoreszenzspektrometer Fluoromax-2 und Fluoromax-3 (ISA SPEX / Jobin Yvon, Grasbrunn) verwendet.

2.9.4 Bestimmung des Energietransfers zwischen LHCII und Farbstoffen

In dieser Arbeit wurden sowohl Energietransfer von einem Donorfarbstoff auf die Chl_a des LHCII (siehe 3.1.1), als auch von LHCII auf einen Akzeptorfarbstoff (siehe 3.2.11) untersucht. Die Effizienz der Energietransferprozesse wurde aus der Löschung der Donorfluoreszenz (siehe 2.9.4.3) oder der Zunahme der Akzeptorfluoreszenz (siehe 2.9.4.4) berechnet.

2.9.4.1 Fluoreszenzmessung für die Energietransferberechnung

Die Effizienz des Energietransfers wurde aus Fluoreszenzemissionsspektren der LHCII-Farbstoff-Probe, sowie einer LHCII- und einer Farbstoffreferenz berechnet. Bei Messungen in Lösung wurden die LHCII-Farbstoff-Probe und die Referenzen auf gleiche Absorption ($< 0,1$) eingestellt. Die Messungen wurden wie unter 2.9.3 beschrieben, mit Detektion im rechten Winkel zur Anregung, aufgenommen.

Bei Messungen an immobilisierten LHCII und Farbstoffen war ein einstellen auf gleiche Konzentration nicht möglich. Jedoch wurden auf die LHCII-Farbstoff-Elektroden und die Referenzen die gleichen Auftragslösungen und Puffer aufgetragen, um ein ähnliche Belegungsdichte zu erreichen. Des Weiteren wurden stets nur Halbleiterelektroden aus einer HerstellungschARGE für eine Messung verwendet. Teilweise wurden für die Fluoreszenzmessungen Filter verwendet, welche die Beeinflussung des Signals durch Streulicht verringerten (siehe 2.13.1). Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte stets frontal zur Anregung.

2. Material und Methoden

2.9.4.2 Dekonvolution des LHCII-Farbstoff-Spektrums

Wie bereits erwähnte (siehe 2.9.4) wurde der Energietransfer zwischen LHCII und einem Farbstoff aus der Differenz der LHCII- bzw. Farbstofffluoreszenz in der LHCII-Farbstoff-Probe und den Referenzen bestimmt. Da die LHCII- und Farbstofffluoreszenzen in den meisten Fällen überlappten, mussten die Einzelfluoreszenzen über eine Dekonvolution des Summespektrums ermittelt werden.

Wie in früheren Arbeiten (Wolf-Klein, 2001; Lion, 2001) erfolgte die Dekonvolution über eine 2-Faktoren-Analyse. Im Folgenden ist die Dekonvolution exemplarisch für den Energietransfer von LHCII auf einen langwelligen Akzeptorfarbstoff dargestellt. Die Dekonvolution wurde im Allgemeinen ausgehend von den Fluoreszenzmaxima von Donor und Akzeptor durchgeführt. Für das dargestellte Beispiel wird eine maximale LHCII-Fluoreszenz bei 681 nm und eine maximale Farbstofffluoreszenz bei 705 nm angenommen. Für die Errechnung der Einzelspektren aus dem LHCII-Farbstoff-Summenspektrum wurde angenommen, dass die Form der Fluoreszenzspektren von LHCII und Farbstoff in der Probe und den Referenzen identisch war. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei den betrachteten Wellenlängen (681 nm und 705 nm) war somit bei allen Spektren konstant.

$$\begin{aligned}F_G 681 &= K \cdot F_G 705 \\F_D 681 &= R \cdot F_D 705 \\F_A 705 &= T \cdot F_A 681\end{aligned}\tag{II}$$

Dabei waren:

- F_G = Fluoreszenz der LHCII-Farbstoff-Probe
- F_D = Fluoreszenz der Chle (Donor) in der LHCII-Referenz
- F_A = Fluoreszenz des Akzeptorfarbstoffes in der Farbstoff-Referenz
- K, R, T = Verhältnis der Fluoreszenzen bei den betrachteten Wellenlängen

Da sich das LHCII-Farbstoff-Summenspektrum aus der LHCII- und der Farbstoff-Fluoreszenz zusammensetzte, galt außerdem:

$$\begin{aligned}F_G 681 &= F_D \text{fit}681 + F_A \text{fit}681 \\F_G 705 &= F_D \text{fit}705 + F_A \text{fit}705\end{aligned}\tag{III}$$

wobei:

- $F_D \text{fit}$ = errechneter Anteil der Chl-Fluoreszenz am LHCII-Farbstoff-Spektrum
- $F_A \text{fit}$ = errechneter Anteil der Akzeptorfarbstoff-Fluoreszenz am LHCII-Farbstoff-Spektrum

2. Material und Methoden

Durch Gleichsetzen der F_D - bzw. F_A -Variablen mit den F_{Dfit} - bzw. F_{Afit} -Variablen und einsetzen der Gleichungen (II) in die Gleichungen (III) konnten die beiden Faktoren für die Dekonvolution, F_{Dfit} 681 und F_{Afit} 705, ermittelt werden.

$$F_{Dfit}681 = \frac{R(K \cdot T - 1) \cdot F_G 681}{R \cdot K \cdot T - K} \quad (IV)$$
$$F_{Afit}705 = \frac{(T \cdot (K - R)) \cdot F_G 705}{1 - R \cdot T}$$

Aus dem LHCII-Farbstoff-Spektrum wurden die Einzelspektren von LHCII und Farbstoff wie folgt berechnet:

$$F_{Dfit}(600 - 850) = F_D(600 - 850) \frac{F_{Dfit}681}{F_D 681} \quad (V)$$
$$F_{Afit}(600 - 850) = F_A(600 - 850) \frac{F_{Afit}705}{F_A 705}$$

Im Allgemeinen war im Summenspektrum eine leichte Verschiebung der LHCII- und Farbstoff-Fluoreszenz gegenüber den Referenzspektren zu beobachten. Daher wurden die Fluoreszenz der Referenzen auf der Wellenlängenachse verschoben, bis die Differenz zwischen dem gemessenen Summenspektrum und einem Summenspektrum aus den errechneten Einzelspektren minimal war.

Durch Vergleich der LHCII- und Farbstoffanteile am LHCII-Farbstoff-Summenspektrum mit den Referenzspektren konnte nun die Effizienz des Energietransfers ermittelt werden.

2.9.4.3 Löschung der Donorfluoreszenz

In den meisten Fällen wurde die Effizienz des Energietransfers über die Löschung der Donorfluoreszenz nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Transfereffizienz[\%]} = \left(1 - \frac{\int F_{Dfit}}{\int F_{Dref}} \right) \cdot 100 \quad (VI)$$

Dabei waren:

- F_{Dfit} = errechneter Anteil der Donorfluoreszenz am LHCII-Farbstoff-Spektrum
- F_{Dref} = gemessene Fluoreszenz der Donor-Referenz

Für die Berechnung wurden die Flächen der Fluoreszenzspektren über den gesamten Wellenlängenbereich der Messung integriert.

2. Material und Methoden

2.9.4.4 Sensibilisierte Akzeptorfluoreszenz

Neben der Löschung der Donorfluoreszenz konnte auch die Zunahme der Akzeptorfluoreszenz zur Berechnung des Energietransfers zwischen LHCII und Farbstoff verwendet werden. Diese Methode wurde jedoch nur zur Ermittlung des Energietransfers von Tetramethylrhodamin auf LHCII angewandt (siehe 3.1.1).

Für die Berechnung wurden, neben dem Anteil der Einzelfluoreszenzen am LHCII-Farbstoff-Summenspektrum, auch die Fluoreszenz-Quantenausbeuten von Donor und Akzeptor benötigt. Für LHCII wurde eine Quantenausbeute von $\Phi_A = 0,154$ (Wolf-Klein, 2001), für Tetramethylrhodamin $\Phi_D = 0,28$ (Root, 1997) angenommen.

Da die Chle des LHCII bei der Anregungswellenlänge von 532 nm auch direkt angeregt werden konnten, wurde für die Berechnung die Fluoreszenz der Chl-Referenz von dem errechneten Anteil der Chl-Fluoreszenz am LHCII-Farbstoff-Summenspektrum abgezogen.

Die Effizienz des Energietransfers wurde nach folgender von H. Wolf-Klein (2001) aufgestellten Gleichung berechnet, die eine Vereinfachung der Berechnung von Fairclough und Cantor (1978) darstellt.

$$\text{Transfereffizienz}[\%] = \frac{\int \frac{F_A \text{ fit}}{\Phi_A}}{\int \frac{F_A \text{ fit}}{\Phi_A} + \int \frac{F_D \text{ fit}}{\Phi_D}} \cdot 100 \quad (\text{VII})$$

mit:

$F_{A \text{ fit}}$ = errechneter Anteil der Akzeptorfluoreszenz am LHCII-Farbstoff-Spektrum nach Abzug der Fluoreszenz der LHCII-Referenz

$F_{D \text{ fit}}$ = errechneter Anteil der Donorfluoreszenz am LHCII-Farbstoff-Spektrum

Φ_A = Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptors

Φ_D = Fluoreszenzquantenausbeute des Donors

2. Material und Methoden

2.9.4.5 Försterkritischer Abstand R_0

Eine exakte Bestimmung des Försterkritischen Abstandes für den Energietransfer zwischen LHCII und einem gekoppelten Farbstoff war in dieser Arbeit nicht möglich, da unklar war, wie viele Chle des LHCII an dem Energietransferprozess beteiligt sind und in welchem Abstand und welcher Orientierung sie zu dem Farbstoff stehen.

Eine Abschätzung von R_0 erfolgte ausgehend von einem Modell mit einem Donor und einem Akzeptor nach den von Latt *et al.* (1965) aufgestellten Gleichungen:

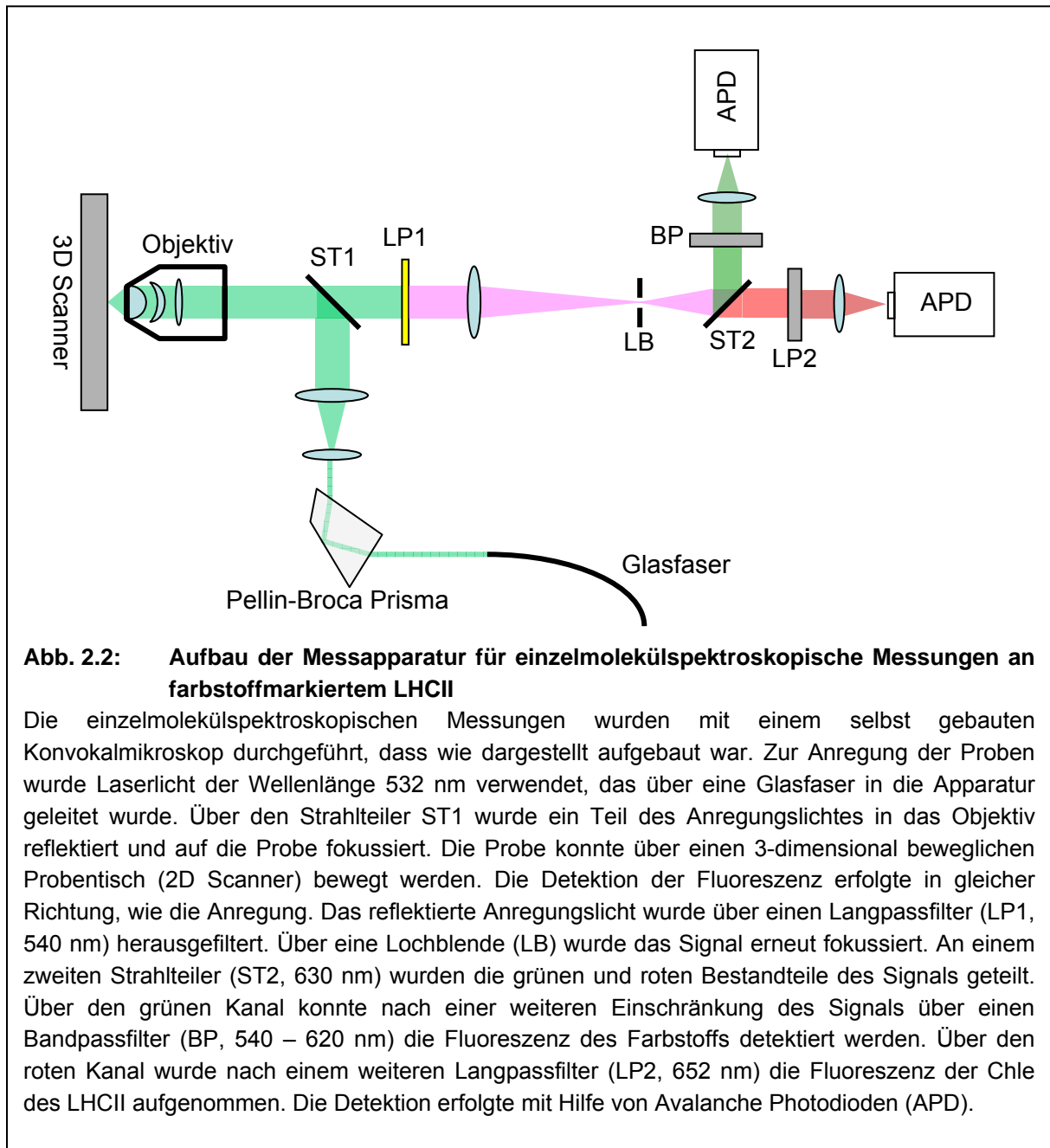
$$R_0 = 9,79 \cdot 10^3 (\phi_D \cdot \kappa^2 \cdot n^{-4} \cdot J_{DA})^{1/6}$$
$$J_{DA} = \frac{\int f_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda}{\int f_D(\lambda) d\lambda} \quad (\text{VIII})$$

- Mit: R_0 = Försterkritischer Abstand; Abstand, bei dem die Energietransfereffizienz 50 % beträgt [Å]
 Φ_D = Fluoreszenzquantenausbeute des Donors;
Tetramethylrhodamin: $\Phi_D = 0,28$ (Root, 1997)
LHCII: $\Phi_D = 0,154$ (Wolf-Klein, 2001)
 κ^2 = Geometrischer Faktor, der über Orientierung der Dipolmomente von Donor und Akzeptor Auskunft gibt; $\kappa^2 = 2/3$
 n = Brechungsindex; $n = 1,33$ (Wasser)
 J_{DA} = Überlappungsintegral zwischen der normierten Donorfluoreszenz und der molaren Extinktion des Akzeptors [cm^3/M]
 f_D = normierte Donorfluoreszenz; $\int f_D(\lambda) = 1$
 λ = Wellenlänge
 ε_A = Molare Extinktion des Akzeptors; Extinktion des jeweiligen Akzeptorfarbstoffes, bzw. $\varepsilon_A = 546000 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für alle Chle des LHCII und $\varepsilon_A = 546000/12 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für ein Chl

2. Material und Methoden

2.10 Einzelmolekülspektroskopie

In dieser Arbeit wurden Vorversuche zu einzelmolekülspektroskopischen Messungen durchgeführt, mit deren Hilfe die Dynamik des N-Terminus von LHCII beobachtet werden sollte. Alle einzelmolekülspektroskopischen Messungen wurden von S. Schuler am 3. Physikalischen Institut der Universität Stuttgart durchgeführt. Der Aufbau der Messapparatur ist in Abb. 2.2 schematisch dargestellt.



Für die Messungen an LHCII wurden die Komplexe über Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt (siehe 2.4.3.2). Die Proben wurden bis zur Messung auf Eis gelagert oder, wenn die Messung erst mehrere Tage später erfolgte, eingefroren. Direkt vor der Durchführung des Experiments wurden die Komplexe mit dem Probenpuffer verdünnt. Die eingesetzte LHCII-Konzentration konnte variieren, lag aber im Allgemeinen im nanomolaren Bereich.

2. Material und Methoden

Alle Messungen, die in dieser Arbeit dargestellt sind, wurden bei Raumtemperatur an gelösten Proteinen durchgeführt. Die Messlösung wurde möglichst Luftblasenfrei auf einen Objektträger mit Vertiefung aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt.

Der Fokus lag bei den Messungen knapp unter dem Deckglas und musste nachreguliert werden, wenn sich auf der Deckglasoberfläche Pigmentaggregate oder Verunreinigungen abschieden. Die Intensität des Anregungslichtes konnte über einen variablen Filter reguliert werden. In den unter 3.1.4 dargestellten Messungen wurde eine Anregungsintensität von 80 μW verwendet. Die maximale zeitliche Auflösung lag bei Messungen mit zwei Photodioden bei 1 ms.

2.11 Elektrochemische Solarzellen

Die elektrochemischen Messzellen, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, bestanden aus einer Halbleiter-beschichteten Anode (siehe 2.11.1) einer Graphit- (siehe 2.11.2.1) oder Gold-beschichteten (siehe 2.11.2.2) Kathode und einem Elektrolytsystem, das Elektronen von der Kathode zur Anode transportierte (siehe 2.11.3). Der grundsätzliche Aufbau der Messzellen entsprach damit dem von O'Regan und Grätzel (1991) beschriebenen Solarzellenmodell.

2.11.1 Beschichtung von ITO-Glas mit Halbleitern

Zur Herstellung der Anode wurden sowohl Titandioxid als auch Zinndioxid verwendet. Beide Halbleiter wurden in Form von kolloidalen Partikeln auf Indium-Zinnoxid-beschichtete Glasplatten (ITO-Glas) aufgetragen. Bei der Herstellung der Elektroden aus einer Halbleiterpaste (siehe 2.11.1.1 und 2.11.1.6) wurden die Anoden gesintert, um einen elektrischen Kontakt zwischen den Partikeln zu gewährleisten. Bei der Anfertigung nach der Solgel-Methode (siehe 2.11.1.3 und 2.11.1.5) wurde ein flüssiges Halbleitersol auf die Glasplatten aufgetragen. Durch ionische Interaktionen zwischen den Partikeln kam es zu einer gelartigen Vernetzung, die, auch ohne Sintern der Elektroden, den Transport von Elektronen durch die Halbleiterschicht ermöglichte.

2.11.1.1 Standardrezept zur Herstellung von TiO_2 -Anoden

Die meisten TiO_2 -Elektroden, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden nach einem leicht abgewandelten Rezept von Nazeeruddin *et al.* (1993) hergestellt.

Vor dem Auftragen des Titandioxids mussten zunächst ITO-Glasplatten für die Beschichtung mit dem Halbleiter vorbereitet werden. Hierfür wurden ITO-Glasscheiben (Pilkington) zu 4 x 4,5 cm großen Glasplatten zugeschnitten. Die Gläser wurden mit Leitungswasser und Spülmittel, sowie $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ und Aceton gründlich gereinigt. Danach wurden die Ränder der Glasplatten auf der ITO-beschichteten Seite in Längsrichtung mit Scotch[®]-Klebeband abgeklebt, wobei in der Mitte ein 1,5 cm breiter Streifen für die Beschichtung mit TiO_2 ausgespart wurde.

2. Material und Methoden

12 g TiO_2 (P25, Degussa AG, Darmstadt) wurden mit 3 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ und 1 ml 100 % Essigsäure gemörsert, um TiO_2 -Aggregate aufzubrechen. Anschließend wurden 1 ml 10 % Triton X-100 und 6 – 7 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ in 1 ml Schritten zugegeben und mit dem TiO_2 zu einer cremigen Paste verrührt. Die Paste wurde dreimal durch ein Sieb mit 0,3 mm Porengröße gestrichen um letzte TiO_2 -Klumpchen zu entfernen und auf die ITO-Glasplatten aufgetragen. Überschüssiges TiO_2 wurde durch Abstreifen mit einem feuchten Spatel entfernt. Die Dicke der so hergestellten TiO_2 -Schicht (50 μm) entsprach der Dicke des Klebebandes, das zum abkleben der Glasplatten verwendet wurde.

Nach zweistündigem Trocknen unter einem Abzug wurden die Klebestreifen entfernt und die Elektroden für 30 min bei 450°C in einem Muffelofen gesintert. Sollten die Elektroden mit wasserfreien Lösungen beschichtet werden, wurden sie bis zur Verwendung in einem Exsikkator gelagert.

2.11.1.2 Herstellung von TiO_2 -Elektroden nach Smestad

Eine Abwandlung des in dieser Arbeit verwendeten Standardrezeptes zur Herstellung von TiO_2 -Elektroden stellte die Methode nach Smestad aus der Anleitung für ein TiO_2 -Solarzellenkit der Firma Solideas dar.

Hier wurden zu 6 g TiO_2 (enthalten im Solarzellenkit von Solideas) in 1 ml Schritten 9 ml verdünnte Essigsäure pH 3 – 4 gegeben, wobei die TiO_2 -Suspension zwischen den einzelnen Schritten so lange gemörsert wurde, bis sie eine homogene Konsistenz aufwies. Anschließend wurde die Suspension mit 1 ml 10 % Triton X-100 versetzt, auf vorbereitete ITO-Glasplatten (siehe 2.11.1.1) aufgetragen und mit einem Glasstab ausgestrichen. Die beschichteten Platten wurden nach zweistündigem Trocknen unter einem Abzug für 30 min bei 450°C gesintert und bis zur weiteren Verwendung in einem Exsikkator gelagert.

2.11.1.3 TiO_2 -Solgel-Elektroden

Zur Herstellung von TiO_2 -Elektroden nach der Solgel-Methode wurde zunächst ein 15 %iger TiO_2 -Stamm (P25, Degussa AG, Darmstadt) in 0,5 % KOH hergestellt. ITO-Glasplatten (Pilkington) wurden so mit Scotch®-Klebeband abgeklebt, dass eine 1,5 x 1,5 cm große Fläche zur Beschichtung mit TiO_2 ausgespart wurde. 3 μl des TiO_2 -Stammes wurden mit 7 μl H_2O versetzt und auf der vorbereiteten ITO-Fläche verteilt. Beim Trocknen der Elektrode über Nacht kam es zur Ausbildung eines TiO_2 -Gels.

Während der Herstellung konnten auch Farbstoffe oder LHCII in den Halbleiter einpolymerisiert werden. Hierfür wurden die Farbstoffe oder Komplexe direkt vor dem Auftragen zu dem TiO_2 -Sol gegeben. Auf ein Sintern der Elektroden wurde verzichtet.

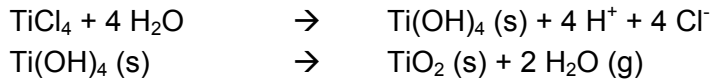
Wenn LHCII oder Farbstoff aus einer Lösung an die fertigen Anoden adsorbiert werden sollten, wurden die Elektroden bei 450°C für 30 min gesintert. Der Sinterprozess war zwar nicht notwendig, um eine elektrische Leitfähigkeit der Halbleiterschicht zu erreichen, führte jedoch zu einer deutlichen Erhöhung der Stabilität der TiO_2 -Schicht.

2. Material und Methoden

2.11.1.4 Adsorption von TiO₂ aus einer TiCl₄-Lösung

Für die Herstellung von TiO₂-Anoden wurde P25-Titandioxid von Degussa (Darmstadt) verwendet, welches noch metallische Verunreinigungen enthielt, die als Elektronenfallen fungieren und so zu einer Verminderung Stromausbeute der Solarzelle führen konnten (Nazeeruddin *et al.*, 1993).

Aus diesem Grund wurde versucht, die Reinheit der TiO₂-Oberfläche durch Adsorption von TiO₂ aus einer TiCl₄-Lösung zu verbessern. Die Reaktion von TiCl₄ zu TiO₂ lief dabei wie folgt ab:



Die Hydroxylierung von TiCl₄ zu Ti(OH)₄ ist eine stark exotherme Reaktion, bei der als Nebenprodukt Salzsäurerauch entsteht. Daher wurde dieser Arbeitsschritt auf Eis unter einem Abzug durchgeführt. Durch langsames Tropfen von 99 % TiCl₄ in eine vorgekühlte HCl-Lösung wurde eine 2 M TiCl₄-Lösung in 2 M HCl hergestellt, wobei TiCl₄ unmittelbar hydroxyliert wurde. Die so hergestellte Ti(OH)₄-Stammlösung war relativ stabil und konnte bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Erst bei Erwärmung wurde das Ti(OH)₄ zu TiO₂ umgesetzt.

Zur Beschichtung von TiO₂-Elektroden wurde der Ti(OH)₄-Stamm mit kaltem H₂O_{bidest} 100fach verdünnt und entsprechend der in 3.2.2.1.2 angegebenen Mengen auf die Halbleiterschicht aufgetragen. Die Elektroden wurden über Nacht bei 17°C inkubiert, wobei sich das TiO₂ auf den vorbereiteten Halbleitern abschied. Schließlich wurden die TiO₂-Anoden bei 450°C für 30 min gesintert und bis zur Verwendung in einem Exsikkator gelagert.

2.11.1.5 SnO₂-Solgel-Elektroden

SnO₂-Solgelelektroden wurden in Anlehnung an ein Rezept von Tian *et al.*, 2000 hergestellt. Ausgehend von einer 15 %igen kolloidalen SnO₂-Lösung (Partikelgröße 15 nm, Alfa Aesar, Karlsruhe) wurde eine Auftragslösung hergestellt, die 14,85 % SnO₂, 0,1 % Karbowachs und 0,1 % Triton X-100 enthielt. Zum Einpolymerisieren in die Halbleiterschicht konnten auch LHCII oder Farbstoffe mit dem Triton X-100 Anteil zu der SnO₂-Auftragslösung gegeben werden.

Die Ränder von ITO-Glasplatten wurden, wie unter 2.11.1.1 beschrieben, in Längsrichtung mit Scotch[®]-Klebeband abgeklebt. Anschließend wurde die SnO₂-Auftragslösung mit einem Spatel auf den Glasplatten ausgestrichen. Die Elektroden wurden bei Raumtemperatur getrocknet, wobei sich ein SnO₂-Gel ausbildete. Elektroden, in die Farbstoffe oder LHCII einpolymerisiert wurden, wurden direkt nach der Polymerisation vermessen. Elektroden, an die Farbstoffe oder LHCII aus einer Lösung adsorbiert werden sollten, wurden zuvor bei 450°C für 30 min gesintert.

2. Material und Methoden

2.11.1.6 Elektroden aus gefälltem SnO₂

Da Farbstoffe und LHCII nur in eingeschränktem Maße an SnO₂-Solgelelektroden adsorbiert werden konnten (siehe 3.2.2.2.1), wurden auch Elektroden aus gefälltem SnO₂ hergestellt, die in dieser Beziehung günstigere Eigenschaften aufwiesen (siehe 3.2.2.2.2).

In die SnO₂-Fällung wurden 10 ml einer 15 %igen kolloidalen Lösung (Partikelgröße 15 nm, Alfa Aesar, Karlsruhe) eingesetzt. Durch Zugabe von 500 µl konzentrierter HNO₃ und anschließendes Vortexen wurde die SnO₂ gefällt und konnte anschließend durch 2-minütiges Zentrifugieren bei 5000 upm und 20°C (Rotor: 1414, Hettich, Tuttlingen) pelletiert werden. Das Pellet (ca. 6 ml) wurde zweimal mit 5 ml EtOH resuspendiert und für 2 min bei 5000 upm und 20°C (Rotor: 1414, Hettich, Tuttlingen) abzentrifugiert. Nach den Waschschrritten betrug das Volumen des Pellets ca. 5 ml. Das SnO₂ wurde mit 500 µl 100% Glycerin und 550 µl 10 % Triton X-100 zu einer zähflüssigen Suspension verrührt und mit einem Spatel auf ITO-Glasplatten ausgestrichen, die wie in 2.11.1.1 beschrieben in Längsrichtung mit Scotch®-Klebeband abgeklebt waren. Nach Entfernen des Klebebandes wurden die Elektroden für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einen kalten Muffelofen gegeben. Der Ofen wurde mit den Elektroden über 2 h auf 450°C aufgeheizt. Nach weiteren 30 min bei 450°C wurde der Ofen abgestellt und die Ofenklappe leicht geöffnet. Zum Auskühlen wurden die Elektroden über Nacht im Ofen belassen und anschließend bis zur Verwendung in einem staubfreien Behältnis gelagert.

2.11.1.7 Elektroden aus SnO₂-Pulver

Anoden aus SnO₂-Pulver (Partikelgröße < 5 µm, Merck, Darmstadt) wurden ähnlich hergestellt, wie die TiO₂-Standardanoden (siehe 2.11.1.1). 6 g SnO₂ Pulver wurde zunächst mit 3 ml H₂O_{dest} und 1 ml 100 % Essigsäure gemörsert, um SnO₂-Aggregate aufzubrechen. Anschließend wurden in 1 ml Schritten 1ml 10 % Triton X-100 und 6 – 7 ml H₂O_{dest} zugegeben, wobei das SnO₂ zu einer cremigen Paste verrührt wurde. Mit einem Spatel wurde das SnO₂ auf ITO-Glasplatten (Pilkington) ausgestrichen, die, wie unter 2.11.1.1 beschrieben, an den Längsrändern mit Scotch®-Klebeband abgeklebt waren. Nach dem Trocknen der Elektroden, für 30 min bei Raumtemperatur unter einem Abzug, wurde das Klebeband entfernt. Die SnO₂-Elektroden wurden für 30 min in einem auf 450°C vorgeheizten Muffelofen gesintert und anschließend bis zur Verwendung in einem staubfreien Behältnis gelagert.

2.11.2 Kathoden für elektrochemische Zellen

Als Kathoden für elektrochemische Messungen wurden in der Regel ITO-Glasscheiben (Pilkington) verwendet, die mit Graphit beschichtet wurden. Das Graphit wurde durch Schraffieren mit einem Bleistift (Härtegrad 8B, Faber Castell, Nürnberg) aufgetragen. Die so hergestellten Graphitelektroden konnten wieder verwendet werden. Hierfür wurden sie vor und nach den elektrochemischen Messungen gründlich mit H₂O und EtOH gewaschen. Beim Waschen nutzte sich die Graphitbeschichtung ab und musste etwa alle drei Messungen erneuert werden (siehe 3.2.4.1).

2. Material und Methoden

Neben den Messungen mit Bleistift-beschichteten Elektroden wurden auch einige Experimente mit Kathoden durchgeführt, die mit Ruß (siehe 3.2.4.1) oder Gold (siehe 3.2.4.2) beschichtet waren. Der Ruß wurde auf die ITO-Glasscheiben aufgetragen, indem die Scheiben für ca. 30 s durch die Spitze einer Kerzenflamme geführt wurden. Die resultierende Beschichtung war recht instabil. Daher konnten die Elektroden jeweils nur einmal verwendet werden.

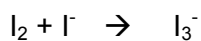
Goldelektroden wurden von J. Liu am MPI für Polymerforschung in Mainz hergestellt. Vor der Beschichtung wurden die ITO-Glasscheiben mit Wasser und Spülmittel, sowie Aceton und EtOH gründlich gespült und mit einem Mikrofaser-Reinigungstuch von Staub befreit. Die 50 nm dicke Goldschicht wurde durch Elektroevaporation auf die Scheiben aufgetragen.

2.11.3 Elektrolytssysteme für elektrochemische Zellen

Bei den meisten elektrochemischen Messungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde ein Iodid-Iod-Gemisch als Elektrolytssystem verwendet. Mit anderen Elektrolyten, wie 0,2 M KCl (siehe 3.2.3.3) Benzochinon und Benzohydrochinon (siehe 3.2.3.4) wurden nur einzelne Messungen durchgeführt.

2.11.3.1 Iodid-Iod-Elektrolyte

Iodid-Iod-Elektrolyte wurden in Anlehnung an O'Regan und Grätzel (1991) hergestellt. Iodid wurde dabei stets in einer Konzentration von 0,5 M, Iod in einer Konzentration von 0,04 M eingesetzt. Iod alleine war in polaren Lösungsmitteln nicht löslich. In Verbindung mit der Iodid-Komponente bildete sich jedoch ein Triiodid-Komplex, der die Löslichkeit erhöhte:



Um die Löslichkeit der Iodid-Komponente zu gewährleisten wurde das Kation des Iodids je nach Lösungsmittel variiert. In MeOH und EtOH wurde Tetrapropylammonium-Iodid (TPAI), in H₂O und Glycerin wurde Kaliumiodid eingesetzt. Bei Ethylenglycolderivaten als Lösungsmittel wurden entweder Kaliumiodid oder Litiumiodid verwendet.

2.11.3.2 Benzochinon-Benzohydrochinon-Elektrolyte

Benzochinon und Benzohydrochinon wurden ausschließlich in den unter 3.2.3.4 dargestellten Versuchen als Elektrolyt eingesetzt. Dabei wurden sowohl Messungen mit Benzohydrochinon als alleiniger Elektrolytkomponente, als auch mit einem Gemisch aus Benzohydrochinon und Benzochinon durchgeführt. Als Lösungsmittel für die Elektrolytkomponenten wurde EtOH oder H₂O_{dest} verwendet.

2. Material und Methoden

Benzohydrochinon war in beiden Lösungsmitteln gut löslich und wurde stets in einer Konzentration von 0,5 M eingesetzt. Zur Herstellung von Elektrolyten, die beide Komponenten enthielten, wurde zunächst Benzohydrochinon im jeweiligen Lösungsmittel vorgelegt. Zu dieser Lösung wurde Benzochinon entsprechend einer Konzentration von 0,04 M gegeben. Nach Vortexen und 10minütiger Inkubation im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 102 H, Bandelin electronic, Berlin) wurde ungelöstes Benzochinon in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in die elektrochemischen Messungen eingesetzt.

2.12 Adsorption von Farbstoffen und LHCII an Halbleiteranoden

Im Mittelpunkt der Bemühungen zur Entwicklung einer elektrochemischen Solarzelle mit LHCII standen die Experimente zur Adsorption von Farbstoffen und LHCII an Halbleiterelektroden. Wie unter 3.2.6 und 3.2.9 beschrieben, wurden zahlreiche Parameter variiert, um eine Optimierung der Adsorption zu erreichen. Im Folgenden wird daher nur die allgemeine Vorgehensweise bei der Belegung von Elektroden mit Farbstoffen und LHCII dargestellt.

2.12.1 Adsorption von Farbstoffen

Zur Belegung von Elektroden mit Farbstoff wurde um die 1,5 x 1,5 cm großen Halbleiterflächen ein Ring aus Knetwachs (Kinderknete, weiß, EBERHARD FABER, Neumarkt) auf die ITO-Glasplatten aufgetragen. Auf diese Weise entstand ein Becken, dessen Boden die Halbleiteroberfläche bildete, und dessen Wände aus der Knetmasse bestanden.

Auf die so präparierte Halbleiteroberfläche wurden 500 µl Farbstofflösung luftblasen-frei aufgetragen. Die Menge des aufgetragenen Farbstoffes lag zwischen 10 und 100 nmol. Polare Farbstoffe wurden in EtOH oder 10 mM NaP pH 6, 0,1 % LM aufgetragen. Bei hydrophoben Farbstoffen wurden Aceton oder Tetrahydrofuran als Lösungsmittel verwendet. Die Ansätze wurden in der Regel über Nacht bei 10°C im Dunkeln inkubiert. Ansätze, bei denen der Farbstoff in Aceton aufgetragen wurde, wurden für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, da das Aceton bei längeren Inkubationszeiten verdunstete. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand von den Elektroden abgenommen. Das Volumen des Überstandes wurde gemessen und die Farbstoffkonzentration photometrisch bestimmt. Durch den Vergleich mit der aufgetragenen Farbstoffmenge wurde die Belegungsdichte auf der Elektrodenoberfläche errechnet. Schließlich wurde die Knetmasse von der Elektrode entfernt und das ITO-Glas um die Halbleiterfläche vorsichtig mit EtOH gereinigt.

2. Material und Methoden

2.12.2 Adsorption von LHCII

LHCII wurde auf ähnliche Weise an Halbleiterelektroden adsorbiert wie Farbstoffe (siehe 2.12.1). In den Experimenten, die zu Beginn dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden die Komplexe vor der Belegung der Elektroden mittels Dichtegradientenultrazentrifugation aufgereinigt (siehe 2.4.3.2) und in Dichtegradientenlösung (5 mM NaP pH 6, 0,1 % LM, 0,5 M Saccharose) auf die Halbleiteroberfläche aufgetragen. In späteren Versuchen wurde auf die Dichtegradientenultrazentrifugation verzichtet, oder die Saccharose vor der Adsorption der LHCII an den Halbleiter entfernt (siehe 2.4.4). Die Komplexe wurden in 5 mM NaP pH 6, 0,1 % LM, 10 % Glycerin auf die Elektroden aufgetragen. Das Glycerin diente dabei zur Stabilisierung der Komplexe (siehe 3.2.6.1.2).

Vor der Adsorption von LHCII wurden die Halbleiterelektroden, wie unter 2.12.1 beschrieben mit Knetwachs abgedichtet. Die aufgetragene LHCII-Menge konnte, je nach Versuch, variieren, lag jedoch meist bei 0,1 nmol LHCII-Trimeren pro cm² sichtbarer Elektrodenoberfläche. Das Auftragsvolumen betrug stets 500 µl. Die Ansätze wurden über Nacht, gelegentlich auch über mehrere Tage, bei 10°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Überstände von den Elektroden abgenommen. Zur Berechnung der Komplex-Belegungsdichte auf den Elektroden wurde das Volumen der Überstände und die LHCII-Konzentration bestimmt. Vor der spektroskopischen Charakterisierung der Elektroden wurde die Knetmasse entfernt und die den Halbleiter umgebende ITO-Glasfläche mit EtOH gereinigt.

2.13 Spektroskopische Charakterisierung der elektrochemischen Zellen

Nach der Adsorption von Farbstoffen oder LHCII (siehe 2.12) wurden die Halbleiterelektroden spektroskopisch charakterisiert. Absorptions- und Fluoreszenzspektren wurden in der Regel von getrockneten Halbleiteranoden aufgenommen. Für die Erstellung von Wirkungsspektren wurden die Anoden mit Elektrolytlösung und Graphitkathoden zu einer Messzelle zusammengesetzt.

2.13.1 Absorptions- und Fluoreszenzspektren

Absorptionsspektren von Halbleiterelektroden wurden mit einem MPS 2000 Photometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) aufgenommen, für das ein selbst angefertigter Einsatz zur Vermessung von Glasplatten zur Verfügung stand. Um Streuung und Reflexion zu minimieren wurde der vermessene Ausschnitt der Elektrode mit einer selbst angefertigten Blende aus schwarzem Photokarton auf 1 x 1cm begrenzt. Die aufgenommenen Spektren konnten auf Millimeterpapier ausgedruckt werden. Für eine Digitalisierung der Daten wurden die Zahlenwerte der einzelnen Datenpunkte ausgedruckt und manuell in ein Tabellenkalkulationsprogramm übertragen.

2. Material und Methoden

Alle photometrischen Messungen wurden mit folgenden Parametern durchgeführt:

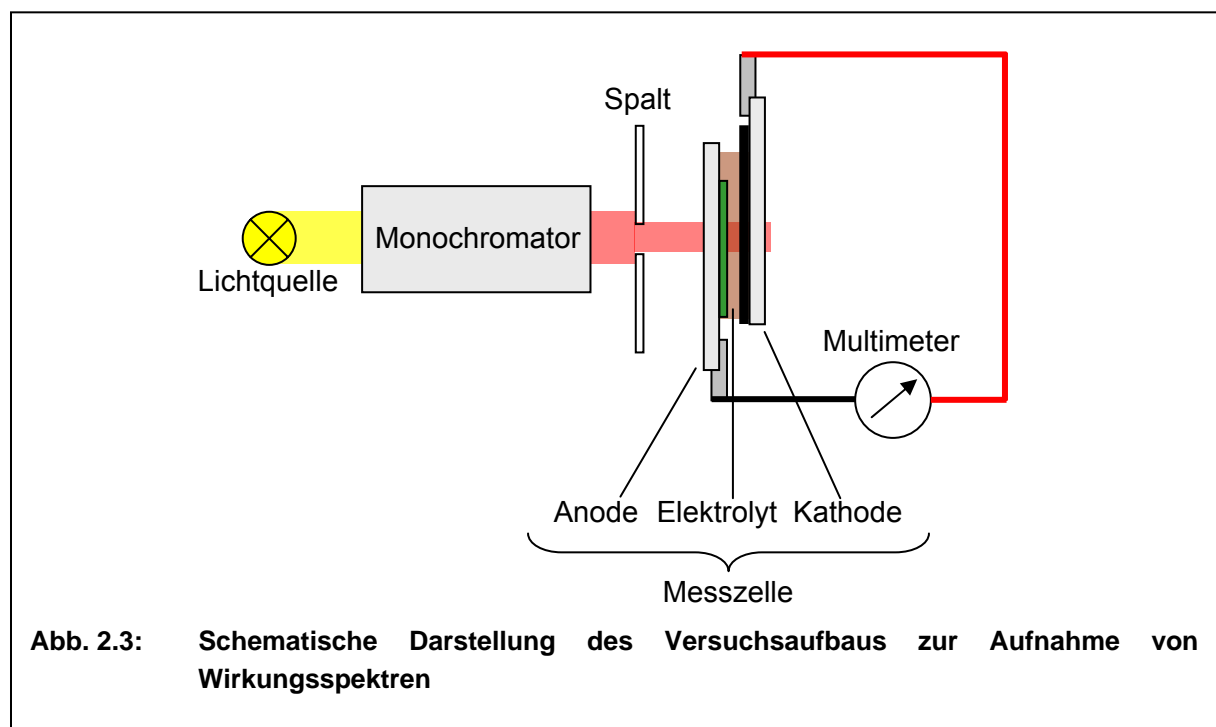
Detektionsmodus:	Absorption oder Transmission
Wellenlängenbereich:	200 nm – 850 nm
Increment:	1 nm für den Ausdruck der Spektren 5 nm zur Digitalisierung der Datenpunkte
Spaltbreite:	1 nm

Vor der Messung wurde eine Nulllinie ohne Elektrode (in Luft) aufgenommen. Als Referenz diente das Spektrum einer Halbleiterelektrode aus der gleichen Herstellungcharge, die nicht mit Farbstoff oder LHCII belegt war.

Fluoreszenzspektren von Elektroden wurden mit den unter 2.9.3 angegebenen Parametern am Fluoreszenzspektrometer Fluoromax-3 (ISA SPEX / Jobin Yvon, Grasbrunn) mit aufgenommen. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte frontal zur Anregung. Um bei Emissions- und Excitationsspektren von immobilisiertem LHCII den Einfluss von gestreutem Anregungslicht auf das Signal zu minimieren, wurde ein Langpass-Kantenfilter (OG 550 Farbglass, ITOS GmbH, Mainz) zwischen die Probe und den Emissionsmonochromator gesetzt.

2.13.2 Wirkungsspektren

Die Wirkungsspektren von elektrochemischen Zellen wurden mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometers Fluoromax-2 (ISA SPEX / Jobin Yvon, Grasbrunn) aufgenommen. Dabei wurde lediglich die Lichtquelle des Spektrometers zur Belichtung der Zelle verwendet. Die Fluoreszenz wurde nicht detektiert. Der Messaufbau ließ sich schematisch wie folgt darstellen:



2. Material und Methoden

Nach dem Einsetzen der Messzelle in die Apparatur wurde gewartet, bis sich ein konstanter Dunkelstrom einstellte. Die Messung wurde mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Messmodus:	Excitationsspektrum
Excitation:	300 – 860 nm
Integrationszeit:	10 s
Increment:	5 nm
Spaltbreite:	Ex: 3 nm

Durch die Einschränkung der Spaltbreite auf 3 nm wurde eine sichtbare Anodenfläche von 1,5 x 0,2 cm (= 0,3 cm²) bestrahlt. Während der Messung wurde der von der Zelle produzierte Strom mit Hilfe eines Digitalmultimeters gemessen. Für jede Wellenlänge wurde nach einer Bestrahlungsdauer von ca. 5 s der entsprechende Stromwert notiert und nach Beendigung der Messung manuell in ein Tabellenkalkulationsprogramm übertragen.

2.13.3 Bestimmung des IPCE-Wertes

Bei dem IPCE-Wert (incident monochromatic photon-to-current conversion efficiency) handelt es sich um einen allgemein verwendeten Standard zum Vergleich von Wirkungsspektren elektrochemischer Solarzellen. Der IPCE-Wert drückt aus, welcher Prozentsatz der Photonen, die bei einer Wellenlänge auf eine Solarzelle eingestrahlt werden, von der Zelle in Strom umgewandelt werden.

1993 wurde von Nazeeruddin *et al.* folgende Gleichung für die Berechnung des IPCE-Wertes angegeben:

$$IPCE = \frac{[(1,25 \cdot 10^3) \cdot \text{Photostromdichte } [\mu\text{A}/\text{cm}^2]]}{[\text{Wellenlänge } [\text{nm}] \cdot \text{Photonenfluss } [\text{W}/\text{m}^2]]} \quad (\text{IX})$$

Zur Berechnung der Photostromdichte wurden die in den Wirkungsspektren aufgenommenen Stromwerte, die aus der Bestrahlung von 0,3 cm² Anodenfläche resultierten (siehe 2.13.2) auf die Fläche von 1 cm² hochgerechnet.

Neben dem Wirkungsspektrum der Solarzelle wurde zur Ermittlung des IPCE-Wertes ein Lampenspektrum der Lichtquelle benötigt, mit dessen Hilfe der Photonfluss bei den betrachteten Wellenlängen ermittelt werden konnte. Das Lampenspektrum wurde mit einem Quantensensor (Eigenbau, Fachbereich Biologie, Mainz) aufgenommen, dessen Detektor an die Position der Messzelle in den Strahlengang des zur Aufnahme der Wirkungsspektren verwendeten Fluoreszenzspektrometers (Fluoromax-2, ISA SPEX / Jobin Yvon, Grasbrunn) gesetzt wurde. Zunächst wurde das Lampenspektrum mit den unter 2.13.2 beschriebenen Einstellungen aufgenommen. Wie unter 2.13.2 erwähnt, deckte das eingestrahlte Licht bei einer Spaltbreite von 3 nm eine Fläche von 1,5 x 0,2 cm ab. Der Lichtstrahl war damit zu schmal, um die gesamte Detektorfläche des Quantensensors zu bedecken. Aus diesem Grund wurde im Eichpunkt des Quantensensors bei 600 nm die Lichtintensität mit einer Spaltbreite von 20 nm gemessen.

2. Material und Methoden

Die erhöhte Spaltbreite gewährleistete eine vollständige Abdeckung des Detektors durch das eingestrahlte Licht, die Aufnahme eines Lampenspektrums war mit diesen Einstellungen jedoch nicht möglich. Daher wurden die, bei der Aufnahme des Lampenspektrums mit 3 nm Spaltbreite ermittelten Lichtintensitäten, anhand des Referenzwertes bei 600 nm und 20 nm Spaltbreite auf die Fläche des Detektors hochgerechnet.

Das so erstellte Lampenspektrum stellte die Lichtintensität (I_L) für jede der betrachteten Wellenlängen in $\mu\text{mol Photonen pro m}^2\text{s}$ dar. Der Photonenfluss konnte aus den gemessenen Werten wie folgt berechnet werden:

$$\text{Photonenfluss [W/m}^2] = N_y \cdot h \cdot \nu = N_y \cdot h \cdot c / \lambda \quad (\text{X})$$

mit:

- N_y = Anzahl der Photonen einer Wellenlänge = $I_L [\mu\text{mol/m}^2\text{s}] \cdot 6,02214 \cdot 10^{17}$
- h = Plancksches Wirkungsquant = $6,62 \cdot 10^{-34}$ [Js]
- ν = Frequenz des eingestrahlichten Lichts [s^{-1}]
- c = Lichtgeschwindigkeit = $3 \cdot 10^8$ [m/s]
- λ = Wellenlänge [m]

Alternativ zu zur Berechnung nach Nazeeruddin *et al.* (1993) konnte der IPCE-Wert aus den aufgenommenen Wirkungs- und Lampenspektren auch auf direkterem Weg ermittelt werden:

$$\text{IPCE}(\lambda) [\%] = \frac{N_{e^-}}{N_y} \cdot 100 \quad (\text{XI})$$

mit:

- N_{e^-} = Anzahl der abgegebenen Elektronen

Die Anzahl der abgegebenen Elektronen (N_{e^-}) ergab sich aus dem gemessenen Strom nach folgendem Zusammenhang:

$$N_{e^-} = 6,3 \cdot 10^{18} \cdot Q = 6,3 \cdot 10^{18} \cdot I \cdot t \quad (\text{XII})$$

mit:

- Q = Elektrizitätsmenge [C]
- I = Stromstärke [A]
- t = Zeit [s]; (in diesem Fall $t = 1\text{ s}$)

Da Nazeeruddin *et al.* (1993) bei der Erstellung von Gleichung VIII verschiedene physikalische Konstanten miteinander verrechneten und den resultierenden Wert auf $1,25 \cdot 10^3$ rundeten, waren die nach den Gleichungen VIII und X berechneten IPCE-Werte nicht ganz identisch (siehe auch Rupperecht, 1998). Das in 3.2.1.1 dargestellte Wirkungsspektrum wurde mit Hilfe von Gleichung VIII erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche zur einzelmolekülspektroskopischen Untersuchung der Dynamik des N-Terminus des LHCII

Wie in 1.2.3 beschrieben, ist der N-Terminus des LHCII von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Antennenfunktion des Komplexes. Da durch kristallographische Untersuchungen (Kühlbrandt *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2004) nur unvollständige Momentaufnahmen dieses Bereiches gewonnen werden konnten, wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob die Struktur des N-Terminus dynamischen Veränderungen unterworfen ist.

Mögliche Änderungen der Struktur sollten über den Energietransfer zwischen den Chlen des LHCII und einem N-terminal gekoppelten Farbstoff sichtbar gemacht werden. Voraussetzung für die Messung war, dass ein Wechsel der Position des N-Terminus zu einer Veränderung von Orientierung und Abstand des gebundenen Farbstoffes zu den Chlen des LHCII führte, die wiederum eine Variation des Energietransfers zur Folge hatte. Die Messungen sollten mit einem Konfokalmikroskop an farbstoffmarkierten LHCII in Lösung durchgeführt werden, wobei die Verteilung der Energietransfereffizienzen unter Komplexe, die sich durch den Fokus bewegten Aufschluss über die Anteile unterschiedlicher Konformationen an der LHCII-Population geben sollte.

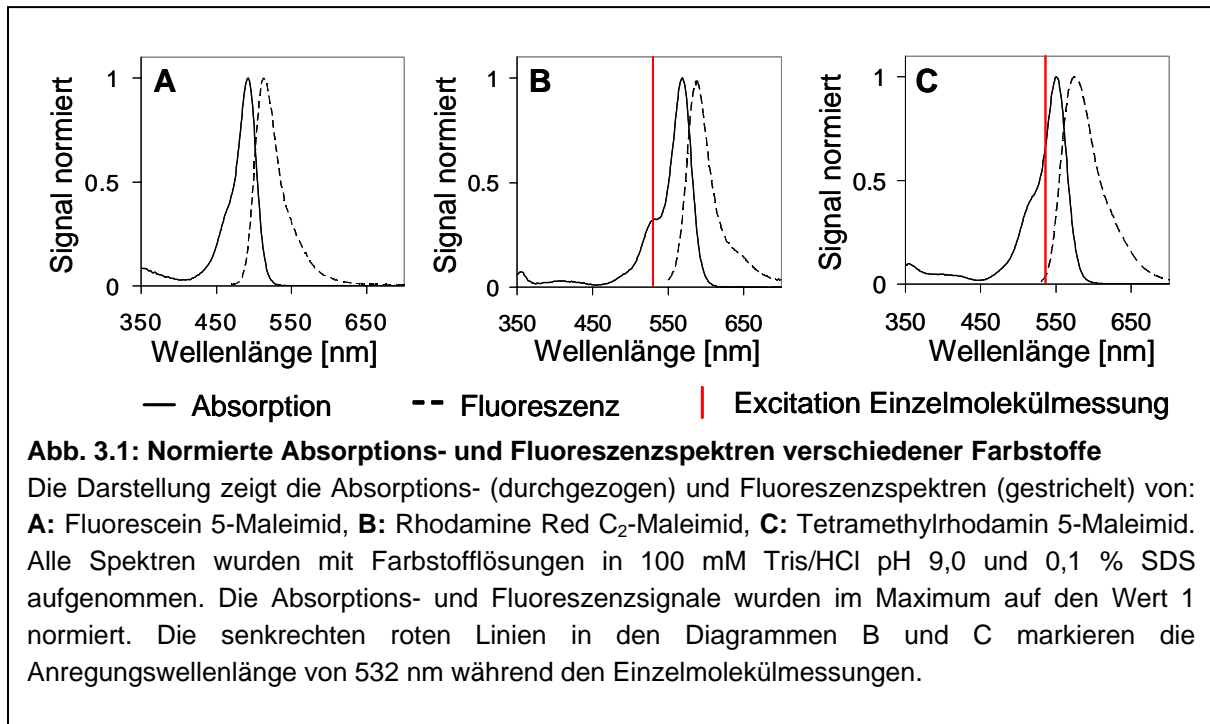
3.1.1 Auswahl eines Farbstoffes für die Energietransfermessungen mit LHCII

Für die Messung der Dynamik des N-Terminus von LHCII über den Energietransfer zwischen den Chlen des Komplexes und einem Farbstoff standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen konnte ein infrarot absorbierender Farbstoff als Akzeptor der Anregungsenergie der Chle eingesetzt werden. Zum anderen konnte ein Farbstoff an LHCII gekoppelt werden, der in der Grünlücke der Chle absorbierte und die Energie auf LHCII übertrug.

Für die Messung des Energietransfers von LHCII auf einen Akzeptor standen zu Beginn dieser Arbeit die IR-Farbstoffe Cy5.5, Alexa Fluor 680 und BTI zur Verfügung. Aus den Fluoreszenzemissionsspektren der Farbstoffe wurde deutlich, dass die Fluoreszenz von Cy5.5 (Wolf-Klein, 2001) und Alexa Fluor 680 (Lion, 2001) stark mit der Emission von LHCII überlappte. Eine separate Detektion der LHCII- und Farbstofffluoreszenzen, die für die Einzelmolekülspektroskopie vorausgesetzt wurde, war daher nicht möglich. BTI fluoreszierte mit einem Maximum bei 735 nm so langwellig, dass die Emissionsspektren von LHCII und Farbstoff nur wenig überlappten. Die Fluoreszenzquantenausbeute des Farbstoffes in wässrigem Medium war mit 0,03 (Wolf-Klein, 2001) jedoch so gering, dass die Detektion von einzelnen Farbstoffmolekülen nicht möglich gewesen wäre.

3. Ergebnisse

Aus diesem Grund wurde entschieden, einen Farbstoff einzusetzen, der in der Grünlücke der LHCII-Absorption angeregt werden konnte. In die engere Auswahl kamen die Farbstoffe BODIPY-Iodacetamid, Fluorescein 5-Maleimid, Rhodamine-Red C₂-Maleimid und Tetramethylrhodamin 5-Maleimid.



Die Betrachtung der Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Farbstoffe ergab, dass die Fluoreszenz von BODIPY-Iodacetamid, bezogen auf die Absorption, zu niedrig war, um eine ausreichende Detektion in der Einzelmolekülspektroskopie zu gewährleisten. Die Absorption von Fluorescein 5-Maleimid (Abb. 3.1.A) zwischen 450 nm und 500 nm überlappte stark mit der Chl *b*- und Carotinoidabsorption des LHCII, was eine annähernd separate Anregung des Farbstoffes unmöglich machte.

Rhodamine Red C₂-Maleimid (Abb. 3.1.B) und Tetramethylrhodamin 5-Maleimid (Abb. 3.1.C) eigneten sich dagegen gut für die Einzelmolekülmessungen, da der kurzweilige Teil des Absorptionsmaximums genau im Minimum der LHCII-Absorption lag. Die Entscheidung fiel dabei auf Tetramethylrhodamin 5-Maleimid, weil es bei der letztendlich verwendeten Anregungswellenlänge von 532 nm eine höhere Absorption aufwies.

3. Ergebnisse

In Abb. 3.2 sind Fluoreszenzemissionsspektren von LHCII-Tetramethylrhodamin, einer unmarkierten LHCII-Referenz und einer Farbstofflösung abgebildet, die mit einer Anregung bei 532 nm aufgenommen wurden.

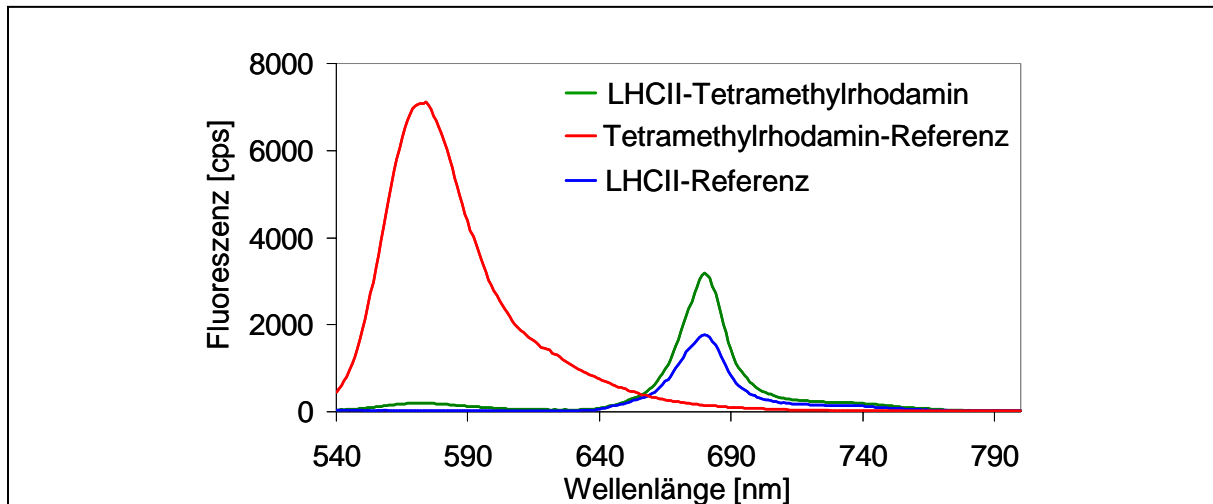


Abb. 3.2: Fluoreszenzspektrum zur Berechnung des Energietransfers von Tetramethylrhodamin auf LHCII

Lhcb1 des Klon S3Ch wurde mit Tetramethylrhodamin 5-Maleimid markiert. Das markierte Protein wurde über eine präparative PAGE von unmarkiertem Protein und freiem Farbstoff getrennt und mit Pigmenttotalextrakt rekonstituiert. Um den Energietransfer von Tetramethylrhodamin auf LHCII zu bestimmen, wurden Fluoreszenzspektrum des Ansatzes, sowie von gleich konzentrierten Farbstoff- und LHCII-Referenzen aufgenommen. Wie bei den Einzelmolekülmessungen erfolgte die Anregung der Proben bei 532 nm. Die Emission wurde zwischen 540 nm und 800 nm detektiert. Aus der Löschung der Tetramethylrhodaminfluoreszenz wurde eine Energietransfereffizienz von 98 % ermittelt. Die Transfereffizienzen, die aus der Zunahme der LHCII-Fluoreszenz errechnet wurden, lag bei 86 %. Für die Berechnung wurde eine LHCII-Fluoreszenzquantenausbeute von 0,154 angenommen (Wolf-Klein, 2001).

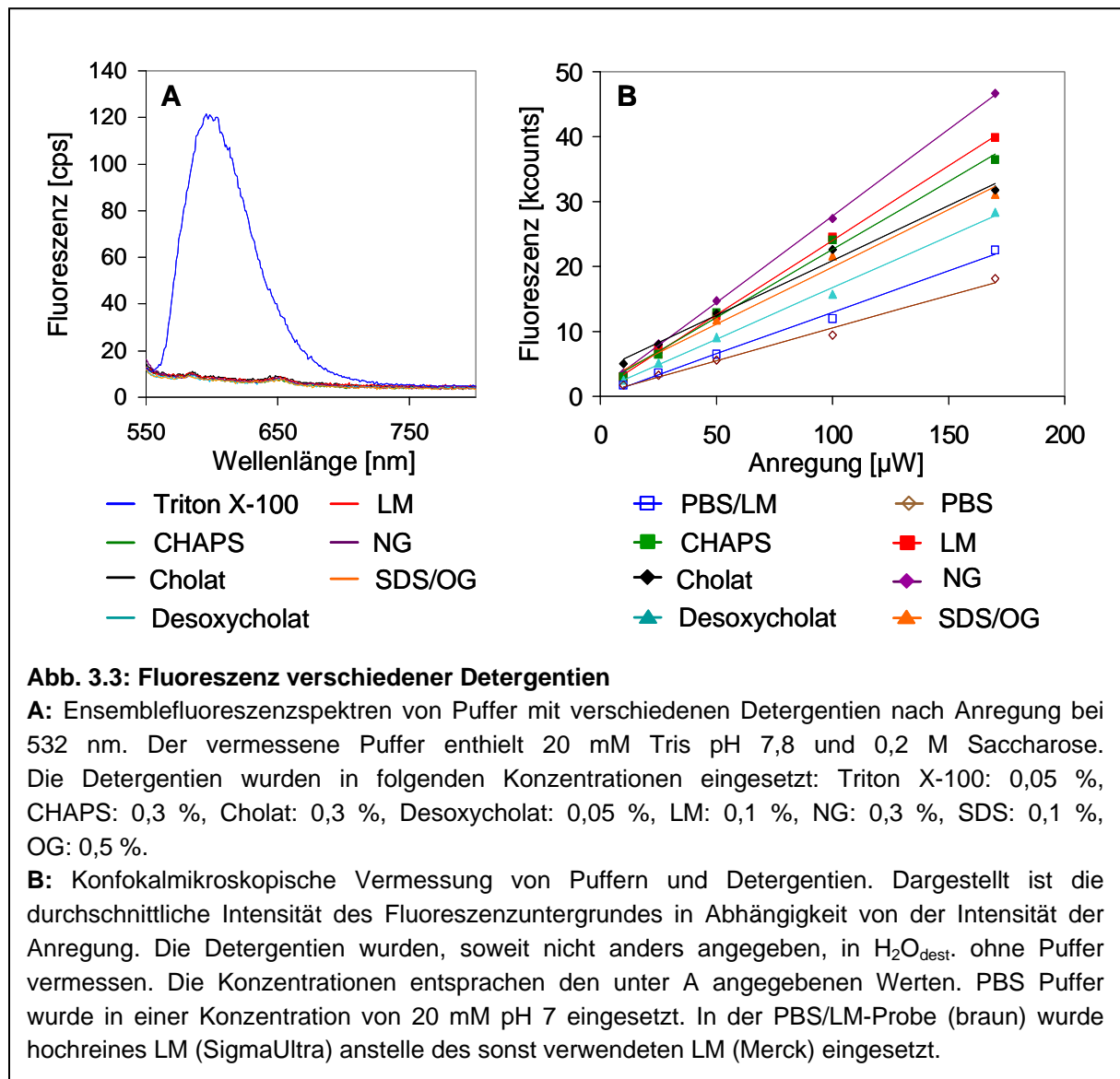
An den Ensemblespektren war zu erkennen, dass ein großer Teil der Anregungsenergie des Farbstoffes auf LHCII übertragen wurde. Das Spektrum des unmarkierten LHCII zeigte, dass die Komplexe auch in der Grünlücke der Chlorophylle zu einem erheblichen Maße direkt angeregt werden konnten. Der Energietransfer von Tetramethylrhodamin führte lediglich zu einer Verdoppelung der Fluoreszenz von 1760 cps auf 3195 cps.

3.1.2 Einfluss von Detergentien auf das Fluoreszenz-Hintergrundsignal

Ein erhebliches Problem bei der Messung der Fluoreszenz von einzelnen LHCII-Molekülen in Lösung stellten fluoreszierende Verunreinigungen in der Messlösung dar.

Die Fluoreszenz des enthaltenen Puffers konnte durch Aufreinigung über Aktivkohle vermindert werden. Besonders viele Verunreinigungen waren jedoch in den Detergentien enthalten, die benötigt wurden, um LHCII in Lösung zu halten und nicht gereinigt werden konnten. Um die Intensität der Hintergrundfluoreszenz zu minimieren, wurde die Fluoreszenz verschiedener Detergentien überprüft (Abb. 3.3).

3. Ergebnisse



Schon in den Ensemblespektren der Detergentien zeigte sich, dass Triton X-100 Verunreinigungen enthielt, die nach Anregung bei 532 nm sehr stark fluoreszierten (Abb. 3.3.A). In der konfokalmikroskopischen Messung wurde bei Desoxycholat und hochreinem LM (SigmaUltra) die geringste Fluoreszenz beobachtet (Abb. 3.3.B).

In weiteren Experimenten erwies sich Desoxycholat als ungeeignet für einzelmolekülspektroskopische Messungen an LHCII, da bei der eingesetzten Desoxycholatkonzentration auch nach der Denaturierung von LHCII noch ein vollständiger Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* zu sehen war. Dadurch war eine Unterscheidung von gefalteten und denaturierten Komplexen in der Konfokalmikroskopie nicht mehr möglich.

Die hohe Fluoreszenz von SDS und OG erschwerte die einzelmolekülspektroskopische Beobachtung von Farbstoff-markiertem Lhcb1-Apoprotein, das als Referenz für die Messung an nativen Komplexen dienen sollte (siehe 3.1.3).

3. Ergebnisse

3.1.3 Farbstoff-markiertes BSA und WSCP als Referenzen für die Energietransfermessung

Als Referenzen für die Einzelmolekülmessung an LHCII-Tetramethylrhodamin sollten Messungen an unmarkiertem LHCII, sowie an markiertem Lhcb1-Apoprotein ohne Pigmente durchgeführt werden. Da das Lhcb1-Apoprotein in LM nicht löslich war, wurde eine Kombination von 0,1 % SDS und 0,5 % OG zur Solubilisierung des Proteins verwendet. In der Einzelmolekülspektroskopie war die Hintergrundfluoreszenz des SDS-OG-Gemisches jedoch so hoch, dass die markierten Proteine nicht mehr eindeutig identifiziert werden konnten.

Aus diesem Grund wurde überprüft, ob die löslichen Proteine BSA (Bovine Serum Albumin) und WSCP (Water Soluble Chlorophyll Protein) als farbstoffmarkierte Referenz eingesetzt werden konnten. Entscheidend für die Eignung als Referenz für LHCII waren dabei die Größe der Proteine, sowie die Markierbarkeit mit Tetramethylrhodamin 5-Maleimid.

WSCP war mit 22 kDa nur etwas kleiner als Lhcb1 (25,5 kDa) und enthielt zwei Cysteine in der Aminosäuresequenz, die mit dem SH-reaktiven Farbstoff markiert werden konnten. In der Konfokalmessung zeigte sich jedoch, dass WSCP, aufgrund der fehlenden Detergenzhülle, schneller diffundierte als LHCII. In der Folge konnten die einzelnen Protein-Farbstoff-Spitzen nicht mehr aufgelöst werden. Es war nur eine Erhöhung des Fluoreszenzuntergrundes zu beobachten.

Im Gegensatz zu WSCP war BSA mit 67 kDa deutlich größer als Lhcb1. Die Sequenz des Proteins enthielt zahlreiche Cysteine (z.B. 35 Cysteine bei P02769, ExPASy), weshalb die Markierung mit einem niedrigen Farbstoff/Protein-Verhältnis von 1/1 erfolgte (siehe 2.7.2.1). In der Einzelmolekülmessung war zu sehen, dass BSA mit einer ähnlichen Geschwindigkeit wie LHCII diffundierte. Die Spitzen der Farbstoff-Protein-Fluoreszenz waren teilweise sehr hoch, was darauf schließen ließ, dass mehrere Farbstoffe an ein BSA-Molekül gebunden waren.

3.1.4 Einzelmolekülspektroskopische Messungen an LHCII-Tetramethylrhodamin

Die Fluoreszenzmessungen an einzelnen LHCII-Molekülen wurden mit einem Konfokalmikroskop durchgeführt, wie es unter 2.10 beschrieben ist. Dabei wurden die Fluoreszenzsignale von Tetramethylrhodamin (540 nm – 620 nm; grün) und LHCII (> 652 nm; rot) auf zwei separaten Kanälen detektiert. Die LHCII-Komplexe befanden sich in Lösung auf einem Objektträger mit Vertiefung, der luftblasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt war. Um das Volumen einzuschränken, in dem die Detektion erfolgte, wurde das Objektiv des Mikroskops so eingestellt, dass der Fokus knapp unter dem Deckglas lag.

3. Ergebnisse

Fluoreszierende Partikel, LHCII wie Verunreinigungen, die durch den Fokus diffundierten, riefen in der zeitaufgelösten Detektion spitze Signalmaxima hervor (Abb. 3.4).

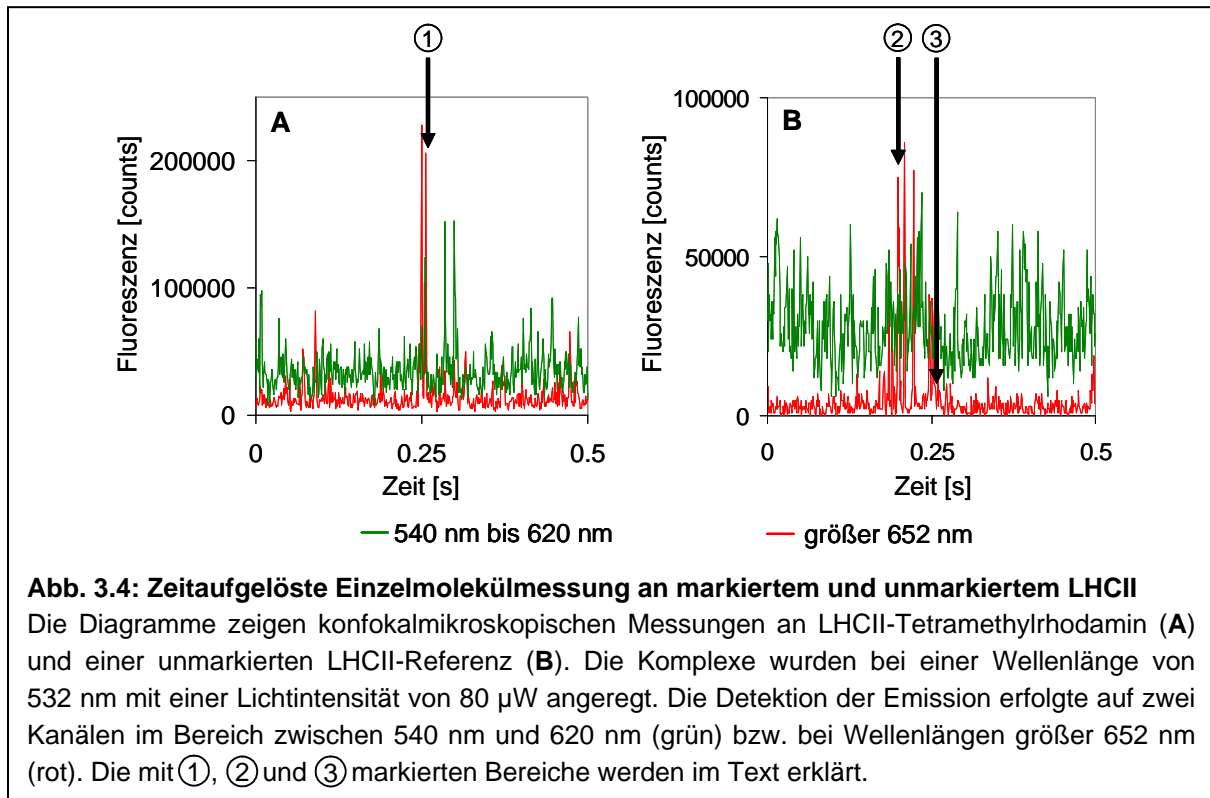


Abb. 3.4: Zeitaufgelöste Einzelmolekülmessung an markiertem und unmarkiertem LHCII

Die Diagramme zeigen konfokalmikroskopischen Messungen an LHCII-Tetramethylrhodamin (A) und einer unmarkierten LHCII-Referenz (B). Die Komplexe wurden bei einer Wellenlänge von 532 nm mit einer Lichtintensität von 80 μ W angeregt. Die Detektion der Emission erfolgte auf zwei Kanälen im Bereich zwischen 540 nm und 620 nm (grün) bzw. bei Wellenlängen größer 652 nm (rot). Die mit ①, ② und ③ markierten Bereiche werden im Text erklärt.

Da die Diffusion der LHCII-Moleküle sehr schnell war, waren die zu beobachtenden Signalspitzen häufig nur eine Millisekunde breit, was der maximalen zeitlichen Auflösung der Messapparatur entsprach. Eine Unterscheidung zwischen fluoreszierenden Verunreinigungen und LHCII-Komplexen gestaltete sich daher schwierig. Einzig das gleichzeitige Auftreten einer Spitze im grünen und im roten Kanal wies darauf hin, dass es sich um ein farbstoffmarkiertes LHCII-Molekül handelte (Abb. 3.4.A.①). Außerdem traten in der unmarkierten LHCII-Referenz deutlich weniger Signalspitzen im grünen Kanal auf (Abb.3.4.B).

Neben einzelnen LHCII-Molekülen (Abb. 3.4.B.②) waren auch LHCII-Aggregate zu sehen, die sich durch ein breiteres Signal mit geringerer Intensität von den einzelnen Komplexen unterschieden (Abb. 3.4.B.③).

Im Verlauf der Messung kam es zu einer Adsorption von LHCII-, Pigmentaggregaten oder Verunreinigungen an die Oberfläche des Deckglases, wodurch sich die Untergrundfluoreszenz erhöhte (Abb. 3.4.B. grüner Kanal). Diese Verschiebung des Signalhintergrundes musste durch gelegentliche Nachjustierung des Objektivs und der Detektoren ausgeglichen werden.

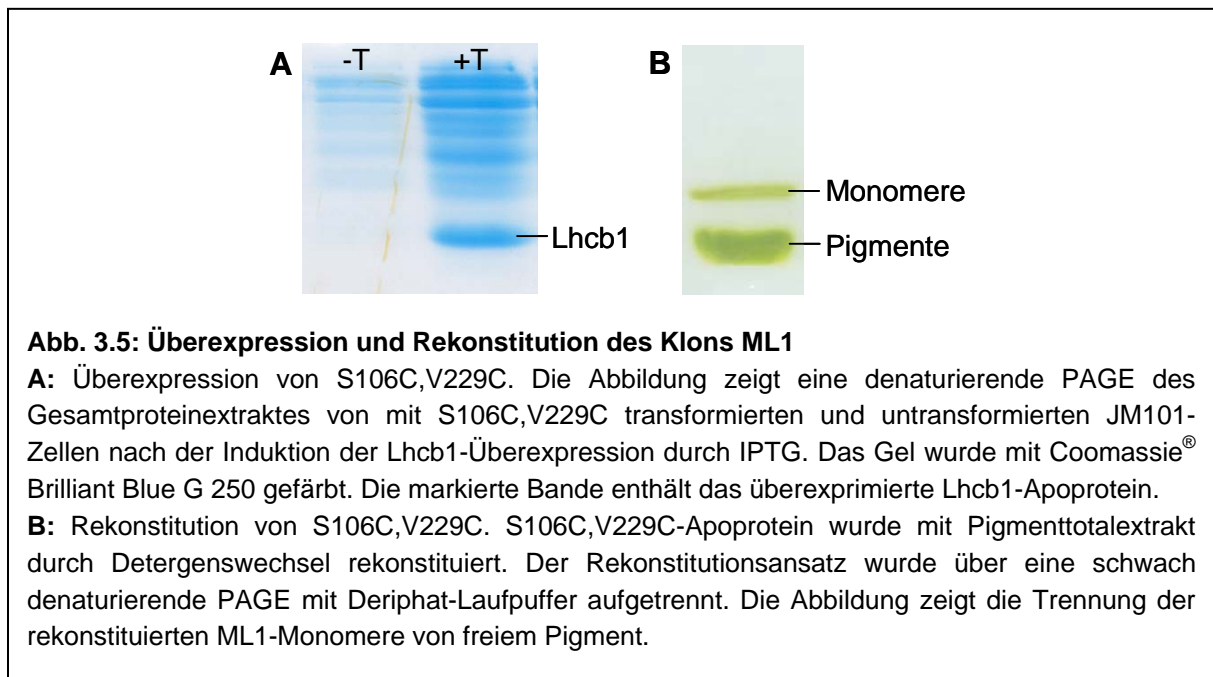
Nachdem sich die Unterscheidung zwischen LHCII-Molekülen und Verunreinigungen in den ersten Messungen als schwierig erwiesen hatte, wurde versucht, die Diffusion der Komplexe durch Erhöhung der Viskosität der Messlösung zu verlangsamen. Die Experimente waren jedoch nicht erfolgreich, da sich durch Zusatz von Glycerin oder Saccharose die Untergrundfluoreszenz der Lösung stark erhöhte. Derivate von Ethylenglycol und Ethylencarbonat führten in höheren Konzentrationen zu einer deutlichen Destabilisierung des LHCII und konnten ebenfalls nicht eingesetzt werden.

3. Ergebnisse

In der Folge wurde entschieden, die Diffusion von LHCII durch Insertion einzelner Komplexe in Liposomen zu verlangsamen. Die Versuche hierzu wurden von S. Boggasch fortgesetzt. Als Alternative zu den Messungen in Lösung wurde eine Immobilisierung der farbstoffmarkierten LHCII-Komplexe an einer Oberfläche erwogen (siehe 3.1.5).

3.1.5 Herstellung eines Lhcb1-Klones für die orientierte Bindung von Monomeren an Oberflächen

Um die orientierte Bindung von LHCII-Monomeren an Oberflächen zu ermöglichen, wurde der Lhcb1-Klon S106C,V229C (ML1) hergestellt, der zwei Cysteine auf der luminalen Seite des Komplexes, an den Positionen 106 und 229 in der Proteinsequenz, enthielt (siehe 2.5). Im Anschluss an die Klonierung wurde das S106C,V229C-Insert sequenziert. Dabei entsprach das Sequenzierungsergebnis der erwarteten Sequenz (Anhang).



Das ML1-Apoprotein konnte nach Anzucht von transformierten JM101-Zellen in LB-Medium durch Induktion mit IPTG überexprimiert (Abb. 3.5.A) und anschließend nach der Detergenswechsel-Methode rekonstituiert werden. Im Vergleich zu dem Protein mit der nativen Sequenz (D7f.3) waren keine Unterschiede in der Rekonstitutionsausbeute zu sehen.

In weiteren, von S. Boggasch durchgeführten, Versuchen wurde zunächst die Insertion einzelner LHCII in Liposomen verfolgt. Daher wurden bis zum Ende dieser Arbeit keine Experimente zur orientierten Immobilisierung von S106C,V229C durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.2 Versuche zur Integration von Lichtsammlerkomplexen in eine elektrochemische Solarzelle

In der Natur besteht die Hauptaufgabe des LHCII darin, Sonnenlicht zu absorbieren und die so gewonnene Energie an das Reaktionszentrum des Photosystems II weiterzuleiten (siehe 1.2.2). Im initialen Schritt der Photosynthese wird die Anregungsenergie im Reaktionszentrum in eine Ladungstrennung umgewandelt.

Dieser Vorgang der Erzeugung eines elektrischen Potentials durch Umwandlung von Lichtenergie wurde bei der Entwicklung von elektrochemischen Solarzellen kopiert (O'Regan und Grätzel, 1991). Ausgehend von den Ähnlichkeiten zwischen pflanzlichen Reaktionszentren und elektrochemischen Solarzellen wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob LHCII als Lichtantenne in einer Solarzelle eingesetzt werden kann.

3.2.1 Festlegung von Standards zum Vergleich der Wirkungsspektren verschiedener elektrochemischer Solarzellen

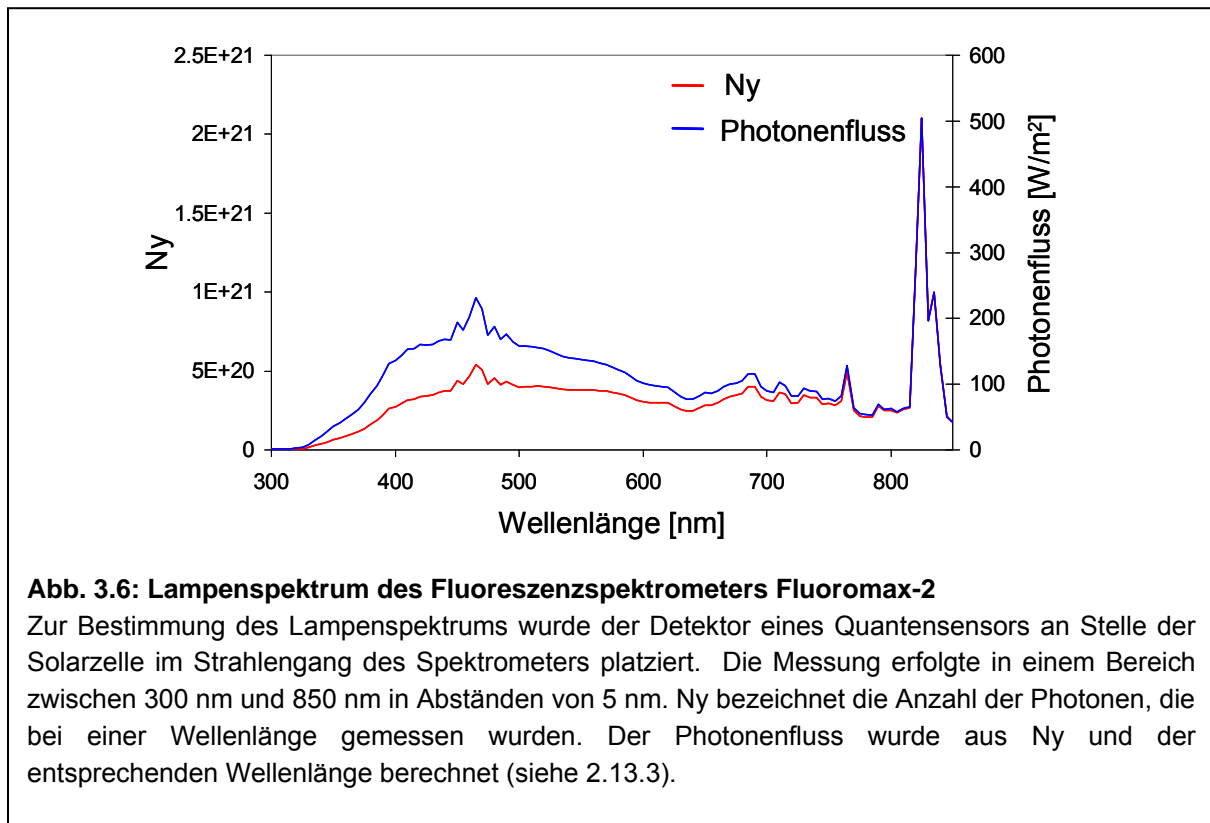
Innerhalb dieser Arbeit wurden Experimente an elektrochemischen Solarzellen mit verschiedenen Halbleitermaterialien und einer weiten Bandbreite an Sensibilisatorfarbstoffen durchgeführt. Als Standards für den Vergleich der einzelnen Messungen miteinander wurden der IPCE-Wert, sowie eine Normierung der Stromwerte im Maximum der Elektronenübergänge im Halbleiter verwendet. Beide Bezugsgrößen werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.2.1.1 Der IPCE-Wert

Der gängigste Standard, der in der Literatur zur Darstellung von Wirkungsspektren verwendet wird, ist der sog. IPCE-Wert (incident monochromatic photon-to-current conversion efficiency; Nazeeruddin *et al.*, 1993). Der IPCE-Wert beschreibt, welcher Prozentsatz der Photonen einer Wellenlänge, die auf eine Solarzelle eingestrahlt werden, in eine Ladungstrennung umgewandelt wird. Eine genaue Beschreibung der Berechnung des IPCE-Wertes findet sich unter 2.13.3.

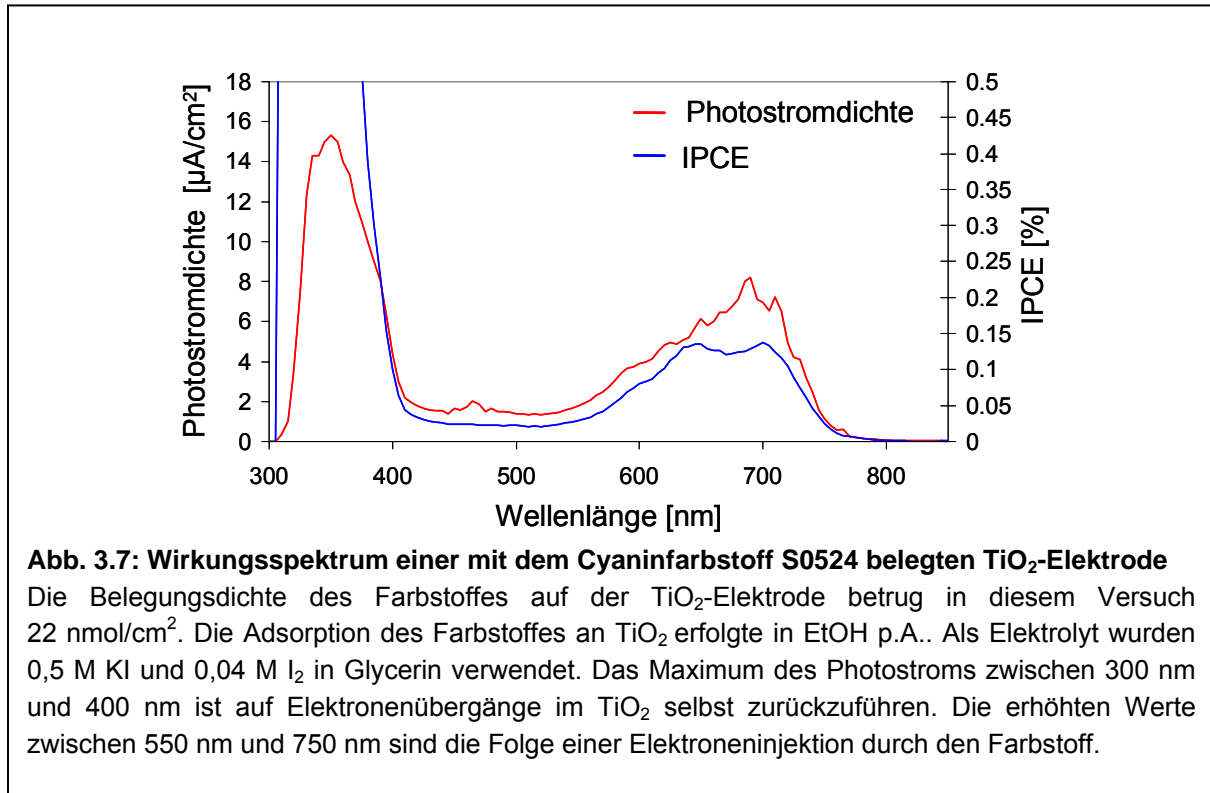
3. Ergebnisse

Um für aufgenommene Wirkungsspektren die IPCE-Werte zu berechnen, wurde zunächst ein Lampenspektrum der verwendeten Lichtquelle aufgenommen (Abb. 3.6).



Der Quantensensor, der für die Aufnahme des Lampenspektrums verwendet wurde, weist im Bereich zwischen 440 nm und 950 nm einen näherungsweise linearen Verlauf der Detektorsensitivität auf. Jenseits dieses Wellenlängenbereiches nimmt die Sensitivität rapide ab, weshalb die gemessene Lichtintensität außerhalb des linearen Bereiches deutlich unter den tatsächlichen Werten liegt. Für die IPCE-Spektren, die mit diesem Lampenspektrum berechnet wurden, bedeutete das eine Überbewertung des IPCE-Wertes bei Wellenlängen kleiner 440 nm (Abb. 3.7). Die Information über den Anteil des Stroms, der durch Elektronenübergänge im Halbleiter selbst erzeugt wurde, ging somit vollständig verloren.

3. Ergebnisse



Wie das Lampenspektrum, wiesen auch viele der aufgenommenen Wirkungsspektren bei Wellenlängen größer 650 nm einen unregelmäßigen Verlauf auf. Die Korrektur bezüglich des Lampenspektrums, bei der Erstellung des IPCE-Spektrums, führte häufig zu einer Glättung des Signals in diesem Bereich (siehe Abb. 3.7). In einigen Fällen trat jedoch auch eine Verstärkung des Rauschens auf, was auf eine Verschiebung der jeweiligen Wirkungsspektren gegenüber dem verwendeten Lampenspektrum hindeutete.

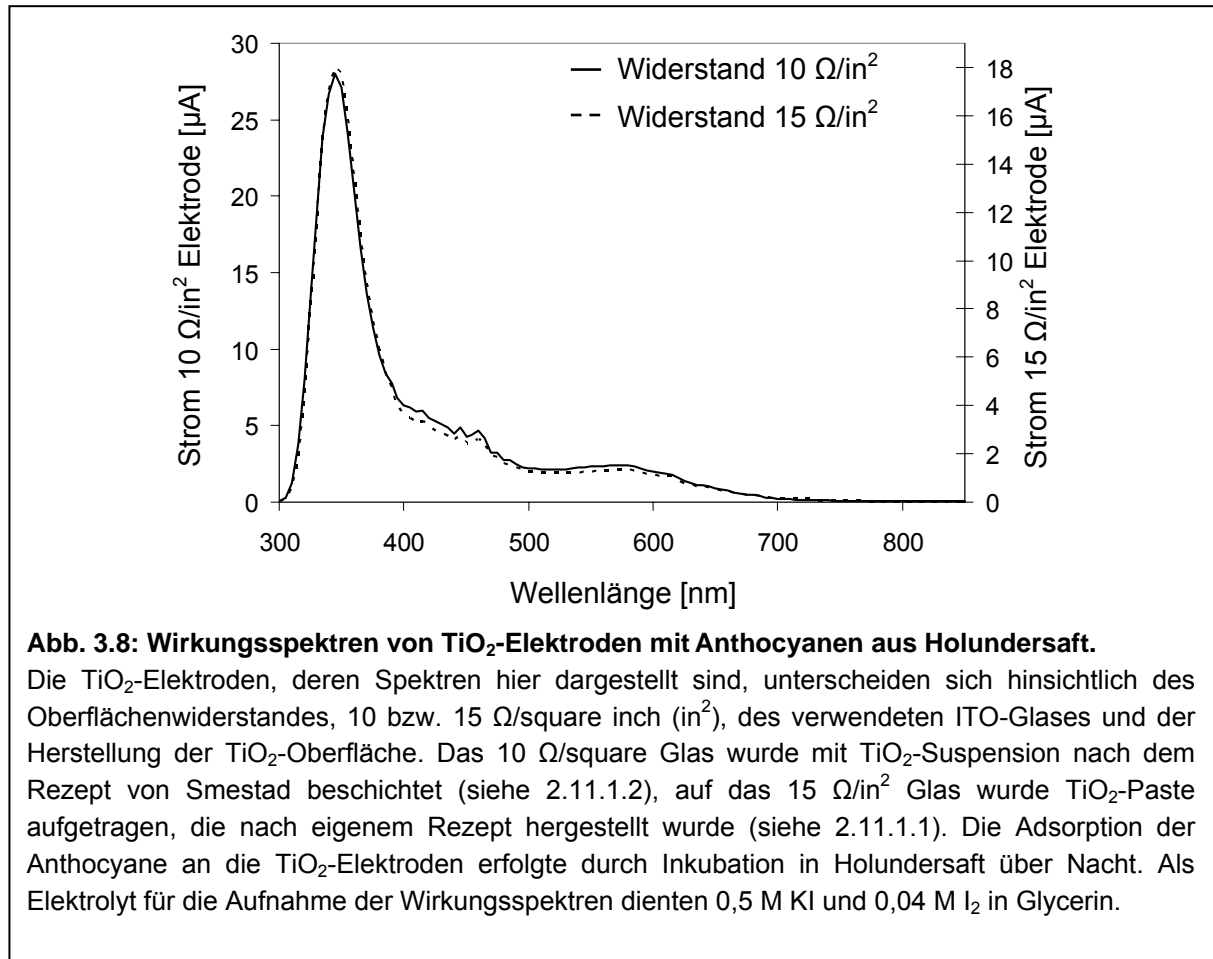
Aufgrund dieser Verschiebung der Wirkungsspektren gegenüber dem separat aufgenommenen Lampenspektrum und der Einschränkung des Wellenlängenbereichs, über den der IPCE-Wert ermittelt werden konnte, wurde zum Vergleich der Spektren untereinander die Normierung im Maximum der Elektronenübergänge im Halbleiter (siehe 3.2.1.2) als interner Standard herangezogen.

3.2.1.2 Die Normierung bezüglich des Halbleiter-Maximums

Das Maximum der Elektronenübergänge im Halbleiter lag bei allen Wirkungsspektren von TiO₂- und SnO₂-Elektroden, die im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen wurden, zwischen 335 nm und 355 nm. Die absolute Stromintensität im Maximum hing jedoch stark von den einzelnen Komponenten der Messzelle ab und konnte um mehrere Größenordnungen variieren. Mit SnO₂-Zellen wurden absolute Stromwerte um 1 µA im Halbleitermaximum gemessen, bei TiO₂-Zellen konnten Werte von über 30 µA erreicht werden. Großen Einfluss auf die Stromstärke hatten dabei das verwendete Elektrolytsystem sowie das Lösungsmittel, in dem die Elektrolytkomponenten gelöst waren (vgl. 3.2.3.1).

Trotz der Varianz der absoluten Stromwerte konnte meist eine gute Übereinstimmung der Form der Wirkungsspektren beobachtet werden (Abb. 3.8).

3. Ergebnisse



Die Abbildung zeigt eine vergleichende Messung an einer nach eigenem Rezept hergestellten TiO₂-Zelle und einer Zelle, die mit einem Solarzellenbausatz von Sol Ideas™ angefertigt wurde. Für die Messung wurden Anthocyane aus Holundersaft als Sensibilisatoren eingesetzt, da sie eine höhere Photostabilität aufweisen, als die Chlorophyllderivate und die meisten kommerziellen Farbstoffe, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Trotz der Unterschiede im Rezept für die Herstellung der TiO₂-Elektrode und der Leitfähigkeit der Glas-Platten ist die Form der beiden Spektren nahezu identisch. Die nach eigenem Rezept hergestellte Zelle lieferte dabei etwa ein Drittel weniger Strom als die Zelle aus dem Bausatz, was gut mit dem höheren Oberflächenwiderstand der verwendeten Glasplatten korreliert.

Bei Messungen mit verschiedenen Farbstoffen oder Elektrolytsystemen wurden teilweise deutlich größere Abweichungen in der Form des Halbleiter-Maximums beobachtet, als bei der in Abb. 3.8 dargestellten Messung (siehe 3.2.3.1). Um bei diesen Messungen eine zusätzliche Verminderung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse durch unterschiedliche Parameter bei der Herstellung der TiO₂-Elektroden zu vermeiden, wurden stets nur Elektroden aus der gleicher Herstellungscharge verglichen.

3. Ergebnisse

3.2.2 Herstellung und Charakterisierung verschiedener Halbleiterelektroden

Bis zum heutigen Tage wurde eine große Bandbreite an Materialien für den Einsatz in elektrochemischen Solarzellen entwickelt. Neben den gängigen Halbleitermaterialien, Titandioxid (O'Regan und Grätzel, 1991) und Zinndioxid (Tian *et al.*, 2000), rücken organische Halbleiter zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses (Das *et al.*, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Titandioxid und Zinndioxid als Elektrodenmaterialien verwendet, da sie einfach zu verarbeiten sind und sich als geeignete Substrate für die Adsorption von Farbstoffen (O'Regan und Grätzel, 1991; Tian *et al.*, 2000) und Proteinen (Topoglidis *et al.*, 1998; Topoglidis *et al.*, 2003a) erwiesen haben.

3.2.2.1 Titandioxidelektroden

Schon in früheren Versuchen (Lion, 2001) konnte gezeigt werden, dass sich Titandioxid als Substrat für die Adsorption von LHCII und Farbstoffen eignete. Ausgehend von diesen Erfahrungen wurde versucht, die Eigenschaften der Halbleiteroberfläche durch eine alternative Herstellungsweise, die Solgel-Methode, und die Adsorption von TiO_2 aus einer TiCl_4 -Lösung zu verbessern.

3.2.2.1.1 TiO_2 -Solgel-Elektroden

Neben den nach dem standardisierten Rezept angefertigten TiO_2 -Elektroden (siehe 2.11.1.1) wurden auch TiO_2 -Elektroden nach der Solgel-Methode hergestellt (siehe 2.11.1.3). Die Methode für die Herstellung dieser Elektroden wurde ausgehend von dem Rezept für SnO_2 -Solgel-Elektroden (siehe 2.11.1.5) entwickelt. Die TiO_2 -Suspension, welche auf die ITO-Glasplatte aufgetragen wurde, bestand aus einer 15%igen, basischen TiO_2 -Suspension, die mit 0,05%igem Triton X-100 versetzt wurde. In mehreren Handversuchen wurde die Menge der aufgetragenen Suspension, sowie das TiO_2 /Triton X-100-Verhältnis variiert, um eine möglichst große TiO_2 -Schichtdicke zu erhalten. Nach dem Auftragen auf die Glas-Platte wurde die TiO_2 -Suspension bei Raumtemperatur eingetrocknet, wobei sich eine gelartige TiO_2 -Schicht ausbildete. Eine zu hohe Auftragsmenge oder ein zu niedriger Triton X-100-Anteil führten dabei zur Ausbildung von Rissen in der Halbleiterschicht. Das endgültige Rezept zur Herstellung von TiO_2 -Solgel-Elektroden ist unter 2.11.1.3 dargestellt.

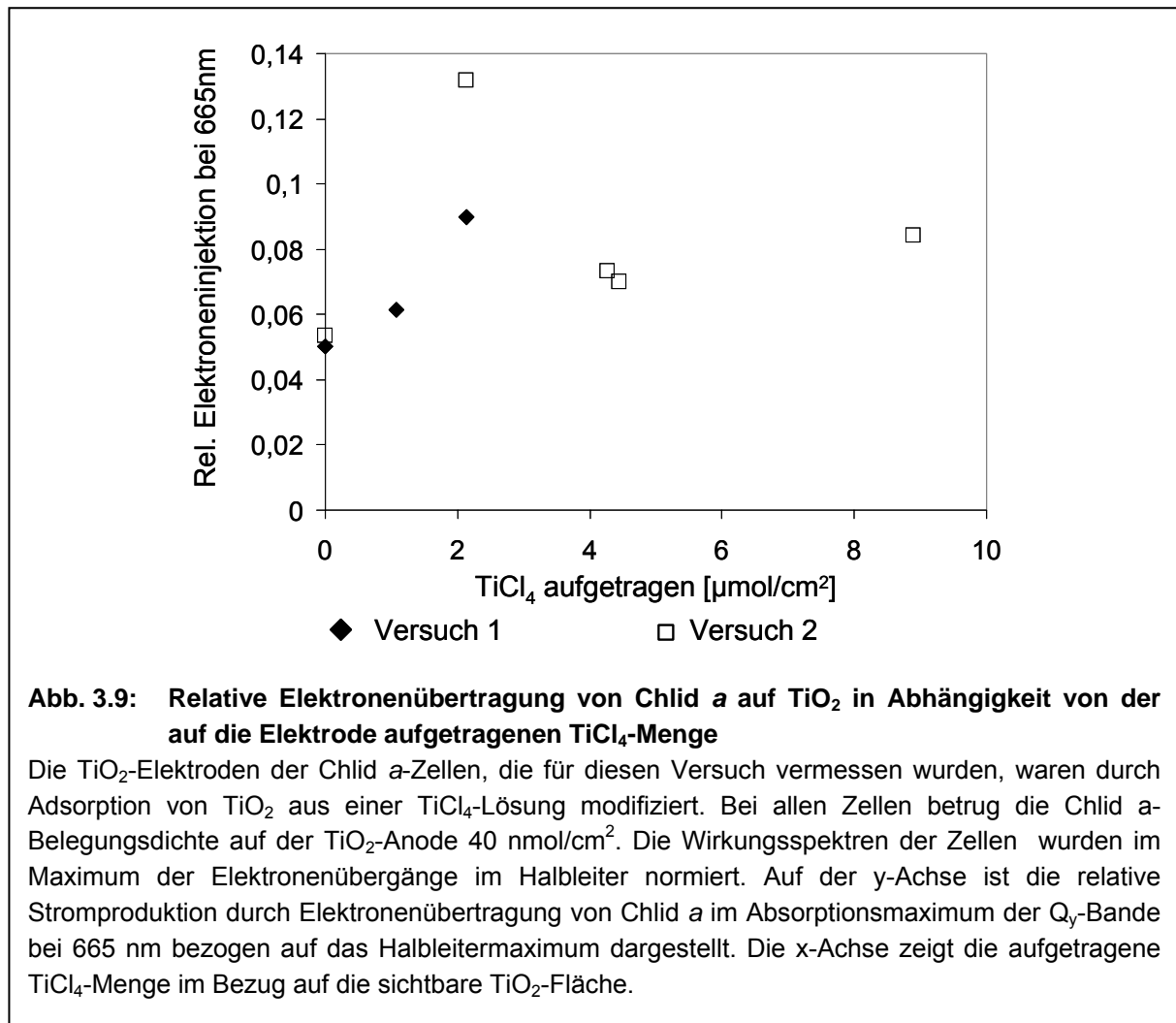
Die durch Eintrocknen der TiO_2 -Suspension hergestellte Halbleiterschicht wies zwar nur eine geringe Stabilität gegenüber mechanischen Beschädigungen auf, es war jedoch nicht nötig, die Elektrode einem Sinterprozess zu unterziehen, um eine leitfähige TiO_2 -Schicht zu erhalten. Der Verzicht auf das Sintern der Elektrode ermöglichte das Einbetten von LHCII (siehe 3.2.5) und Farbstoffen (siehe 3.2.8) in den Halbleiter.

3. Ergebnisse

3.2.2.1.2 Versuche zur Optimierung der TiO_2 -Oberfläche durch Adsorption von TiO_2 aus einer TiCl_4 -Lösung

In dieser Arbeit wurden Titandioxidelektroden aus Titandioxid P25 von Degussa verwendet, das zu einem geringen Anteil metallische Verunreinigungen enthält. Diese Verunreinigungen im Titandioxid können Elektronen, die sich durch das Leitungsband des Halbleiters bewegen, abfangen und so den Wirkungsgrad der TiO_2 -Zelle vermindern. Zur Verbesserung der Reinheit der TiO_2 -Oberfläche wurden Versuche durchgeführt, in denen Titandioxid aus einer TiCl_4 -Lösung an die Oberfläche der TiO_2 -Elektroden adsorbiert wurde. Das hierbei verwendete Verfahren ist in Abschnitt 2.11.1.4 dargestellt.

An die so modifizierten Elektroden wurde Chlid *a* adsorbiert. Vergleichsmessungen mit TiO_2 -Elektroden, auf die kein TiCl_4 aufgetragen wurde, zeigten eine starke Streuung der Messwerte (Abb. 3.9).



Trotz der Streuung der Messwerte war zu erkennen, dass die relative Elektroneninjektion durch Chlid *a*, bezogen auf das TiO_2 -Maximum, bei Elektroden, die mit TiCl_4 behandelt worden waren, stets höher war, als bei Elektroden, an die kein zusätzliches TiO_2 adsorbiert wurde. Der Effekt war jedoch so gering, dass im Weiteren auf eine Modifizierung der Elektrodenoberfläche mit TiCl_4 verzichtet wurde.

3. Ergebnisse

3.2.2.2 Zinndioxidelektroden

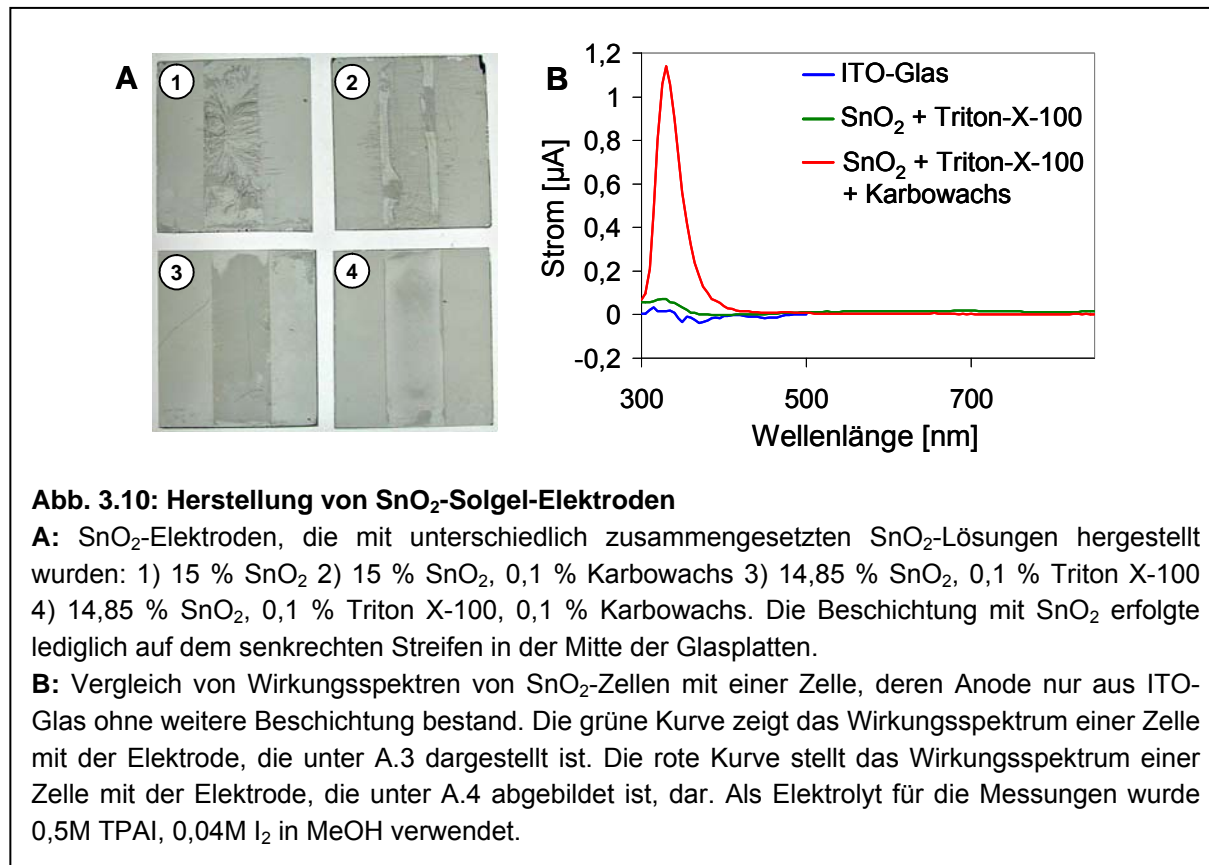
Als Alternative zu Titandioxid wurde Zinndioxid als Elektrodenmaterial eingesetzt. Das Leitungsband von SnO_2 zeichnet sich, im Vergleich zu TiO_2 , durch ein positiveres Redoxpotential aus, was diesen Halbleiter zu einem geeigneten Akzeptor für die Elektronenübertragung von Terrylenfarbstoffen macht (siehe 3.2.10).

3.2.2.2.1 SnO_2 -Solgel-Elektroden

Die Herstellung von SnO_2 -Elektroden nach der Solgel-Methode erfolgte in Anlehnung an ein Rezept von Tian *et al.* (2000). Eine 15 %ige kolloidale SnO_2 -Lösung wurde auf ITO-Glasoberflächen aufgetragen und eingetrocknet. Wurde nur SnO_2 auf die ITO-Schicht aufgetragen, kam es zur Ausbildung von SnO_2 -Kristallen, die sich leicht von der Glasplatte ablösten (Abb. 3.10.A.1). Die Zugabe von Karbowachs, einem Polyethylenglycol-Derivat, verhinderte die Ausbildung dieser Kristalle (Abb. 3.10.A.2). Wurde zusätzlich Triton X-100 zu der Lösung gegeben, so verbesserte sich die Adhäsion des Zinndioxids an die ITO-Schicht deutlich (Abb.3.10.A.3). Die Kombination von Triton-X-100 und Karbowachs führte schließlich zur Ausbildung einer gelartigen Halbleiterschicht, die sich beim Sintern zu einer transparenten, glasartigen Oberfläche verfestigte (3.10.A.4).

Aus den Wirkungsspektren der SnO_2 -Zellen wurde ersichtlich, dass nur, wenn Triton X-100 und Karbowachs zu der Zinndioxidlösung gegeben wurden, eine leitfähige Elektrodenoberfläche entstand (Abb. 3.10.B). Die Leitfähigkeit war dabei nicht davon abhängig, ob die Halbleiterelektrode direkt nach dem Eintrocknen der SnO_2 -Lösung verwendet oder zunächst gesintert wurde. Das endgültige Rezept für SnO_2 -Solgel-Elektroden wird in Abschnitt 2.11.1.5 erläutert.

3. Ergebnisse



Farbstoffe und LHCII adsorbierten nur in sehr geringem Maße an die gesinterten SnO_2 -Elektroden. Zu einer sichtbaren Farbstoff- und Proteinbelegung kam es nur in Bereichen, in denen die Elektrodenoberfläche eine rauere Struktur aufwies. Ein solcher Bereich ist in Abb. 3.10.A.4 als dunkler Schatten innerhalb der SnO_2 -Schicht zu erkennen. Wurde auf den Sinterprozess verzichtet, so löste sich die Halbleiteroberfläche während der Inkubation in Protein- oder Farbstofflösung vollständig auf. Der Verzicht auf das Sintern ermöglichte es jedoch, während der Herstellung der Elektroden, geringe Mengen an Farbstoffen (siehe 3.2.8) und LHCII (siehe 3.2.5) in die Halbleiterschicht einzupolymerisieren.

3.2.2.2.2 SnO_2 -Elektroden aus gefälltem SnO_2

Eine weitere Möglichkeit zur Beschichtung von ITO-Glas mit Zinndioxid bestand darin, das SnO_2 durch Zugabe von Säure zu fällen und als Paste auf die Glasoberfläche aufzutragen (siehe 2.11.1.6).

Nach dem Eintrocknen der SnO_2 -Schicht und anschließendem Sintern entstanden auf diese Weise Elektroden mit einer semitransparenten, rauen Halbleiteroberfläche. In Wirkungsspektren der gesinterten Zellen war ein deutliches Strommaximum durch Elektronenübergänge in der SnO_2 -Schicht zu sehen. Auch die Adsorption von LHCII (siehe 3.2.6.2.2) und Farbstoffen (siehe 3.2.10) an die Elektroden war möglich. Die bei der Adsorption von LHCII erreichten Belegungsdichten lagen deutlich über den Werten, die mit SnO_2 -Solgel-Elektroden erreicht wurden, waren jedoch niedriger als bei den untersuchten Titandioxidelektroden.

3. Ergebnisse

3.2.2.2.3 SnO₂-Elektroden aus SnO₂-Pulver

Da LHCII an Elektroden aus gefälltem SnO₂ in geringerem Maße adsorbierte, als an TiO₂-Elektroden, wurden Versuche zur Herstellung von Elektroden aus pulverförmigem Zinndioxid durchgeführt. Die SnO₂-Partikel, die hierfür verwendet wurden, waren mit bis zu 5 µm deutlich größer, als die in anderen Versuchen eingesetzten TiO₂-Partikel (21 nm) und die Partikel in der kolloidalen SnO₂-Lösung (15 nm).

Die SnO₂-Elektroden wurden auf die gleiche Weise hergestellt, wie die Elektroden aus Titandioxidpulver (siehe 2.11.1.1). Beim Trocknen der SnO₂-Schicht auf der ITO-Oberfläche bildete sich eine stabile, undurchsichtige Elektrodenoberfläche aus. Beim Abkühlen der Elektroden nach dem Sintern kam es jedoch in den meisten Fällen zu einer vollständigen Ablösung des Zinndioxids von ITO-Glas. Die Zinndioxidschicht blieb dabei in sich stabil und löste sich in Form eines Plättchens von der Glasoberfläche ab. Auch eine Verlangsamung des Abkühlungsprozesses führte nicht zu einer Verbesserung der Adhäsion.

Wirkungsspektren, die mit Elektroden durchgeführt wurden, bei denen sich das SnO₂ nicht gelöst hatte, zeigten kein Stromsignal durch Elektronenübergänge im Halbleiter, was darauf hindeutete, dass entweder die Halbleiterschicht selbst nicht in der Lage war, Elektronen zu leiten, oder kein elektrischer Kontakt zwischen SnO₂ und ITO-Glas zustande kam.

Versuche zur Adsorption von LHCII an die SnO₂-Elektroden führten zu Belegungsdichten, die mit der LHCII-Adsorption an Titandioxid vergleichbar waren.

Da es jedoch nicht möglich war, die Elektroneninjektion durch Farbstoffe zu messen, wurden keine weiteren Versuche mit diesen Elektroden durchgeführt.

3.2.3 Einfluss verschiedener Elektrolytsysteme auf die Eigenschaften der Solarzellen

Für die Integration von LHCII in eine elektrochemische Solarzelle ist das Elektrolytsystem von entscheidender Bedeutung. Da es in direktem Kontakt zu den an der Halbleiteroberfläche adsorbierten Komplexen steht, darf es die Proteine nicht schädigen. Andererseits muss der Elektrolyt in der Lage sein, die Sensibilisatorfarbstoffe der Zelle nach der Elektronenübertragung auf den Halbleiter zu regenerieren.

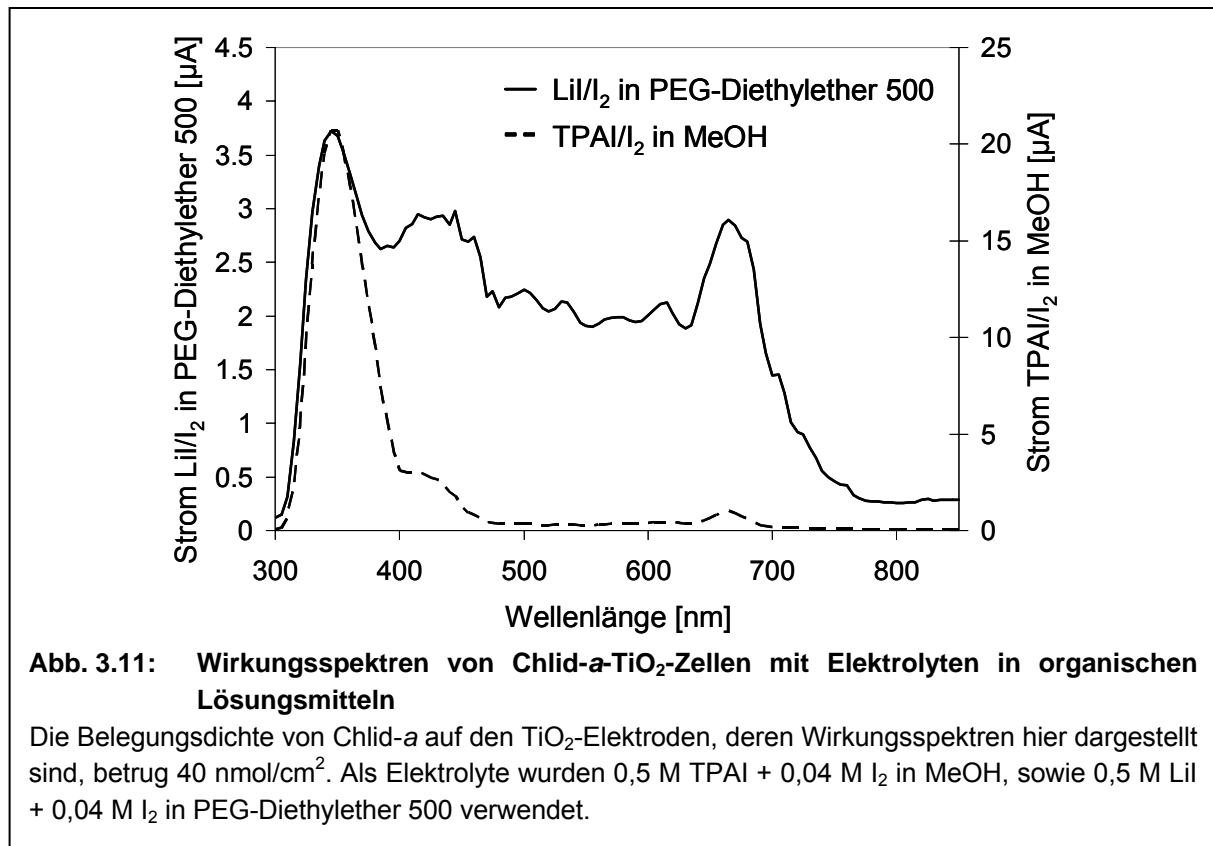
3.2.3.1 Elektrolyte aus Iodid und Iod in organischen Lösungsmitteln

In elektrochemischen Solarzellen des Grätzel-Zell-Typs werden meist Elektrolytsysteme eingesetzt, welche aus einem Gemisch aus Iodid und Iod bestehen, das in einem organischen Lösungsmittel gelöst wird. Typische Lösungsmittel, die hierbei verwendet werden, sind EtOH, MeOH oder Acetonitril.

Für eine Grätzel-Zelle, in der Pigment-Protein-Komplexe als Lichtsammler eingesetzt werden sollen, sind diese Lösungsmittel nicht geeignet, da sie unmittelbar zur Denaturierung der Komplexe führen. Die Pigmente, welche an das Proteingerüst gebunden sind, gehen dabei in die Lösungsmittelphase über und stehen somit nicht mehr als Lichtantennen zur Verfügung.

3. Ergebnisse

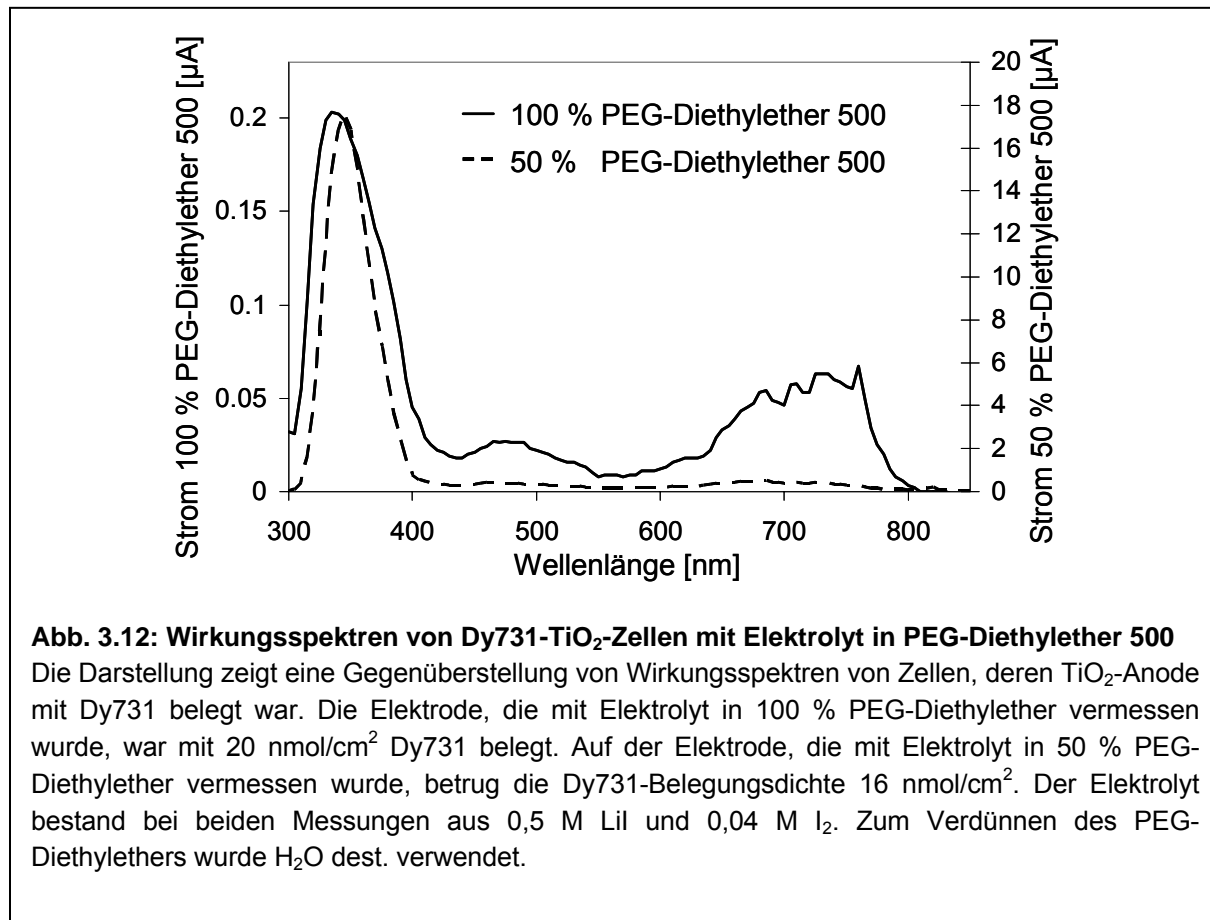
Da auch Wasser als Lösungsmittel für die Elektrolytkomponenten nicht geeignet war (siehe 3.2.9.1), wurden Versuche mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt, die weniger harsch auf die Stabilität der Komplexe wirken sollten. Lithiumiodid und Iod in PEG-Diethylether 500 stellte sich dabei als besonders geeigneter Elektrolyt für die Elektroneninjektion durch Farbstoffe heraus (Abb. 3.11).



In der Abbildung ist eine Gegenüberstellung der Wirkungsspektren zweier Chlid-a-Zellen zu sehen. Die Verwendung von LiI und I₂ in PEG-Diethylether 500 (primäre y-Achse) als Elektrolyt führte gegenüber der Messung mit TPAI und I₂ in MeOH (sekundäre y-Achse) zu einer Verminderung des gemessenen Stromes im Titandioxidmaximum um etwa 80 %. Die Elektroneninjektion durch Chlid a war jedoch bei der Zelle, in der PEG-Diethylether als Lösungsmittel für den Elektrolyt eingesetzt wurde, mit 2,9 µA im Maximum der Q_y-Bande bei 665 nm signifikant höher als bei der Zelle, in der MeOH als Lösungsmittel für die Elektrolytkomponenten diente (1,0 µA bei 665 nm). Durch die Anpassung der y-Achsenabschnitte der Spektren im Halbleitermaximum wurde dieser Effekt noch deutlicher. Die einzelnen Strommaxima des Wirkungsspektrums der PEG-Diethylether 500-Zelle korrelierten dabei gut mit den Absorptionsbanden von Chlid-a in Lösung.

Obwohl PEG in geringeren Konzentrationen zur Stabilisierung von Proteinen verwendet wird (Stevenson, 2000), zeigte sich, dass LHCI bei hohen PEG-Konzentrationen nicht stabil war (vgl. 3.1.4). Aus diesem Grund wurden auch Versuche durchgeführt, bei denen die PEG-Diethyletherkonzentration durch Verdünnen mit Wasser vermindert wurde (Abb. 3.12).

3. Ergebnisse



Vergleicht man die Wirkungsspektren der Dy731-Zellen mit 100 % (primäre y-Achse) und 50 % PEG-Diethylether 500 (sekundäre y-Achse) als Lösungsmittel für die Elektrolytkomponenten, so erkennt man, dass die Verdünnung des organischen Polymers mit Wasser zu einer Zunahme des Strommaximums bei 350 nm um fast zwei Größenordnungen, von 0,2 µA auf 17,6 µA, führt. Auch der im Absorptionsmaximum des Farbstoffes bei 735 nm erzeugte Strom ist mit 0,4 gegenüber 0,06 µA deutlich stärker, als bei der Messung mit 100 % PEG-Diethylether 500 als Elektrolytlösungsmittel. In Relation zu den Elektronenübergängen im Halbleiter selbst, liegt das Stromsignal durch Elektronenübertragung vom Farbstoff jedoch wesentlich niedriger, als bei der Messung mit 100 % PEG-Diethylether 500.

Neben Ethylenglycolerivaten wurde auch Glycerin als schonendes Lösungsmittel für Solarzellen mit LHCII untersucht. Wirkungsspektren von Zellen in denen KI und I₂ in Glycerin als Elektrolyt eingesetzt wurden, sind unter anderem in Abbildung 3.27 dargestellt. Bezogen auf das Halbleitermaximum wurden mit Glycerin als Lösungsmittel für die Elektrolytkomponenten ähnliche Werte für die Elektroneninjektion gemessen wie mit Iodid und Iod in MeOH oder EtOH (vgl. Abb. 3.26).

Versuche mit LHCII und Glycerin als Elektrolytlösungsmittel zeigten, dass auf Halbleiterelektroden immobilisierter LHCII auch in 100 % Glycerin ausreichend stabil ist, um Fluoreszenz- (siehe 3.2.12.3) und Wirkungsspektren (siehe 3.2.13) aufzunehmen. Aus diesem Grund konnte auf eine Verdünnung des Lösungsmittels mit Wasser verzichtet werden.

3. Ergebnisse

3.2.3.2 Quasifeste Elektrolytsysteme aus Iodid und Iod in einer Gelmatrix

Als Alternative zu flüssigen Elektrolyten wurden auch Versuche mit semifesten Elektrolytsystemen durchgeführt. Hierbei waren die Ladungsträger des Elektrolyts in eine Gelmatrix eingebettet, die ausreichend Flüssigkeit enthielt, um eine Diffusion der Ladungsträger zu ermöglichen, deren feste Phase jedoch LHCII und Farbstoffe auf der Halbleiteroberfläche stabilisieren sollte.

3.2.3.2.1 Acrylamid als Gelmatrix

Wie schon in früheren Versuchen (Lion, 2001) gezeigt werden konnte, führt das Einpolymerisieren von immobilisiertem LHCII in eine 15 %ige Acrylamidmatrix zu einer Stabilisierung der Komplexe gegenüber organischen Lösungsmitteln, die als flüssige Phase des Elektrolytsystems dienen könnten.

In dieser Arbeit wurden Versuche mit Zellen, die Dy701 als Sensibilisator und 15 % Acrylamid als Gelmatrix enthielten durchgeführt. Hierfür wurden zwei TiO₂-Elektroden mit je 11 nmol/cm² Dy701 aus einer methanolischen Lösung beschichtet. Anschließend wurde die Halbleiterschicht mit einer 50 µm dicken 15 %igen Acrylamid-Lage überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Acrylamids wurde auf eine Elektrode 0,5 M TPAI und 0,04 M I₂ in EtOH auf die andere 0,5 M TPAI und 0,04 M I₂ in MeOH aufgetragen, wodurch das Wasser weitgehend aus dem Gel verdrängt und durch organisches Lösungsmittel ersetzt wurde. Schließlich wurde auf die Gelmatrix eine Graphitkathode aufgesetzt.

Bei der Aufnahme der Wirkungsspektren der so hergestellten Zellen zeigte sich, dass Reaktionen des Stromsignals auf die Veränderung der Anregungswellenlänge wesentlich langsamer erfolgten, als bei Zellen mit rein flüssigen Elektrolyten. Neben dem Strommaximum bei 350 nm war bei beiden Spektren eine leichte Zunahme des Stromsignals von 0,03 µA auf 0,2 µA im Bereich der Farbstoffabsorption zwischen 650 nm und 800 nm zu beobachten. Die Elektroneninjektion durch den Farbstoff war, gegenüber Zellen mit flüssigen organischen Elektrolytmatrixen, jedoch so gering, dass mit diesem System keine weiteren Versuche mehr durchgeführt wurden.

3.2.3.2.2 Agarose als Gelmatrix

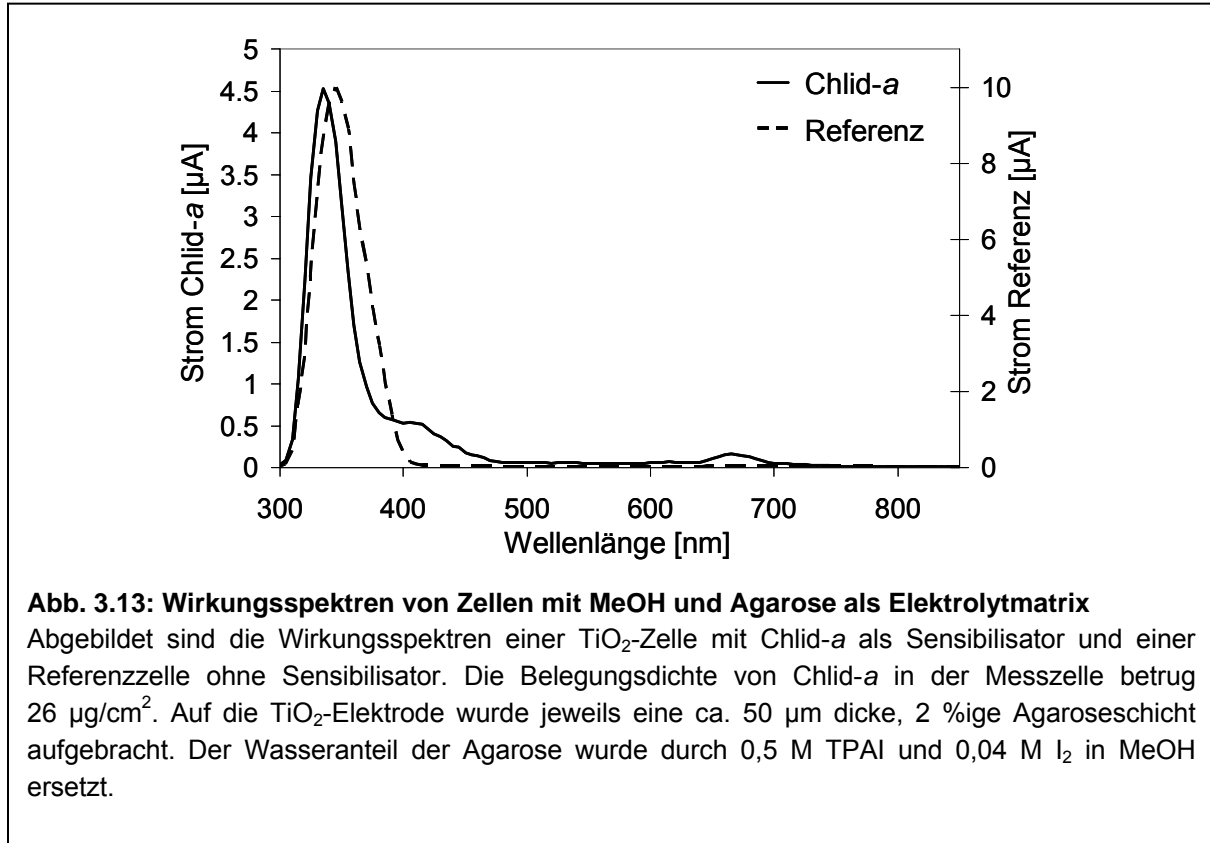
Neben den Versuchen mit Acrylamid als Matrix für den Elektrolyten, wurden auch Messungen an Zellen durchgeführt, in denen die Ladungsträger des Elektrolyts in 2 % Agarose eingebettet waren.

Die Messungen wurden mit TiO₂-Anoden durchgeführt, die mit je 26 µg/cm² Chlid-a aus einer methanolischen Lösung beschichtet wurden. Anschließend wurde auf die Elektroden eine 50 µm dicke 2 %ige Agaroseschicht aufgetragen.

Zunächst wurden Wirkungsspektren von Zellen aufgenommen, in denen Wasser als flüssige Phase diente, durch die die Ladungsträger im Gel diffundieren konnten. Dafür wurden 0,5 M KI und 0,04 M I₂ in die Gelmatrix der Zelle einpolymerisiert. In den Wirkungsspektren, welche direkt nach dem Auspolymerisieren der Gelschicht aufgenommen wurden, war keine Elektroneninjektion durch das Chlid-a zu sehen.

3. Ergebnisse

Für die Versuche mit MeOH als flüssiger Phase des Elektrolytsystems wurde die Anode mit Agarose beschichtet, die noch keine Ladungsträger enthielt. Anschließend wurden 0,5 M TPAI und 0,04 M I₂ in MeOH auf die Gelschicht aufgetragen, wodurch die wässrige Phase des Gels weitgehend durch das organische Lösungsmittel mit den enthaltenen Ladungsträgern verdrängt wurde.



In den Wirkungsspektren dieser Zellen war eine signifikante Elektroneninjektion durch Chlid-a zu erkennen (Abb. 3.13). Die relative Signalstärke durch Elektronenübertragung vom Sensibilisator auf den Halbleiter, bezogen auf das Titandioxidmaximum, war dabei mit den Werten vergleichbar, die bei Zellen mit flüssigen methanolischen Elektrolyten zu sehen waren (Abb. 3.11).

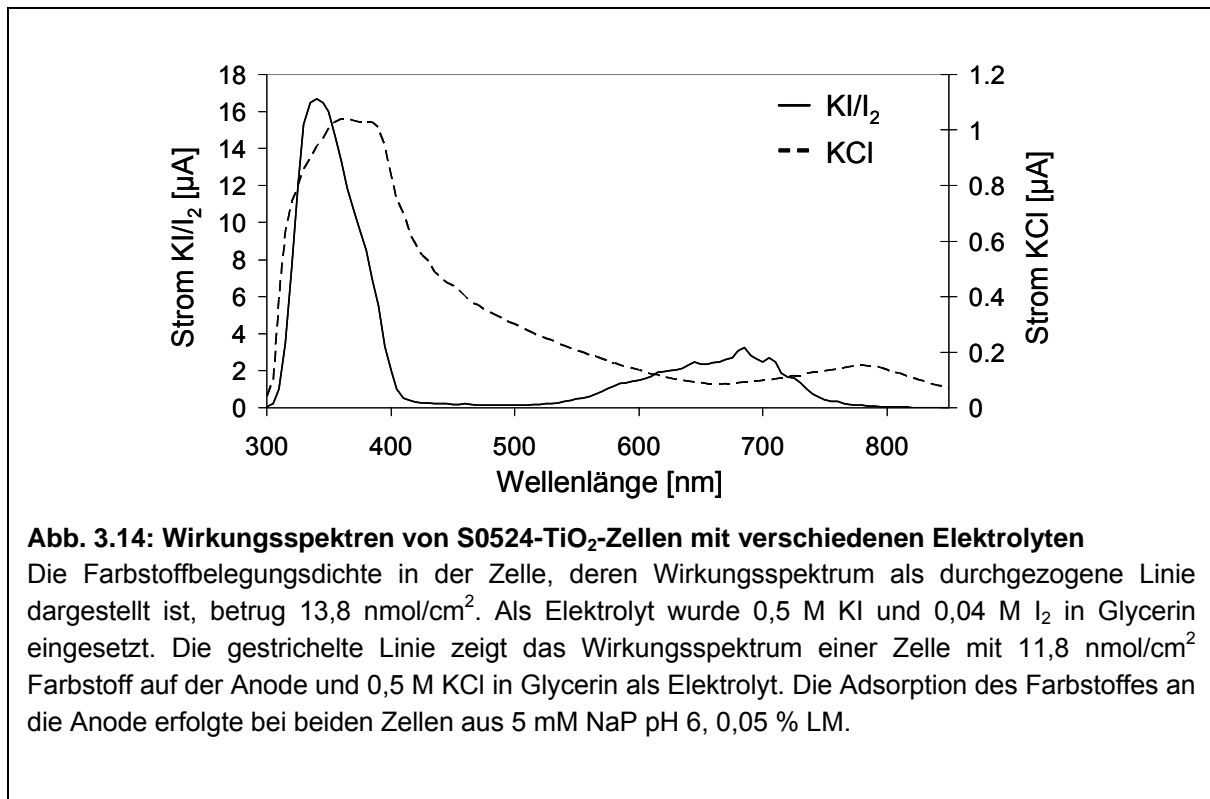
Wurde immobilisierter LHCII in Agarose eingebettet, so kam es im Gegensatz zum Einpolymerisieren in Acrylamid nicht zu einer Stabilisierung der Komplexe gegenüber organischen Lösungsmitteln. Daher wurden keine weiteren Versuche mit Agarose als Elektrolytmatrix durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.2.3.3 Kalziumchlorid als Elektronentransporter im Elektrolyt

Alternativ zu Iodid und Iod wurde auch Kalziumchlorid auf seine Eignung als Ladungsträger in einer Solarzelle überprüft. Als Lösungsmittel für das KCl wurden sowohl Wasser als auch Glycerin verwendet.

Die Experimente mit H₂O als Lösungsmittel wurden mit Dy701 und Dy731 als Sensibilisatoren durchgeführt. In den Versuchen mit Glycerin als Lösungsmittel diente S0524 als Sensibilisatorfarbstoff (Abb. 3.14).

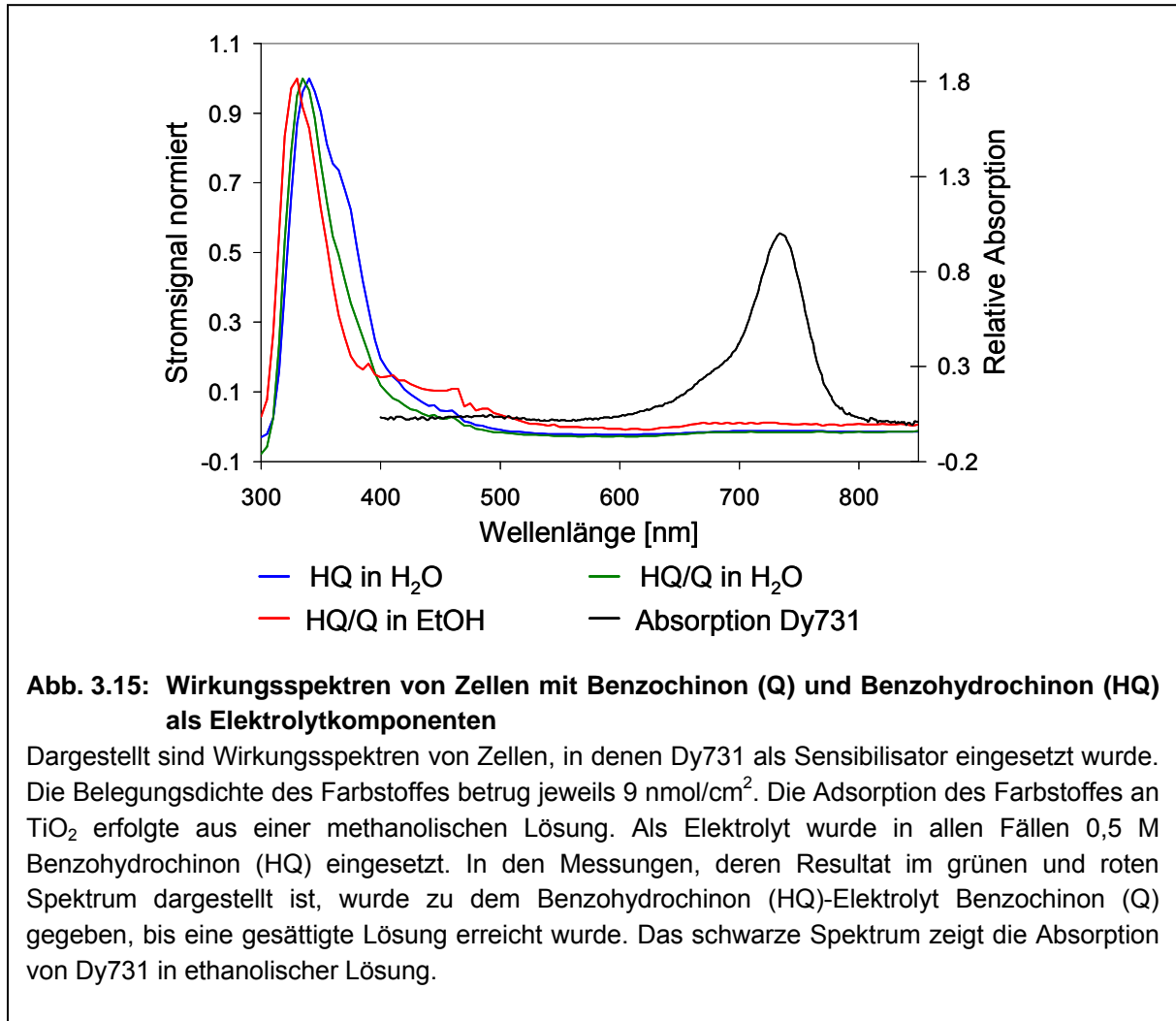


Zwar war in allen Wirkungsspektren, die aus diesen Versuchen resultierten, ein deutliches Strommaximum zwischen 300 nm und 400 nm zu sehen, das durch Elektronenübergänge im Halbleiter hervorgerufen wurde, es konnte jedoch in keinem Fall eine signifikante Elektroneninjektion durch die Farbstoffe gemessen werden.

3.2.3.4 Benzochinon und Benzohydrochinon als Elektrolytkomponenten

Um die Tauglichkeit von Benzochinon und Benzohydrochinon als Elektrolytbestandteile zu untersuchen, wurden sowohl Messungen mit Chlid-a-TiO₂-Zellen als auch mit Dy731-TiO₂-Zellen (Abb. 3.15) durchgeführt. In Anlehnung an die Versuche mit Iodid und Iod als Elektrolytkomponenten wurde Benzohydrochinon stets mit einer Konzentration von 0,5 M eingesetzt. Benzochinon wurde in einer Menge eingesetzt, die einer Konzentration von 0,04 M entsprechen hätte. Diese Benzochinonmenge war jedoch weder in H₂O noch in EtOH vollständig löslich. Die Elektrolytansätze wurden daher vor der Messung abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Elektrolyt in die Messung eingesetzt.

3. Ergebnisse



Weder bei den Zellen mit Chlid-a noch in den Dy731-Zellen war eine deutliche Elektroneninjektion durch die Sensibilisatoren zu sehen. Nur das Wirkungsspektrum mit Dy731 als Sensibilisator und Benzochinon und Benzohydrochinon in EtOH als Elektrolyt (rote Kurve in Abb. 3.15) wies ein erhöhtes Stromsignal im Bereich zwischen 400 nm und 500 nm auf, das möglicherweise mit einer Absorptionsbande des Farbstoffes in diesem Bereich korrelierte.

3.2.4 Einfluss verschiedener Kathodenmaterialien auf die elektrochemischen Eigenschaften der Solarzellen

Wie in 1.1.1 beschrieben, wird das Elektrolytsystem einer elektrochemischen Zelle durch Elektronenübertragung von einer, der Halbleiteranode gegenüberliegenden, Kathode regeneriert. Die Eigenschaften des Kathodenmaterials wirken sich daher nicht direkt auf die Elektronenübertragung vom Sensibilisator auf die Anode aus, sind aber für den Wirkungsgrad der gesamten Zelle von entscheidender Bedeutung.

3. Ergebnisse

3.2.4.1 Graphit als Kathodenmaterial

Für die meisten elektrochemischen Messungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden Graphitkathoden verwendet, die durch Auftragen von Graphit aus einer Bleistiftmine hergestellt wurden. Das Beschichten der ITO-Oberfläche mit Bleistiftgraphit resultierte in einer leicht ungleichmäßigen Graphitschicht (Abb. 3.16.A, unten). Eine vollständige Abdeckung der ITO-Oberfläche konnte nicht erreicht werden.

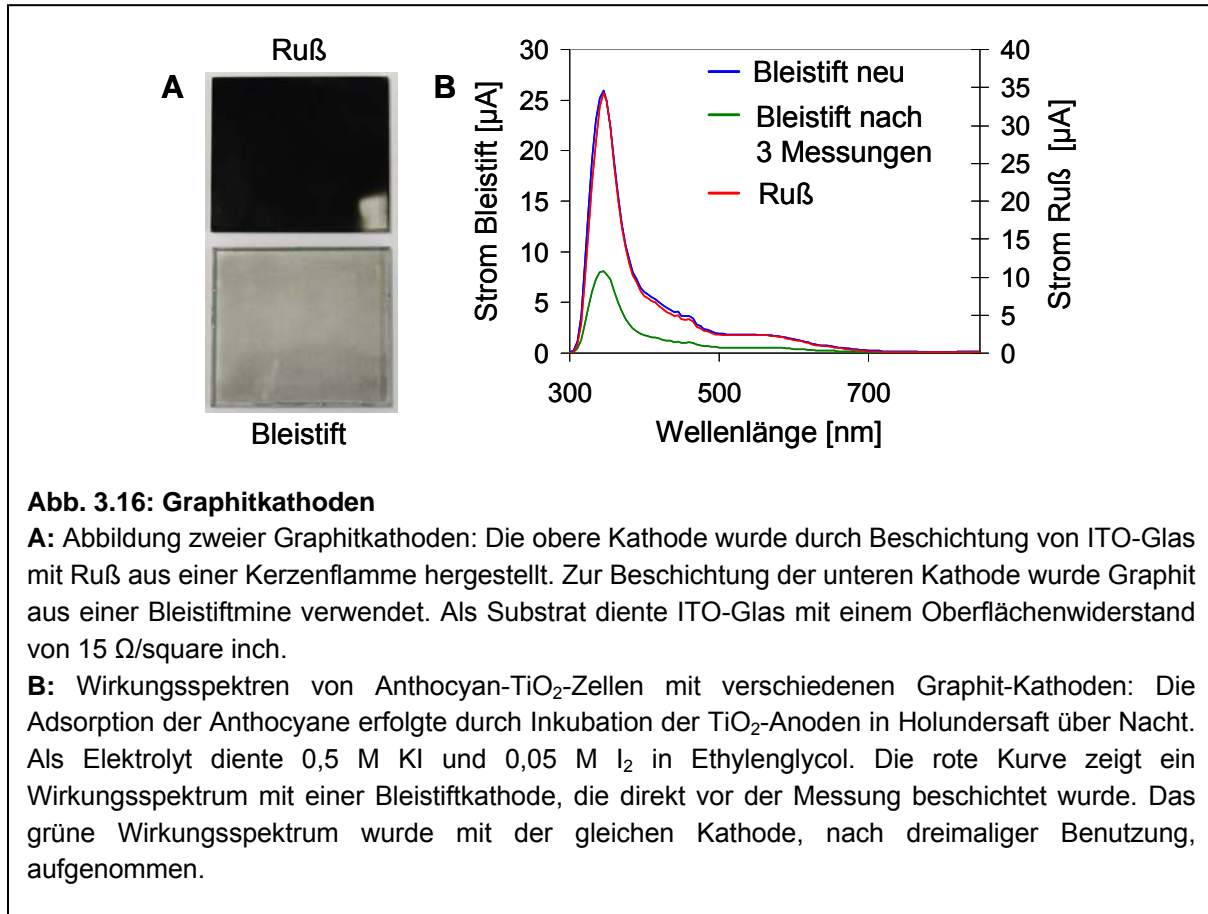


Abb. 3.16: Graphitkathoden

A: Abbildung zweier Graphitkathoden: Die obere Kathode wurde durch Beschichtung von ITO-Glas mit Ruß aus einer Kerzenflamme hergestellt. Zur Beschichtung der unteren Kathode wurde Graphit aus einer Bleistiftmine verwendet. Als Substrat diente ITO-Glas mit einem Oberflächenwiderstand von 15 Ω /square inch.

B: Wirkungsspektren von Anthocyan-TiO₂-Zellen mit verschiedenen Graphit-Kathoden: Die Adsorption der Anthocyane erfolgte durch Inkubation der TiO₂-Anoden in Holundersaft über Nacht. Als Elektrolyt diente 0,5 M KI und 0,05 M I₂ in Ethylenglycol. Die rote Kurve zeigt ein Wirkungsspektrum mit einer Bleistiftkathode, die direkt vor der Messung beschichtet wurde. Das grüne Wirkungsspektrum wurde mit der gleichen Kathode, nach dreimaliger Benutzung, aufgenommen.

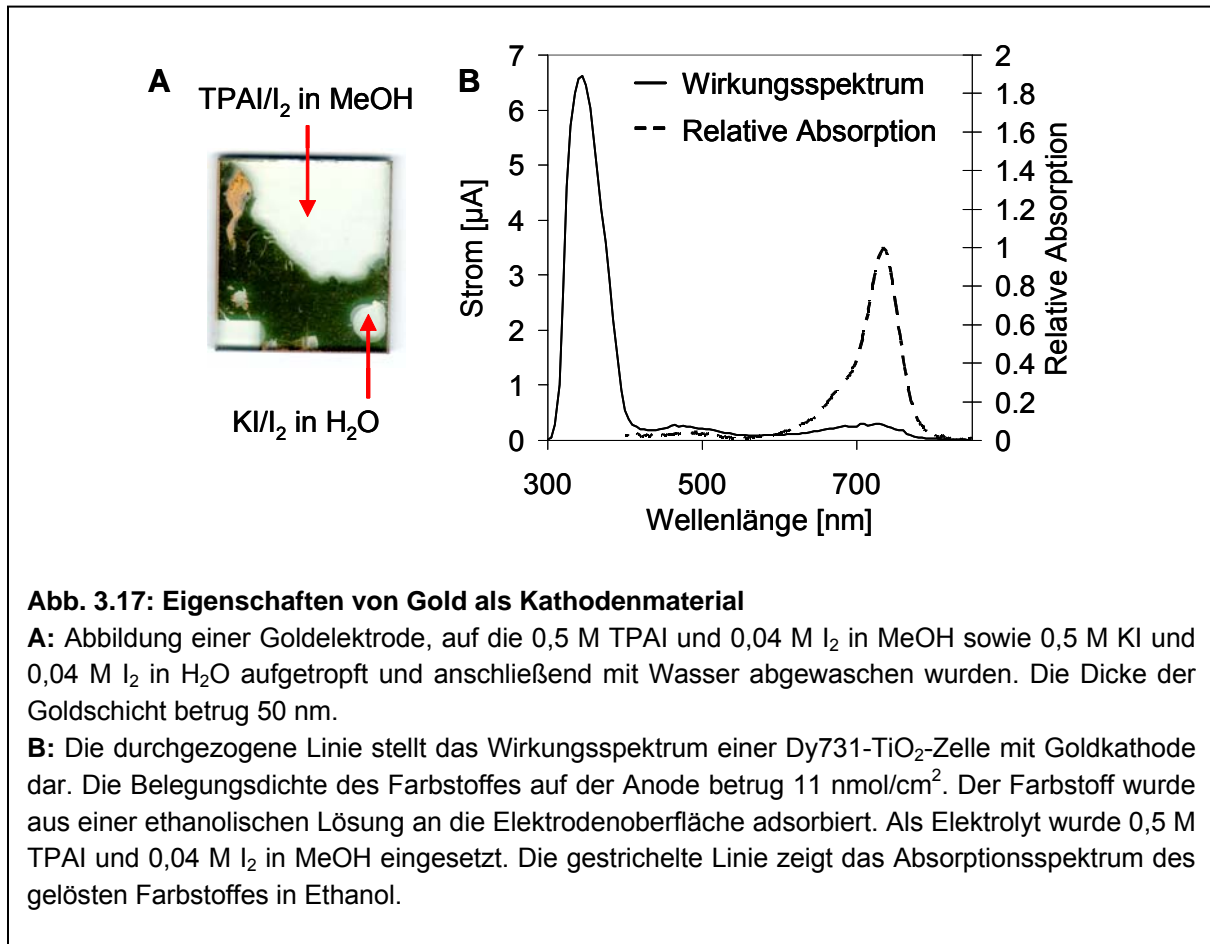
Eine Verringerung der Kontaktfläche zwischen ITO-Glas und Elektrolytlösung konnte erreicht werden, wenn die Kathode durch Applikation von Ruß auf die ITO-Oberfläche mittels einer Kerzenflamme hergestellt wurde (Abb. 3.11.6, oben). Zellen mit einer solchen Rußkathode (sekundäre y-Achse) lieferten gegenüber Zellen mit einer Bleistiftkathode (primäre y-Achse) ein um ca. 30 % höheres Stromsignal in den Wirkungsspektren (Abb. 3.16.B). Eine Veränderung des Verhältnisses zwischen den Elektronenübergängen im Halbleiter und der Elektroneninjektion durch den Sensibilisator, das sich in einer Veränderung der Spektrenform niedergeschlagen hätte, war nicht zu beobachten.

Ein Nachteil der Rußkathode gegenüber der Bleistiftkathode bestand in der deutlich geringeren Stabilität der Kohlenstoffschicht. So kam es, aufgrund der auftretenden Scherkräfte durch den Elektrolyt, in der Regel schon beim Zusammenbau der Zelle zur Beschädigung der Rußschicht. Eine mehrfache Verwendung der Kathode war nicht möglich. Bleistiftbeschichtete Kathoden konnten hingegen mehrfach verwendet werden. Nach einigen Messungen war, als Folge der Abnutzung der Graphitschicht, jedoch eine Verringerung des von der Zelle erzeugten Stromsignals zu beobachten (Abb. 3.16.B). Dieser Verschleiß konnte durch regelmäßiges Erneuern der Graphitschicht ausgeglichen werden.

3. Ergebnisse

3.2.4.2 Gold als Kathodenmaterial

Neben Graphit wurde auch Gold als mögliches Kathodenmaterial untersucht. Hierfür wurde durch Vakuumdeposition eine 50 nm dicke Goldschicht auf die ITO-Glasplatten aufgebracht. Elektrochemische Experimente mit den so hergestellten Kathoden zeigten jedoch, dass sich Gold im Zusammenhang mit Iodid und Iod als Elektrolytkomponenten nicht als Elektrodenmaterial eignet (Abb. 3.17).



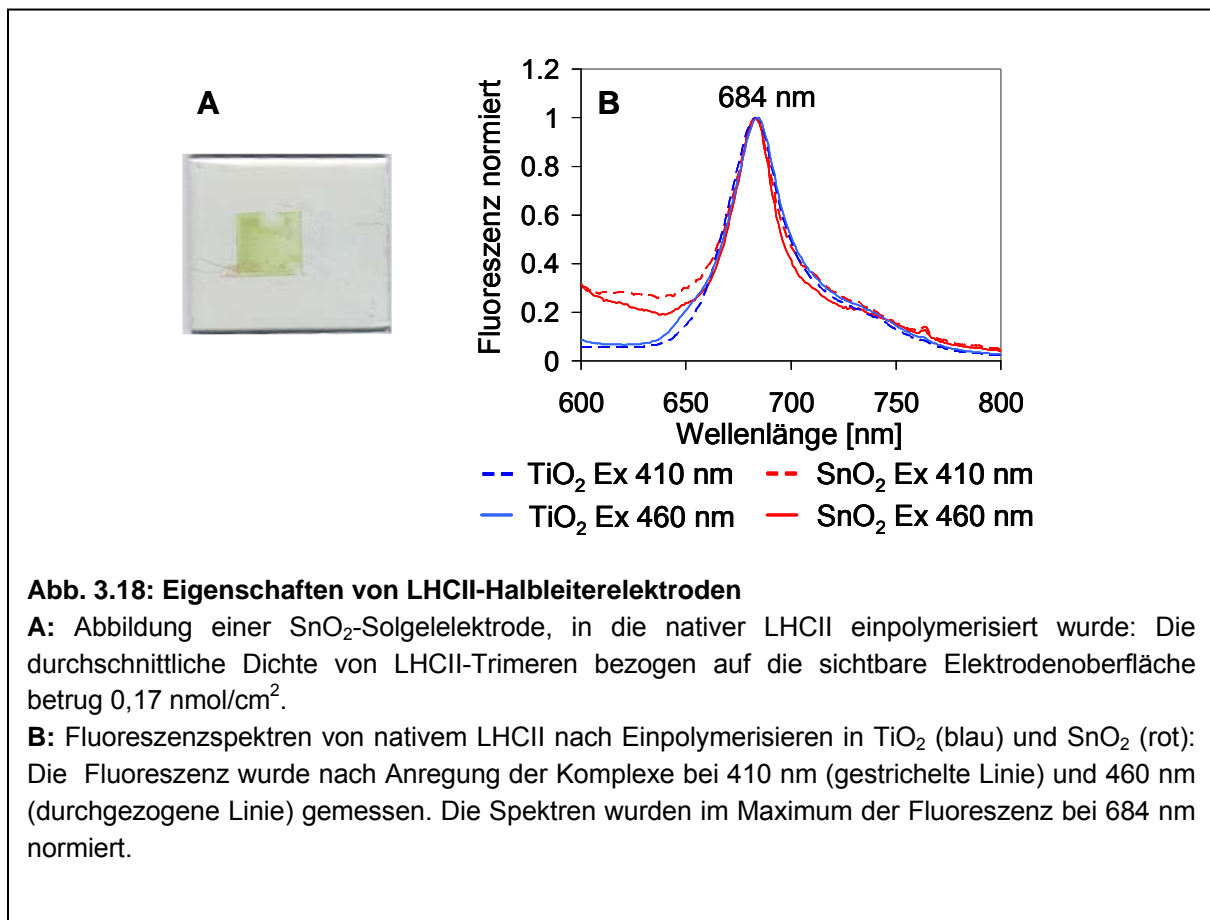
Wurde eine Iod-Iodid-Lösung auf die Goldbeschichtung aufgetragen, so führte dies unmittelbar zur Auflösung der Kathodenoberfläche (Abb. 3.17.A). Im Wirkungsspektrum (Abb. 3.17.B) hatte der Verlust der Goldschicht, gegenüber vergleichbaren Messungen mit Graphitkathoden, eine Verminderung der Elektroneninjektion durch den Farbstoff (vgl. 3.2.9.1) zur Folge.

Wurden KCl oder Benzochinon und Benzohydrochinon anstelle von Iodid und Iod als Elektrolytbestandteile verwendet, so kam es zwar nicht zur Auflösung der Goldkathode, diese Elektrolyte waren jedoch für die durchgeführten elektrochemischen Messungen nicht geeignet (siehe 3.2.3.4).

3. Ergebnisse

3.2.5 Einpolymerisieren von LHCII in Halbleiterelektroden

Die Herstellung von Halbleiterelektroden nach der Solgel-Methode (siehe 3.2.2.1.1 und 3.2.2.2.1) ermöglichte das Einbetten von nativem LHCII in die Halbleiterschicht. Hierfür wurden jeweils 19 μl einer 20 $\mu\text{molaren}$ LHCII-Trimer-Lösung in 0,05 % Triton X-100 mit 6 μl der 15 %igen kolloidalen Halbleiterlösung gemischt, auf eine 1,5 x 1,5 cm große abgeklebte Elektrodenfläche aufgetragen und bei Raumtemperatur eingetrocknet. Beim Trocknen der Zinndioxidschicht wurde der LHCII von durch das entstehende Halbleitergel verdrängt, was zu einer unregelmäßigen Verteilung der Komplexe führte (Abb. 3.18.A). In den TiO_2 -Elektroden war der LHCII nach dem Trocknen gleichmäßig verteilt.



Nach dem Trocknen wurden Fluoreszenzspektren der LHCII-haltigen Halbleiterelektroden aufgenommen (Abb. 3.18.B). In den Spektren, die mit Anregung bei 460 nm aufgenommen wurden, war ein nahezu vollständiger Energietransfer von Chl-*b* auf Chl-*a* zu sehen. Das Spektrum der Komplexe in TiO_2 wies eine leichte Chl-*b*-Fluoreszenzschulter bei 650 nm auf. Im Spektrum der Komplexe in SnO_2 wurde diese Schulter, soweit vorhanden, durch den Streuungsanteil des Signals überdeckt.

Obwohl in Folge der Einpolymerisation der Komplexe in das Halbleitermaterial keine deutliche Schädigung der Komplexe zu erkennen war, wurde dieser Ansatz zur Immobilisierung des LHCII nicht weiter verfolgt, da die LHCII-Dichte in den Elektroden mit $0,17 \text{ nmol/cm}^2$ deutlich niedriger lag als nach der Adsorption der Komplexe an die Halbleiter (siehe 3.2.6.1.1). Ähnliches galt auch für die Einpolymerisation von Farbstoffen in die Halbleiterelektroden (siehe 3.2.8).

3. Ergebnisse

3.2.6 Adsorption von LHCII an Halbleiterelektroden

Schon in früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass LHCII an Titandioxidelektroden adsorbiert werden kann (Rupprecht, 1998; Wolf-Klein, 2001; Lion, 2001), wobei sich die spektroskopischen Eigenschaften des Komplexes durch den Kontakt mit dem Halbleiter nicht veränderten. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden weitere Versuche zur Adsorption von LHCII an Titandioxid und Zinndioxid durchgeführt.

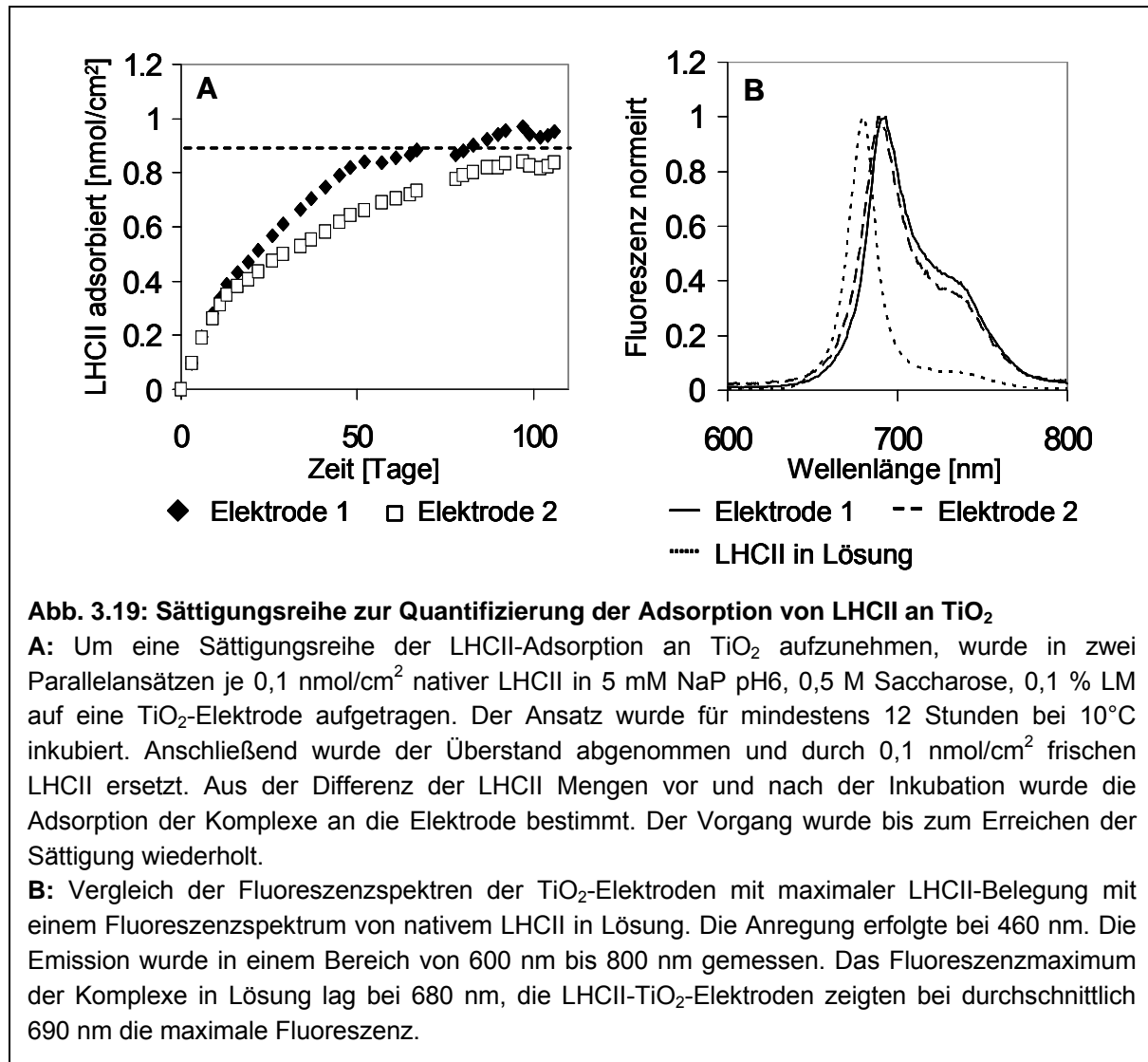
3.2.6.1 Adsorption von LHCII an Titandioxid

Durch Experimente zur Adsorption von LHCII an TiO_2 sollte die Interaktion zwischen den Komplexen und der Elektrode näher charakterisiert und eine Optimierung der Adsorption hinsichtlich der Belegungsdichte und Komplexstabilität erreicht werden. Parallel zu den dargestellten Versuchen wurden von R. Berens (2005) Experimente durchgeführt, die das gleiche Ziel verfolgten.

3.2.6.1.1 Quantifizierung der LHCII-Adsorption

Mittels einer Sättigungsreihe, die über einen Zeitraum von 106 Tagen aufgenommen wurde, wurde die maximale Belegungsdichte von LHCII an TiO_2 ermittelt (Abb. 3.19.A). Die Quantifizierung der LHCII-Adsorption über die Differenz der aufgetragenen LHCII-Menge und der LHCII-Menge, die sich nach den Inkubationsschritten im Überstand befand, ergab eine Belegungsdichte von durchschnittlich $0,9 \text{ nmol/cm}^2$ im Sättigungsbereich. Nach Beendigung des Versuches wurde an der LHCII- TiO_2 -Elektrode 1 eine Pigmentextraktion durchgeführt. Die Elektrode wurde hierfür mit Aceton (für Pigmente) und Butanol gewaschen. Es gelang jedoch nicht, alle Pigmente aus der Elektrode zu extrahieren. Die TiO_2 -Schicht wies auch nach dem Waschen noch eine leichte Grünfärbung auf. Die Chl-Konzentrationsbestimmung nach der Pigmentextraktion ergab einen Wert von $30,45 \mu\text{g/cm}^2$. Geht man von 12 Chlen pro LHCII-Monomer und einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 900 g/mol für die Chlorophylle aus, so erhält man bei einer Elektrodenfläche von $2,25 \text{ cm}^2$ eine Belegungsdichte von $0,42 \text{ nmol LHCII-Trimeren pro cm}^2$.

3. Ergebnisse



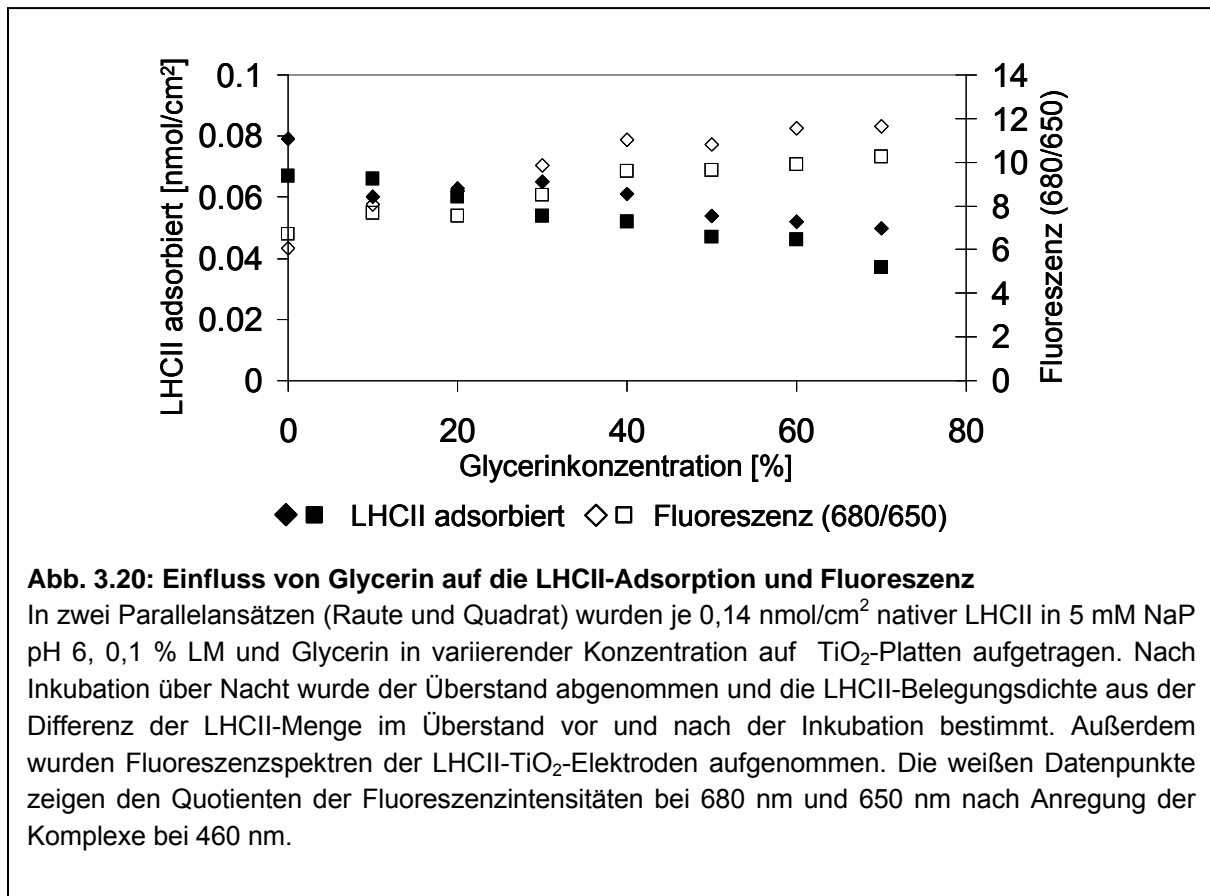
Am Ende des Versuches wurden auch Fluoreszenzspektren der LHCII-TiO₂-Elektroden aufgenommen (Abb. 3.14.B). Der Vergleich der Emissionsspektren der Elektroden mit einem Emissionsspektrum von LHCII in Lösung ergab eine Rotverschiebung der maximalen LHCII-Fluoreszenz um 10 nm von 680 nm auf 690 nm. Außerdem war ein deutlicher Anstieg der langwelligen Fluoreszenz im Bereich zwischen 730 nm und 740 nm zu erkennen.

3.2.6.1.2 Stabilisierung der Pigment-Protein-Komplexe durch Glycerin

In früheren Versuchen (Lion 2001) und den Versuchen, die zu Beginn dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde LHCII bei der Adsorption an Titandioxid durch Zusetzen von Saccharose stabilisiert. Elektrochemische Messungen mit dem Farbstoff S0247 zeigten jedoch, dass sich die Anwesenheit von Saccharose negativ auf die Elektronenübertragung vom Farbstoff auf den Halbleiter auswirkt (siehe 3.2.9.2). Der Verzicht auf Saccharose während der Adsorption von LHCII an die Halbleiteroberfläche resultierte wiederum in einer Destabilisierung der Komplexe, die sich in einer deutlich erhöhten Chl-*b*-Fluoreszenz bei 650 nm niederschlug, wenn die LHCII-TiO₂-Elektroden bei 460 nm angeregt wurden.

3. Ergebnisse

Aus diesem Grund wurde versucht, LHCII während der Adsorption an TiO_2 durch Glycerin zu stabilisieren (Abb. 3.20).

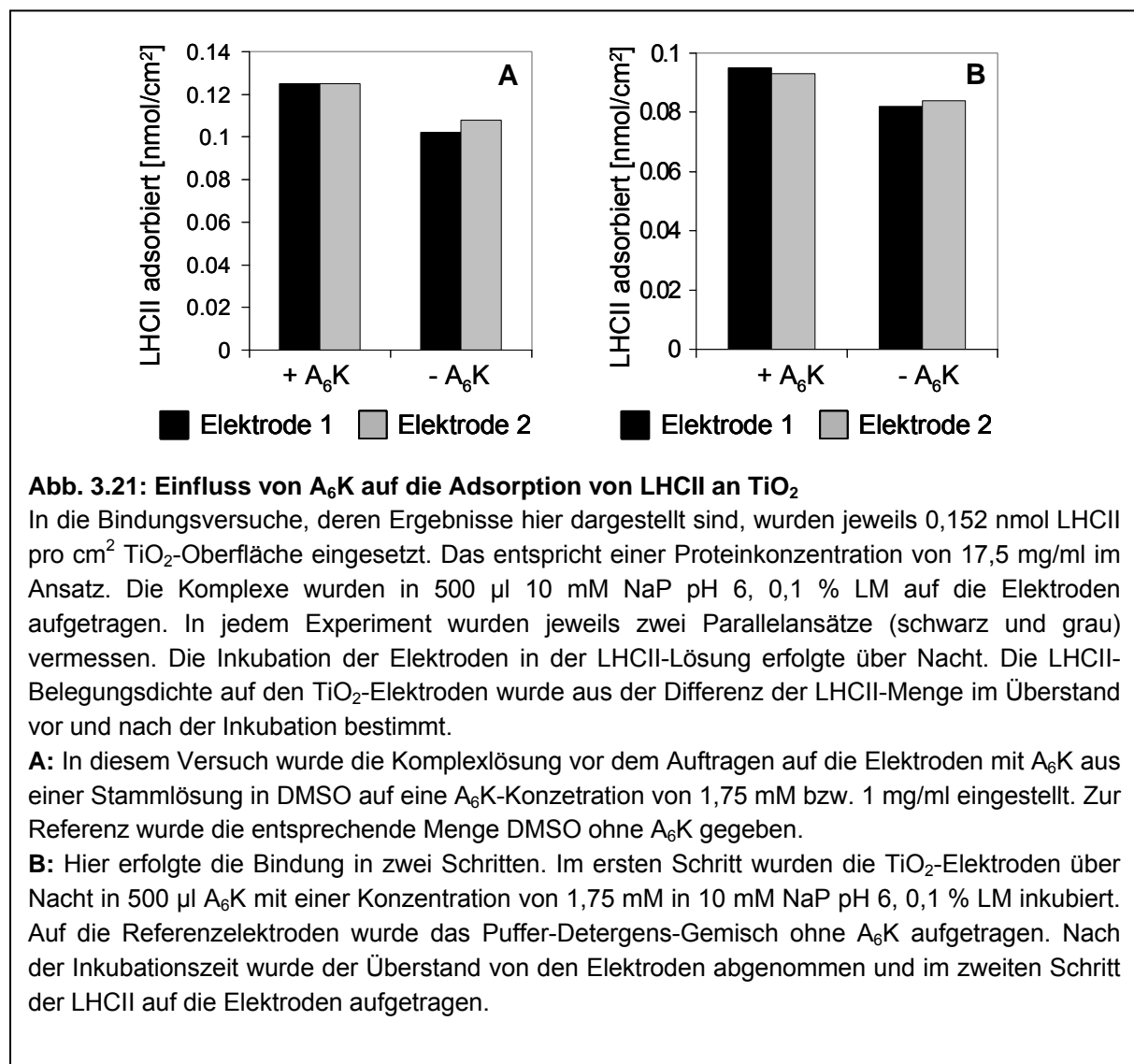


Die Abbildung zeigt den Einfluss von Glycerin auf die Adsorption von LHCII an Titandioxid, sowie auf die Fluoreszenz der adsorbierten Komplexe. Der Quotient aus den Fluoreszenzen bei 680 nm und 650 nm (weiße Datenpunkte) dient dabei als Maß für die Funktionalität der Komplexe. Wurde bei der Adsorption der Komplexe an TiO_2 kein Glycerin zugegeben, so war auch bei diesen Messungen eine Chl-*b*-Schulter im Emissionsspektrum der LHCII- TiO_2 -Elektroden zu sehen. Der Grund für das Auftreten einer solchen Chl-*b*-Schulter im LHCII-Emissionsspektrum lag entweder in einer Verminderung des Energietransfers von Chl-*b* auf Chl-*a* innerhalb der Komplexe oder in der Anwesenheit von freiem Chl-*b*, welches durch den Zerfall von LHCII während der Adsorption an TiO_2 entstand. Die Zugabe von Glycerin zur Komplexlösung führte zur Verringerung der Chl-*b*-Fluoreszenz und somit zu einer Erhöhung des Quotienten der Fluoreszenzen bei 680 nm und 650 nm. Schon bei einer Glycerinkonzentration von 20 % war keine ausgeprägte Chl-*b*-Schulter mehr zu erkennen. Wurde die Glycerinkonzentration weiter erhöht, so kam es zu einer Verschmälerung der Chl-*a*-Fluoreszenzbande, die eine weitere Erhöhung des Quotienten zur Folge hatte. Mit zunehmender Glycerinkonzentration war außerdem eine Abnahme der Adsorption von LHCII an TiO_2 zu beobachten (schwarze Datenpunkte). Experimente, bei denen Farbstoff- TiO_2 -Elektroden mit Puffer und Glycerin gespült wurden, deuteten zusätzlich auf eine Beeinträchtigung der Farbstoffadsorption durch zu hohe Glycerinkonzentrationen im Puffer hin (siehe 3.2.9.3). Aus diesem Grund wurde in allen weiteren Versuchen eine Glycerinkonzentration von 10 % zur Stabilisierung von LHCII eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.2.6.1.3 Einfluss des amphiphilen Peptids A₆K auf LHCII-Adsorption und -Stabilität

Ähnlich wie Lipide oder Detergentien weist das Peptid A₆K einen relativ großen hydrophoben Bereich aus einer Folge von 6 Alaninen und einen hydrophilen Kopf auf, der hier aus einem C-terminalen Lysin besteht. In zwei Versuchen wurde untersucht, ob A₆K aufgrund seines amphiphilen Charakters oder der positiv geladenen Kopfgruppe die Adsorption von LHCII an Titandioxid oder die Stabilität der Komplexe beeinflusst. Im ersten Experiment wurde A₆K (Seraing, Belgien) direkt in die LHCII-Lösung gegeben, welche auf die Elektroden aufgetragen wurde (Abb.3.21.A). Im zweiten Versuch wurden die Elektroden zunächst in einer A₆K Lösung inkubiert und LHCII anschließend in einem zweiten Schritt aufgetragen (Abb. 3.21.B). Um den Einfluss des Peptids auf die Stabilität von LHCII beurteilen zu können, wurde in den Versuchen auf die Zugabe von Saccharose oder Glycerin zur Stabilisierung der Komplexe verzichtet.



3. Ergebnisse

Bei beiden Experimenten führte die Anwesenheit von A₆K zu einer leichten Verbesserung der Adsorption von LHCII an TiO₂. Eine Stabilisierung der Komplexe durch das Peptid war jedoch nicht zu beobachten. Fluoreszenzspektren der adsorbierten Komplexe, die mit einer Anregungswellenlänge von 460 nm aufgenommen wurden, wiesen in allen Fällen eine deutliche Schulter bei 650 nm auf. Diese Schulter ist auf eine Zunahme der Chl-*b*-Fluoreszenz, aufgrund der Denaturierung von Komplexen auf der Halbleiteroberfläche, zurückzuführen.

3.2.6.2 Adsorption von LHCII an Zinndioxid

Parallel zu den Experimenten mit Titandioxid wurde versucht, LHCII an SnO₂-Elektroden zu adsorbieren. Für die Versuche wurden sowohl SnO₂-Solgelelektroden, als auch Elektroden, die aus gefälltem SnO₂ hergestellt wurden, verwendet.

3.2.6.2.1 Adsorption von LHCII an SnO₂-Solgelelektroden

Wie in Abschnitt 3.2.2.2.1 beschrieben, führte die Herstellung von SnO₂-Elektroden nach der Solgel-Methode zur Ausbildung von Halbleiteroberflächen, die im ungesinterten Zustand eine gelartige Konsistenz aufwiesen. Eine Proteinadsorption an dieses SnO₂-Gel war nicht möglich, da das Auftragen von Wasser zur sofortigen Auflösung des Gels führte.

Durch den Sinterprozess verwandelte sich das SnO₂-Gel in eine feste, glasartige Halbleiteroberfläche. Die Oberfläche war dabei meist nicht homogen, sondern bestand aus glatten und raueren Bereichen (siehe Abb. 3.10). Eine Adsorption von LHCII konnte nur an den raueren Bereichen der Elektroden beobachtet werden. Die entsprechenden Bereiche färbten sich dabei leicht grün. Insgesamt war die Adsorption im Vergleich zur aufgetragenen Proteinmenge aber stets so gering, dass eine Quantifizierung der Oberflächenbelegung nicht möglich war. Auch die Fluoreszenzspektren der adsorbierten Komplexe ließen aufgrund der geringen Belegungsdichte von Komplexen auf der Oberfläche und der hohen Streuung des Signals durch die SnO₂-Schicht keine Rückschlüsse auf die Intaktheit der Komplexe zu.

3.2.6.2.2 Adsorption von LHCII an durch SnO₂-Fällung hergestellte Elektroden

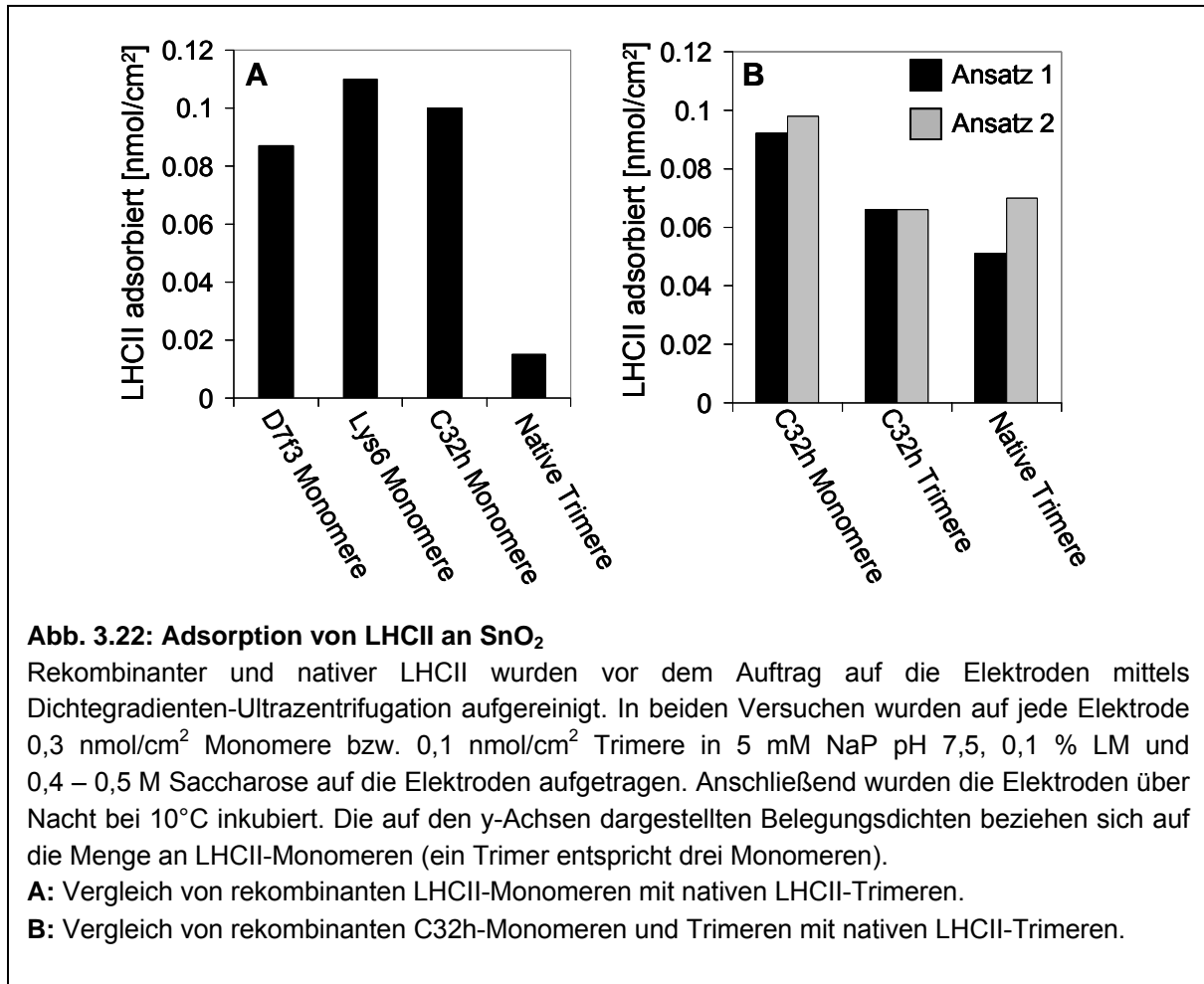
Neben SnO₂-Solgelelektroden wurden auch Elektroden aus einer SnO₂-Paste hergestellt, die durch Fällung des Zinndioxids aus einer kolloidalen Lösung gewonnen wurde (siehe 3.2.2.2.2).

LHCII adsorbierte an diese Elektroden deutlich besser als an SnO₂-Solgelelektroden, was eine Quantifizierung der Adsorption, sowie die spektroskopische Untersuchung der immobilisierten Komplexe möglich machte.

In Fluoreszenzspektren der LHCII-SnO₂-Elektroden war nur eine leichte Chl-*b*-Schulter bei 650 nm zu sehen, was darauf hindeutete, dass die immobilisierten Komplexe weitgehend intakt waren. Die maximale Belegungsdichte von nativen LHCII-Trimeren auf diesen SnO₂-Elektroden lag mit 0,07 nmol/cm² deutlich unter den Werten, die mit Titandioxidelektroden erreicht wurden (siehe 3.2.6.1.1).

3. Ergebnisse

Um zu sehen, ob die geringere Belegungsdichte mit der kleineren Partikelgröße des verwendeten SnO₂ (15 nm) gegenüber TiO₂ (21 nm) zusammenhing, wurden Versuche durchgeführt, in denen die Adsorption von LHCII-Monomeren und Trimeren an die Halbleiteroberfläche verglichen wurde (Abb. 3.22).



Im ersten Experiment (Abb. 3.22.A) wurde die Adsorption von rekombinanten LHCII-Monomeren mit der Adsorption von nativen LHCII-Trimeren verglichen. Dabei wurden drei verschiedene LHCII-Klone, D7f3, Lys6 und C32h, eingesetzt. Die Sequenz von D7f3 ist identisch mit der Sequenz des nativen LHCII, Lys6 trägt eine Sequenz von sechs Lysinen am N-Terminus und C32h einen His₆-Tag am C-Terminus (siehe auch 2.1.3). Zwischen diesen Monomeren ergab sich nur ein geringer Unterschied in der Adsorption an SnO₂, wobei die Belegungsdichte der Klone Lys6 und C32h etwas höher lag als bei D7f3. Wesentlich deutlicher fiel der Unterschied zwischen den rekombinanten Monomeren und den nativen Trimeren aus. Die Belegungsdichte der Trimere betrug 0,005 nmol/cm², was 0,015 nmol Monomeren pro cm² sichtbarer Halbleiteroberfläche gleichkam. Das entsprach etwa einem Viertel bis einem Fünftel des Wertes, der mit den Monomeren erreicht wurde.

3. Ergebnisse

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob dieser Unterschied in der Größendifferenz zwischen Monomeren und Trimeren oder in der Präparation der Proben begründet war, wurde ein Versuch durchgeführt, in dem native LHCII-Trimere mit rekombinanten C32h-Monomeren und Trimeren verglichen wurden (Abb. 3.22.B). Hier fiel die Differenz in der Belegungsdichte zwischen Monomeren und Trimeren wesentlich geringer aus als bei den Ergebnissen, die in Abb. 3.22.A dargestellt sind. Auf der Halbleiteroberfläche konnten etwa $\frac{1}{3}$ weniger Trimere als Monomere immobilisiert werden. Zwischen den nativen Trimeren und den C32h-Trimeren war kein signifikanter Unterschied in der Belegungsdichte zu erkennen.

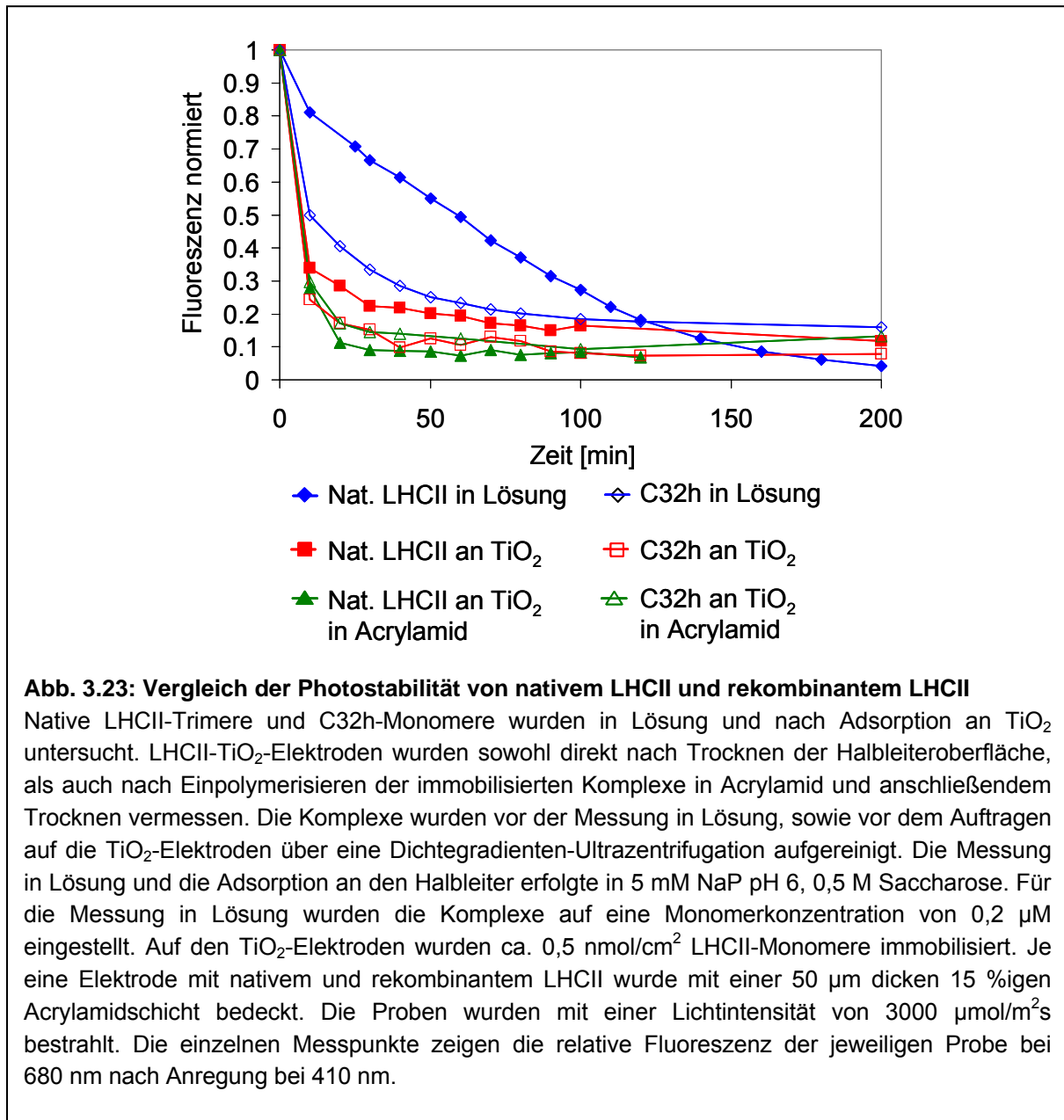
3.2.7 Photostabilität des LHCII

Wie in einer Pflanze, sind Pigment-Protein-Komplexe in einer Solarzelle hohen Lichtintensitäten und schwankenden klimatischen Bedingungen ausgesetzt. Abgesehen vom intrinsischen Oxidationsschutz durch die in den Komplexen enthaltenen Xanthophylle, stehen dabei keine Mechanismen zur Verfügung, die Proteine und Pigmente vor einer Schädigung zu bewahren. Auch eine Regeneration der Lichtsammler ist im geschlossenen System der Solarzelle nicht möglich. Daher ist die Photostabilität der Komplexe von entscheidender Bedeutung für die Lebensdauer einer LHCII-Solarzelle.

3.2.7.1 Vergleich der Photostabilität von Monomeren und Trimeren in Lösung und nach Immobilisierung auf Halbleiterelektroden

Die Photostabilität von LHCII wurde sowohl in Lösung, als auch nach Immobilisierung auf TiO₂-Elektroden bestimmt. Im ersten Versuch wurde die Photostabilität von nativen LHCII-Trimeren und rekombinanten C32h-Monomeren verglichen (Abb. 3.23). Hierfür wurden die Komplexe mit einem Diaprojektor bei einer Lichtintensität von 3000 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ bestrahlt und zu bestimmten Zeitpunkten Fluoreszenzspektren der Proben aufgenommen. Die Fluoreszenz wurde sowohl nach Anregung von Chl-*a* bei 410 nm, als auch nach Anregung von Chl-*b* bei 460 nm gemessen.

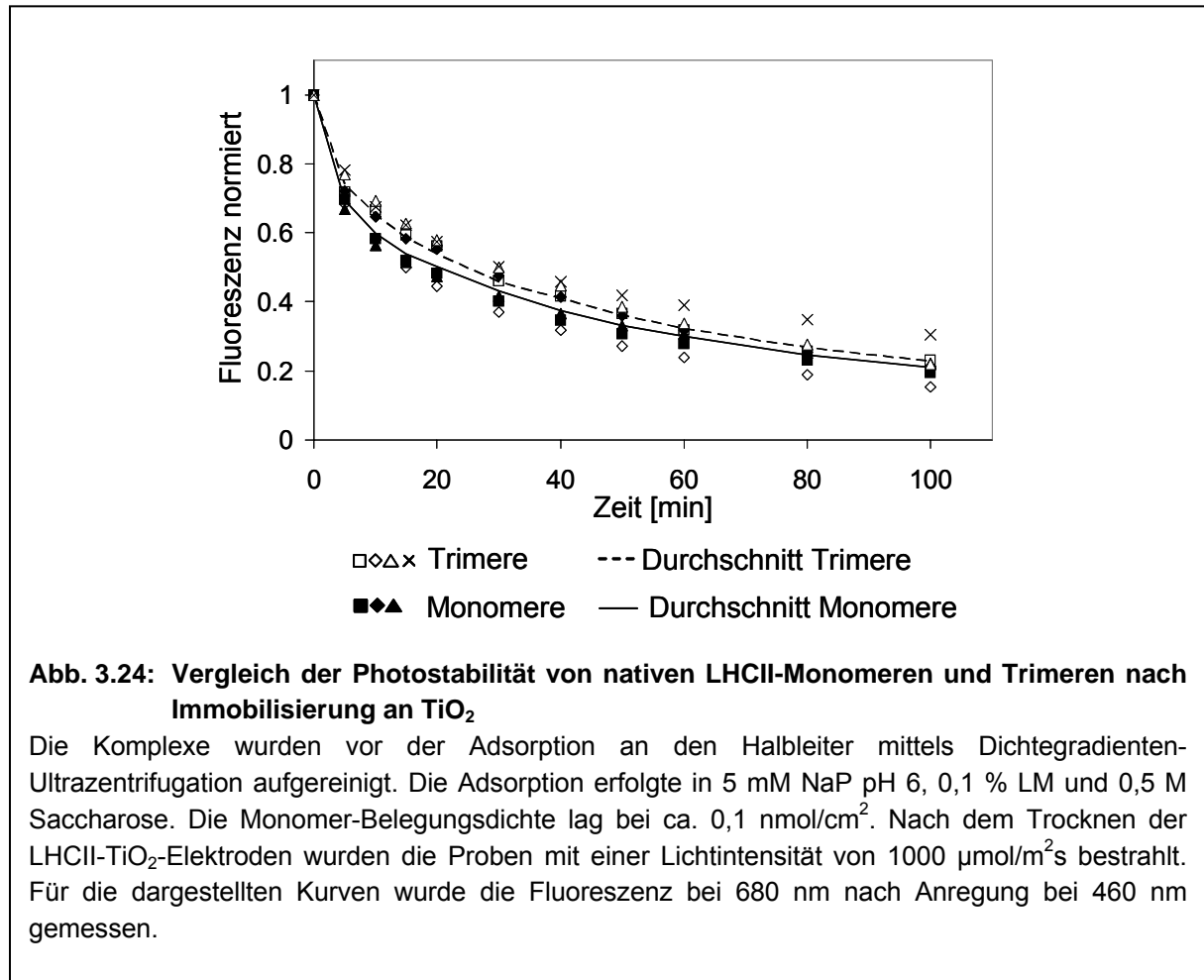
3. Ergebnisse



Wie in der Abbildung zu sehen ist, kommt es bei allen Proben, außer dem nativen LHCII in Lösung, zu einer schnellen Abnahme der Fluoreszenz durch das Bleichen der Komplexe. Auch das Einpolymerisieren der LHCII-TiO₂-Elektroden in Acrylamid führte nicht zu einer Stabilisierung der Komplexe. Nach 200 Minuten war das Fluoreszenzsignal bei allen Proben auf das Niveau des Signaluntergrunds abgesunken. Eine Grünfärbung der Elektroden war nicht mehr zu erkennen.

Da ein Unterschied in der Photostabilität von nativen Trimeren und C32h-Monomeren in Lösung zu sehen war, wurde die Photostabilität von nativen Trimeren und Monomeren nach Adsorption an TiO₂ nochmals genauer untersucht. Um eine bessere Auflösung im Anfangsbereich der Messung zu erhalten, wurden die Proben mit einer niedrigeren Lichtintensität von 1000 µmol/m²s bestrahlt (Abb. 3.24).

3. Ergebnisse



Aufgrund der niedrigeren Lichtintensität nahm die Fluoreszenz der Komplexe langsamer ab als in dem Versuch, der in Abb. 3.23 gezeigt ist. Ein Unterschied in der Photostabilität von Monomeren und Trimeren war in dieser Messung jedoch nicht zu sehen.

Eine detaillierte Untersuchung Photostabilität von LHCII nach der Adsorption an SnO₂, bzw. nach Einpolymerisieren in SnO₂ oder TiO₂ war, aufgrund der niedrigen Komplexdichte auf den entsprechenden Elektroden (siehe 3.2.5 und 3.2.6.2.2), nicht möglich. Allerdings war auch hier ein Ausbleichen des LHCII zu beobachten, wenn die Elektroden mit Starklicht bestrahlt wurden.

3.2.7.2 Versuche zur Verbesserung der Photostabilität der Komplexe

Zunächst wurde versucht, die Photostabilität des auf TiO₂ immobilisierten LHCII durch Fluten der Elektrode mit Stickstoff zu erhöhen. Hierfür wurde die TiO₂-Elektrode, die mit 0,2 nmol/cm² nativem LHCII belegt war, durch einen Ring aus Knetwachs und eine zweite Glasplatte gegenüber der umgebenden Luft abgedichtet. In den Zwischenraum zwischen der Elektrode und der zweiten Glasplatte wurde über den gesamten Zeitraum der Messung hinweg ein konstanter Stickstoffstrom geleitet. Die Bestrahlung der Zelle erfolgte mit 3000 μmol Photonen pro m²s.

3. Ergebnisse

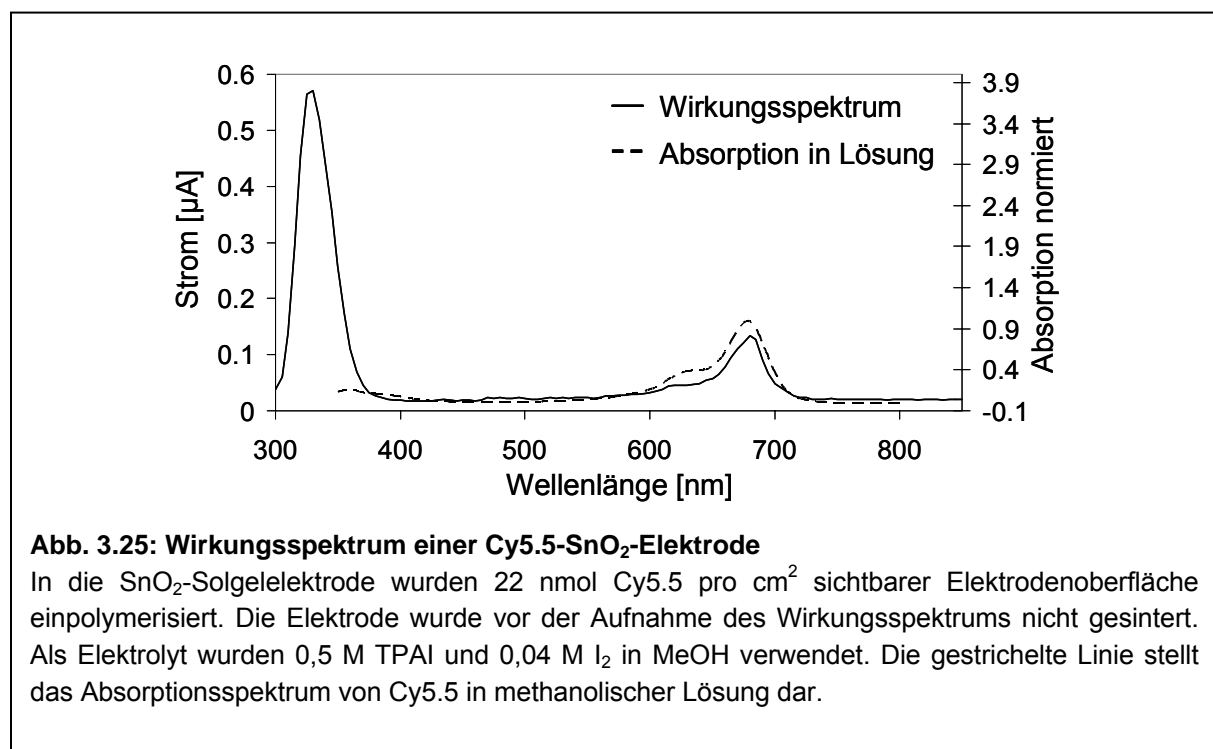
Ein Problem während dieser Messung stellte, aufgrund der erhöhten Dicke, die Platzierung der Messzelle im Strahlengang des Fluoreszenzspektrometers dar. Durch leichte Abweichungen in der Position der Zelle kam es zu einer starken Streuung der Fluoreszenzwerte. Zwar schien das Fluoreszenzsignal tendenziell langsamer abzunehmen, als bei der Kontrolle, die in Luft vermessen wurde, eine definitive Aussage über die Photostabilität war jedoch nicht möglich.

Im Folgenden wurde versucht, die Komplexe durch Koadsorption mit den Antioxidantien Ascorbat und Tocopherol zu stabilisieren. Dabei erwies sich die hohe Hydrophobizität des Tocopherols als hinderlich. So war es trotz Detergentien nicht möglich, Tocopherol in der LHCII-Lösung zu lösen. Wurde Tocopherol zunächst in einem separaten Bindungsschritt aus einer acetonischen Lösung an die TiO_2 -Oberfläche adsorbiert, so war die Oberfläche anschließend so hydrophob, dass eine Belegung mit LHCII nicht mehr möglich war. Die Koadsorption von LHCII mit Ascorbat ohne Tocopherol führte nicht zu einer Erhöhung der Photostabilität der Komplexe.

3.2.8 Einpolymerisieren von Farbstoffen in Halbleiterelektroden

Auf die gleiche Weise wie LHCII (siehe 3.2.5) konnten auch Farbstoffe in Solgelelektroden einpolymerisiert werden. Die Farbstoffe wurden direkt zur kolloidalen SnO_2 - oder TiO_2 -Lösung gegeben, die anschließend auf eine ITO-Glasplatte aufgetragen wurde. Nach dem Trocknen der Auftragslösung waren die Farbstoffe gleichmäßig in der entstandenen Halbleiteroberfläche verteilt.

Die so hergestellten Farbstoff-Halbleiterelektroden konnten ohne vorheriges Sintern elektrochemisch vermessen werden (Abb. 3.25).



3. Ergebnisse

Die Abbildung zeigt das Wirkungsspektrum einer SnO₂-Elektrode, in die der Farbstoff Cy5.5 einpolymerisiert wurde. Die Elektroneninjektion durch den Farbstoff, zwischen 600 nm und 750 nm, korrelierte gut mit dem Absorptionsspektrum des Farbstoffes in methanolischer Lösung.

Das Einbetten von Farbstoffen in die Anode führte jedoch generell zu einer geringeren Elektroneninjektion, bezogen auf das Halbleitermaximum, als die Adsorption der Farbstoffe an die Halbleiteroberfläche. Auch eine Stabilisierung der Farbstoff-Halbleiter-Interaktion war nicht zu beobachten. Farbstoffe, die in einem Lösungsmittel nicht an eine gesinterte Elektrode adsorbierten, wurden durch das gleiche Lösungsmittel auch aus einem Halbleitertegel gelöst, in das sie eingebettet waren.

3.2.9 Adsorption von Farbstoffen an TiO₂-Elektroden und Elektroneninjektion

Seit der Entwicklung der ersten elektrochemischen Solarzellen Anfang der 90er Jahre wurde für eine große Zahl unterschiedlicher Farbstoffe nachgewiesen, dass sie in der Lage sind, Elektronen auf TiO₂ zu übertragen. Diese Arbeit konzentrierte sich daher weitgehend auf Farbstoffe, die hauptsächlich im roten und infraroten Bereich des Lichtspektrums absorbierten und sich daher als Akzeptoren für die Anregungsenergie des LHCII eigneten (siehe 3.2.11).

3.2.9.1 Vergleich der untersuchten Farbstoffe hinsichtlich der Adsorption an TiO₂ und Elektroneninjektion in den Halbleiter

Im Rahmen dieser und einer früheren Arbeit (Lion, 2001) wurden verschiedene Farbstoffe hinsichtlich der Adsorption an Titandioxid und der Elektronenübertragung auf den Halbleiter untersucht. Eine Übersicht aller betrachteten Farbstoffe ist in Tab. 3.1 zu finden.

Von entscheidender Bedeutung für den Einsatz eines Farbstoffes in einer LHCII-Solarzelle war die Möglichkeit, diesen Farbstoff gemeinsam mit LHCII auf der Titandioxidoberfläche zu adsorbieren. Hierfür musste der Farbstoff entweder in wässriger Puffer-Detergens-Lösung an die Halbleiteroberfläche adsorbieren, oder so hydrophob sein, dass er in organischem Lösungsmittel auf die Elektrode aufgebracht werden konnte und sich nach dem Wechsel in ein wässriges Medium nicht von der Oberfläche ablöste. Das Kriterium der Adsorption in wässriger Lösung wurde von zahlreichen Farbstoffen erfüllt. Unter diesen Farbstoffen konnte jedoch nur mit den Farbstoffen Dy701 und Dy731 (Dyomics) sowie den Farbstoffen S0121, S0247 und S0524 (FEW-Chemicals) eine messbare Elektroneninjektion auf TiO₂ beobachtet werden. Die Perrylenfarbstoffe PDI-COOH und PMI-COOH, die vom MPI für Polymerforschung (Mainz) hergestellt wurden, konnten in THF an TiO₂ adsorbiert werden und lösten sich nach dem Wechsel in Puffer nicht von der Oberfläche ab. Als Energieakzeptor für die Anregungsenergie von LHCII kamen diese Farbstoffe nicht in Frage, da sie hauptsächlich Licht der Wellenlängen unter 600 nm absorbierten. Die Elektronenübertragung von diesen Farbstoffen auf TiO₂ lag nur knapp über der Nachweisgrenze, konnte jedoch, im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Farbstoffen, auch bei Verwendung von 0,5 M KI und 0,04 M I₂ in Wasser als Elektrolyt beobachtet werden.

3. Ergebnisse

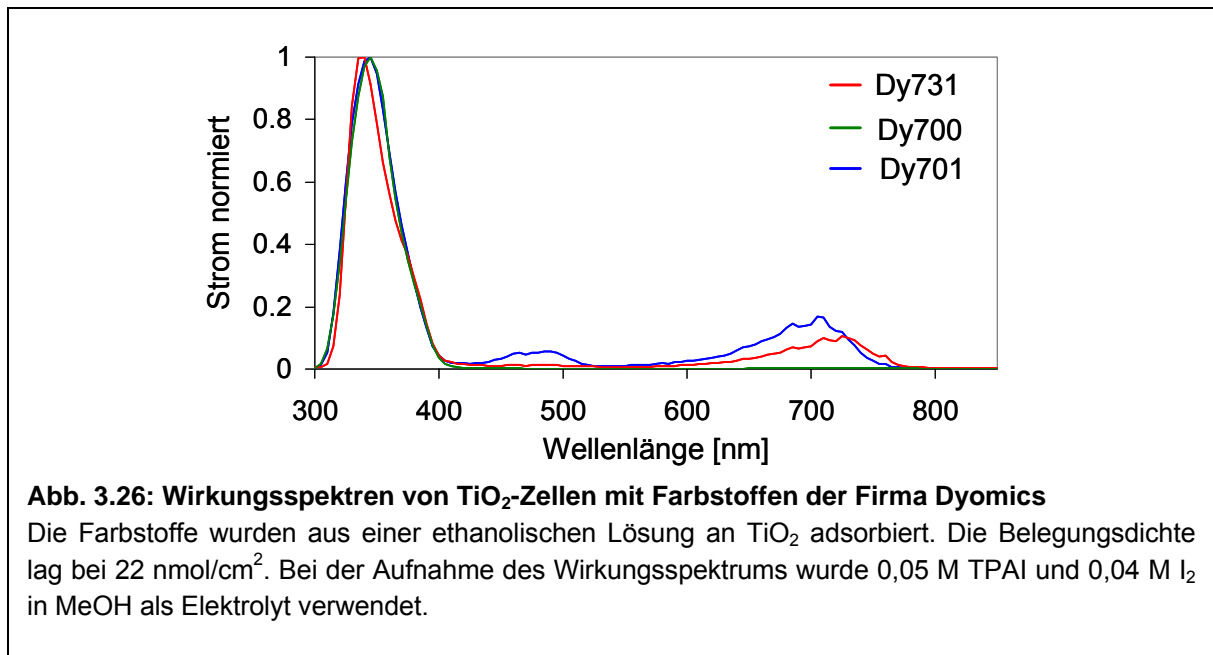
Farbstoff		Adsorption an TiO ₂		Elektroneninjektion	
Hersteller	Kurzname	EtOH/THF	Puffer/Detergens	EtOH	Glycerin
MPI für Polymerforschung	BTI ¹⁾	-	-	-	-
	BTI-O-R2 ¹⁾	-	-	0	0
	QDI ¹⁾	-	-	0	0
	QDI-O-R4 ¹⁾	-	-	0	0
	Qu42	-	++	-	-
	TDI	-	-	0	0
	TDI-COOH	+	*	-	-
	PDI-COOH	++	*	+	-
	PDI-NH2 ¹⁾	-	++	-	-
PMI-COOH	+	*	+	-	
Molecular Probes	Alexa Fluor 680 ¹⁾	+++	-	++	++
Fluka	Atto 680	-	+++	-	-
	DOTCI	-	+++	-	-
	NIR-797	-	+++	-	-
	Ni-Farbstoff	-	+	-	-
Amersham	Cy5.5 ¹⁾	+++	-	++	++
Dyomics	Dy700	+++	++	-	-
	Dy730	+++	++	-	-
	Dy701	+++	++	++	-
	Dy731	+++	++	++	-
Radiant Dyes	DDI	-	+++	-	-
	Kryptocyanin	-	+++	-	-
	Oxazin 750	-	+++	-	-
FEW-Chemicals	S0121	+	++	+	+
	S0247	++	+++	++	++
	S0524	+	+++	++	+++
	S0525	-	-	-	-
	S0584	~	~	~	~
sonstige	Rhodamin 700	-	+++	-	-

Legende	
Symbol	Bedeutung
-/+ /++ /+++	nicht/etwas/gut/sehr gut
*	bleibt nach Adsorption in organischem Lösungsmittel in Puffer stabil an der Elektrode gebunden
0	Versuch nicht möglich
~	Versuch nicht durchgeführt
¹⁾	Diese Farbstoffe wurden schon früher (Lion, 2001) untersucht
Farbstoffgruppen: Rylene, Rhodamine, Cyanine, Hemicyanine, andere.	

Tab. 3.1: Vergleich verschiedener Farbstoffe hinsichtlich der Adsorption an TiO₂ und der Elektronenübertragung auf den Halbleiter. (Eine ausführliche Auflistung aller verwendeten Farbstoffe befindet sich im Anhang dieser Arbeit).

3. Ergebnisse

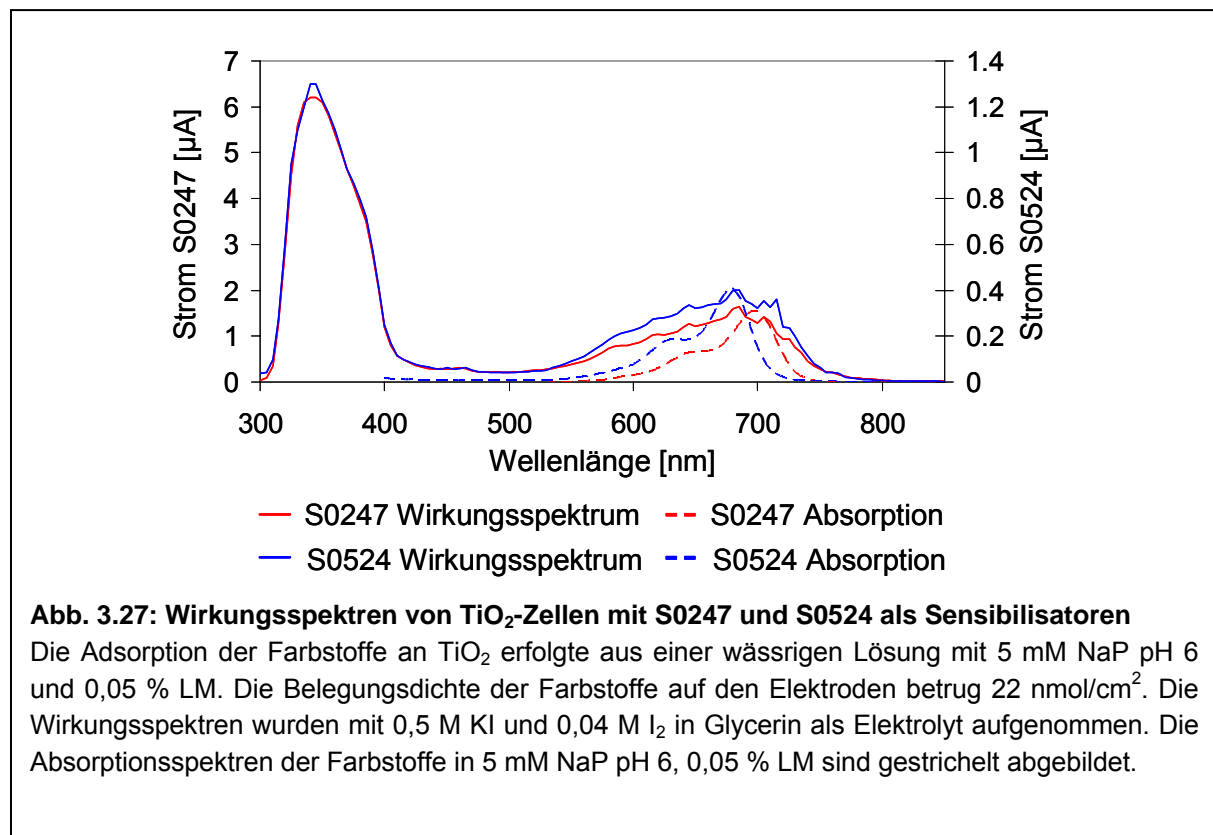
Da die Farbstoffe Dy701, Dy731, S0247 und S0524 sowohl das Kriterium der Adsorption an TiO_2 in Puffer erfüllten, als auch in der Lage waren, Elektronen auf den Halbleiter zu übertragen, wurden mit diesen Farbstoffen weitere Messungen durchgeführt. Die Wirkungsspektren von Dy701, Dy731 und Dy700 sind in Abb. 3.26 dargestellt.



Die Wirkungsspektren der Dyomics-Farbstoffe wurden mit TPAI und I_2 in MeOH als Elektrolyt aufgenommen. Mit Iodid und Iod in Wasser konnte keine Elektroneninjektion gemessen werden. Wurde Glycerin als Lösungsmittel für die Elektrolytkomponenten verwendet, so kam es zur Ablösung der Farbstoffe von der Elektrodenoberfläche. Damit war es nicht möglich, eine Elektronenübertragung von den Farbstoffen auf den Halbleiter unter Bedingungen zu messen, unter denen eine ausreichende Stabilität des LHCII gewährleistet wäre. Dy700 unterschied sich von Dy701 nur um eine Sulfonylgruppe (eine statt zwei SO_3^- -Gruppen), zeigte jedoch in keiner der durchgeführten Messungen eine Elektroneninjektion in das Leitungsband von TiO_2 .

3. Ergebnisse

Anders als die Dyomics-Farbstoffe, übertrugen die Farbstoffe S0121, S0247 und S0524 von FEW-Chemicals auch Elektronen auf Titandioxid, wenn KI und I₂ in Glycerin als Elektrolyt eingesetzt wurde (Abb. 3.27).



Das Maximum der Elektroneninjektion der beiden Farbstoffe lag bei 685 nm. Obwohl sich die Absorptionsmaxima der Farbstoffe in wässriger Lösung um ca. 19 nm unterschieden, schlug sich dieser Unterschied nicht in der Lage oder Form der Strombande im Wirkungsspektrum nieder. Da Iodid und Iod in Glycerin eine hinreichende Stabilität des LHCII gewährleisteten, konnten mit diesen Farbstoffen auch Wirkungsspektren von Zellen aufgenommen werden, bei denen LHCII und Farbstoff an die Anode adsorbiert waren (siehe 3.2.13).

3.2.9.2 Beeinflussung der Elektroneninjektion durch Saccharose-Dichtegradientenlösung

Um Elektroden herzustellen, die mit einem Sensibilisatorfarbstoff und LHCII beschichtet waren, wurden die Farbstoff-TiO₂-Elektroden über Nacht in einer LHCII-Lösung inkubiert. Zu Beginn der Arbeit wurde das LHCII nach der Aufreinigung mittels Dichtegradientenultrazentrifugation in der Dichtegradientenlösung auf die Elektroden aufgebracht. Dabei zeigte sich jedoch, dass Komponenten dieser Lösung die Elektroneninjektion durch die Farbstoffe herabsetzten (Abb. 3.28).

3. Ergebnisse

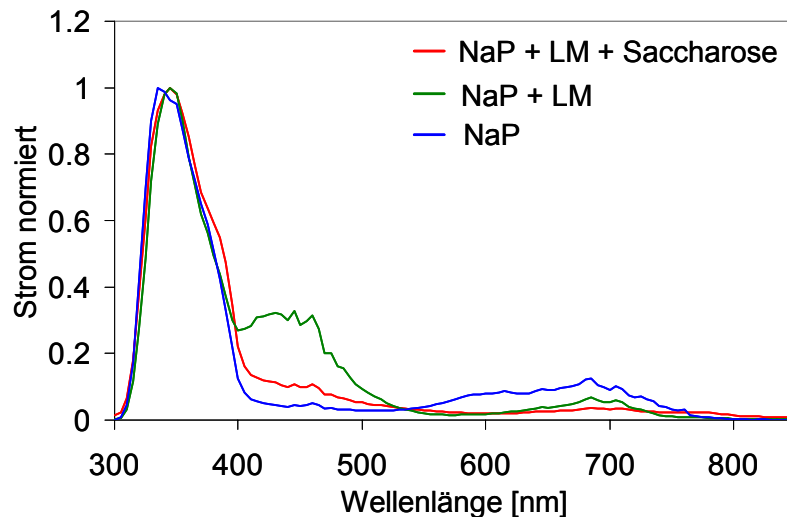


Abb. 3.28: Wirkungsspektren von S0247-TiO₂-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Puffern

Die Adsorption von S0247 an TiO₂ erfolgte aus einer ethanolischen Lösung. Die Belegungsdichte des Farbstoffes auf der Elektrode lag bei 22 nmol/cm². Die S0247-TiO₂-Elektroden wurden vor der Aufnahme des Wirkungsspektrums in dem jeweiligen Puffer inkubiert. Dabei wurden die Komponenten in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: NaP: 20 mM pH 6, LM: 0,1 %, Saccharose: 0,5 M. Die Wirkungsspektren wurden mit 0,5 M KI und 0,04 M I₂ in Glycerin als Elektrolyt aufgenommen.

Das Waschen der S0247-TiO₂-Elektroden mit einer wässrigen Pufferlösung führte stets zu einer Ablösung von Farbstoff von der Elektrodenoberfläche (siehe auch 3.2.11.2), sodass auch die Inkubation in NaP-Puffer ohne Detergentien oder Saccharose schon zu einer deutlichen Verminderung der Elektroneninjektion im Bereich zwischen 600 nm und 750 nm führte. Detergentien und Saccharose verstärkten diesen Effekt noch. Nach der Inkubation in der Dichtegradientenlösung, 20 mM NaP, 0,1 % LM, 0,05 M Saccharose, sank die Elektroneninjektion nahezu auf das Niveau des Signaluntergrunds ab. In der Zelle, deren Kathode mit NaP und LM gespült wurde (grünes Spektrum), kam es außerdem zu einem Anstieg der Elektroneninjektion zwischen 400 nm und 500 nm. Eine Erklärung für diesen Effekt konnte nicht gefunden werden.

Im Folgenden wurden verschiedene Puffer (siehe 3.2.9.4) und Detergentien (siehe 3.2.9.5) hinsichtlich ihres Einflusses auf die Farbstoffadsorption an TiO₂ untersucht. Anstelle von Saccharose wurde Glycerin zur Stabilisierung von LHCII während der Adsorption an die Halbleiteroberfläche verwendet (siehe 3.2.6.1.2).

3. Ergebnisse

3.2.9.3 Abhängigkeit der Farbstoffadsorption an TiO_2 von der Glycerinkonzentration

Neben Saccharose stellte sich auch Glycerin als geeignetes Mittel zur Stabilisierung von LHCII während der Adsorption an Halbleiter heraus (siehe 3.2.6.1.2). Das Waschen von Farbstoff- TiO_2 -Elektroden mit einem glycerinhaltigen Waschpuffer führte ähnlich wie bei Saccharose-haltigen Puffern zu einer Ablösung des Farbstoffes von der Halbleiteroberfläche (Abb. 3.29).

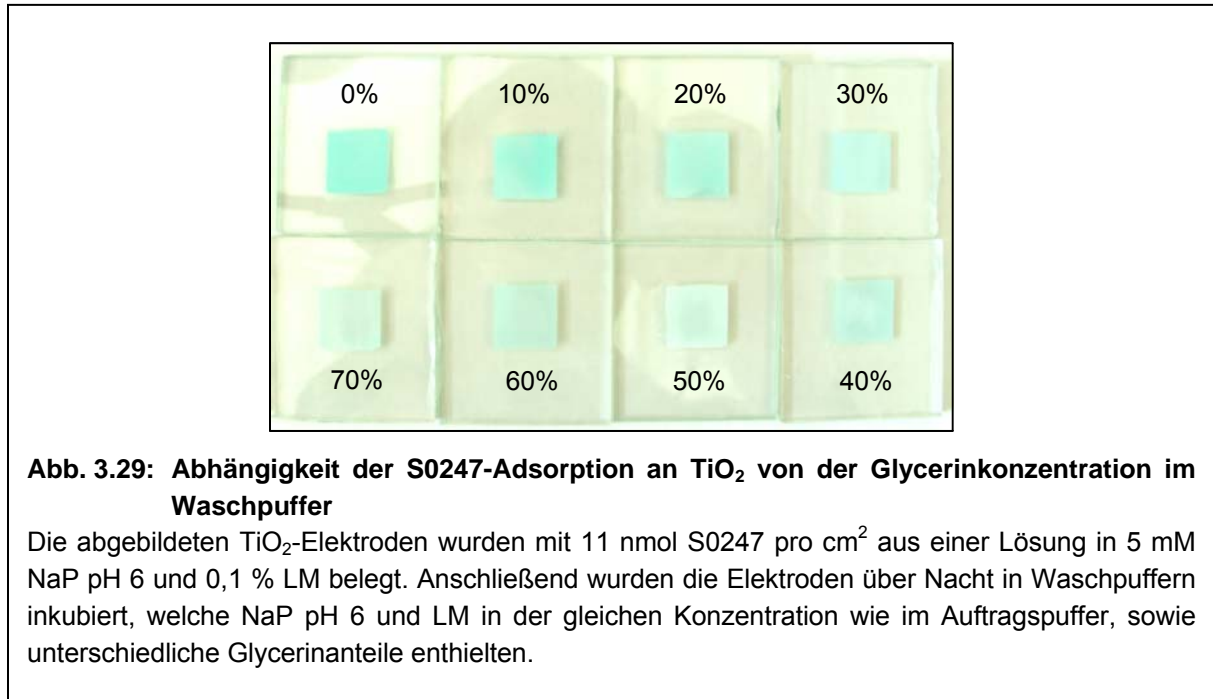


Abb. 3.29: Abhängigkeit der S0247-Adsorption an TiO_2 von der Glycerinkonzentration im Waschpuffer

Die abgebildeten TiO_2 -Elektroden wurden mit $11 \text{ nmol S0247 pro cm}^2$ aus einer Lösung in $5 \text{ mM NaP pH } 6$ und $0,1 \text{ \% LM}$ belegt. Anschließend wurden die Elektroden über Nacht in Waschpuffern inkubiert, welche $\text{NaP pH } 6$ und LM in der gleichen Konzentration wie im Auftragspuffer, sowie unterschiedliche Glycerinanteile enthielten.

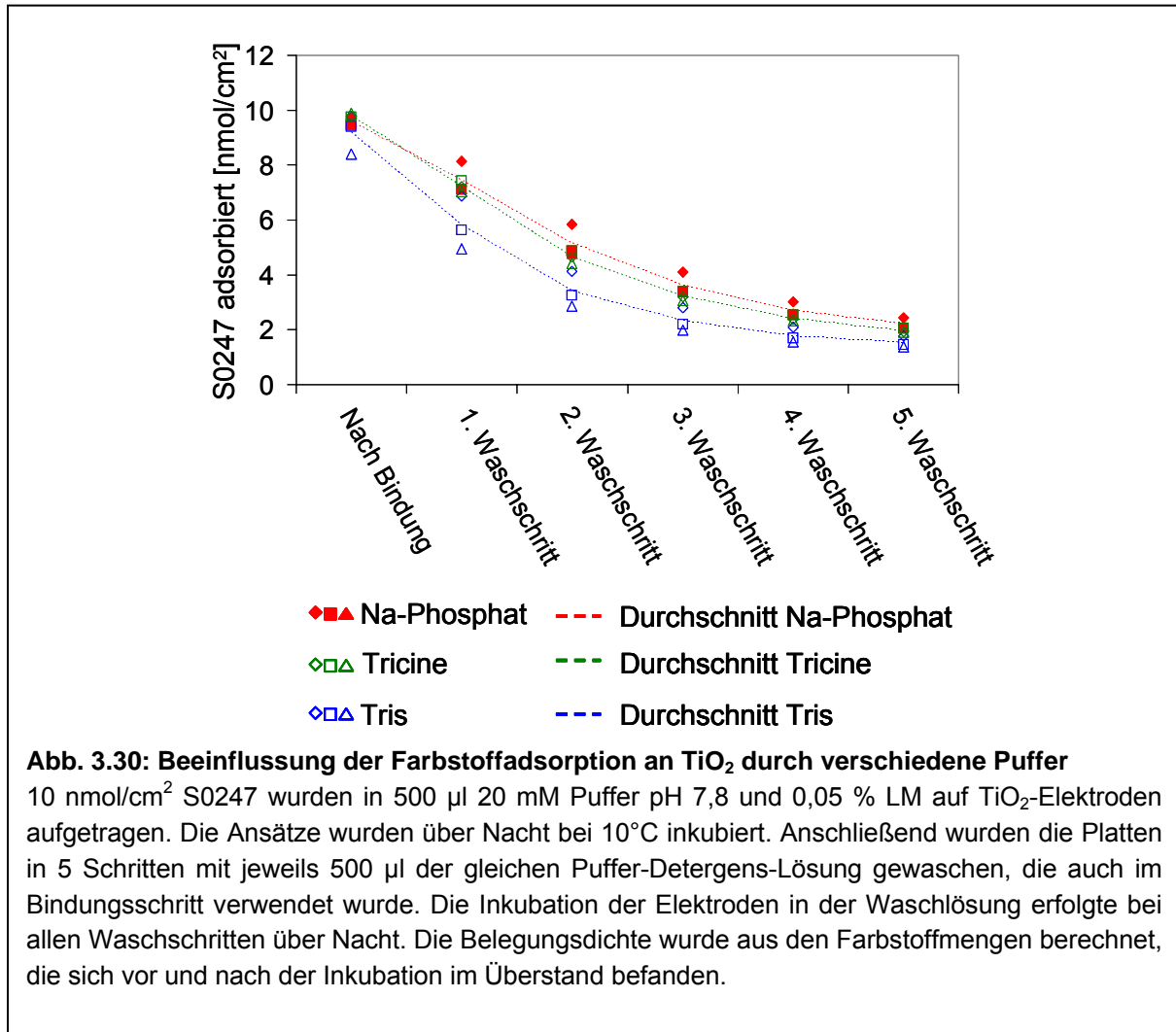
Die Abbildung zeigt S0247- TiO_2 -Elektroden, die in Waschpuffer inkubiert wurden, der unterschiedliche Konzentrationen an Glycerin enthielt. Tendenziell ist bei den Platten eine Verminderung der Farbstoffbelegung mit zunehmender Glycerinkonzentration zu erkennen. Besonders stark war die Abnahme bei Glycerinkonzentrationen bis 30 \% . Die Belegungsdichte nahm hier von 5 nmol/cm^2 bei 0 \% auf 3 nmol/cm^2 bei 30 \% Glycerin ab. Das Waschen der Elektroden mit Puffern, die 30 \% bis 70 \% Glycerin enthielten, führte zu Farbstoff-Belegungsdichten zwischen 2 nmol/cm^2 und 3 nmol/cm^2 . Eine stetige Abnahme der Belegungsdichte mit zunehmender Glycerinkonzentration war bei diesen Elektroden nicht zu beobachten. Vielmehr schien die Belegungsdichte um einen Wert von ca. $2,5 \text{ nmol/cm}^2$ zu schwanken. Diese Schwankung ist möglicherweise auf Unterschiede in der Beschaffenheit der TiO_2 -Elektroden zurückzuführen.

Um die Farbstoffbelegung nicht zu sehr zu vermindern, wurde in den folgenden Versuchen eine Glycerinkonzentration von 10 \% in die LHCII-Auftragslösung eingesetzt. Die Verwendung von 100 \% Glycerin als Lösungsmittel für die Elektrolytkomponenten führte während der elektrochemischen Messungen nicht zu einer nennenswerten Ablösung der Farbstoffe S0247 und S0524 von der Elektrodenoberfläche. Wurden die Elektroden jedoch über Nacht in 100 \% Glycerin inkubiert, so gingen die Farbstoffe fast vollständig in Lösung.

3. Ergebnisse

3.2.9.4 Einfluss des verwendeten Puffers auf die Farbstoffadsorption an TiO_2

Wie in 3.2.9.3 dargestellt, führte das Waschen von Farbstoff- TiO_2 -Elektroden mit NaP-Puffer zur Ablösung der Farbstoffe von der Elektrodenoberfläche. In vergleichenden Messungen mit anderen Puffern wurde untersucht, wie der Puffer die Farbstoffadsorption an TiO_2 beeinflusst (Abb. 3.30).



In den Experimenten mit NaP, Tris (HCl) und Tricine (NaOH) konnte kein signifikanter Unterschied in der Adsorption von S0247 an TiO_2 festgestellt werden. Von 10 nmol/cm² aufgetragenem Farbstoff adsorbierten im Bindungsschritt deutlich über 90 % an die Halbleiteroberfläche. Im ersten Waschschrift reduzierte sich die adsorbierte Farbstoffmenge auf 6 bis 8 nmol/cm². Das bedeutete eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen adsorbiertem und gelöstem Farbstoff. Weitere Waschschriffe führten schließlich zur nahezu vollständigen Ablösung des Farbstoffes von den Elektroden.

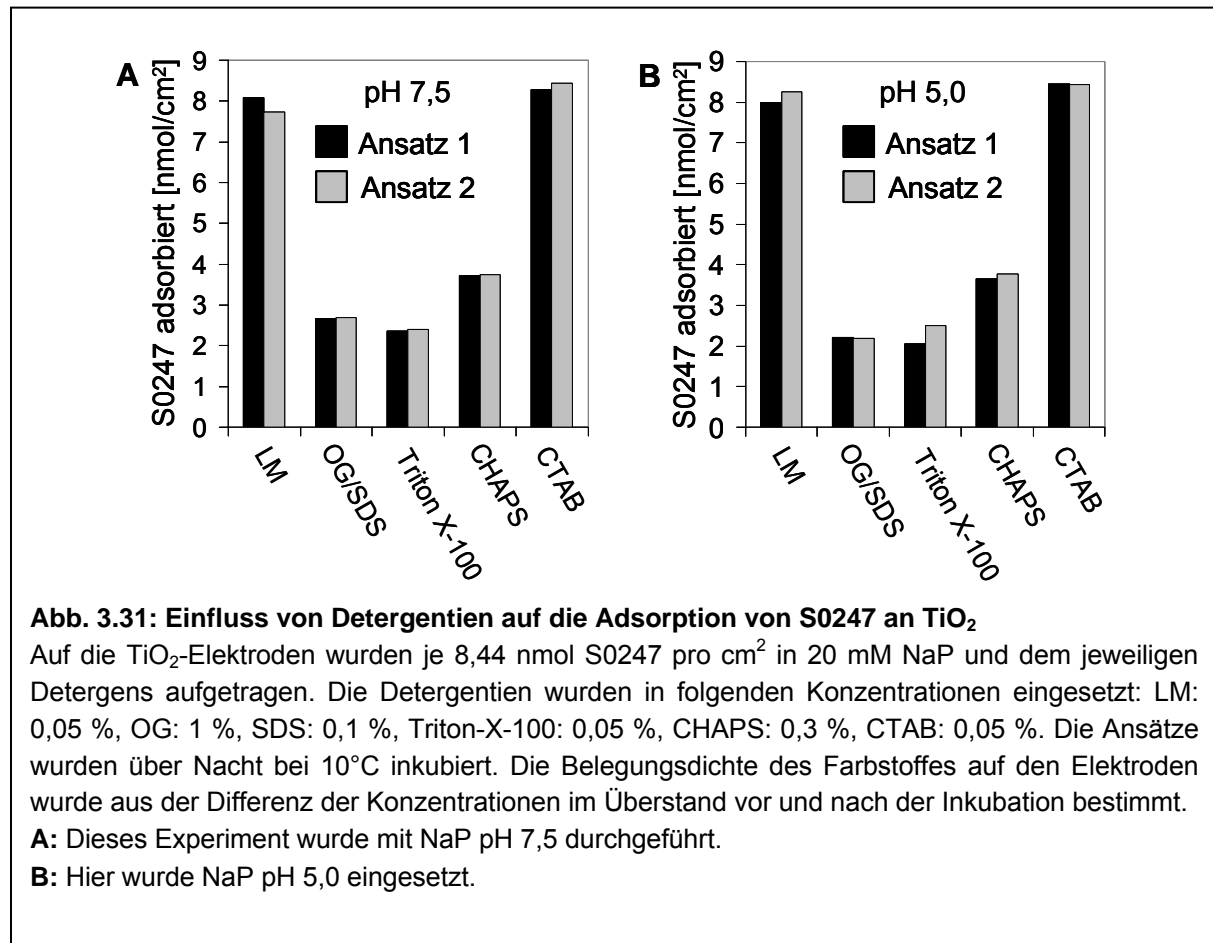
Ebenfalls durchgeführte Versuche zur Adsorption von Farbstoffen aus NaP-Lösungen mit verschiedenen pH-Werten zeigten, dass der pH-Wert der Auftragslösung keinen Einfluss auf die Belegungsdichte des Farbstoffes auf der TiO_2 -Oberfläche hat.

3. Ergebnisse

3.2.9.5 Abhängigkeit der Farbstoffadsorption vom verwendeten Detergens

Experimente, in denen Farbstoffe in unterschiedlichen Detergentien auf TiO_2 aufgetragen wurden, zeigten, dass die Adsorption der Farbstoffe an die Elektrode stark vom verwendeten Detergens abhängt.

Im ersten Versuch wurde der Farbstoff S0247 bei zwei pH-Werten, pH 7,5 und pH 5,0, mit verschiedenen Detergentien auf TiO_2 -Elektroden aufgebracht (Abb. 3.31). Dabei wurden ungeladene (LM, OG und Triton X-100), kationische (CTAB), anionische (SDS) und zwitterionische (CHAPS) Detergentien verwendet.



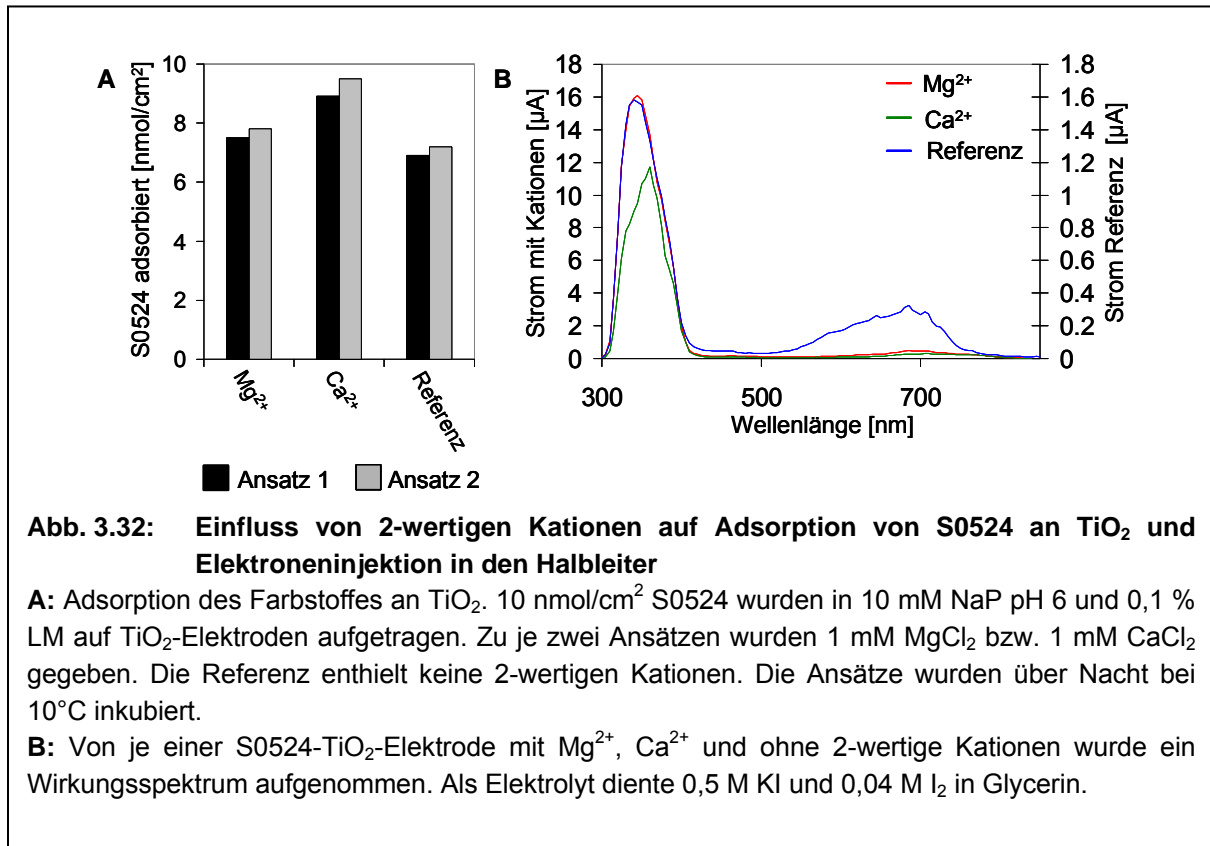
Das ungeladene Detergens LM und das kationische Detergens CTAB führten zu einer fast vollständigen Adsorption des aufgetragenen Farbstoffes an die Halbleiteroberfläche. Mit allen anderen Detergentien adsorbierte weniger als die Hälfte der Farbstoffmoleküle an TiO_2 . Der pH-Wert hatte keinen Einfluss auf dieses Ergebnis.

In einem weiteren Versuch wurde die Adsorption des Farbstoffes S0247 in LM und CTAB mit der Adsorption ohne Detergens verglichen. Der Verzicht auf Detergens im Bindungsschritt führte dazu, dass so gut wie kein S0247 an TiO_2 adsorbierte. Stattdessen haftete der Großteil des aufgetragenen Farbstoffes an der Knetmasse, die zum Abdichten der Elektroden verwendet wurde. Nach dem Bindungsschritt wurden die Elektroden mehrmals mit dem gleichen Puffer gewaschen, der bei der Adsorption des Farbstoffes an TiO_2 verwendet worden war. Im Vergleich zu LM führte das Waschen mit CTAB zu einer langsameren Ablösung des Farbstoffes von der Elektrodenoberfläche.

3. Ergebnisse

3.2.9.6 Abhängigkeit der Farbstoffadsorption und Elektroneninjektion von zweiwertigen Kationen

Anhand des Farbstoffes S0524 wurde untersucht, ob zweiwertige Kationen die Adsorption des Farbstoffes an TiO_2 oder die Elektronenübertragung auf den Halbleiter beeinflussen (Abb. 3.32).



Bei den Ansätzen mit Ca^{2+} war gegenüber den Ansätzen mit Mg^{2+} und der Referenz ohne zweiwertige Kationen eine leichte Erhöhung der S0524-Belegungsdichte auf der TiO_2 -Oberfläche zu beobachten (Abb. 3.32.A). Die Elektroneninjektion durch den Farbstoff war im Verhältnis zu den Elektronenübergängen im Halbleiter bei den Zellen mit Ca^{2+} und Mg^{2+} im Vergleich zur Referenz jedoch stark vermindert. Der Strom im Absorptionsmaximum des Farbstoffes lag bei diesen Zellen nur leicht über dem Signaluntergrund.

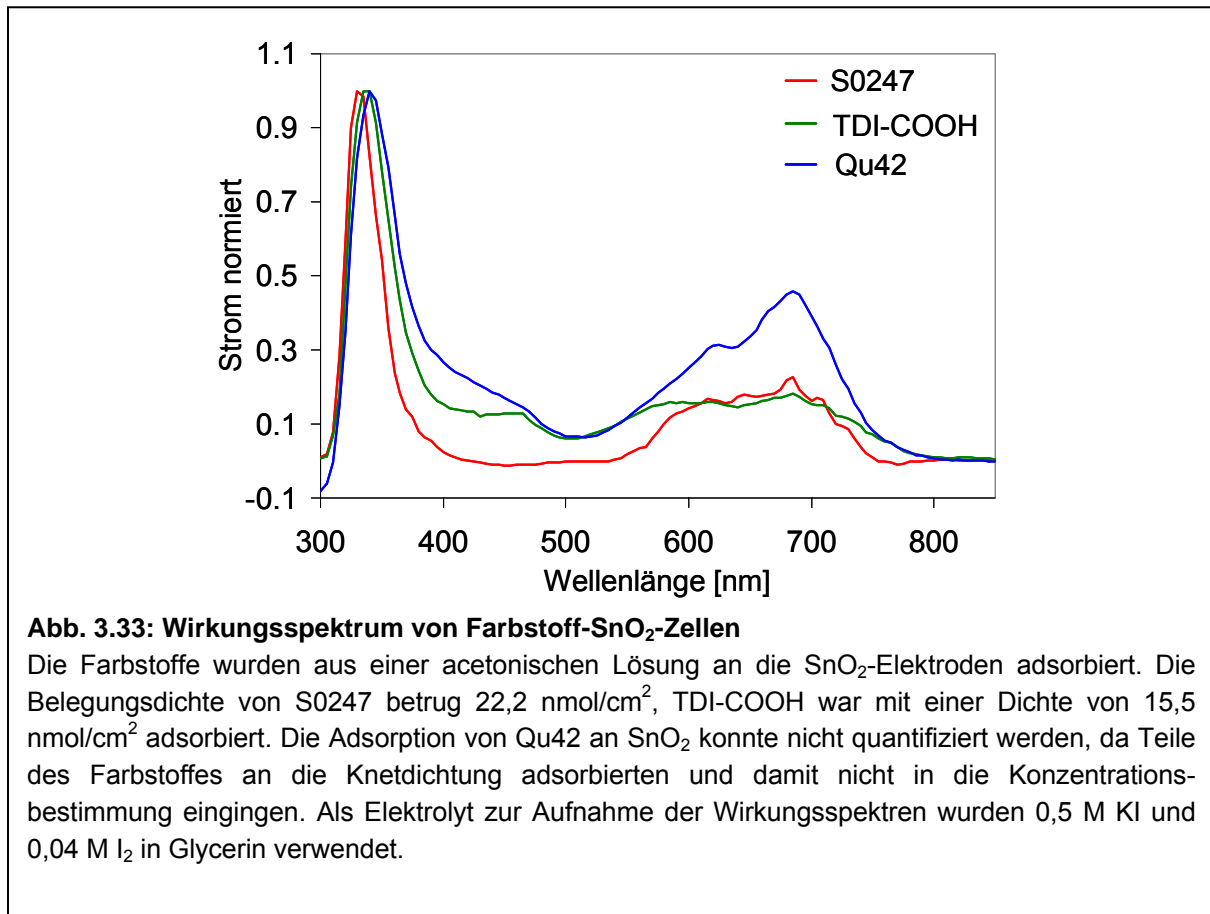
Der Strom, der im Maximum der Elektronenübergänge im Halbleiter produziert wurde, war bei der Referenzzelle deutlich niedriger, als bei den Zellen mit 2-wertigen Kationen. Die Ursache hierfür war eine versehentliche Benetzung der Stromabnehmer mit Elektrolytlösung, die zu einer Verminderung des absoluten Signals, nicht jedoch zu einer Veränderung der Form des Spektrums führte. Für den Signaleinbruch, der bei der Ca^{2+} -Zelle zwischen 300 nm und 400 nm zu sehen war, konnte keine Ursache ermittelt werden.

3. Ergebnisse

3.2.10 Adsorption von Farbstoffen an SnO₂-Elektroden und Elektroneninjektion

Durch die Herstellung von Zinndioxyelektroden aus gefälltem SnO₂ wurde es möglich, Farbstoffe in quantitativen Mengen an die Halbleiteroberfläche zu adsorbieren. Die Belegungsdichte von 22 nmol/cm², die dabei erreicht wurde, war mit den Werten vergleichbar, die bei der Adsorption von Farbstoffen an Titandioxid gemessen wurden.

Die Elektroneninjektion von Farbstoffen in das Leitungsband von SnO₂ wurde mit den Farbstoffen S0247, TDI-COOH und Qu42 untersucht (Abb. 3.33).



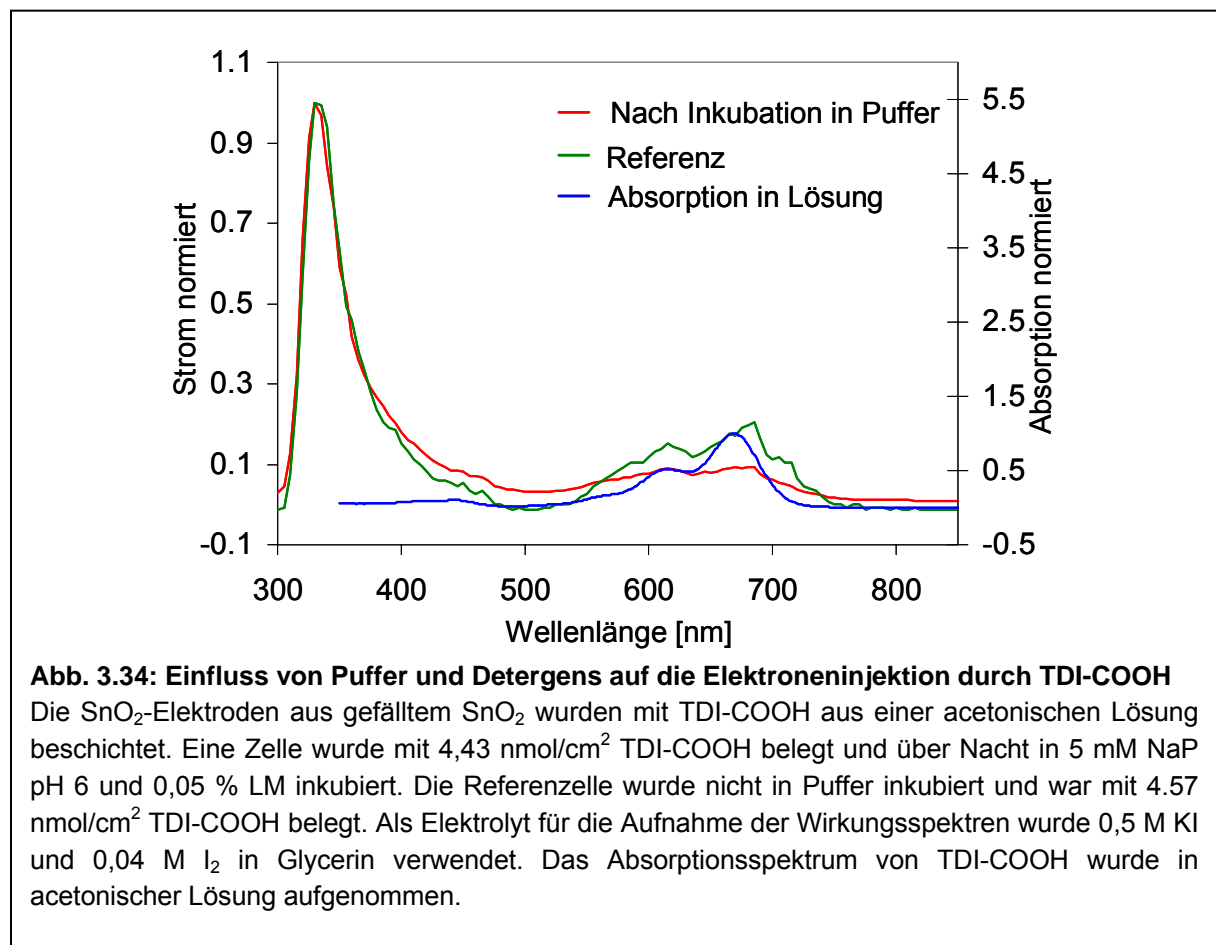
Jeder der drei überprüften Farbstoffe war in der Lage, Elektronen auf SnO₂ zu übertragen. Der Wellenlängenbereich der Elektroneninjektion korrelierte mit den Hauptabsorptionsbanden der Farbstoffe zwischen 550 nm und 750 nm. Von besonderem Interesse war hierbei die Elektroneninjektion durch die Terrylene TDI-COOH und Qu42, die bei Versuchen mit Titandioxid keine Elektroneninjektion gezeigt hatten (siehe 3.2.9.1).

Der Farbstoff Qu42 war aufgrund seiner vier Sulfonylgruppen wasserlöslich, eine Adsorption des Terrylens an SnO₂ aus wässriger Lösung konnte jedoch nicht beobachtet werden. Vielmehr löste sich der Farbstoff nach Adsorption in Aceton und Wechsel der Elektrode in wässriges Puffermedium vollständig von der Oberfläche ab. Für eine Koadsorption mit LHCII kam Qu42 demnach nicht in Frage.

Der Farbstoff TDI-COOH war dagegen so hydrophob, dass er in Aceton an die Elektrode adsorbiert werden konnte und sich nach dem Wechsel in ein Puffer-Detergens-Gemisch nicht von der Oberfläche löste. Das Ergebnis einer Energietransfermessung, die nach der Koadsorption dieses Terrylens mit LHCII an SnO₂ gemessen wurde, ist unter 3.2.11.3 dargestellt.

3. Ergebnisse

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Inkubation einer TDI-COOH-Elektrode in Puffer und Detergens zu einer Verminderung der Elektroneninjektion durch den Farbstoff führte (Abb. 3.34).



Obwohl der Farbstoff durch die NaP-LM-Lösung nicht von der Elektrodenoberfläche abgelöst wurde, war nach der Inkubation der TDI-COOH-Elektrode in Puffer und Detergens eine Verringerung der Elektroneninjektion zu erkennen. Aus Fluoreszenzspektren der Elektroden wurde ersichtlich, dass die Inkubation in wässrigem Medium zu einem vollständigen Verlust der Farbstofffluoreszenz führte (vgl. 3.2.11.3).

3.2.11 Koadsorption von LHCII und Farbstoff an Halbleiter und Energietransfer

Wie bereits gezeigt wurde, konnten sowohl LHCII (siehe 3.2.6.1 und 3.2.6.2), als auch Farbstoffe (siehe 3.2.9 und 3.2.10) an Halbleiterelektroden adsorbiert werden. Um eine gemeinsame Adsorption beider Komponenten an die Elektrodenoberfläche zu erreichen, wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Farbstoffe, die in wässrigem Medium nicht am Halbleiter hafteten, jedoch eine SH- oder aminofunktionale Gruppe aufwiesen, wurden zunächst kovalent an LHCII gekoppelt. Anschließend wurde versucht, das LHCII-Farbstoff-Konstrukt orientiert an den Halbleiter zu binden. Farbstoffe, die in Puffer an TiO₂ oder SnO₂ adsorbierten, konnten auch ohne kovalente Kopplung mit LHCII an die Elektroden adsorbiert werden.

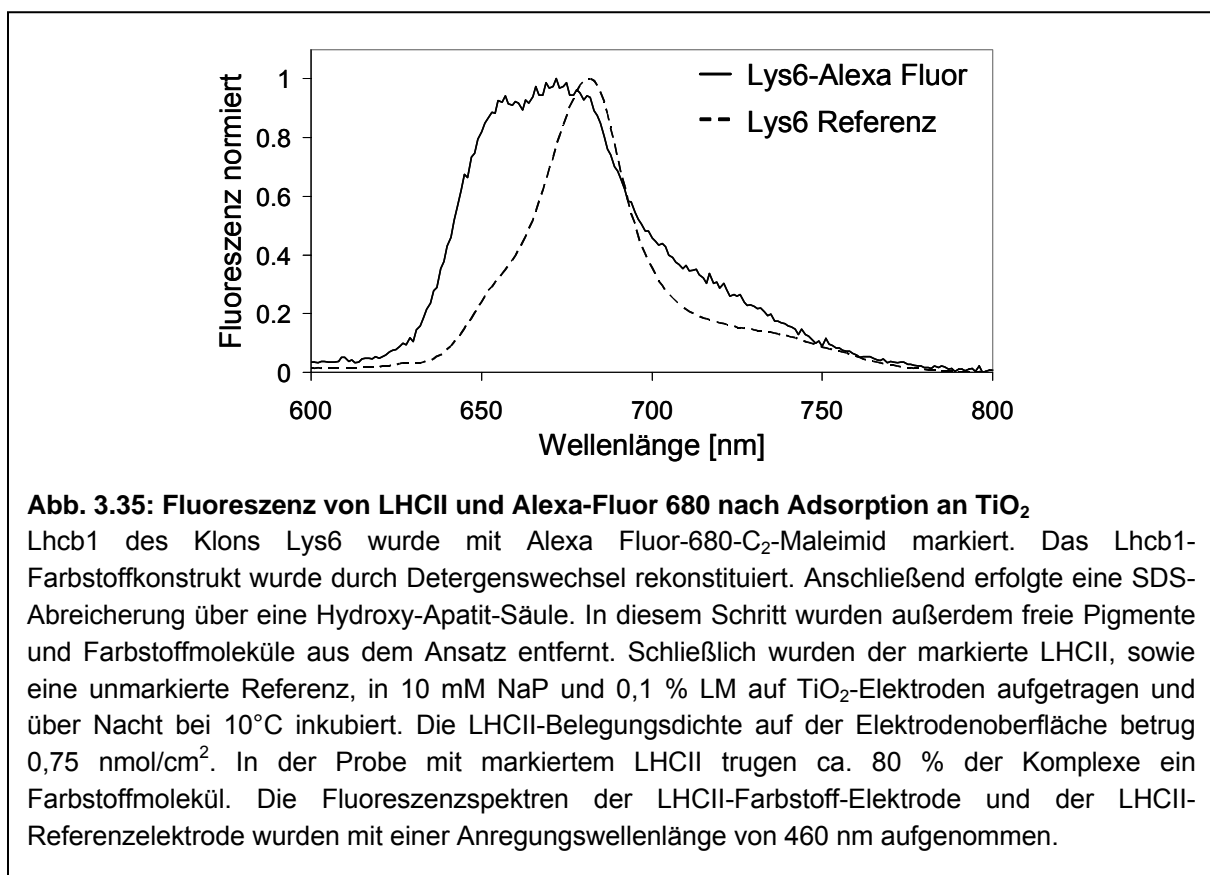
3. Ergebnisse

3.2.11.1 Adsorption von LHCII-Farbstoff-Konstrukten an Titandioxid

Zur Adsorption von LHCII-Farbstoff-Konstrukten an TiO_2 wurde der Lhcb1-Klon Lys6 verwendet, der von H. Wolf-Klein (2001) speziell zu diesem Zweck hergestellt worden war. Lys6 weist nahe des N-Terminus eine Sequenz von 6 Lysinen auf, an deren C-terminaler Seite ein singuläres Cystein folgt.

In der Theorie sollte bei neutralem pH-Wert eine gerichtete Adsorption des LHCII über die positiv geladenen Lysine erfolgen. Dadurch würde das singuläre Cystein in die Nähe der Elektrodenoberfläche gebracht und ein direkter Kontakt zwischen Farbstoff und Halbleiter gewährleistet.

Abb. 3.35 zeigt die Fluoreszenzspektren von markiertem und unmarkiertem LHCII nach Adsorption an TiO_2 .



Im Fluoreszenzspektrum der immobilisierten LHCII-Farbstoff-Konstrukte war die Chl *b*-Fluoreszenz bei 650 nm, nach Anregung bei 460 nm, gegenüber dem Referenzspektrum stark erhöht. Die Fluoreszenz von Chl *a* wies im Vergleich zur Referenz eine Blauverschiebung um 8 nm, von 681 nm auf 673 nm, auf. Die Abnahme des Energietransfers von Chl *b* auf Chl *a* und die Verschiebung der Fluoreszenz zu kürzeren Wellenlängen ließ darauf schließen, dass die immobilisierten Komplexe fast vollständig zerfallen waren. Im Spektrum der nicht markierten Referenz war dagegen nur eine leichte Chl *b*-Fluoreszenz zu sehen, was darauf hindeutet, dass diese Komplexe auch nach der Immobilisierung noch weitgehend intakt waren.

3. Ergebnisse

Die erhöhte Fluoreszenz des markierten LHCII zwischen 700 nm und 750 nm war auf den Farbstoff zurückzuführen. Der Farbstoff absorbierte bei 460 nm, mit einem Extinktionskoeffizienten von $2000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, zwar nur wenig Licht, die Absorption reichte jedoch aus, um eine geringfügige Fluoreszenz zu induzieren. Aus diesem Grund ließ sich nicht sagen, ob die Farbstofffluoreszenz, die im Spektrum zu sehen war, auf einen Energietransfer von den Chlen des LHCII oder auf direkte Anregung des Farbstoffes zurückzuführen war.

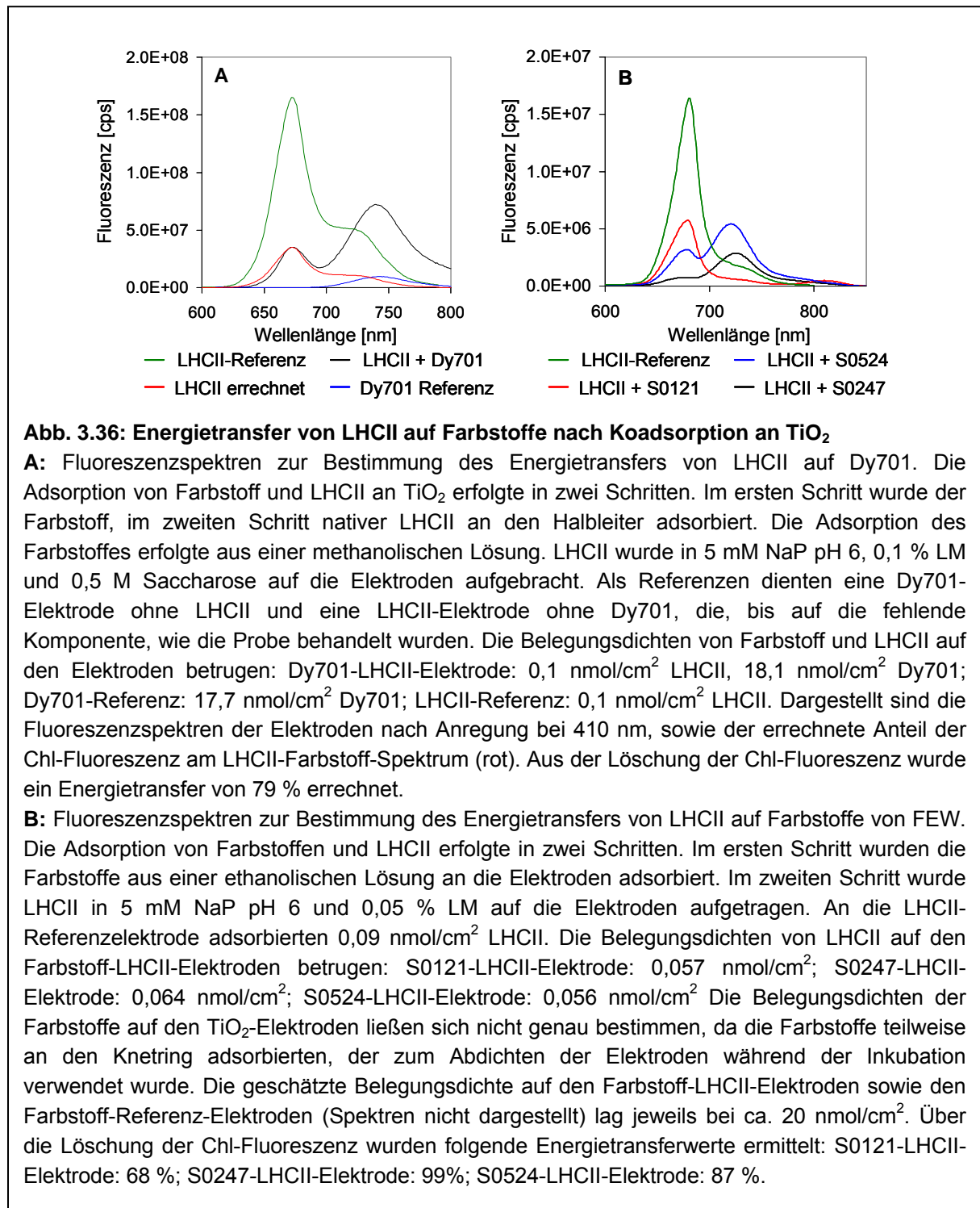
3.2.11.2 Koadsorption von LHCII und Farbstoffen an TiO_2

Wie schon erwähnt (siehe 3.2.9.1), konnte eine Koadsorption von Farbstoffen und LHCII an Titandioxid nur erfolgen, wenn die verwendeten Farbstoffe in Puffer-Detergens-Lösung an die Halbleiteroberfläche adsorbierten, oder so hydrophob waren, dass sie im Anschluss an die Adsorption aus organischer Lösung auch nach einem Wechsel in wässriges Medium auf der Elektrode verblieben.

Zur Gruppe der hydrophilen Farbstoffe, die in polarem organischem Lösungsmittel oder wässriger Lösung an TiO_2 adsorbiert werden konnten, gehörten die Dyomics-Farbstoffe Dy701 und Dy731, sowie die Farbstoffe S0121, S0247, S0524 von FEW-Chemicals und der Farbstoff Qu42, der am MPI für Polymerforschung entwickelt wurde. Der einzige hydrophobe Farbstoff, der für die Koadsorption mit LHCII verwendet wurde, war TDI-COOH, ebenfalls vom MPI für Polymerforschung hergestellt.

Die Adsorption von Farbstoff und LHCII an TiO_2 erfolgte in der Regel in zwei Schritten. In einem ersten Schritt wurde der Farbstoff aus organischer oder wässriger Lösung an den Halbleiter adsorbiert. Nach Abnehmen des Überstandes mit ungebundenem Farbstoff, wurde LHCII in Puffer-Detergens-Lösung auf die Oberfläche aufgetragen. Die Inkubation der Elektrode in LHCII-Lösung erfolgte stets über Nacht. Anschließend wurden die Elektroden an Luft getrocknet und standen für Energietransfermessungen zur Verfügung (Abb. 3.36).

3. Ergebnisse



Der Energietransfer von LHCII auf den Farbstoff wurde stets über die Löschung der Donorfluoreszenz bestimmt (siehe 2.9.4.3). In Abb. 3.36.A ist ein Beispiel für eine Energietransfermessung abgebildet. Die Energietransfereffizienz wurde aus der Differenz zwischen dem Spektrum der LHCII-Referenz (grün) und dem Anteil der Chl-Fluoreszenz (rot) am Spektrum der Elektrode mit LHCII und Farbstoff (schwarz) errechnet.

3. Ergebnisse

Da die Fluoreszenz von LHCII von der Dichte der Komplexe auf der Elektrodenoberfläche abhing, hatten Unterschiede in den LHCII-Belegungsdichten auf der Farbstoff-LHCII-Elektrode und der LHCII-Referenzelektrode eine Verminderung der Messgenauigkeit zur Folge. War die LHCII-Belegungsdichte auf der Referenzelektrode höher als auf der Elektrode mit Farbstoff, so führte das wahrscheinlich zu einer Überbewertung des Energietransfers. Im umgekehrten Fall war davon auszugehen, dass der apparente Energietransferwert zu niedrig war. Tabelle 3.2 gibt eine Übersicht über die einzelnen Messungen mit den zugehörigen Belegungsdichten von LHCII und Farbstoff.

Farbstoff	Belegungsdichte LHCII-Referenz [nmol/cm ²]	Belegungsdichte LHCII [nmol/cm ²]	Belegungsdichte Farbstoff [nmol/cm ²]	Verhältnis Farbstoff/LHCII	Energie-transfer [%]
Dy701	0,1	0,1	18,1	181	79
S0121	0,09	0,057	ca. 20	ca. 350	68
S0247	0,09	0,064	ca. 20	ca. 310	99
S0247	0,33	0,39	36,6	94	98
S0247	0,28	0,24	10,5	44	99,6
S0247	0,28	0,24	10,7	45	99,2
S0247	0,09	0,07	17,3	247	96
S0524	0,09	0,056	ca. 20	ca. 360	87
S0524	0,20	0,21	7,9	38	99,3
TDI-COOH	-	-	12	-	84
Qu42	0,076	0,067	22,2	331	85
Qu42	ca. 0,05	ca. 0,05	6,9	ca. 140	85

Legende	
Ungefähre Angaben (ca.)	<u>Farbstoff-Belegungsdichte:</u> Aufgrund der Adsorption von Farbstoff an die Knetdichtung konnte die Belegungsdichte nicht genau bestimmt werden <u>LHCII-Belegungsdichte:</u> Aus der Dekonvolution des Absorptionsspektrums des Überstandes nach den Bindungsschritten in Farbstoff- und LHCII-Absorption konnte die LHCII-Belegungsdichte nicht exakt bestimmt werden.
-	Die Bestimmung der LHCII-Konzentration im Überstand war nicht möglich. Die Elektroden wurden mit LHCII aus der gleichen Auftragslösung belegt.

Tabelle 3.2: Einzelergebnisse der Energietransfermessung nach Koadsorption von Farbstoffen und nativem LHCII an TiO₂

In allen Messungen wurden hohe Energietransfereffizienzen von 68 % bis über 99 % ermittelt. Am höchsten waren die Werte von Elektroden, an denen LHCII mit den Farbstoffen S0247 oder S0524 immobilisiert wurde (Abb. 3.36.B).

3. Ergebnisse

Die Bedeutung von LHCII als Antenne in einer Solarzelle hängt jedoch nicht ausschließlich vom Energietransfer auf den Sensibilisator ab, sondern auch vom Verhältnis der Belegungsdichten von LHCII und Farbstoff. Der Großteil der Messungen wurde mit einem Farbstoff/LHCII-Trimer-Verhältnis über 100/1 durchgeführt (Tabelle 3.2). Durch Erhöhung der LHCII-Konzentration in der Auftragslösung konnte das Verhältnis auf 40/1 herabgesetzt werden. Allerdings hatte die erhöhte LHCII-Adsorption an den Halbleiter eine Verminderung der absoluten Farbstoff-Belegungsdichte zur Folge.

Eine Ausnahme stellte ein Versuch dar, in dem LHCII ohne Zusatz von Glycerin an die TiO_2 -Farbstoff-Elektrode adsorbiert wurde (Tabelle 3.2, Zeile 4). Der Verzicht auf das stabilisierende Glycerin führte in diesem Versuch jedoch zu einer teilweisen Denaturierung der Komplexe.

Wurde LHCII in mehreren Bindungsschritten auf die Oberfläche aufgebracht, so kam es, wie beim Waschen von Farbstoffelektroden mit Puffer (siehe 3.2.9.4), zu einer sukzessiven Ablösung des Farbstoffes von der Elektrode. Das gleichzeitige Auftragen von LHCII und Farbstoff in einem einzigen Bindungsschritt führte, gegenüber der separaten Adsorption in zwei Schritten, sowohl zu einer Verminderung der Farbstoff-, als auch der LHCII-Belegungsdichte.

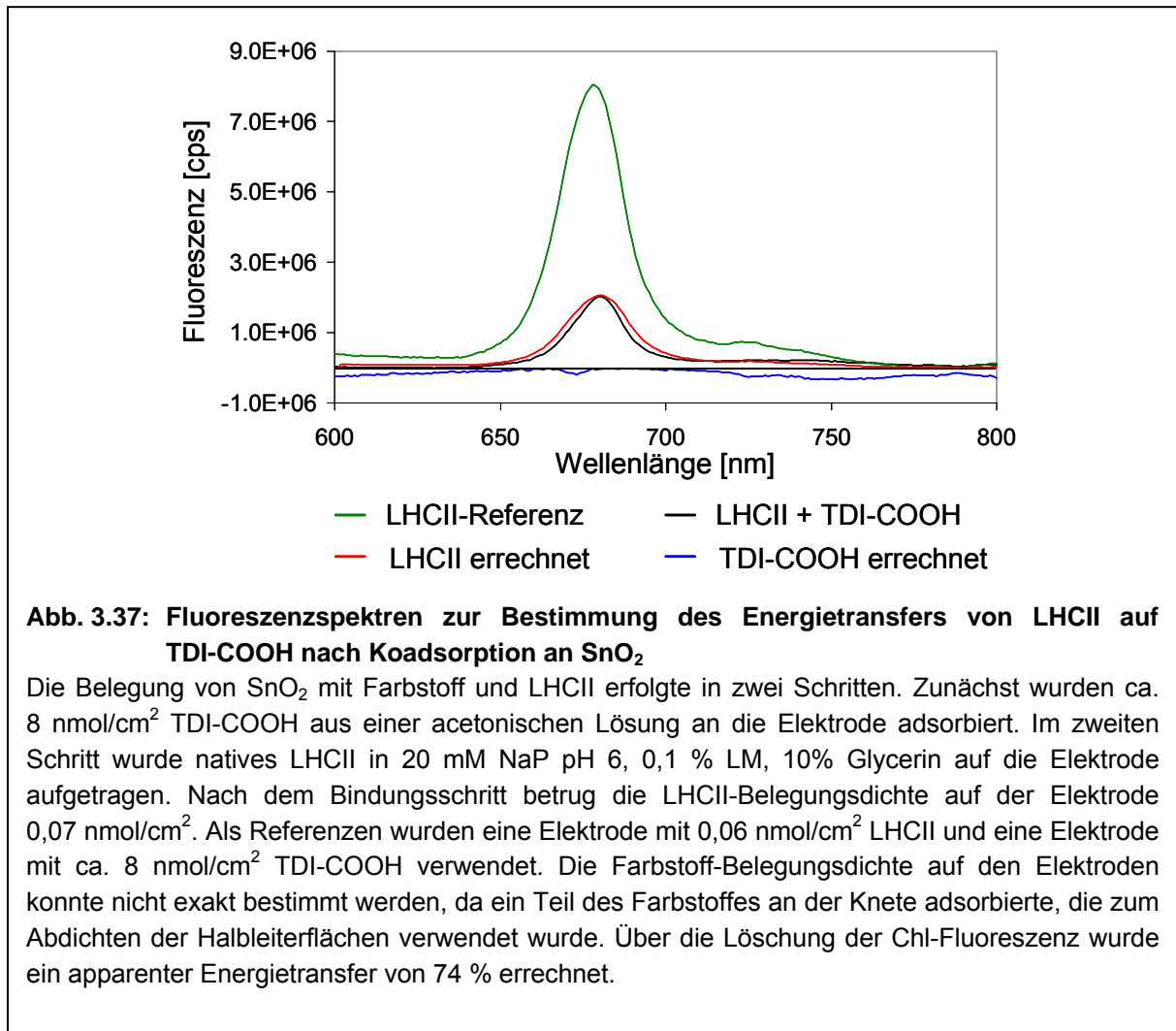
3.2.11.3 Koadsorption von LHCII und Farbstoffen an SnO_2

Aufgrund seiner elektrochemischen Eigenschaften eignete sich Zinndioxid vor allem in Verbindung mit Rylenfarbstoffen als Elektrodenmaterial (siehe 3.2.10).

Unter den Rylenen kamen sowohl Qu42 als auch TDI-COOH durch die Lage der Hauptabsorptionsbande bei ca. 680 nm als potentielle Akzeptoren für die Chl-Anregungsenergie in Frage. Eine Koadsorption mit LHCII war jedoch nur mit dem Farbstoff TDI-COOH möglich.

Der Farbstoff wurde zunächst in Aceton an SnO_2 adsorbiert. Anschließend wurde LHCII in wässriger Lösung auf die TDI-COOH- SnO_2 -Elektrode aufgebracht. Der Farbstoff war so hydrophob, dass er sich in der Puffer-Detergens-Lösung nicht von der Halbleiteroberfläche löste. Aus Fluoreszenzspektren, die von der TDI-COOH-LHCII-Elektrode sowie von Referenzelektroden aufgenommen wurden, konnte der Energietransfer von LHCII auf TDI-COOH bestimmt werden (Abb. 3.37).

3. Ergebnisse



Der Transfer der Anregungsenergie auf TDI-COOH führte zu einer Verminderung der Chl-Fluoreszenz der Farbstoff-LHCII-Elektrode um 74 % gegenüber der LHCII-Referenzelektrode. Eine Erhöhung der Farbstofffluoreszenz aufgrund der Energieübertragung war jedoch nicht zu beobachten (vgl. 3.2.10).

Die Belegungsichte von LHCII auf den Elektroden lag in diesem Versuch bei 0,06 nmol/cm², bzw. 0,07 nmol/cm². Das waren die höchsten Werte, die für die Adsorption von nativen LHCII-Trimeren an Zinndioxid erreicht wurden (vgl. 3.2.6.2.2). Allerdings lag die Dichte der Komplexe auf der Halbleiteroberfläche noch deutlich unter den Höchstwerten der Adsorption von LHCII an Titandioxid (0,9 nmol/cm²; siehe 3.2.6.1.1).

3. Ergebnisse

3.2.12 Einfluss der Elektrolytkomponenten auf Energietransfer und Fluoreszenz von LHCII und Farbstoff

In den elektrochemischen Versuchen innerhalb dieser Arbeit erwies sich ein Gemisch aus Iodid und Iod in Glycerin als wirkungsvollstes Elektrolytsystem. Gleichzeitig ist Iodid als Löschermolekül bekannt, das den angeregten Zustand einiger Fluorophore strahlungslos in den Grundzustand überführen kann (Möller und Denicola, 2002). Die Lebensdauer der angeregten Zustände von LHCII und Sensibilisatorfarbstoff ist auch von Bedeutung für den Energietransfer von den Chlen auf den Akzeptor und die anschließende Elektronenübertragung auf den Halbleiter. Aus diesem Grund wurden der Einfluss des Elektrolyts auf den Energietransfer von LHCII auf einen Farbstoff und die Fluoreszenz von Donor und Akzeptor einer näheren Betrachtung unterzogen.

3.2.12.1 Löschung der LHCII- und Farbstofffluoreszenz in Lösung

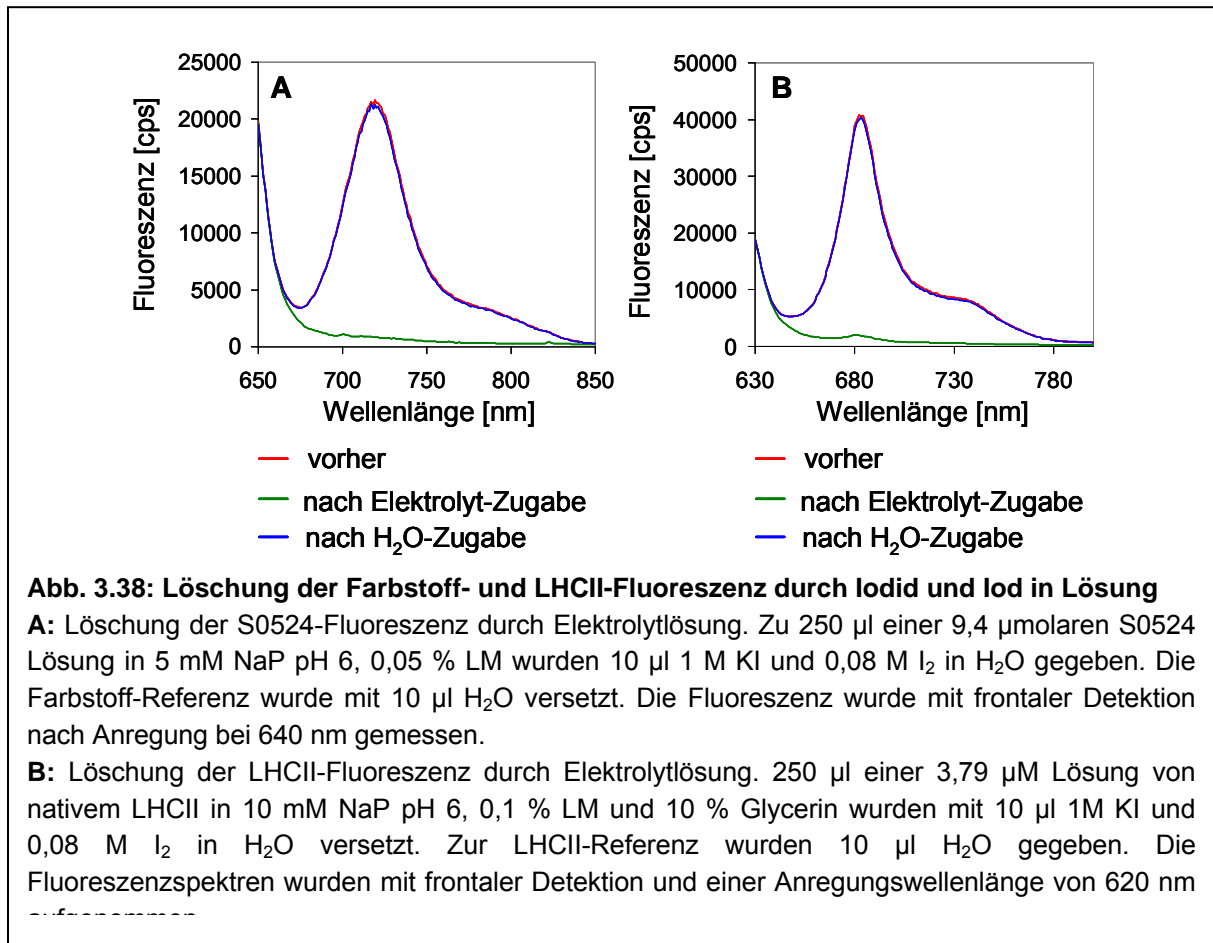
Der Einfluss der Komponenten des Iodid-Iod-Elektrolytsystems auf die Fluoreszenz von Farbstoff und LHCII wurde anhand des Farbstoffes S0524 und nativen LHCII-Trimeren untersucht.

In ersten Versuchen wurden LHCII- und Farbstofflösungen mit Kaliumiodid versetzt. Dabei führten auch hohe KI-Konzentrationen nicht zu einer messbaren Verminderung der Fluoreszenz.

Im Gegensatz zu Kaliumiodid war Iod nur in sehr geringem Maße wasserlöslich. Daher konnte der Effekt von Iod auf die Fluoreszenzen von Farbstoff und LHCII nicht gesondert betrachtet werden. Stattdessen wurden Experimente durchgeführt, in denen ein Gemisch aus Iodid und Iod zu Farbstoff- und LHCII-Lösungen gegeben wurde. Das Mischungsverhältnis von KI und I_2 von 12,5/1 entsprach dabei dem Verhältnis in den Elektrolytlösungen, die in elektrochemischen Versuchen verwendet wurden.

Zur Darstellung der Fluoreszenzlöschung wurden Fluoreszenzemissionsspektren von unterschiedlich konzentrierten Farbstoff- und LHCII-Lösungen vor und nach der Zugabe des Elektrolyts aufgenommen. Die Vermessung von verdünnten Lösungen, mit einer OD < 0,1 bei der Anregungswellenlänge, erfolgte mit Detektion im rechten Winkel, Spektren von konzentrierten Lösungen wurden mit frontaler Detektion aufgenommen.

3. Ergebnisse



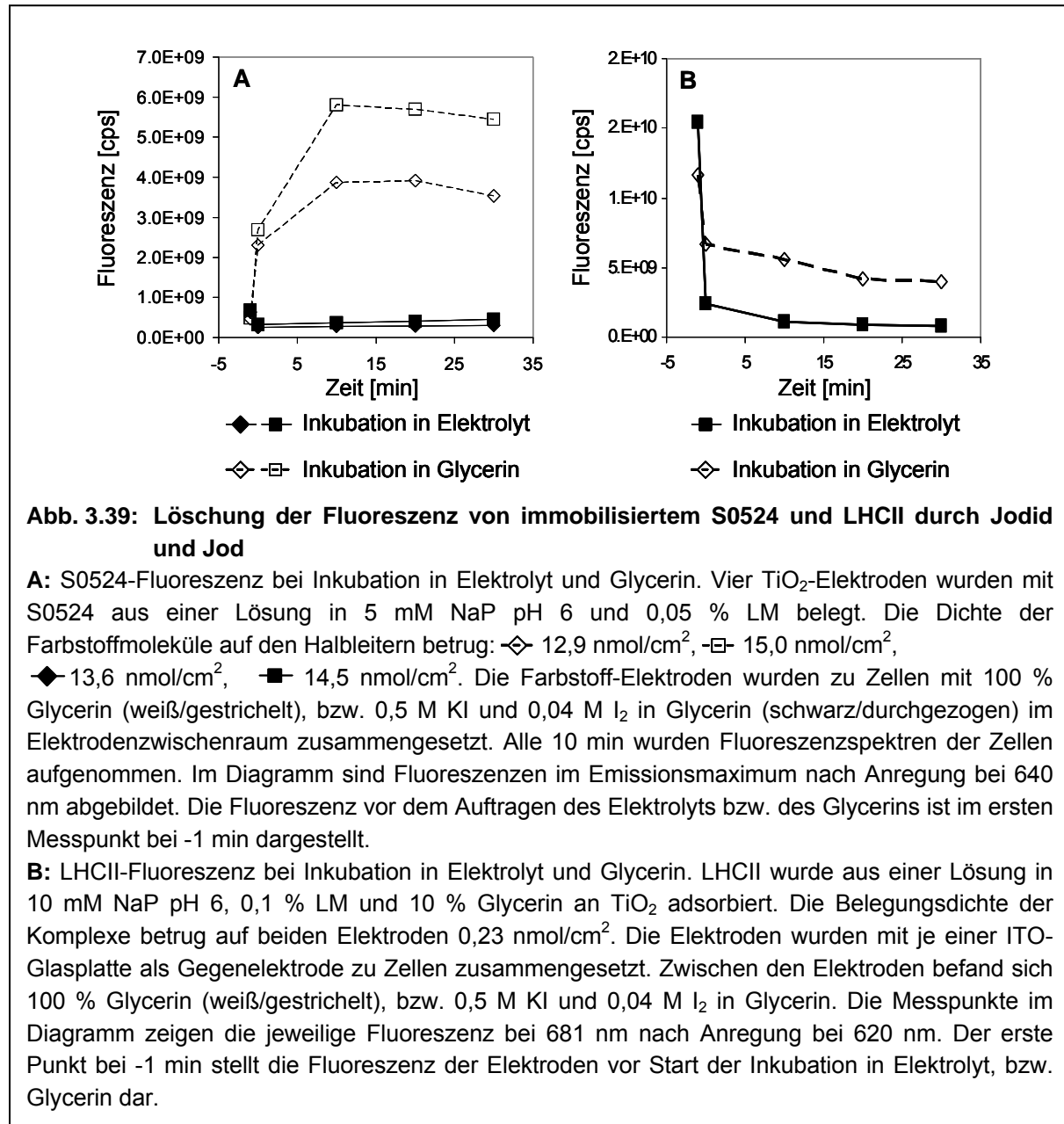
In den Messungen war eine deutliche Verminderung der Farbstoff- und LHCII-Fluoreszenz bei Zugabe des Elektrolyts zu beobachten. Bei den Versuchen mit hoch konzentrierten Fluorophor- und Elektrolytkonzentrationen verschwand die Fluoreszenz fast vollständig (Abb. 3.38).

Die Absorption von Anregungslicht und Fluoreszenzemission durch den Elektrolyten konnte dabei weitgehend ausgeschlossen werden, da der Elektrolyt nur bei Wellenlängen unter 550 nm absorbierte und Anregung sowie Detektion der Fluoreszenz bei Wellenlängen über 600 nm erfolgte.

3. Ergebnisse

3.2.12.2 Löschung der Fluoreszenz von immobilisiertem LHCII und Farbstoff

Neben den Messungen in Lösung (siehe 3.2.11.1) wurden auch an TiO₂ immobilisierte LHCII-Moleküle und Farbstoffe im Hinblick auf die Löschung der Fluoreszenz durch Elektrolytlösung untersucht (Abb. 3.39).



Sowohl bei den Farbstoff- (Abb. 3.39.A) als auch bei den LHCII-Zellen (Abb. 3.39.B) konnte nach dem Auftragen einer glycerinischen Elektrolytlösung eine Abnahme der Fluoreszenz beobachtet werden. Für sich betrachtet ließ dieser Effekt noch keinen Schluss auf die Löschung der Fluoreszenz durch das im Elektrolyt enthaltene Iodid und Iod zu, da das Auftragen der glycerinischen Lösung auf die trockenen Elektroden einen Wechsel der Fluorophorumgebung bedeutete. Eine Abschätzung des Einflusses der Elektrolytkomponenten auf die Fluoreszenz von S0524 und LHCII konnte nur durch den Vergleich mit Zellen erfolgen, in die Glycerin ohne Iodid und Iod eingesetzt wurde.

3. Ergebnisse

Bei den Farbstoff-Zellen führte die Inkubation in 100 % Glycerin zu einer Zunahme der Fluoreszenz im Vergleich zu den mit Elektrolyt benetzten Elektroden. Hier konnte davon ausgegangen werden, dass die Verringerung der Fluoreszenz in den Zellen mit Elektrolyt auf das Iodid-Iod-Gemisch zurückzuführen war.

Bei den LHCII-Elektroden hatte das Auftragen von Glycerin und Elektrolytlösung, eine Abnahme der Fluoreszenz zur Folge. Zwar fiel die Verminderung der Fluoreszenz bei der Zelle ohne Iodid und Iod geringer aus als bei der Zelle mit Elektrolyt. Ursachen hierfür könnten jedoch auch Unterschiede in der Elektrodenoberfläche oder LHCII-Verteilung sein. Abgesehen von der generellen Abnahme der Fluoreszenz war in Spektren, die mit Anregung bei 460 nm aufgenommen wurden, keine Veränderung des Verhältnisses zwischen Chl-*b*- und Chl-*a*-Fluoreszenz zu erkennen. Die Inkubation in Glycerin und Elektrolytlösung führte demnach nicht unmittelbar zur Denaturierung der Komplexe.

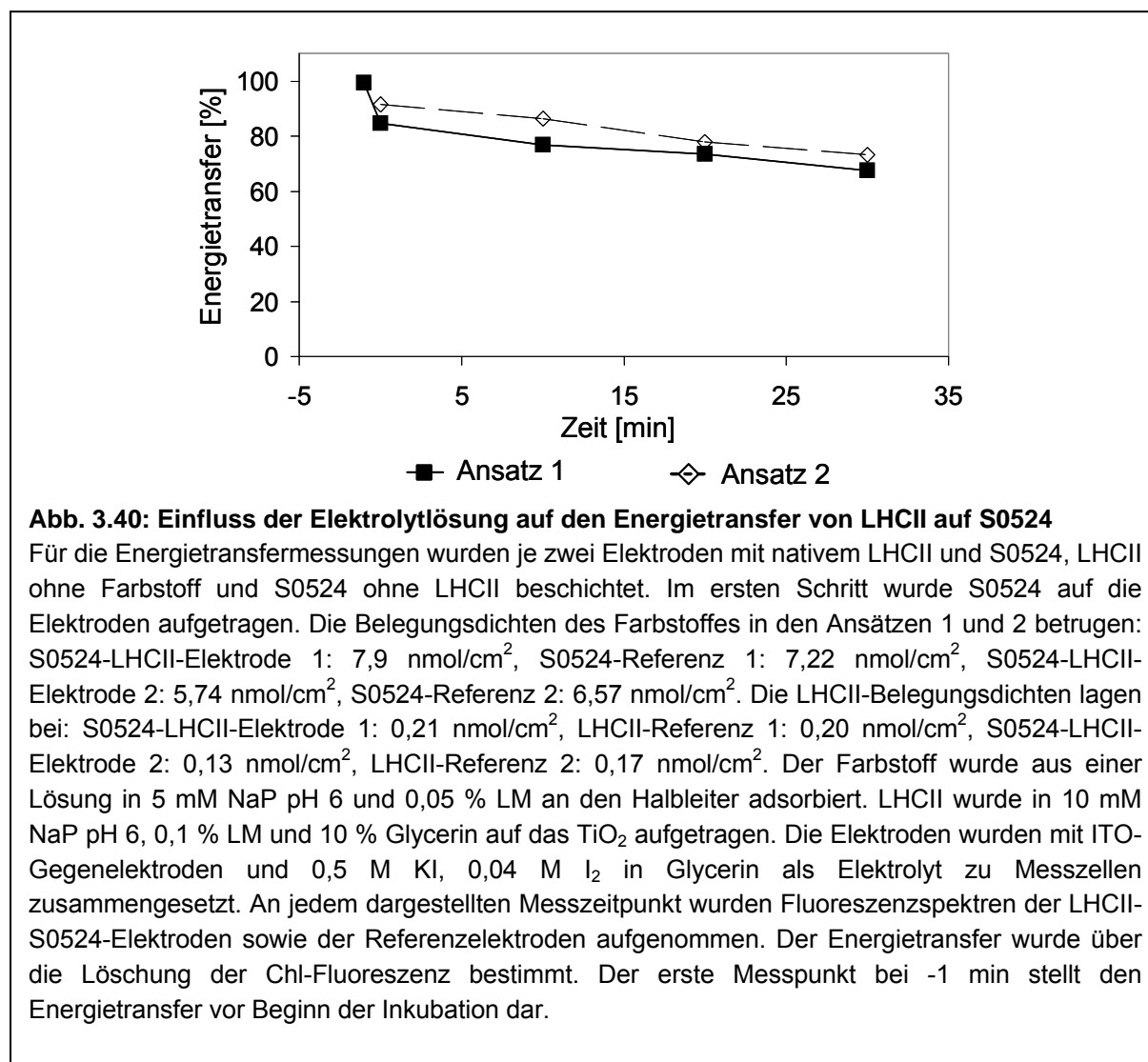
Bei allen Messungen fiel auf, dass erst nach einer Inkubationszeit von 10 min der endgültige Fluoreszenzwert erreicht wurde. Die langsame Veränderung der Fluoreszenzintensität könnte mit einem langsamen Eindringen der viskosen Glycerinlösungen in die Poren des TiO₂ zusammenhängen.

3.2.12.3 Einfluss des Elektrolyts auf den Energietransfer von LHCII auf einen Akzeptorfarbstoff

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die Elektrolytlösung in erheblichem Maße die Fluoreszenz von Farbstoffen und LHCII beeinflusste (3.2.11.1 und 3.2.11.2), wurde untersucht, ob dies auch eine Veränderung des Energietransfers von LHCII auf einen Akzeptorfarbstoff zur Folge hatte.

3. Ergebnisse

An zwei S0524-LHCII-Elektroden wurde der Energietransfer während der Inkubation in Elektrolytlösung bestimmt (Abb. 3.40).



Anhand der Fluoreszenzspektren der LHCII- und Farbstoff-Elektroden, die für die Bestimmung des Energietransfers aufgenommen wurden, konnte, wie in 3.2.12.2, eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz beobachtet werden, sobald die Elektroden mit Iodid-Iod-Lösung benetzt wurden.

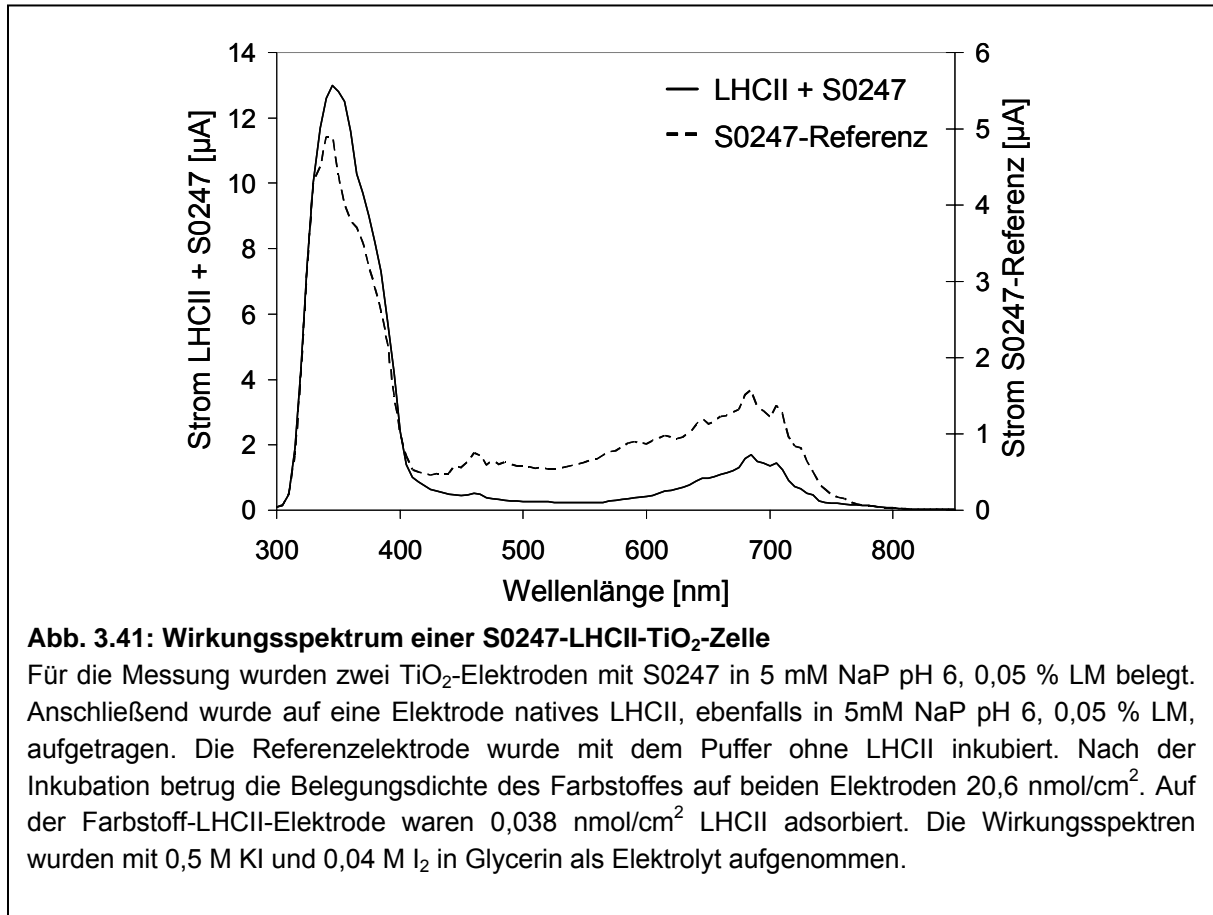
Gegenüber der Fluoreszenzlöschung fiel die Veränderung des Energietransfers wesentlich geringer aus. Zwar kam es bei Ansatz 1 zu einer sprunghaften Abnahme des Energietransfers von 99 % auf 85 %, sobald der Elektrolyt auf die Elektroden aufgetragen wurde, danach sank der apparente Energietransfer jedoch nur noch langsam auf einen Wert von 67,5 % nach 30 min. Bei Ansatz 2 betrug die apparente Effizienz des Energietransfers am Ende der Messung 73 %.

Damit wurden auch nach einer halben Stunde, was der maximalen Dauer der elektrochemischen Messung zur Erstellung eines Wirkungsspektrums entsprach, noch mehr als $\frac{2}{3}$ der Anregungsenergie der Chle von LHCII auf den Akzeptorfarbstoff übertragen.

3. Ergebnisse

3.2.13 Wirkungsspektren von Zellen mit Farbstoff und LHCII

Nach der Koadsorption von Farbstoff und LHCII an Halbleiteroberflächen oder der Einbettung in die Elektrodenschicht wurden elektrochemische Messungen durchgeführt, die das Zusammenspiel von LHCII-Antenne und Sensibilisatorfarbstoff charakterisieren sollten. Abb. 3.41 zeigt die Wirkungsspektren einer S0247-LHCII-Zelle, sowie einer Referenzzelle ohne Lichtsammelproteine.



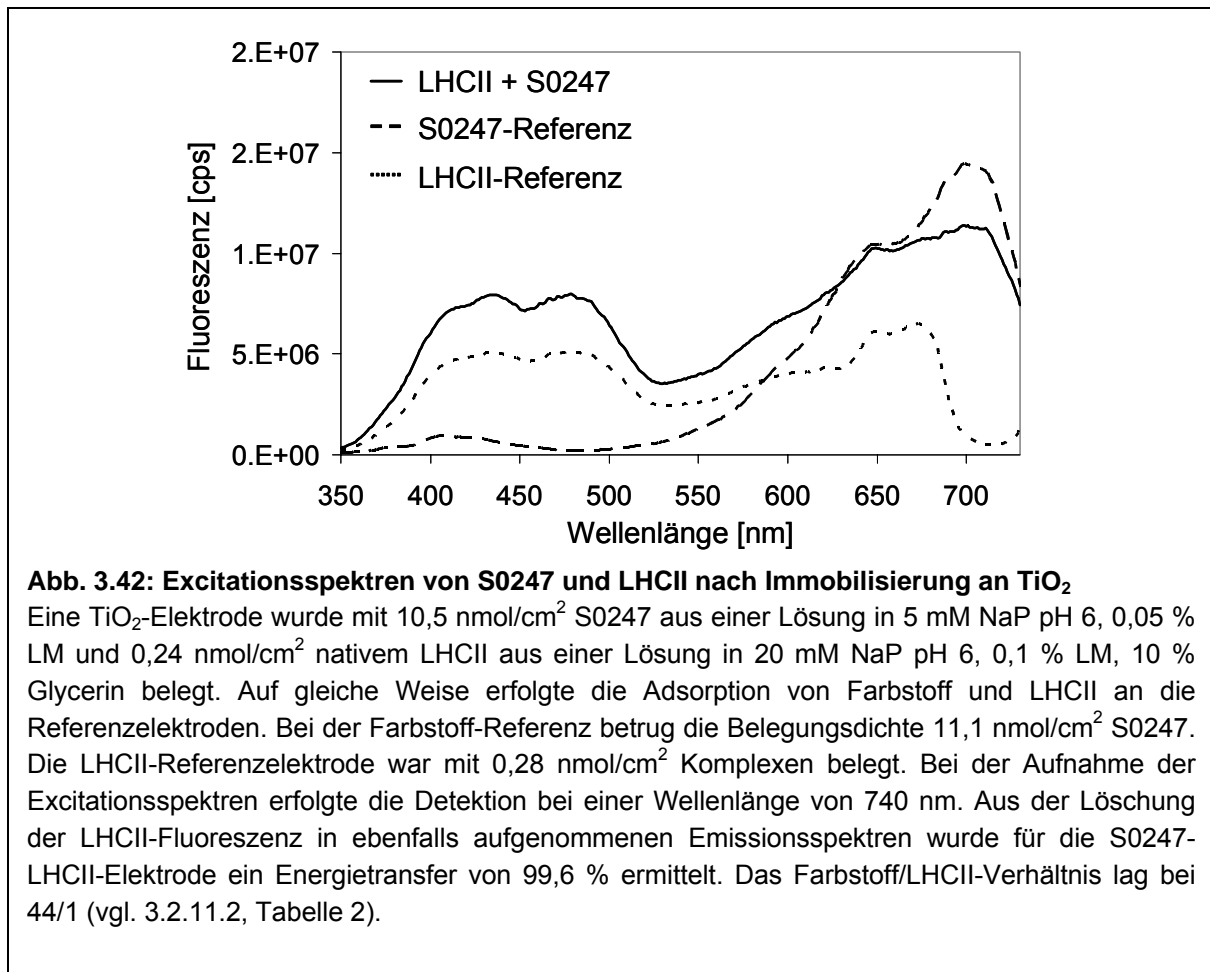
In beiden Spektren war eine deutliche Elektroneninjektion durch S0247 zu sehen. Die Stromwerte im Farbstoffmaximum bei 685 nm betragen 1,7 µA bei der S0247-LHCII-Zelle und 1,6 µA bei der Referenz. Bezogen auf das TiO₂-Maximum war die Elektronenübertragung bei der Referenzzelle jedoch deutlich höher, als bei der Zelle mit LHCII.

Im Wirkungsspektrum der Farbstoff-LHCII-Zelle war keine Erhöhung des Stromwertes zwischen 400 nm und 550 nm erkennbar, die sich auf die Soretabsorption der Chl des LHCII zurückführen ließ. Das kleine Maximum bei 460 nm kam durch die höhere Intensität des eingestrahlt Lichtes in diesem Bereich zustande.

Ursache für die geringe Antennenwirkung des LHCII war wahrscheinlich das hohe Farbstoff/LHCII-Verhältnis von 542/1. Eine Erhöhung des LHCII-Anteils in den Messzellen war nur auf Kosten der Farbstoff-Belegungsdichte möglich (siehe 3.2.11.2). Die geringere Sensibilisatordichte hatte wiederum eine verringerte Elektronenübertragung auf den Halbleiter zur Folge.

3. Ergebnisse

Bei Farbstoff/LHCII-Verhältnissen von ca. 40/1 war keine Elektroneninjektion durch den Farbstoff zu sehen. Um dennoch einen Hinweis zu erhalten, welchen Einfluss der Energietransfer von LHCII auf die Excitation des Akzeptorfarbstoffes hatte, wurden Fluoreszenzexcitationsspektren der Farbstoff-LHCII-Elektroden aufgenommen (Abb. 3.42).



In der Messung, deren Ergebnis hier abgebildet ist, trug die Absorption durch LHCII, vor allem im kurzwelligen Bereich zwischen 350 nm und 550 nm, erheblich zur Excitation des LHCII-Farbstoff-Systems bei. Bei der Detektionswellenlänge von 740 nm fluoreszierten sowohl LHCII als auch S0247. Aus den Emissionsspektren der Elektroden konnte jedoch eine Effizienz von über 99 % für den Energietransfer von den Lichtsammelkomplexen auf den Farbstoff bestimmt werden, was den Schluss zuließ, dass die LHCII-Excitationsbanden im Spektrum größtenteils durch den Energietransfer von LHCII auf S0247 hervorgerufen wurden.

3. Ergebnisse

3.2.14 Übersicht über die optimalen Konfigurationen für Zellen mit LHCII und Akzeptorfarbstoffen

In der folgenden Tabelle werden nochmals die idealen Konfigurationen zur Herstellung von TiO_2 - und SnO_2 -Zellen mit LHCII und Akzeptorfarbstoffen, sowie die wichtigsten Ergebnisse, die mit diesen Zellen erhalten wurden, zusammengefasst.

Halbleiter	TiO_2	SnO_2
Herstellung der Anoden	Standardrezept (siehe 2.11.1.1)	Anode aus gefälltem SnO_2 (siehe 2.11.1.6)
Elektrolytssystem	0,5 M KI, 0,04 M I_2 in Glycerin (siehe 3.2.3.1)	0,5 M KI, 0,04 M I_2 in Glycerin (siehe 3.2.3.1)
Kathode	Graphit (Bleistift) (siehe 3.2.4.1)	Graphit (Bleistift) (siehe 3.2.4.1)
Farbstoffe	S0247, S0524 (FEW-Chemikals) (siehe 3.2.9.1)	TDI-COOH (MPI für Polymerchemie) (siehe 3.2.10)
Immobilisierung der Farbstoffe	Adsorption aus Lösung in MeOH oder 0,5 M NaP pH 6,0, 0,05 % LM (siehe 3.2.9.1)	Adsorption aus Lösung in Aceton (siehe 3.2.10)
Stabilität der Farbstoffbindung	Dissoziation von Farbstoff bei der Immobilisierung von LHCII (siehe 3.2.9.2, 3.2.11.2)	Keine Dissoziation des Farbstoffes von der Elektrode (siehe 3.2.11.3)
Elektroneninjektion	gut (siehe 3.2.9.1)	gut (siehe 3.2.10)
LHCII-Immobilisierung	Adsorption aus Lösung in 5 mM NaP pH 6,0, 0,1% LM, 10% Glycerin (siehe 3.2.6.1)	Adsorption aus Lösung in 5 mM NaP pH 6,0, 0,1% LM, 10% Glycerin (siehe 3.2.6.2.2)
Stabilität des LHCII	Intakt nach Immobilisierung Photostabilität gering (siehe 3.2.6.1, 3.2.7)	Intakt nach Immobilisierung Photostabilität gering (siehe 3.2.6.2.2, 3.2.7)
Energietransfer nach Koadsorption von LHCII und Farbstoff	87 – 99,6 % (siehe 3.2.11.2)	74 % (siehe 3.2.11.3)

Tabelle 3.3: Konfiguration und Messergebnisse von Zellen mit LHCII und Akzeptorfarbstoffen

4. Diskussion

4.1 Einzelmolekülspektroskopische Untersuchung der Dynamik des N-Terminus des LHCII

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Konformationsänderungen des N-Terminus des LHCII auf einzelmolekülspektroskopischer Ebene zu untersuchen. Aufgrund von messtechnischen Problemen, die sich aus der Hintergrundfluoreszenz der verwendeten Pufferlösungen und der hohen Diffusionsgeschwindigkeit der einzelnen Lichtsammelkomplexe ergaben (siehe 3.1.2) wurden im Rahmen der Arbeit jedoch lediglich Vorversuche zu den eigentlichen Messungen der Dynamik des N-Terminus durchgeführt. Im Folgenden soll dargestellt werden, welche Rückschlüsse aus diesen Vorversuchen für anschließende einzelmolekülspektroskopischen Untersuchungen am LHCII gezogen werden können.

4.1.1 Tetramethylrhodamin als Donorfarbstoff für Energiemessungen

Gemeinsam mit Mitarbeitern des 3. physikalischen Instituts der Universität Stuttgart wurde versucht, ein System zur einzelmolekülspektroskopischen Untersuchung der Dynamik des N-Terminus von LHCII zu etablieren, das auf dem Resonanzenergietransfer von Tetramethylrhodamin auf die Chl des Komplexes basiert. Die Effizienz des Energietransfers in einem solchen System hängt unter anderem vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor, der Orientierung der Übergangsdipolmomente der Partner und der Überlappung zwischen Donorfluoreszenz und Akzeptorabsorption ab (vgl. 1.2.2). Die sensibelste Größe für die Untersuchung von Konformationsunterschieden stellt dabei voraussichtlich der Abstand zwischen den Chl des LHCII und dem N-terminal gekoppelten Farbstoff dar, da die Effizienz des Energietransfers proportional zur sechsten Potenz dieses Abstandes ist. Eine entfernungsabhängige Veränderung des Energietransfers lässt sich nur beobachten, wenn der Abstand zwischen Donor und Akzeptor in der Nähe der Distanz für den halbmaximalen Energietransfer (Försterkritischer Abstand, R_0) liegt, oder die Abstandsänderung innerhalb des Übergangsbereiches zwischen einem Energietransfer von 100 % und 0 % erfolgt.

In einem einfachen Modell mit einem Donor und einem Akzeptor kann R_0 nach Latt *et al.* (1965) über die unter 2.9.4.5 dargestellten Gleichungen VIII bestimmt werden. Im Falle des farbstoffmarkierten LHCII liegt jedoch ein System mit einem Donorfarbstoff und mehreren Chl als Akzeptoren vor, wobei nicht bestimmt werden kann, wie viele Chl des Komplexes tatsächlich am Energietransferprozess beteiligt sind. Um R_0 dennoch grob abschätzen zu können, wurden die Chl des LHCII als ein eng gekoppeltes System betrachtet. Nach Gleichung VIII wurde R_0 für 12 Chl mit einem Extinktionskoeffizienten von $546000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 670 nm und für ein Chl mit einer Extinktion von $546000/12$ bei 670 nm berechnet. Die Abschätzung ergab einen försterkritischen Abstand von 42 Å bei einem Akzeptormolekül und einen Wert von 304 Å bei 12 Chl.

4. Diskussion

Geht man von der von Liu *et al.* (2004) ermittelten Position von Serin 14, der dem N-Terminus am nächsten gelegenen Aminosäure, deren Lage durch die Kristallstruktur aufgelöst werden konnte, aus, so wird nahezu das gesamte LHCII-Monomer durch einen Radius von 42 Å um diese Position abgedeckt. ESR-Messungen an TEMPO-markiertem LHCII (Jeschke *et al.*, 2005) ergaben für die Aminosäure 3, an die in dieser Arbeit der Farbstoff gekoppelt wurde, jedoch mögliche Positionen, die in größerer Entfernung von der Transmembrandomäne des Proteins, etwa 10 bis 20 Å über der Membranebene, liegen.

In jedem Fall ist jedoch davon auszugehen, dass der Energietransfer von Tetramethylrhodamin auf mehr als ein Chl erfolgt. R_0 ist damit so groß, dass es unwahrscheinlich erscheint, dass sich eine Konformationsänderung in einer Änderung des Energietransfers niederschlägt. Unterstützt wird diese Vermutung auch durch die Energietransfermessungen, die mit Tetramethylrhodamin-markiertem LHCII im Ensemble durchgeführt wurden und hohe Energietransfereffizienzen zwischen 85 und 98 % ergaben.

In weiteren Versuchen von S. Boggasch, die auf den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen aufbauen, werden daher langwellige Fluoreszenzfarbstoffe der Firma Dyomics, die im Laufe der Arbeit zugänglich wurden, anstelle von Tetramethylrhodamin für die Energietransfermessungen verwendet (mündliche Mitteilung durch S. Boggasch). Der Energietransfer erfolgt in diesem Fall von den Chl auf den langwelligen Farbstoff. Zur Verringerung von R_0 , gegenüber den Messungen mit Tetramethylrhodamin, ist es dabei wichtig, einen Farbstoff zu verwenden, dessen Absorptionsspektrum nur geringfügig mit der Fluoreszenz von LHCII überlappt, da diese Überlappung mit zunehmender Wellenlänge stärker in das Überlappungsintegral von Donorfluoreszenz und Akzeptorabsorption eingeht und damit einen großen Einfluss auf den Wert von R_0 hat. Gelingt es, einen solchen Farbstoff zu finden, so ergibt sich aus diesem System mit geringer spektraler Überlappung von Donor und Akzeptor der Vorteil, dass die Chl des LHCII und der Farbstoff auch unabhängig voneinander angeregt werden können. Auf ein Farbstoff-markiertes Apoprotein als Referenz, das aufgrund schlechter Löslichkeit und starker Hintergrundfluoreszenz zu erheblichen Problemen bei den Einzelmolekülmessungen führte (siehe 3.1.2), könnte somit verzichtet werden.

4.1.2 Mögliche Einflüsse der Kopplung von Protein und Farbstoff auf die Konformation der Bindungspartner

Will man die Dynamik des N-Terminus des LHCII mit Hilfe des Energietransfers zwischen den Chl des Komplexes und einem gekoppelten Farbstoff untersuchen, so müssen neben den spektroskopischen Eigenschaften des Farbstoffes auch mögliche Einflüsse des Markers auf die Proteinkonformation in Betracht gezogen werden.

Im Falle der Kopplung von Tetramethylrhodamin an LHCII sind sowohl elektrostatische Interaktionen des zwitterionischen Farbstoffes mit geladenen Aminosäuren des Proteins, als auch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Ringsystem des Farbstoffes und dem hydrophoben Transmembranbereich des Komplexes oder der umgebenden Detergenshülle denkbar. Außerdem können die Proteinstruktur und die mögliche Dynamik einer Konformationsänderung durch die sterischen Eigenschaften des gekoppelten Farbstoffes beeinflusst werden. Nachgewiesen wurde eine Beeinträchtigung der Proteindynamik durch gekoppelte Farbstoffmoleküle von Erker *et al.* (2004), die nach der

4. Diskussion

Markierung von Arthropoden-Hämocyanin mit einem hohen Überschuss des Farbstoffes Tetramethylcarboxyrhodamin-Succinimidylester (180 Farbstoffmoleküle pro 24mer) eine stark verminderte Kooperativität des Proteins bei der Sauerstoffbindung beobachteten. Die Autoren beschrieben jedoch auch, dass Markierungen mit einem geringen molaren Farbstoff/Protein-Verhältnis von 0,9 zu keiner erkennbaren Veränderung des Sauerstoffbindungsverhaltens des Hämocyanins führten.

Einen Hinweis darauf, dass ein kleines Farbstoffmolekül, das an ein Cystein an Position 3 nahe dem N-Terminus an LHCII gekoppelt ist, die globale Proteinstruktur nicht beeinflusst, lieferten Horn und Paulsen (2004). Die Autoren untersuchten die Dynamik der Faltung von LHCII anhand des Energietransfers von Bodipy 507/545 IA auf die Chl des Komplexes. Die Faltungskinetiken von Proteinen, die ein Farbstoffmolekül am N-Terminus trugen, zeigten dabei keinen signifikanten Unterschied zur Faltung von Proteinen, die am C-Terminus oder der stromalen, bzw. luminalen Schleifenregion markiert waren. Eine Beeinträchtigung der Proteinstruktur in der unmittelbaren Umgebung des Farbstoffes kann zwar auch in diesem Fall nicht völlig ausgeschlossen werden, da eine Ausbildung von LHCII-Monomeren auch bei Mutanten möglich ist, deren N-terminale Domäne vollständig deletiert wurde (Hobe *et al.*, 1995). Insgesamt erscheint der Einfluss von kleinen Farbstoffen ohne Nettoladung, wie Bodipy 507/545 AI oder Tetramethylrhodamin, auf die Messung jedoch vertretbar.

Die Infrarotfarbstoffe der Firma Dyomics, die aufgrund ihrer günstigeren spektroskopischen Eigenschaften in weiterführenden Experimenten verwendet werden (vgl. 3.2.11), könnten sich im Hinblick auf die Beeinflussung der Proteinkonformation als problematischer erweisen, da diese Farbstoffe größer sind und teilweise mehrere Nettoladungen aufweisen, die mit geladenen Aminosäuren des Proteins interagieren könnten. Auch die Orientierung der Farbstoffe selbst könnte sich auf die Messungen auswirken, da sie über einen relativ langen Linker mit dem Protein verbunden sind.

4.1.3 Immobilisierung des markierten LHCII und Insertion in Liposomen

Wie in 2.10 beschrieben, wurden alle einzelmolekülspektroskopischen Messungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, an LHCII in Lösung vorgenommen. Zur Bestimmung der Dynamik des N-Terminus sollten die Farbstoff- und Chl-Fluoreszenzen der durch den Fokus der Apparatur diffundierenden Komplexe detektiert und über eine Korrelationsanalyse ausgewertet werden. Aus der statistischen Verteilung des Verhältnisses zwischen Donor und Akzeptorfluoreszenz sollten Informationen über mögliche unterschiedliche Konformationen des N-Terminus gewonnen werden.

In den durchgeführten Messungen an gelöstem LHCII zeigte sich jedoch, dass die Komplexe so schnell durch den Fokus diffundierten, dass eine eindeutige Identifizierung der Lichtsammelkomplexe und die Integration der Fluoreszenzintensitäten nicht möglich waren. In der Folge wurden daher zwei alternative experimentelle Ansätze, die Immobilisierung der Komplexe auf einer Oberfläche und die Insertion von einzelnen LHCII in Liposomen, in Erwägung gezogen.

4. Diskussion

Zur Immobilisierung von LHCII-Monomeren auf einer Oberfläche wurde der LHCII-Klon S106C,V229C hergestellt, der je ein Cystein am C-Terminus und in der luminalen Schleife des Proteins beinhaltet. Diese Cysteine auf der luminalen Seite des Proteins sollen eine orientierte Bindung der Monomere an eine funktionalisierte Oberfläche ermöglichen (vgl. MacBeath *et al.*, 1999; Benters *et al.*, 2001). Die Markierung der Komplexe mit einem Farbstoff müsste in diesem Fall über den Aminoterminus erfolgen.

Gegenüber der Messung in Lösung würde die Immobilisierung der Komplexe zu einer deutlichen Verminderung der Hintergrundfluoreszenz im Bezug auf das Komplexsignal führen (Literaturstelle). Eine eindeutige Identifizierung des LHCII wäre damit möglich. Des Weiteren könnte das Fluoreszenzsignal der einzelnen Komplexe über einen längeren Zeitraum aufgenommen werden, wodurch eine genauere Bestimmung der Anteile von Farbstoff- und Chl-Fluoreszenz möglich wäre.

Allerdings ist der experimentelle Aufwand einer Immobilisierung einzelner LHCII-Monomere deutlich höher als bei einer Messung in Lösung. Daher kann nur eine geringere Zahl von Komplexen vermessen werden, wodurch die statistische Auswertung des Ergebnisses beeinträchtigt wird. Außerdem kann nach der Bindung der Komplexe an eine Oberfläche nicht ausgeschlossen werden, dass die Konformation des Proteins durch Interaktionen mit der Oberfläche beeinflusst wird.

Aufgrund der Nachteile, die sich aus der Immobilisierung des LHCII ergeben könnten, wurde für die weiteren, von S. Boggasch durchgeführten, Versuche zunächst der Ansatz der Rekonstitution der Komplexe in Liposomen verfolgt.

Die Insertion von LHCII in Liposomen führt, aufgrund der Größe der Vesikel, im Vergleich zu den Detergens-solubilierten Komplexen zu einer Verringerung der Diffusionsgeschwindigkeit. Die Unterscheidung zwischen der Komplexfluoreszenz und fluoreszierenden Verunreinigungen wird damit erleichtert. Außerdem könnte die Farbstoff- und Chl-Fluoreszenz über einen längeren Zeitraum integriert werden, wodurch die Genauigkeit der einzelnen Messungen erhöht würde. Da die Messung in Lösung erfolgt, kann, wie bei der Vermessung des Detergens-solubilierten LHCII, die Fluoreszenz von einer großen Anzahl von Komplexen aufgenommen werden. Außerdem stellt die Vesikelumgebung, gerade bei der Verwendung von Thylakoidlipiden, eine Annäherung an das natürliche Umfeld des Proteins dar, wodurch die Aussagekraft der Ergebnisse im Hinblick auf das *in vivo*-Verhalten des LHCII verbessert wird.

4.2 Versuche zur Integration von LHCII in eine elektrochemische Solarzelle

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob pflanzliche Lichtsammelkomplexe als Lichtantennen in eine elektrochemische Solarzelle integriert werden können. Basierend auf einer Anfang der 1990er Jahre von M. Grätzel vorgestellten Solarzelle (O'Regan und Grätzel, 1991) sollte ein Modellsystem entwickelt werden, in dem die von LHCII absorbierte Lichtenergie auf Akzeptorfarbstoffe übertragen wird, die daraufhin Elektronen in das Leitungsband eines Halbleiters injizieren.

4. Diskussion

4.2.1 Vergleich der Wirkungsspektren von elektrochemischen Zellen

Für die Auswertung der in diesem Teil der Arbeit durchgeführten elektrochemischen Messungen war es wichtig, Experimente mit verschiedenen Parametern, wie unterschiedlichen Farbstoffen, Halbleitern oder Elektrolytsystemen, miteinander vergleichen zu können. Hierzu musste zunächst ein Standard festgelegt werden, der eine sinnvolle Gegenüberstellung der Ergebnisse ermöglichte. Als mögliche Richtgrößen kamen dabei der, häufig in der Literatur verwendete, IPCE-Wert (siehe 3.2.1.1) und der Bezug des gemessenen Photostroms auf die Elektronenübergänge im Halbleiter in Frage (siehe 3.2.1.2).

4.2.1.1 Niedriger Photostrom und IPCE-Wert

Schon in früheren elektrochemischen Experimenten mit Solarzellen des Grätzel-Zelltyps, die innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden (Rupprecht, 1998), lagen die Stärke des gemessenen Photostroms und damit auch die IPCE-Werte der Zellen deutlich unter den Messwerten, die in anderen Arbeiten mit vergleichbaren Systemen erzielt wurden (Kay und Grätzel, 1993; Kay *et al.*, 1994). So wurden an den in dieser Arbeit vermessenen Zellen bei Bestrahlung mit Weißlicht Stromwerte von 30 bis 70 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ erzielt, während die von anderen Autoren beobachteten Werte zwischen 5 (Kay und Grätzel, 1993) und 17 mA/cm^2 (Nazeeruddin *et al.*, 1993) lagen. Dabei war zunächst unklar, ob der geringere Stromertrag allein auf eine schwächere Elektronenübertragung durch die verwendeten Sensibilisatorfarbstoffe zurückzuführen war, oder ob auch physikalische Eigenschaften der Zellkomponenten zur Verminderung des abgreifbaren Photostroms beitrugen.

Einen Anhaltspunkt für eine System-bedingte niedrige Stromausbeute anstelle einer geringen Elektronenübertragung durch die eingesetzten Farbstoffe lieferte die Berechnung und Gegenüberstellung der IPCE-Werte im UV- und sichtbaren Bereich des Lichts. Wie in Abb. 3.7 zu sehen ist lag die, von einer TiO_2 -Zelle mit dem Farbstoff S0524 produzierte, Photostromdichte in der Absorptionsbande des Farbstoffes bei 700 nm bei etwa 8 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$. Daraus ergab sich ein IPCE-Wert von etwa 0,15 % bei dieser Wellenlänge. Demgegenüber wurde im Maximum der Elektronenübergänge im TiO_2 bei 350 nm eine Photostromdichte von etwa 15 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen.

Im UV-Bereich konnte der IPCE-Wert nicht direkt aus dem in Abb. 3.7 dargestellten Spektrum entnommen werden, da die Sensitivität des Quantensensors, der zur Aufnahme des für die Berechnung Lampenspektrums (Abb. 3.6) verwendet wurde, bei Wellenlängen unter 440 nm stark nachließ. Die gemessene Lichtintensität betrug dementsprechend bei 350 nm nur noch 17 % des Wertes bei 445 nm obwohl die Lichtstärke der verwendeten Xenonlampe, laut den Angaben des Herstellers (Osram), in diesem Wellenlängenbereich nur um 30 % abnahm. Die geringere Sensitivität des Quantensensors führte somit zu einer Unterschätzung der Lichtintensität bei Wellenlängen unter 440 nm, die eine entsprechende Überschätzung des IPCE-Wertes gegenüber der Stromdichte zur Folge hatte (Abb. 3.7). Nimmt man bei 350 nm eine Lichtintensität an, die dem 0,7fachen des gemessenen Wertes bei 445 nm entspricht, so ergibt sich mit der Photostromdichte, die aus den Elektronenübergängen im TiO_2 bei 350 nm resultiert, ein IPCE-Wert von 0,4 %.

4. Diskussion

Diesem Wert gegenüber stehen IPCE-Werte von 60 bis 70 %, wie sie von Nazeeruddin *et al.* (1993) bzw. Kay und Grätzel (1993) an vergleichbaren TiO₂-Elektroden bei 350 nm gemessen wurden. Die Tatsache, dass Kay und Grätzel auch bei Elektroden, die nicht mit Sensibilisatorfarbstoffen belegt waren, IPCE-Werte von über 60 % im Absorptionsmaximum des TiO₂ erzielten, zeigt eindeutig, dass die geringen Stromwerte in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten nicht auf einer mangelnden Elektroneninjektion durch die Sensibilisatorfarbstoffe beruhten, sondern vielmehr auf einen verminderten Elektronentransport innerhalb der Grundkomponenten der Zellen, Halbleiteranode, Graphitkathode und Elektrolyt, zurückzuführen waren.

Die Ursache für die geringe Stromausbeute der hier vermessenen Grätzel-Zellen konnte bis zum Ende dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Variationen der verwendeten ITO-Substrate (siehe 3.2.1.2), Elektrolytsysteme (siehe 3.2.3.1), Kathodenmaterialien (siehe 3.2.4.1) und Methoden zur Herstellung der TiO₂-Elektroden (siehe 3.2.2.1) ergaben teilweise leichte Verbesserungen in der Stromausbeute. Der Unterschied von über zwei Größenordnungen der zwischen den in dieser Arbeit gemessenen und von anderen Autoren beschriebenen Stromausbeuten ließ sich hierdurch jedoch nicht erklären.

4.2.1.2 Bezug der Elektroneninjektion auf das Halbleitermaximum

Aus der systematisch niedrigen Stromausbeute der verwendeten Zellen und der geringen Sensitivität des Quantensensors im UV ergaben sich zwei wesentliche Einschränkungen für die Verwendung der IPCE-Werte zum Vergleich der aufgenommenen Wirkungsspektren. Zum einen waren die IPCE-Werte der Zellen, die in dieser Arbeit hergestellt wurden, um etwa zwei Größenordnungen niedriger als entsprechende Literaturwerte, was eine direkte Gegenüberstellung unmöglich machte. Zum anderen ging aufgrund der geringen Sensitivität des Quantensensors die Information über den UV-Bereich des Wirkungsspektrums, und damit über die Elektronenübergänge im Halbleiter, verloren.

Zum Vergleich der hier aufgenommenen Wirkungsspektren wurde daher, anstelle der IPCE-Werte, das Verhältnis der Elektroneninjektion durch Farbstoffmoleküle zu den Elektronenübergängen im Halbleiter als interner Standard herangezogen. Hierfür wurden die Stromwerte der Wirkungsspektren entweder im Maximum der Elektronenübergänge in der Halbleiterelektrode normiert (siehe Abb. 3.15) oder die dargestellten Y-Achsenabschnitte zweier Wirkungsspektren so gewählt, dass ein Vergleich der Spektrenform möglich wurde (siehe Abb. 3.8).

Wie Experimente zeigten, in denen Zellkomponenten, wie ITO-Substrat (siehe 3.2.1.2) oder Graphitbeschichtung der Kathode (siehe 3.2.4.1) variiert wurden, hatte die veränderte Leitfähigkeit dieser Elektrodenkomponenten zwar Abweichungen im absoluten Stromertrag der Zellen zur Folge, führte jedoch nicht zu erkennbaren Veränderungen der Form der aufgenommenen Wirkungsspektren. Auf diese Weise konnten trotz der geringen Stärke des von den Zellen produzierten Stromes Aussagen gemacht werden, in wieweit die untersuchten Farbstoffe und Solarzellkomponenten in Verbindung mit LHCII für den Einsatz in einer elektrochemischen Solarzelle geeignet waren.

4. Diskussion

Der Nachteil der direkten Gegenüberstellung der aufgenommenen Wirkungsspektren bestand darin, dass auf diese Weise keine Korrektur der Spektren bezüglich des Lichtspektrums der in den Experimenten eingesetzten Xenonlampe möglich war. Aufgrund der fehlenden Korrektur traten in vielen Wirkungsspektren in den Wellenlängenbereichen zwischen 440 und 500 nm und zwischen 650 und 850 nm schmale Strommaxima auf, die ausgeprägte Banden des Lampenspektrums bei den entsprechenden Wellenlängen widerspiegeln. Außerdem war die Lichtintensität der Lampe im UV etwas niedriger, als im sichtbaren Bereich des Lichts (siehe 4.2.1.1), wodurch das Verhältnis zwischen den Elektronenübergängen im Halbleiter und der Elektronenübertragung durch die Sensibilisatorfarbstoffe zugunsten der Elektroneninjektion verschoben wurde. Bei gleicher Lichtintensität wäre davon auszugehen, dass das Maximum der Elektronenübergänge etwa um den Faktor 1,4 höher wäre, als in den dargestellten Spektren (vgl. 4.2.1.1).

4.2.2 Komponenten der elektrochemischen Zellen

Alle in dieser Arbeit hergestellten Messzellen bestanden aus drei wesentlichen Grundkomponenten, einer Halbleiteranode aus Titandioxid oder Zinndioxid, die als Substrat für die Immobilisierung von LHCII und Sensibilisatorfarbstoffen, sowie als Akzeptor für die von den Farbstoffen übertragenen Elektronen fungierte, einem Elektrolytsystem, das die Sensibilisatorfarbstoffe durch Übertragung von Elektronen regenerieren sollte und einer meist Graphit-beschichteten Kathode, über die bei geschlossenem Stromkreis die von der Anode abgegriffenen Elektronen in das System zurückgeführt wurden.

4.2.2.1 Halbleiterelektroden

Heutzutage kommen in elektrochemischen Solarzellen zahlreiche verschiedene Halbleitermaterialien zum Einsatz (Grätzel, 2001), die sich in ihren elektrochemischen Eigenschaften teilweise stark unterscheiden. Die am häufigsten genutzten Halbleiter sind Titandioxid und Zinndioxid, die auch in dieser Arbeit zur Herstellung der Anoden der Messzellen verwendet wurden.

TiO₂ und SnO₂ weisen, im Vergleich zu den meisten anderen Halbleitermaterialien, eine sehr große Bandlücke von ca. 3,2 bzw. 3,8 eV auf (Grätzel, 2001), weshalb Elektronenübergänge innerhalb der Halbleiter nur durch energiereiches UV-Licht angeregt werden können. Erfolgt die Sensibilisierung des Halbleiters, wie in dieser Arbeit, durch Injektion von Elektronen von Farbstoffmolekülen, die auf der Elektrodenoberfläche adsorbiert sind, so ist vor allem das Potential des Leitungsbandes des Halbleiters von Bedeutung. Die absolute Lage des Leitungsbandes ist dabei von den physikalischen Eigenschaften des Halbleiters und der Umgebung der Halbleiterelektrode abhängig, weshalb sich die Angaben verschiedener Autoren bezüglich des Leitungsbandpotentials etwas unterscheiden. Generell kann jedoch für die Halbleiter, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, ein Potential zwischen -4,3 eV (Grätzel, 2001) und -4,5 eV (Burfeindt *et al.*, 1996) gegen Vakuum im Falle von Titandioxid, bzw. ein Potential zwischen -4,73 eV (Tian *et al.*, 2000) und -5,0 eV (Grätzel, 2001) gegen Vakuum für Zinndioxid angenommen werden. Bezogen auf das Potential der Standardwasserstoffelektrode (NHE) liegen die Leitungsbandpotentiale der Halbleiter damit

4. Diskussion

etwa bei $-0,2$ eV (TiO_2 ; Grätzel, 2001) bzw. $+0,5$ eV (SnO_2 ; Grätzel, 2001). Das Leitungsbandpotential von SnO_2 ist damit etwas niedriger (bezüglich Vakuum) bzw. positiver (bezüglich NHE), als das des TiO_2 .

Bemerkbar machte sich dieser Potentialunterschied vor allem bei Experimenten, in denen die Elektronenübertragung von Rylenefarbstoffen auf die Halbleiter untersucht wurde (siehe 3.2.9, 3.2.10). Die Messungen ergaben, dass lediglich die Perrylenefarbstoffe PMI-COOH und PDI-COOH in der Lage waren, Elektronen auf Titandioxid zu übertragen (siehe 3.2.9). Die Terrylene TDI-COOH und Qu42 zeigten keine messbare Elektroneninjektion in das Leitungsband von TiO_2 (siehe 3.2.9), übertrugen jedoch Elektronen auf SnO_2 (siehe 3.2.10). Diese Beobachtungen korrelierten mit den Verhältnissen zwischen den Leitungsbandpotentialen der Halbleiter und den Energieniveaus der LUMO-Orbitale, die an ähnlichen Farbstoffderivaten gemessen wurden (Zhao *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999; Quante, 1994). Nur die Farbstoffe, deren LUMO-Potential negativer war, als $-0,2$ eV (bezüglich NHE), konnten Elektronen auf TiO_2 zu übertragen. Der Halbleiter SnO_2 eignete sich somit vor allem für Terrylenfarbstoffe mit positiverem LUMO-Potential als Elektrodensubstrat.

Der Farbstoff S0247, der sich gut als Sensibilisator für TiO_2 eignete (siehe 3.2.9), übertrug ebenfalls Elektronen auf SnO_2 . Die Elektroneninjektion in das Leitungsband von SnO_2 war, bezogen auf die Elektronenübergänge im Halbleiter, jedoch nicht höher als die Elektronenübertragung auf TiO_2 (siehe 3.2.10). Die Verwendung von Zinndioxid als Elektrodenmaterial brachte demnach bei S0247 und ähnlichen Farbstoffen keinen Vorteil gegenüber der Herstellung der Elektroden aus Titandioxid.

Für den Wirkungsgrad einer elektrochemischen Solarzelle sind, neben dem Potential des Leitungsbandes, auch die physikalischen Eigenschaften des Halbleiters, wie die Partikelgröße, Partikeloberfläche und Leitfähigkeit von Bedeutung.

Eine detaillierte Untersuchung zur Abhängigkeit des Wirkungsgrades von elektrochemischen Solarzellen auf TiO_2 -Basis von den Methoden zur Herstellung des Halbleitermaterials wurde 2002 von Nakade *et al.* veröffentlicht. In ihrer Arbeit verglichen die Autoren kommerzielles Titandioxid P25 (P25-TiO_2), wie es auch hier verwendet wurde, mit TiO_2 , das sie durch Hydrolyse von TiCl_4 in wässriger Lösung herstellten (S1-TiO_2) und TiO_2 , das durch Hydrolyse aus Titan-tetraisopropoxid gewonnen wurde (S2-TiO_2). Dabei wurden teilweise deutliche Unterschiede in den Eigenschaften der drei Halbleiterspezies gefunden. So betrug die Partikelgröße des P25-TiO_2 21 nm, während S1-TiO_2 mit 19 nm und S2-TiO_2 mit 12 nm etwas kleiner waren. Die Oberfläche der Halbleitermaterialien lag, nach dem Sintern bei 450°C , bei $55 \text{ m}^2/\text{g}$ im Falle von P25-TiO_2 , bei $75 \text{ m}^2/\text{g}$ im Falle von S2-TiO_2 und bei $110 \text{ m}^2/\text{g}$ im Falle von S1-TiO_2 . Bei dem durch Hydrolyse von TiCl_4 hergestellten Halbleitermaterial stand demnach bei gleicher Menge die doppelte Oberfläche zur Immobilisierung von Sensibilisatorfarbstoffen zur Verfügung, wie bei dem kommerziellen TiO_2 . Auch bezüglich des Wirkungsgrades und der Elektronen-Diffusionsgeschwindigkeit schnitt das S1-TiO_2 deutlich besser ab als das P25-TiO_2 .

Ob durch Hydrolyse von TiCl_4 hergestelltes TiO_2 auch bei einer Solarzelle mit LHCII zur Verbesserung des Wirkungsgrades gegenüber dem kommerziellen Halbleiter führen würde, lässt sich schwer sagen. Einerseits könnten, aufgrund der größeren Oberfläche und höheren Reinheit des Halbleitermaterials, deutlich mehr Farbstoffmoleküle an der Oberfläche adsorbiert und die Elektroneninjektion verbessert werden. Andererseits deuten Versuche zur

4. Diskussion

Adsorption von LHCII an P25-TiO₂-Elektroden darauf hin, dass nicht die gesamte Halbleiteroberfläche für die Adsorption der Lichtsammelkomplexe zugänglich ist (siehe 3.2.6.1.1). Vergleiche zur Adsorption der Komplexe an TiO₂ und SnO₂ lassen den Schluss zu, dass die Zugänglichkeit der Elektroden für LHCII von der Porengröße der Halbleiterschicht begrenzt wird (siehe 4.2.5.1). Wäre dies der Fall, so könnte es, trotz der wesentlich größeren Oberfläche des Materials, bei der Verwendung von TiO₂, das durch Hydrolyse von TiCl₄ hergestellt wurde, zu einer Verminderung der LHCII-Adsorption kommen, da die Partikelgröße, und damit vermutlich auch die Porengröße, bei dem so gewonnenen Halbleiter geringer ist als bei P25-TiO₂.

4.2.2.2 Elektrolytsysteme

In einer potentiellen Solarzelle mit pflanzlichen Lichtsammelkomplexen muss das Elektrolytsystem zwei grundlegende Voraussetzungen erfüllen. Zum einen muss es, wie in allen Zellen des Grätzel-Zelltyps, die Sensibilisatorfarbstoffmoleküle regenerieren, nachdem sie Elektronen auf die Substratelektrode übertragen haben. Zum anderen stellt der Elektrolyt die direkte Umgebung der Lichtsammelkomplexe dar, die mit den Farbstoffen koadsorbiert wurden, und darf daher die Stabilität dieser Komplexe nicht beeinträchtigen.

In vielen Arbeiten zur Elektronenübertragung von Farbstoffen auf TiO₂ oder SnO₂ werden Iod/Iodid-Kombinationen in verschiedenen organischen Lösungsmitteln als Elektrolytsysteme eingesetzt. Die dabei verwendeten Lösungsmittelkombinationen, wie Acetonitril und Ethanol (Nazeeruddin *et al.*, 1993) oder Ethylencarbonat und Propylencarbonat (Kay und Grätzel, 1993) eignen sich jedoch nicht für eine elektrochemische Zelle mit LHCII, da sie bei Kontakt mit LHCII unmittelbar zur Denaturierung der Komplexe führen (vgl. 3.2.3.1). Als brauchbares Lösungsmittel für die Elektrolytkomponenten erwies sich dagegen Glycerin. Zum einen war bei der Verwendung von Iod und Iodid in glycerinischer Lösung in Verbindung mit einigen Farbstoffen, wie den Cyaninderivaten S0247 und S0524, eine deutliche Elektroneninjektion in TiO₂ zu erkennen, was auf eine effiziente Regeneration der Farbstoffe schließen ließ (siehe 3.2.9.1). Zum anderen konnte, im Vergleich mit ausschließlich wässriger Puffer/Detergens-Lösung, in Anwesenheit von Glycerin eine Stabilisierung von LHCII während der Adsorption an TiO₂ beobachtet werden (siehe 3.2.6.1.2). Auch Iod/Iodid-Elektrolytsysteme in 100 % Glycerin führten im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht zu einer erkennbaren Schädigung der Komplexe (siehe 3.2.12.3). Diese Messungen dauerten im Allgemeinen jedoch nicht länger als einige Stunden.

Für den dauerhaften Einsatz von LHCII in einer Solarzelle sind flüssige Elektrolyte nicht geeignet. Einerseits konnte in Verbindung mit den in dieser Arbeit untersuchten Sensibilisatorfarbstoffen eine Dissoziation der Farbstoffmoleküle von der Halbleiteroberfläche beobachtet werden, wenn die Elektroden über längere Zeit in glycerinischer Lösung inkubiert wurden (siehe 3.2.9.1). Andererseits bietet eine flüssige Umgebung keinen ausreichenden Schutz der Komplexe vor harschen Umweltbedingungen, wie z.B. hoher Temperatur. Eine hinreichende Stabilisierung der Proteinstruktur lässt sich hier nur durch Einbetten des LHCII in eine feste Matrix und die damit verbundene Einschränkung der Bewegungsfreiheit des Proteins erreichen.

4. Diskussion

Auch in elektrochemischen Solarzellen ohne Proteinkomplexe kommen in den letzten Jahren verstärkt feste Elektronentransportsysteme zum Einsatz. Dabei unterscheidet man zwischen festen Elektrolyten, wie Kupferiodid (Tennakone *et al.*, 1997; Hagfeldt und Grätzel, 2000; Sirimanne und Soga, 2003), und organischen Lochleitern, wie Triphenyldiaminen (Hagen *et al.*, 1997) oder Polypyrrolen (Cervini *et al.*, 2004). Zur Einpolymerisation von TiO₂-immobilisiertem LHCII sind diese Elektronentransportmaterialien allerdings nicht geeignet, da sie bei hohen Temperaturen auf den Halbleiter aufgebracht werden müssen, die eine Denaturierung der Komplexe zur Folge hätten.

Einen Kompromiss zwischen flüssigem und festem Elektrolyten stellen quasifeste Elektrolytsysteme dar, die auf der Kombination von gelöstem Iod und Iodid mit einer festen Gelmatrix beruhen. Die Ionen diffundieren bei diesen Elektrolyten durch die flüssige Phase des Gels, während die feste Matrix zu einer Stabilisierung der Farbstoffe (Kaneko *et al.*, 2003), bzw. in diesem Fall der Lichtsammelkomplexe, auf der Halbleiteroberfläche beitragen soll. Tatsächlich wurde in früheren Versuchen (Lion, 2001) beobachtet, dass die Resistenz von LHCII gegenüber organischen Lösungsmitteln durch Einbetten in eine Polyacrylamidmatrix und anschließendes Trocknen erheblich verbessert wird. In Messungen an einer Zelle mit dem Farbstoff Dy701 und einer Iod/Iodid-Kombination in Polyacrylamid als Elektrolyt war jedoch nur eine geringe Elektronenübertragung von dem Sensibilisatorfarbstoff auf den Halbleiter zu sehen.

Eine Elektroneninjektion, die mit den Werten von Zellen vergleichbar war, die einen flüssigen Elektrolyt enthielten, wurde erreicht, wenn Agarose und Methanol als Matrix für die Elektrolytkomponenten verwendet wurden. Möglicherweise konnten die ionischen Komponenten des Elektrolyten in dieser Matrix aufgrund der größeren Poren und des höheren Flüssigkeitsgehalts des Gels schneller diffundieren als in der vergleichbaren Acrylamidmatrix. Bedingt durch die hohe Porenweite des Gels, kam es jedoch nicht zu einer Stabilisierung des einpolymerisierten LHCII gegenüber der flüssigen Phase des Elektrolyten. Für die Verwendung in einer LHCII-haltigen Solarzelle war dieses System somit nicht geeignet.

Obwohl die Versuche mit quasifesten Elektrolytsystemen in dieser Arbeit nicht erfolgreich verliefen, ist es grundsätzlich möglich, Pigment-Protein-Komplexe mit festen Elektronentransportmaterialien zu kombinieren. Den Beweis hierfür lieferten Das *et al.* (2004), denen es gelang bakterielle Reaktionszentren und pflanzliches Photosystem I in eine Solarzelle mit organischen Halbleitern zu integrieren. Ob die von Das *et al.* verwendeten Halbleiter auch für den Einsatz in einer Solarzelle mit LHCII und Sensibilisatorfarbstoffen geeignet wären, müsste jedoch noch experimentell überprüft werden.

4. Diskussion

4.2.2.3 Kathodenmaterialien

In den meisten Arbeiten zu elektrochemischen Solarzellen des Grätzel-Zelltyps werden Kathoden aus Platin eingesetzt, die eine effiziente Regeneration des Elektrolytsystems der Zellen gewährleisten (vgl. Kay und Grätzel, 1993; Nazeeruddin *et al.*, 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurden aufgrund der mangelnden technischen Voraussetzungen zur Anfertigung von Platinelektroden in den meisten Experimenten Bleistift-beschichtete ITO-Gläser als Kathoden verwendet. Im Gegensatz zu einer geschlossenen Platinoberfläche, führt das Auftragen von Graphit mittels Bleistift nicht zu einer vollständigen Abdeckung des ITO-Glases, weshalb die Stromausbeute bei Zellen mit Bleistift-Kathoden im Vergleich zu Zellen mit Platin-Kathoden um etwa $\frac{1}{3}$ verringert ist (vgl. Rupprecht, 1998; Wegner, persönliche Mitteilung). Der Vorteil dieser Graphit-Kathoden liegt in ihrer hohen Stabilität. Erst nach mehrfacher Verwendung war aufgrund der stringenten Reinigung der Elektroden zwischen den Messungen eine Verminderung der Stromausbeute zu beobachten, die eine Erneuerung der Elektrodenbeschichtung nötig machte (siehe 3.2.4.1).

Eine wesentlich geringere Stabilität wiesen dagegen Ruß- und Gold-beschichtete Kathoden auf, die in einigen Messungen zum Einsatz kamen. So wurde durch die Verwendung von Ruß als Kathodenmaterial gegenüber Graphit zwar eine Erhöhung des Photostroms um etwa $\frac{1}{3}$ erreicht (siehe 3.2.4.1). Allerdings kam es aufgrund der geringen Haftung des Karbons auf der ITO-Oberfläche und der Scherkräfte, die beim Kontakt zwischen Elektrode und Elektrolyt auftraten, oft schon während des Zusammensetzens der Messzellen zu Beschädigungen der Kathode, die eine Messung unmöglich machten.

Noch deutlicher, als bei den Kohlenstoff-beschichteten Elektroden, trat die geringe Haftung zwischen Elektrodenmaterial und ITO-Glas bei der Verwendung von Gold als Elektrodenmaterial zu Tage. Hier löste sich die Goldbeschichtung vollständig auf, sobald sie mit der Elektrolytlösung in Kontakt kam. Eine Verbesserung der Haftung könnte hier möglicherweise durch das Auftragen von ein bis zwei Monolagen Chrom als Substrat für die Goldbeschichtung erreicht werden (Wegner, persönliche Mitteilung).

4.2.3 Adsorption von Farbstoffen an TiO_2 und Elektroneninjektion in den Halbleiter

Seit der Einführung der ersten elektrochemischen Solarzelle durch O'Regan und Grätzel (1991) wurden unterschiedlichste Varianten des, als Grätzel-Zelle bezeichneten, Solarzellentyps hergestellt. In diesem Zusammenhang beschäftigt sich bis heute eine große Zahl von Arbeiten mit der Erprobung verschiedener Farbstoffe im Hinblick auf ihre Tauglichkeit als Sensibilisatoren in elektrochemischen Zellen.

Auch in dieser Arbeit wurden unterschiedliche Farbstoffe an TiO_2 und SnO_2 adsorbiert und auf ihre Fähigkeit zur Übertragung von Elektronen in das Leitungsband der Halbleiter überprüft. Der Schwerpunkt wurde dabei auf Infrarotfarbstoffen gelegt, die sich auch als Akzeptoren für die Übertragung der Anregungsenergie durch LHCII eigneten. Abgesehen von Rylenderivaten, die von Mitarbeitern der AG Müllen am MPI für Polymerforschung (Mainz) speziell für den Einsatz in einer LHCII-Solarzelle hergestellt wurden, handelte es sich bei den untersuchten Sensibilisatoren ausschließlich um kommerziell erhältliche

4. Diskussion

Farbstoffe. Da diese Farbstoffe für andere Zwecke, wie den Einsatz in Farbstofflasern oder als Fluoreszenzmarker, produziert wurden, lagen im Vorfeld der Versuche keine Informationen zum Redoxverhalten vor, die eine Auswahl bestimmter Farbstoffe oder Farbstofffamilien ermöglicht hätten.

Die Adsorption von Farbstoffen an Titandioxid oder Zinndioxid erfolgt meist über hydrophile oder elektrostatische Wechselwirkung zwischen polaren oder geladenen Gruppen der Farbstoffmoleküle und der Halbleiteroberfläche. Sensibilisatorfarbstoffe, die aus organischen Lösungen an Halbleiterelektroden immobilisiert werden, besitzen daher in der Regel Carboxyl- (Kay und Grätzel, 1993; Tachibana *et al.*, 2000), Sulfonyl- (Deng *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000) oder Phosphatgruppen (Burfeindt *et al.*, 1996), die eine stabile Interaktion mit der Elektrodenoberfläche ermöglichen.

Ausgehend von den Literaturdaten wurden auch in dieser Arbeit zunächst Farbstoffe mit negativ geladenen Ankergruppen, wie Cy5.5 und Alexa Fluor 680, eingesetzt. Diese Farbstoffe adsorbierten, analog zu den Ergebnissen anderer Experimentatoren, in organischer Lösung stark an Titandioxid (siehe 3.2.9.1; Tabelle 3.1). In wässriger Puffer-Detergens-Lösung konnte jedoch keine Adsorption an den Halbleiter beobachtet werden. Weitere Experimente zeigten, dass eine Immobilisierung an TiO_2 aus wässriger Lösung nur möglich war, wenn die Farbstoffe mindestens eine positive Ladung, meist in Form einer tertiären Aminogruppe, enthielten (Chen *et al.*, 2001). Zwitterionische Moleküle, wie Dy701, Dy731 oder S0247 und S0524 konnten sowohl in organischer, als auch in wässriger Umgebung an TiO_2 adsorbiert werden.

Auch die Elektronenübertragung von den Sensibilisatorfarbstoffen auf den Halbleiter wurde von den Substituenten der Farbstoffmoleküle beeinflusst. Im Fall der Cyanin- und Hemicyaninfarbstoffe wirkten sich vor allem Sulfonylsubstituenten positiv auf die Fähigkeit zur Elektroneninjektion in das Leitungsband von TiO_2 aus. Besonders deutlich fiel dieser Effekt bei den Farbstoffen Dy700 und Dy701, bzw. Dy730 und Dy731 der Firma Dyomics aus. So zeigten die Farbstoffe Dy701 und Dy731, die sich von den Derivaten Dy700 und Dy730 nur durch jeweils eine zusätzliche Sulfonylgruppe unterschieden, eine deutliche Elektronenübertragung auf TiO_2 , während Dy700 und Dy730 nicht in der Lage waren Elektronen in das Leitungsband des Halbleiters zu injizieren.

Bei den Rylensfarbstoffen weisen im Allgemeinen Perrylene ein negativeres LUMO-Potential als Terrylene und Quatterylene auf (vgl. Lee *et al.*, 1999) und sind daher nach Anregung eher in der Lage, Elektronen auf TiO_2 oder SnO_2 zu übertragen. Außerdem führen zusätzliche Imidfunktionen bei Rylenen zu einem positiveren LUMO-Potential (Lee *et al.*, 1999), während Phenoxy-Substituenten ein negativeres LUMO-Potential zur Folge haben (mündliche Mitteilung durch F. Nolde).

Die Elektronenübertragung von Rylenen auf TiO_2 war schon in früheren Versuchen untersucht worden (Lion, 2001). Dabei hatte sich gezeigt, dass lediglich die mit einem Carboxylanker versehenen Perrylene-Monoimide (PMI-COOH) und Perrylene-Diimide (PDI-COOH) in der Lage waren, Elektronen auf den Halbleiter zu übertragen (vgl. Tabelle 3.1). Bei den untersuchten Terrylen- und Quatterylenderivaten konnte keine Elektroneninjektion gemessen werden.

4. Diskussion

Auch bei den in dieser Arbeit eingesetzten Terrylene-Farbstoffen, TDI-COOH und Qu42, wurde keine Elektronenübertragung auf TiO_2 festgestellt, obwohl die Farbstoffe je vier Phenoxy-Funktionen aufwiesen (Tabelle 3.1). Beide Farbstoffe zeigten jedoch eine deutliche Elektroneninjektion in das Leitungsband von SnO_2 (siehe 3.2.10). Hinzu kam, dass der Farbstoff TDI-COOH aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit mit LHCII an der Halbleiteroberfläche koadsorbiert werden konnte, was ihn zu einem möglichen Sensibilisator für eine Solarzelle mit LHCII machte.

4.2.4 Einfluss adsorbierter Substanzen auf die Farbstoffadsorption und die Elektroneninjektion

Im Rahmen der Adsorption von Farbstoffen und LHCII an Titandioxid und Zinndioxid wurden zahlreiche verschiedene Substanzen auf die Halbleiteroberflächen aufgetragen, welche die elektrochemischen Eigenschaften der Elektroden potentiell beeinflussen konnten. So wurden Farbstoffe meist in organischen Lösungsmitteln, wie EtOH, MeOH oder Aceton, auf die Elektroden aufgebracht, während die Lichtsammlerkomplexe aus einer wässrigen Pufferlösung, die Detergentien und Saccharose oder Glycerin zur Stabilisierung der Komplexe enthielt, an den Halbleiter adsorbiert wurden. Die Untersuchung der Einflüsse, die all diese Substanzen auf die physikalischen und elektrochemischen Eigenschaften von Halbleiteroberflächen ausüben, steht noch am Anfang. Daher soll die Komplexität der Vorgänge an Halbleiteroberflächen hier nur anhand einiger besser untersuchter Beispiele und den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen dargestellt werden.

4.2.4.1 Einfluss von Wasser und Sauerstoff

Ausführliche Untersuchungen zur Adsorption von H_2O und O_2 an Titandioxidelektroden wurden 1999 von Weidmann *et al.* durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sowohl Wasser, als auch Sauerstoff recht stabil an den Halbleiter adsorbieren. So kam es beim Erhitzen der TiO_2 -Elektroden erst ab einer Temperatur von 100°C zur Dissoziation der Moleküle von dem Halbleiter. Dabei wurden sowohl für H_2O als auch für O_2 zwei temperaturabhängige Maxima für den Austritt der Moleküle aus der Elektrode, bei 150°C bis 200°C , sowie bei 350°C bis 400°C , beobachtet.

Bezüglich der Adsorption von Wasser an TiO_2 ist noch nicht eindeutig geklärt, nach welchem Mechanismus die Anlagerung erfolgt. Grundsätzlich werden zwei Mechanismen, die molekulare Adsorption ganzer Wassermoleküle und die dissoziative Adsorption, bei der OH^- und H^+ gebunden werden, unterschieden. Hugenschmidt *et al.* (1994) schlossen aus thermischen Desorptions- und UV-photoemissionsspektroskopischen Messungen, dass Wasser in einer weniger als einmolekularen Schicht dissoziativ an die TiO_2 -Oberfläche adsorbiert. Henderson (1996) folgerte aus seinen Experimenten dagegen, dass nur ein geringer Anteil der Wassermoleküle dissoziativ gebunden wird, während die molekulare Adsorption dominiert, sobald sich die Belegungsdichte an eine geschlossene einmolekulare Schicht annähert.

4. Diskussion

Auch der Einfluss der adsorbierten H_2O - und O_2 -Moleküle auf die elektrochemischen Eigenschaften von TiO_2 gestaltet sich komplex. So beobachteten Weidmann *et al.* (1999), dass die Leitfähigkeit von TiO_2 mit zunehmendem Sauerstoffpartialdruck abnahm. Auf der anderen Seite stellten die Autoren auch fest, dass die Vorbehandlung von Elektroden mit Vakuum bzw. H_2O und Vakuum zu einer deutlichen Verringerung der Leerlauf-Spannung und des Kurzschlussstromes gegenüber Elektroden führte, die mit Sauerstoff oder H_2O vorbehandelt wurden.

Bei den Versuchen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte kein eindeutiger Effekt von Wasser oder Sauerstoff auf die Elektronenübergänge innerhalb der Halbleiterelektroden beobachtet werden.

Die Adsorption von Farbstoffen an die Elektroden und die Elektronenübertragung von den Farbstoffen auf den Halbleiter waren jedoch stark davon abhängig, in welchen Lösungsmitteln die Farbstoffe auf die Elektroden aufgetragen und die Elektrolytkomponenten in die Zelle eingesetzt wurden (siehe Tabelle 3.1).

Einige Farbstoffe, wie Alexa Fluor 680 oder Cy5.5, konnten ausschließlich aus organischem Lösungsmittel an TiO_2 immobilisiert werden, während andere Farbstoffe, wie Atto 680, DOTCI oder NIR-797, nur in wässriger Umgebung an den Halbleiter adsorbierten. Bei Farbstoffen, die sowohl in EtOH, als auch in Puffer und Detergens an TiO_2 adsorbierten, war der Wechsel vom organischen Lösungsmittel in die wässrige Umgebung stets mit einer Verminderung der Elektroneninjektion verbunden. Im Falle der Farbstoffe Dy701 und Dy731 konnte keine Übertragung von Elektronen vom Farbstoff auf TiO_2 beobachtet werden, wenn die Farbstoff-belegten TiO_2 -Elektroden über Nacht in Puffer und Detergens inkubiert wurden. Auch an S0247-beschichteten Elektroden wurde nach der Inkubation in Puffer eine Verringerung der Elektroneninjektion festgestellt (siehe 3.2.9.2). Im Falle der TiO_2 -adsorbierten Cyanin- und Hemicyaninfarbstoffe lag die Hauptursache für die Verminderung der Elektronenübertragung wahrscheinlich darin, dass der Großteil des adsorbierten Farbstoffes nach dem Wechsel in die wässrige Umgebung von der Halbleiteroberfläche abdissoziierte. Der vollständige Verlust der Elektroneninjektion, wie im Falle von Dy701 und Dy731, lässt sich hierdurch jedoch nicht erklären. Auch die Wirkungsspektren von SnO_2 -Zellen deren Anoden mit TDI-COOH, einem Terrylenfarbstoff, der in wässriger Umgebung nicht von der Halbleiteroberfläche abdissoziiert, belegt waren, deuten darauf hin, dass sich die Inkubation in Puffer negativ auf die Elektronenübertragung vom Farbstoff auf den Halbleiter auswirkt (siehe Abb. 3.34).

4.2.4.2 Beeinflussung durch adsorbierte Metalle

Metalle, wie Eisen, Natrium oder Kalium, adsorbieren bei neutralen pH-Werten stark an Titandioxid und sind, je nach Herstellungsmethode, in unterschiedlich hohem Maße als Verunreinigung im Halbleitermaterial vorhanden. So enthält das durch Flammen-Hydrolyse hergestellte P25-Titandioxid (Degussa AG, Darmstadt), das in den meisten Experimenten innerhalb dieser Arbeit verwendet wurde, bis zu 100 ppm Fe_2O_3 (Nazeeruddin *et al.*, 1993). Fe^{3+} , das auf der Oberfläche der TiO_2 -Partikel adsorbiert ist, kann als Elektronenfalle fungieren und die Elektroneninjektion durch Sensibilisatorfarbstoffe beeinträchtigen. Die meisten Experimentatoren stellen TiO_2 daher durch oxidative Hydrolyse von TiCl_3 her (Kavan *et al.*, 1993) (vgl. 4.2.2.1) oder adsorbieren TiO_2 aus einer sauren TiCl_4 -Lösung an das

4. Diskussion

kommerzielle Halbleitermaterial (Nazeeruddin *et al.*, 1993), um die Eigenschaften der Elektrodenoberfläche zu verbessern. Die Deposition von TiO_2 aus einer sauren Titanchloridlösung führt nach Angaben der Autoren zur Ausbildung einer sehr reinen Halbleiteroberfläche, da Fe^{3+} aufgrund seiner besseren Löslichkeit nicht mit dem TiO_2 präzipitiert wird.

Auch in dieser Arbeit wurde versucht, die Titandioxidelektroden durch Adsorption von TiO_2 aus einer TiCl_4 -Lösung zu verbessern (siehe 3.2.2.1.2). Dabei konnte nach der Behandlung der Elektroden mit TiCl_4 in allen Fällen eine Zunahme der relativen Elektroneninjektion von Chlid *a* bezogen auf die Elektronenübergänge im Halbleiter festgestellt werden. Die einzelnen Messwerte zeigten jedoch eine sehr starke Streuung. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Elektroneninjektion durch das Pigment und der aufgetragenen TiCl_4 -Menge ließ sich daher nicht erkennen (Abb. 3.2.2.1.2). Im Schnitt war die Zunahme der Elektroneninjektion durch die zusätzliche Deposition von TiO_2 im Verhältnis zu dem mit dem Verfahren verbundenen Aufwand so gering, dass die Prozedur in weiteren Versuchen nicht mehr durchgeführt wurde.

Neben Eisen können auch Alkalimetalle, wie Natrium und Kalium, die elektrochemischen Eigenschaften der TiO_2 -Oberfläche beeinflussen. So beobachteten Hardman *et al.* (1991) zusätzliche elektronische Zustände innerhalb der Bandlücke von TiO_2 , die durch die Adsorption von K^+ induziert wurden. Offenbar wurde der Halbleiter durch die adsorbierten Kaliumionen reduziert, wobei die Elektronen, welche von Kalium auf Titandioxid übertragen wurden, die neu entstandenen Zustände, etwa 1 bis 2 eV über dem Valenzband des Halbleiters, besetzten.

In dieser Arbeit wurden Natriumphosphatpuffer zum Einstellen des pH-Wertes bei der Adsorption von Farbstoffen und LHCII an Halbleiterelektroden verwendet. Kalium wurde als kationischer Bestandteil des Elektrolyten bei vielen elektrochemischen Messungen eingesetzt. Dabei konnte nicht festgestellt werden, dass die Ergebnisse der durchgeführten Versuche durch die Anwesenheit der Alkalimetall-Ionen beeinflusst wurden.

Im Gegensatz zu Natrium und Kalium führten zweiwertige Kationen, wie Mg^{2+} und Ca^{2+} , jedoch zu einer deutlichen Veränderung der elektrochemischen Eigenschaften der TiO_2 -Elektroden. In dem unter 3.2.9.6 beschriebenen Versuch wurde untersucht, welchen Effekt die Anwesenheit von Mg^{2+} oder Ca^{2+} während der Adsorption des Farbstoffes S0524 an TiO_2 auf die Belegungsdichte des Farbstoffes auf der Elektrode und die Elektroneninjektion hat. Ziel des Versuches war es, die Oberflächenladung des Halbleiters durch die adsorbierten Kationen zu positivieren und so die Interaktion zwischen dem negativ geladenen Farbstoff und der TiO_2 -Elektrode zu verbessern.

Entgegen der Erwartungen konnte jedoch nur eine minimale Erhöhung der Belegungsdichte beobachtet werden, wenn Ca^{2+} zur Farbstoff-Auftragslösung zugesetzt wurde. Bei den anschließend aufgenommenen Wirkungsspektren zeigte sich, dass die relative Elektroneninjektion durch den Farbstoff, bezogen auf das Halbleitermaximum, bei den mit Mg^{2+} und Ca^{2+} behandelten Elektroden gegenüber der Referenz ohne zweiwertige Kationen stark vermindert war. In den weiteren Versuchen wurde daher von der Zugabe von Magnesium oder Kalzium abgesehen.

4. Diskussion

4.2.4.3 Einflüsse von Puffern und Detergentien

Im Allgemeinen werden Farbstoffe bei der Herstellung von elektrochemischen Solarzellen des Grätzel-Zell-Typs aus organischer Lösung an die Halbleiterelektrode adsorbiert. Zu den Auswirkungen von verschiedenen Puffern und Detergentien auf die Adsorption von Farbstoffen an Halbleiteroberflächen und Elektronenübertragung ist daher wenig bekannt. Lediglich der Einfluss von Cholat und Desoxycholat auf die Adsorption von Chl-Derivaten an TiO_2 wurde näher untersucht (Kay und Grätzel, 1993). Dabei zeigte sich, dass der Zusatz der Detergentien bei der Adsorption der Pigmente aus ethanolischer Lösung zu einer Verminderung der Belegungsdichte führte. Gleichzeitig konnte jedoch eine Zunahme der Elektronenübertragung von den Chl-Derivaten auf den Halbleiter beobachtet werden. Offenbar führte die Koadsorption von Pigmenten und Cholansäuren zu einer Verminderung der Aggregation der Pigmente. Außerdem beobachteten die Autoren in Gegenwart der Säuren eine Protonierung der Pigmente und der TiO_2 -Oberfläche, die im Falle des Halbleiters eine leichte Positivierung des Leitungsbandpotentials zur Folge hatte, wodurch die Elektronenübertragung von den Pigmenten ebenfalls verbessert wurde.

In dieser Arbeit zeigte sich bei ersten Versuchen zur Koadsorption von Farbstoffen und LHCII an Titandioxid, dass die Puffer-Detergens-Umgebung großen Einfluss auf die Adsorption der Farbstoffe an die Elektrodenoberfläche hat.

Wurde eine Menge von bis zu 50 nmol/cm^2 der Farbstoffe Dy701 und Dy731 oder der Farbstoffe S0247 und S0524 in wässriger Lösung mit Natriumphosphatpuffer und LM auf eine TiO_2 -Elektrode aufgetragen, so adsorbierten die Farbstoffe zunächst nahezu vollständig an die Halbleiteroberfläche. Beim anschließenden Spülen der Elektrode mit der gleichen Puffer-Detergens-Lösung lösten sich jedoch größere Mengen des jeweiligen Farbstoffes wieder von der Oberfläche ab. Offenbar wurde der adsorbierte Farbstoff durch eine oder mehrere Komponenten des Puffer-Detergens-Systems von der TiO_2 -Oberfläche verdrängt.

Eine solche Verdrängung durch Pufferkomponenten wurde von Moulton *et al.* (2003) nach der Adsorption von Immunglobulin G (IgG) an TiO_2 beobachtet. Die Autoren beschrieben, dass schon bei relativ geringen Phosphatkonzentrationen Teile des Proteins von der Halbleiteroberfläche abgelöst werden konnten. Eine vollständige Entfernung des IgG von der Elektrode war aber auch bei hohen Pufferkonzentrationen nicht möglich.

Um zu überprüfen, ob TiO_2 -adsorbierte Farbstoffe ebenfalls durch Phosphat verdrängt werden, wurde der Farbstoff S0247 mit LM und Natriumphosphat-Puffer, Tricine (NaOH) und Tris (HCl) auf die Halbleiterelektroden aufgetragen und anschließend mit den gleichen Puffern mehrfach über Nacht inkubiert (siehe 3.2.9.4). Dabei war in allen Fällen eine Ablösung des Farbstoffes von der Oberfläche zu sehen. Zwischen den Ansätzen mit verschiedenen Puffern war jedoch kein signifikanter Unterschied erkennbar. Eine spezifische Verdrängung des Farbstoffes durch Phosphat konnte demnach ausgeschlossen werden. Weitere Messungen ergaben, dass auch der pH-Wert des jeweiligen Puffers keinen Einfluss auf die Adsorption von Farbstoffen an Titandioxid hat (vgl. Abb. 3.31).

4. Diskussion

Wesentlich stärkere Auswirkungen auf das Bindungsverhalten von Farbstoffen hatten dagegen unterschiedliche Detergentien (siehe 3.2.9.5). Versuche zur Belegung von TiO₂ mit dem Farbstoff S0247 ergaben, dass nur sehr geringe Farbstoffmengen an den Halbleiter adsorbierten, wenn im Bindungsschritt kein Detergens zugesetzt wurde. Nahezu vollständig adsorbierte der Farbstoff, wenn die Detergentien LM oder CTAB zugegeben wurden. Bei Ansätzen mit Triton X-100, CHAPS oder OG und SDS adsorbierte etwa $\frac{1}{3}$ des aufgetragenen Farbstoffes an die TiO₂-Oberfläche.

Betrachtet man die ionischen Detergentien für sich, so wurden mit dem positiv geladenen CTAB die höchsten und mit dem negativ geladenen SDS nur geringe Belegungsdichten erreicht, während der Wert für den Ansatz mit dem zwitterionischen Detergens CHAPS etwa in der Mitte lag. Dieser Teil der Ergebnisse deutete somit darauf hin, dass die Affinität des Farbstoffes durch das Einbringen zusätzlicher positiver Ladungen erhöht wird, während negative Ladungen zu einer Verminderung der Adsorption führen. Diese Folgerung würde auch zu Beobachtungen passen, die bei der Adsorption von LHCII an Titandioxid und Zinndioxid gemacht wurden (vgl. 4.2.5.4 und Berens, 2005).

Nicht in dieses Bild passen die Belegungsdichten, die mit den nichtionischen Detergentien LM und Triton X-100 erzielt wurden. Enthielt die Auftragslösung LM, so war die Adsorption von S0247 ähnlich gut, wie bei dem Zusatz von CTAB. Mit Triton X-100 wurden dagegen nur relativ geringe Belegungsdichten erreicht. Der Einfluss der Detergentien auf die Adsorption des Farbstoffes basiert demnach nicht ausschließlich auf der Einführung von zusätzlichen Ladungen.

Da die einzelnen Detergentien, die in diesem Versuch eingesetzt wurden, unterschiedlichen Klassen angehörten und sich in Struktur und physikalischen Parametern, wie der kritischen micellaren Konzentration (CMC), Micellengröße und Aggregationszahl unterschieden, konnte nicht geklärt werden, durch welche Parameter die Farbstoffadsorption letztendlich beeinflusst wurde. In weiteren Experimenten wurde LM in die Farbstoffauftragslösung eingesetzt, da mit diesem Detergens hohe Farbstoffbelegungsdichten erreicht wurden und es bei der Adsorption von LHCII an TiO₂ weniger destabilisierend auf Komplexe wirkte als andere Detergentien (Berens, 2005).

4.2.5 Adsorption von LHCII an Halbleiterelektroden

Schon 2001 wurde von Wolf-Klein nachgewiesen, dass LHCII aus einer wässrigen Puffer/Detergens-Lösung an Titandioxidelektroden immobilisiert werden kann. Die Komplex-Belegungsdichten, die dabei gemessen wurden, waren mit 0,03 nmol LHCII-Monomeren pro cm² jedoch noch relativ niedrig. Da die von LHCII absorbierte Lichtmenge und damit die Wirksamkeit der Komplexe als Lichtantenne in einer elektrochemischen Solarzelle entscheidend von der Menge der Komplexe auf der Halbleiterelektrode abhängt, lag ein Schwerpunkt der Versuche, die seitdem durchgeführt wurden, in der Optimierung der Adsorption der Komplexe an verschiedene Halbleiterelektroden.

4. Diskussion

4.2.5.1 Maximale Belegungsdichte der Komplexe auf den Halbleiteroberflächen

Erste Versuche zur Ermittlung der maximalen Belegungsdichte von nativen LHCII-Trimeren auf TiO₂-Elektroden wurden bereits in einer früheren Arbeit (Lion, 2001) durchgeführt. Dabei wurde nach einem Zeitraum von 64 Tagen eine Belegungsdichte von 0,47 nmol/cm² erreicht. Die Wiederholung des Versuchs im Rahmen dieser Arbeit führte zu einem abweichenden Ergebnis. Statt nach 40 bis 60 Tagen trat eine Sättigung der Adsorption hier erst nach etwa 100 Tagen ein (siehe 3.2.6.1.1). Die aus der Bestimmung der LHCII-Konzentrationen in den Überständen ermittelte Belegungsdichte war mit ca. 0,9 nmol/cm² nahezu doppelt so hoch wie in den ersten Versuchen. Eine Überprüfung des Wertes durch Extraktion der Pigmente aus der Halbleiterelektrode ergab ein deutlich niedrigeres Ergebnis von ca. 0,42 nmol LHCII pro cm². Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass nicht alle Pigmente durch Waschen mit Aceton und Butanol in Lösung gebracht werden konnten. Aus der Pigmentextraktion konnte somit lediglich geschlossen werden, dass die Belegungsdichte auf den TiO₂-Elektroden deutlich höher lag als 0,42 nmol/cm².

Die Größe der Halbleiteroberfläche, die für eine Adsorption von LHCII zugänglich ist, lässt sich abschätzen, wenn der Flächenbedarf der Komplexe auf der Oberfläche bekannt ist. Aus dem Strukturmodell von LHCII (Kühlbrandt *et al.*, 1994) wurde der Flächenbedarf von LHCII-Monomeren auf etwa 11,5 nm² geschätzt (Wolf-Klein, 2001), für LHCII-Trimere kann demnach ein Wert von etwa 34,5 nm² angenommen werden (Lion, 2001). Bei einer Belegungsdichte von 0,9 nmol LHCII-Trimeren pro cm² bedeutet das, dass etwa das 190fache Areal der sichtbaren Elektrodenoberfläche mit den Komplexen belegt ist. Nazeeruddin *et al.* errechneten 1993 anhand der Adsorption von Farbstoffmolekülen an TiO₂-Elektroden, dass die Oberfläche des Halbleiters, bei einer Partikelgröße von 15 bis 30 nm und einer Schichtdicke von 8 bis 12 µm, etwa um den Faktor 1000 größer ist, als eine planare Fläche gleicher Ausdehnung. Übertragen auf die LHCII-Adsorption ist demnach nur etwa 1/5 der tatsächlichen Halbleiteroberfläche mit den Komplexen belegt.

Auch in anderen Arbeiten zur Adsorption von Proteinen an TiO₂ wurde beobachtet, dass nicht die gesamte Elektrodenoberfläche für eine Anlagerung der Proteine zugänglich ist. So ermittelten Topoglidis *et al.* (1998) bezüglich der Adsorption von Cytochrom c an eine 4 µm dicke TiO₂-Elektrode, dass die proteinbelegte Halbleiterfläche etwa um den Faktor 150 größer war, als es bei einer planaren Elektrode zu erwarten wäre. Die errechnete TiO₂-Oberfläche war den Autoren zufolge jedoch etwa 300mal so groß, wie bei einer flachen Elektrode.

Versuche zur Adsorption von LHCII an SnO₂-Elektroden (siehe 3.2.6.2.2) deuten darauf hin, dass die Zugänglichkeit der Halbleiterschicht für die Lichtsammelkomplexe durch die Größe der Poren zwischen den Partikeln begrenzt wird. Generell war die Belegungsdichte von nativen LHCII-Trimeren auf den SnO₂-Elektroden deutlich geringer, als auf vergleichbaren TiO₂-Oberflächen. Die höchste gemessene Belegung auf einer SnO₂-Elektrode lag bei 0,02 nmol/cm². Die für die Proteinadsorption zur Verfügung stehende Halbleiteroberfläche, war damit nur etwa 4 bis 5mal größer, als eine ebene Fläche gleicher Abmessung.

4. Diskussion

Die SnO₂-Partikel, die zur Herstellung der Halbleiterschicht verwendet wurden, waren mit ca. 15 nm etwas kleiner als die in den meisten Experimenten eingesetzten TiO₂-Partikel (21 nm). Um herauszufinden, ob die geringere Partikelgröße auch zu einer Verkleinerung der Poren zwischen den Partikeln führte, wurden vergleichende Messungen zur Adsorption von LHCII-Monomeren und Trimeren an den Halbleiter durchgeführt (siehe 3.2.6.2.2). Tatsächlich zeigte sich, dass die maximale Belegungsdichte bei LHCII-Monomeren höher lag, als bei Trimeren. Wahrscheinlich konnten die kleineren Monomere noch in Poren eindringen, die für die Trimere nicht zugänglich waren. Gestützt wurde dieses Ergebnis auch durch einen Versuch, in dem native LHCII-Trimere an eine SnO₂-Elektrode adsorbiert wurden, die aus deutlich größeren Zinndioxidpartikeln (< 5 µm) bestand (siehe 3.2.2.2.3). Zwar wurde in diesem Versuch nicht die maximale Belegungsdichte der Komplexe ermittelt, doch schon nach einem Bindungsschritt war die erreichte Komplexdichte auf der Halbleiteroberfläche etwa zehnmal so hoch, wie bei den sonst verwendeten SnO₂-Elektroden. Eine weitere Verwendung der größeren SnO₂-Partikel kam dennoch nicht in Frage, da sich die Halbleiterschicht nach dem Sintern der Elektrode leicht vom ITO-Glassubstrat ablöste. Außerdem konnte an den so hergestellten Elektroden kein Strom durch Elektronenübergänge im Halbleiter oder Elektroneninjektion durch Farbstoffe gemessen werden.

Besondere Bedeutung hat die Zugänglichkeit der Halbleiteroberfläche für die Koadsorption von Farbstoffen und LHCII. Die maximale Belegungsdichte der verschiedenen Farbstoffe auf den Halbleiterelektroden wurde in dieser Arbeit zwar nicht bestimmt, nach den Ergebnissen von Nazeeruddin *et al.* (1993) muss jedoch davon ausgegangen werden, dass die Farbstoffe aufgrund ihrer geringeren Größe auch an Bereiche der Elektrodenoberfläche adsorbieren, die für die Proteinkomplexe nicht zugänglich sind. In der Folge würde der LHCII seine Anregungsenergie nur auf einen Teil der immobilisierten Farbstoffe transferieren. Im ungünstigsten Fall wäre es auch vorstellbar, dass Energie der Komplexe nur auf einige oberflächlich adsorbierte Farbstoffe übertragen wird, während die Sensibilisierung des Halbleiters durch Farbstoffe erfolgt, die sich in tiefer gelegenen Bereichen der Elektrodenschicht befinden.

Bei näherer Betrachtung erscheint diese extreme Möglichkeit jedoch unwahrscheinlich. Zum einen konnte in Arbeiten, die sich mit der Adsorption von redoxaktiven Proteinen an Titandioxid oder Zinndioxid beschäftigten, stets ein Elektronentransfer zwischen den immobilisierten Proteinen und den Halbleitern gemessen werden (Topoglidis *et al.*, 2000; Topoglidis *et al.*, 2001; Topoglidis *et al.*, 2002; Topoglidis *et al.*, 2003), was belegt, dass auch die elektrochemisch aktiven Bereiche der Halbleiterschicht für die Proteine zugänglich waren. Zum anderen wird aus Fluoreszenzexcitationsspektren von LHCII- und Farbstoff-belegten Elektroden ersichtlich, dass die Lichtsammelkomplexe vor allem bei Wellenlängen unter 550 nm einen deutlichen Beitrag zur Excitation der Akzeptorfarbstoffe leisten (siehe 3.2.13). Würde die Anregungsenergie der Komplexe nur auf einen geringen Teil der koadsorbierten Farbstoffmoleküle übertragen, so wäre zu erwarten, dass der Anteil von LHCII an der Farbstoffanregung wesentlich geringer ausfällt.

4. Diskussion

4.2.5.2 Spektroskopische Eigenschaften der immobilisierten Lichtsammlerkomplexe

Für eine elektrochemische Solarzelle, in der LHCII die Funktion einer Lichtantenne erfüllt, ist es von entscheidender Bedeutung, dass der Komplex-interne Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* durch die Immobilisierung auf einer Halbleiteroberfläche nicht beeinträchtigt wird und die Fähigkeit zur Energieübertragung auf einen externen Akzeptor erhalten bleibt. Als Kontrolle der Intaktheit der immobilisierten Komplexe wurden daher stets Fluoreszenzspektren der LHCII-beschichteten Halbleiterelektroden aufgenommen, anhand derer der Energietransfer von Chl *b* auf Chl *a* überprüft werden konnte.

Bereits in ersten Experimenten zur Adsorption von LHCII an Titandioxid (Wolf-Klein, 2001) zeigte sich, dass die Immobilisierung von geringen LHCII-Mengen an der Halbleiteroberfläche nicht zu einer Verminderung des komplexinternen Energietransfers führte. Lediglich eine leichte Verbreiterung der Fluoreszenzemissionsspektren war zu erkennen. Bei höheren Belegungsdichten, wie sie im Rahmen dieser Arbeit erreicht wurden, war außerdem eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenz zu höheren Wellenlängen, sowie eine Zunahme der langwelligen Fluoreszenz zwischen 730 nm und 750 nm zu sehen. Mögliche Ursachen dieser Veränderungen der LHCII-Fluoreszenz könnten eine Aggregation der Komplexe auf der Halbleiteroberfläche, oder die Reabsorption der Komplexfluoreszenz aufgrund der hohen Konzentration in der Halbleiterschicht sein.

Für die Aggregation von LHCII konnten, neben der Veränderung der Fluoreszenz, keine Hinweise gefunden werden. So waren in Absorptionsspektren, die von LHCII-beschichteten Halbleiterelektroden aufgenommen wurden, keine langwelligen Absorptionsbanden zu sehen, wie sie typischerweise bei einer Aggregation der Komplexe auftreten. Eindeutige Schlüsse konnten aus den Absorptionsspektren allerdings nicht gezogen werden, da die gemessene LHCII-Absorption durch die starke Lichtstreuung in der Halbleiterelektrode stark beeinträchtigt wurde.

Wahrscheinlicher als die Aggregation der Komplexe erscheint eine Reabsorption der emittierten Fluoreszenz durch benachbarte LHCII-Moleküle, wie sie bei hohen LHCII-Konzentrationen zu beobachten ist (Voigt *et al.*, 1996). Übertragen auf eine Lösung entsprach eine Belegungsdichte von 0,9 nmol LHCII-Trimeren pro cm² (siehe 3.2.6.1.1), wie sie in dieser Arbeit erreicht wurde, bei einer Schichtdicke des Halbleiters von weniger als 50 µm (siehe 2.11.1.1) einer Konzentration von mindestens 18 mM LHCII in der Halbleiterschicht.

Abgesehen von der Verschiebung des Fluoreszenzmaximums und der Zunahme der langwelligen Fluoreszenz, war auch bei hohen LHCII-Belegungsdichten keine Verminderung des internen Energietransfers von Chl *b* auf Chl *a* zu erkennen. Des Weiteren hat die Reabsorption der Chl-Fluoreszenz durch benachbarte Komplexe wahrscheinlich keinen Einfluss auf den Energietransfer auf einen koadsorbierten Akzeptorfarbstoff.

Die hohen Werte, von 68 bis über 99 %, die für den Energietransfer von LHCII auf einen koadsorbierten Akzeptor ermittelt wurden, deuten darauf hin, dass die Übertragung der Anregungsenergie auf die jeweiligen Akzeptorfarbstoffe wesentlich schneller erfolgt als die Abführung des angeregten Zustands durch Fluoreszenz.

4. Diskussion

4.2.5.3 Vergleich der Adsorption von nativem und rekombinatem LHCII

Ausführliche Versuche zur Immobilisierung von nativem und rekombinatem LHCII an TiO_2 wurden parallel zu dieser Arbeit von Berens (2005) durchgeführt. Dabei zeigten die rekombinanten Komplexe stets eine höhere Affinität zur Halbleiteroberfläche als der native LHCII. Des Weiteren erwiesen sich auch His_6 -Gruppen innerhalb der Aminosäuresequenz der rekombinanten LHCII als vorteilhaft für die Adsorption der Komplexe an den Halbleiter. Tatsächlich konnte eine deutliche Abfolge der Affinitäten der Komplexe ausgemacht werden, die analog zur Anzahl der eingebrachten His_6 -Motive verlief. Nach einer Inkubationszeit von 16 h wies der LHCII-Klon mit je einem His_6 -Motiv am C- und am N-Terminus (Bero1) die höchste Belegungsdichte auf der Elektrodenoberfläche auf, gefolgt von einer Mutante mit nur einem His_6 -Motiv am C-Terminus (C3.2h). Der Klon mit der nativen Aminosäuresequenz (D7f.3) besaß unter den getesteten rekombinanten LHCII-Varianten die geringste Affinität zur Halbleiteroberfläche.

Gut in das Bild, das sich aus der Arbeit von Berens (2005) ergibt, passen die Beobachtungen, die in der vorliegenden Arbeit bezüglich der Adsorption von LHCII an SnO_2 gemacht wurden (siehe 3.2.6.2.2). Auch hier war die Belegungsdichte der LHCII-Monomere mit Wildtypsequenz (D7f.3) nach Inkubation über Nacht geringer, als die Belegungsdichte der C3.2h-Monomere mit His_6 -Motiv am C-Terminus. Die höchste Belegung wurde mit Monomeren des Klons Lys6, einer LHCII-Mutante mit Lys_6 -Motiv am N-Terminus erreicht. Die Adsorption der LHCII-Mutanten C3.2h und Lys6 kann zwar nur unter Vorbehalt verglichen werden, da sich die basischen Aminosäuremotive in unterschiedlichen Bereichen des Proteins, am C- bzw. am N-Terminus, befinden. Zieht man die Ergebnisse von Berens (2005) hinzu, so lässt sich jedoch eindeutig erkennen, dass sich die in die Komplexe eingebrachten positiv geladenen Motive förderlich auf die Adsorption an TiO_2 - und SnO_2 -Oberflächen auswirken. Der positive Effekt von basischen Aminosäuren auf die Adsorption an Titandioxid wurde auch von Topoglidis *et al.* (2001) beschrieben. Die Autoren beobachteten eine deutliche Verringerung der Adsorption von Cytochrom c an den Halbleiter, nachdem sie die positive Ladung der Lysinreste des Proteins durch Acetylierung maskiert hatten. Außerdem korrelieren die Resultate aus der Adsorption der Lichtsammelkomplexe mit den Beobachtungen, die in dieser Arbeit bei der Immobilisierung von Farbstoffen an Halbleiter gemacht wurden. Hier konnten in wässriger Umgebung ausschließlich Farbstoffe an TiO_2 oder SnO_2 adsorbiert werden, die mindestens eine positive Ladung enthielten (siehe 4.2.3).

Geht man davon aus, dass die Belegungsdichte von LHCII auf TiO_2 - und SnO_2 -Elektroden durch die Porengröße der Halbleiterschicht limitiert wird (vgl. 4.2.5.1), so ist es jedoch unwahrscheinlich, dass mit der Erhöhung der Affinität der Komplexe zur Halbleiteroberfläche auch eine Steigerung der erreichbaren maximalen Belegungsdichte einhergeht. Tatsächlich war bei der Adsorption von nativen LHCII-Trimeren und C3.2h-Trimeren an SnO_2 -Elektroden mit 15 nm SnO_2 -Partikelgröße kein signifikanter Unterschied in der Belegungsdichte zu erkennen (siehe 3.2.6.2.2). Offenbar war hier mit 0,02 nmol Trimeren pro cm^2 die maximale Dichte der Komplexe auf der Oberfläche erreicht.

4. Diskussion

4.2.5.4 Koadsorption von LHCII mit positiv geladenen Peptiden

Eine ähnliche Erhöhung der Affinität von LHCII zu Titandioxid, wie sie beim Einbringen zusätzlicher basischer Aminosäuren in die Komplexe selbst beobachtet wurde, zeigte sich, wenn auch in geringerem Ausmaß, bei der Koadsorption der nativen Komplexe mit kationischen Peptiden.

In dieser Arbeit wurde ein amphiphiles Peptid aus 6 Alaninen und einem C-terminalen Lysin (A_6K) mit nativen Lichtsammelkomplexen an TiO_2 koadsorbiert (siehe 3.2.6.1.3). Ursprünglich sollte dieses Peptid aufgrund seines lipidähnlichen Charakters zu einer Stabilisierung des LHCII auf der Halbleiteroberfläche beitragen (siehe 4.2.6.1). Anstelle einer Erhöhung der strukturellen Stabilität der Komplexe war in den durchgeführten Versuchen jedoch eine leichte Zunahme der Affinität von LHCII zur TiO_2 -Oberfläche zu sehen. Die Verbesserung der LHCII-Adsorption war dabei unabhängig davon, ob die Peptide in einem separaten Bindungsschritt vor den Komplexen, oder gemeinsam mit LHCII auf die Elektrode aufgetragen wurden.

Aus den mit A_6K durchgeführten Versuchen alleine war nicht ersichtlich, ob die Erhöhung der LHCII-Belegungsdichte eine Folge der Maskierung der negativen Oberflächenladung des Halbleiters war, oder auf hydrophoben Wechselwirkungen des Membranproteins mit dem unpolaren Alaninen der adsorbierten Peptide beruhte. Andere Versuche zur Koadsorption von Proteinen und Poly-L-Lysin an TiO_2 (Berens, 2005) und SnO_2 (Astuti *et al.*, 2004) zeigten jedoch eindeutig eine Verbesserung der Proteinadsorption aufgrund der Maskierung der Halbleiteroberfläche durch positiv geladene Peptide.

Berens (2005) beobachtete bei der Adsorption von LHCII an Poly-L-Lysin belegte TiO_2 -Elektroden bei geringen Poly-L-Lysin-Konzentrationen zunächst eine Zunahme der LHCII-Adsorption, nach dem Auftragen höherer Peptidmengen von über 5 nmol pro cm^2 Halbleiteroberfläche war jedoch eine Abnahme der LHCII-Belegung zu sehen. Möglicherweise kam es in Folge der Adsorption des relativ großen Peptids (ca. 7,5 kDa) zu einer Verengung der Poren der Halbleiterschicht, wodurch die für LHCII zugängliche Elektrodenoberfläche verringert wurde. Astuti *et al.* (2004) beschrieben in ihrer Arbeit, dass es erst nach der Belegung der von ihnen verwendeten SnO_2 -Elektroden mit Poly-L-Lysin zu einer nennenswerten Adsorption von Flavodoxin an die Elektrodenoberfläche kam. Außerdem konnten die Autoren zeigen, dass es trotz der Poly-L-Lysin-Belegung zu einem Elektronentransfer zwischen Flavodoxin und dem Halbleiter kam.

4.2.6 Stabilität der immobilisierten LHCII-Komplexe

Ausschlaggebend für den Einsatz von LHCII in einer elektrochemischen Solarzelle ist neben der Funktion der Lichtsammelkomplexe auch die Stabilität der Komplexe auf der Halbleiterelektrode. In dieser Arbeit wurde zum einen die strukturelle oder konformative Stabilität der Proteinkomplexe, zum anderen die Photostabilität der Pigmente der Lichtsammelkomplexe untersucht.

4. Diskussion

4.2.6.1 Konformative Stabilität

Schon in früheren Arbeiten (Wolf-Klein, 2001; Lion, 2001) hatte sich gezeigt, dass die konformative Stabilität von nativem und rekombinantem LHCII in NaP-Puffer, 0,1 % LM und 0,4 – 0,5 M Saccharose ausreichend ist, um eine Adsorption von intakten Komplexen an Titandioxid zu ermöglichen.

Im Laufe dieser Arbeit wurde jedoch deutlich, dass sich die Bestandteile der bisher verwendeten LHCII-Auftragslösung negativ auf die Adsorption von Farbstoffen an die Halbleiterelektrode (siehe 3.2.9.4), sowie auf die Elektroneninjektion von Farbstoff in die Halbleiter auswirken (siehe 3.2.9.2). In einem Versuch zur Elektronenübertragung von S0247 auf TiO₂ war zu beobachten, dass die Verminderung der Elektroneninjektion nach Inkubation der Farbstoff-belegten Elektrode in einer wässrigen Puffer/Detergens-Lösung stärker ausfiel, wenn der Waschpuffer Saccharose enthielt (siehe 3.2.9.2). Auf der anderen Seite führte der Verzicht auf Saccharose während der Adsorption von LHCII an TiO₂, bzw. die Entfernung der Saccharose aus der Auftragslösung zu einer deutlichen Destabilisierung der Komplexe. Tatsächlich ließ sich in den meisten Fällen nach der Immobilisierung auf der Halbleiteroberfläche eine teilweise Denaturierung des LHCII beobachten, die sich in einer Verminderung des Komplex-internen Energietransfers von Chl *b* auf Chl *a* niederschlug. Um der Denaturierung des Proteins entgegenzuwirken, wurde die LHCII-Auftragslösung in den folgenden Experimenten mit 10 % Glycerin versetzt, das die Komplexe hinreichend stabilisierte und nur zu einer leicht erhöhten Dissoziation des mit dem LHCII koadsorbierten Farbstoffs von der TiO₂-Elektrode führte (vgl. 3.2.9.3). Des Weiteren wurde die Elektronenübertragung von den verwendeten Farbstoffen, S0247 und S0524, auf TiO₂ durch Glycerin nicht beeinträchtigt, wie elektrochemische Messungen an Halbleiterelektroden zeigten, die mit diesen Farbstoffen belegt waren und bei denen Glycerin als Lösungsmittel für die Elektrolytkomponenten verwendet wurde (siehe 3.2.9.1).

Auch während der elektrochemischen Messungen erwies sich Glycerin als geeigneter Stabilisator für die Lichtsammelkomplexe. So war bei der Inkubation von LHCII-belegten TiO₂-Elektroden in glycerinischer Elektrolytlösung über einen Zeitraum von 30 min keine Veränderung des Energietransfers von Chl *b* auf Chl *a* zu beobachten (siehe 3.2.12.1). Bei Messungen des Energietransfers von LHCII auf einen externen Akzeptorfarbstoff, während der Inkubation in glycerinischer Elektrolytlösung, kam es zwar zu einer leichten, kontinuierlichen Abnahme des Energietransfers (siehe 3.2.12.2). Ursache hierfür war jedoch möglicherweise eine langsame Dissoziation der Farbstoffmoleküle von der Halbleiteroberfläche, wie sie schon bei der Inkubation von Farbstoffelektroden in Glycerinhaltigen Puffern beobachtet worden war (siehe 3.2.9.3).

Neben Saccharose und Glycerin wurde auch das amphiphile Peptid A₆K im Hinblick auf eine mögliche Stabilisierung der Lichtsammelkomplexe auf der Halbleiteroberfläche untersucht. Ausgangspunkt hierfür war eine Arbeit zur Integration von bakteriellen und pflanzlichen Photosystemen in elektrochemische Solarzellen, in der der stabilisierende Einfluss amphiphiler Peptide auf immobilisierte Photosystem I-Moleküle beschrieben wurde (Das *et al.*, 2004). Zur Stabilisierung der Photosysteme setzten Das *et al.* ein 1:1-Gemisch aus dem, auch in dieser verwendeten kationischen, Peptid A₆K und dem anionischen Peptid V₆D, einer Sequenz aus 6 Valinen und einem C-terminalen Aspartat, ein. Wie Lichtstreuungsmessungen an den Peptiden gezeigt hatten, sind A₆K und V₆D aufgrund ihres amphiphilen,

4. Diskussion

lipidähnlichen Charakters in der Lage, in wässriger Lösung vesikuläre und tubuläre Strukturen auszubilden (Vauthey *et al.*, 2002; von Maltzahn *et al.*, 2003). Ob auch die Stabilisierung des immobilisierten Photosystem I auf der Ausbildung Vesikel-ähnlicher Strukturen beruhte wurde in der Arbeit von Das *et al.* (2004) jedoch nicht näher beschrieben. Ursprünglich sollte auch in der vorliegenden Arbeit ein Gemisch der Peptide A₆K und V₆D zur Stabilisierung von LHCII auf der Halbleiteroberfläche eingesetzt werden. Aufgrund von Problemen bei der Synthese und Aufreinigung der Peptide stand jedoch nur das kationische Peptid A₆K für Versuche zur Verfügung. In den hier durchgeführten Experimenten wurde A₆K zwar in geringerer Gesamtkonzentration, jedoch im gleichen Peptid/Protein-Verhältnis, von 0,1 mmol A₆K pro Gramm LHCII, wie in den Experimenten von Das *et al.*, eingesetzt. Die A₆K-Konzentration war mit 1,75 mM hoch genug, um eine Ausbildung von vesikulären Strukturen zu erlauben (von Maltzahn, 2003).

Als Folge der A₆K-Zugabe konnte eine leichte Erhöhung der Affinität von LHCII zur TiO₂-Oberfläche beobachtet werden (siehe 3.2.6.1.3, 4.2.5.4), eine Veränderung der Komplexstabilität war jedoch nicht zu erkennen. Da nicht bekannt ist, welche Mechanismen der von Das *et al.* (2004) beschriebenen Stabilisierung von Photosystem I durch die Peptide A₆K und V₆D zugrunde liegt, können hier nur Vermutungen angestellt werden, warum die konformative Stabilität des LHCII nicht durch A₆K beeinflusst wurde.

So wäre denkbar, dass nur die Kombination des kationischen Peptids mit dem anionischen V₆D die Ausbildung von Strukturen ermöglicht, die zu einer Stabilisierung von Membranproteinen führen. Die Tatsache, dass die gleiche Veränderung der LHCII-Adsorption an TiO₂ beobachtet wurde, wenn A₆K in einem separaten Inkubationsschritt vor den Komplexen auf den Halbleiter aufgetragen wurde und wenn die Peptide direkt zur LHCII-Auftragslösung gegeben wurden, deutet jedoch darauf hin, dass A₆K stabil an TiO₂ adsorbierte (siehe 3.2.6.1.3). Geht man von einer stabilen Immobilisierung des Peptides auf der Elektrodenoberfläche aus, so wird ersichtlich, dass die Interaktionsmöglichkeiten zwischen A₆K und dem koadsorbierten LHCII, auch aufgrund der geringen Größe des Peptides, stark eingeschränkt sind.

Aufschluss darüber, ob A₆K prinzipiell Wechselwirkungen mit LHCII eingehen kann, die zu einer Stabilisierung der Komplexe führen, könnten Stabilitätsmessungen an LHCII in An- und Abwesenheit von A₆K in Lösung geben. Da die Synthese durch die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) jedoch nur geringe Mengen an Peptidmaterial ergab, konnten diese Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

4.2.6.2 Photostabilität

Ein erhebliches Problem bei der Integration von Biomolekülen in elektrochemische Solarzellen oder Sensoren auf Titandioxidbasis stellt die hohe photokatalytische Aktivität des Halbleitermaterials dar. Absorbiert der Halbleiter UV-Licht, dessen Energie größer ist, als die Bandlücke von 3,2 eV, so kommt es zur Ausbildung eines Elektron-Loch-Paares. Das in Folge der Absorption angeregte Elektron wirkt reduzierend, während das Loch eine stark oxidierende Kraft ausübt, die zum oxidativen Abbau von organischen Molekülen führen kann (Lele und Russell, 2004). Zudem bildet angeregtes TiO₂ aus adsorbiertem Wasser und Sauerstoff Hydroxylradikale und Peroxide, die ebenfalls mit organischen Molekülen reagieren können (Shibata *et al.*, 1998; Horikoshi *et al.*, 2003).

4. Diskussion

Bei der Bestrahlung von LHCII-belegten Titandioxidelektroden mit Starklicht wurde ein schnelles Ausbleichen der Komplex-gebundenen Chle beobachtet (siehe 3.2.7.1). Die Geschwindigkeit des Ausbleichens war dabei unabhängig davon, ob es sich um nativen oder rekombinanten bzw. monomeren oder trimeren LHCII handelte. In Versuchen zur Stabilität des LHCII hatte Fender (2001) eine deutliche Erhöhung der Photostabilität der Komplexe nach Einpolymerisieren in ein Acrylamidgel und anschließendem Trocknen beobachtet. Diese Ergebnisse konnten jedoch nicht auf den TiO_2 -immobilisierten LHCII übertragen werden. Hier zeigte sich kein Unterschied in der Starklichtresistenz zwischen Komplexen, die nur an TiO_2 adsorbiert wurden und Komplexen, die zusätzlich in eine 15 %ige Acrylamidmatrix eingebettet wurden. Ebenfalls ohne Wirkung blieb die Koadsorption von LHCII mit dem Antioxidans Ascorbat.

Das Fluten der Messzelle mit Stickstoff und die damit verbundene Verdrängung von Sauerstoff führten zwar zu einer leichten Verbesserung der Photostabilität. Die Sauerstoffmoleküle, die bereits am Halbleiter adsorbiert waren, konnten durch diese Prozedur jedoch nicht entfernt werden (vgl. 4.2.4.1).

Wie Titandioxid absorbiert auch Zinndioxid stark im UV-Bereich. Die Potentiale von Valenz- und Leitungsband sind bei SnO_2 gegenüber TiO_2 etwas zum Positiven hin verschoben. Die Leitungsbandelektronen sind daher etwas weniger reduzierend, die Löcher im Valenzband wirken dafür oxidierender als bei TiO_2 .

Die Photostabilitätsmessungen, die an TiO_2 - und SnO_2 -immobilisiertem LHCII durchgeführt wurden, ließen sich nur bedingt vergleichen, da die Belegungsdichte, und damit auch die Fluoreszenz der Komplexe, bei den verwendeten SnO_2 -Elektroden deutlich geringer war als bei den TiO_2 -Elektroden. Dennoch konnte auch bei SnO_2 -adsorbiertem LHCII ein schnelles Ausbleichen der Chle beobachtet werden.

Eine erhebliche Verbesserung der Photostabilität von LHCII in einer elektrochemischen Solarzelle auf Titandioxid- oder Zinndioxidbasis wäre daher nur zu erreichen, wenn der ultraviolette Anteil des Sonnenlichts noch vor dem Auftreffen des Lichts auf den Halbleiter herausgefiltert würde. Durch einen externen UV-Filter würde dieser Teil des Sonnenlichts jedoch vollständig der Umwandlung in elektrische Energie entzogen. Der Wirkungsgrad der potentiellen Solarzelle würde damit deutlich verringert.

Ein alternativer Ansatz, durch den sich, bei gleichzeitiger Stabilisierung der Proteine, möglicherweise noch ein Teil des UV-Lichts nutzen ließe, wurde durch Versuche von Lele und Russell (2004) eröffnet. Die Autoren verbesserten die Stabilität von TiO_2 -adsorbiertem Chymotrypsin durch kovalente Kopplung der UV-absorbierenden Verbindung Oligo[2-[3-(2*H*-benzotriazol-2-yl)-4-hydroxyphenyl]ethyl-Methacrylat] (Oligo(HBMA)). In Folge der Kopplung von Oligo(HBMA) waren auch nach fünf Stunden UV-Bestrahlung noch mehr als 50 % des Enzyms aktiv, während ohne den Lichtschutz schon nach drei Stunden keine Aktivität mehr erkennbar war.

Würde man LHCII mit UV-absorbierenden Molekülen koppeln, die in der Lage sind ihre Anregungsenergie auf die Chlorophylle des Komplexes zu übertragen, so würde das UV-Licht der Absorption durch Titandioxid entzogen, könnte aber dennoch der Energieumwandlung durch einen Akzeptorfarbstoff zugeführt werden.

4. Diskussion

4.2.7 Gemeinsame Immobilisierung von LHCII und Farbstoffen

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Möglichkeiten zur Immobilisierung von LHCII und Akzeptorfarbstoffen auf Halbleiterelektroden untersucht: das Einpolymerisieren von Protein und Farbstoff in das Halbleitermaterial, die Adsorption von kovalenten Konstrukten aus LHCII und Farbstoff sowie die Koadsorption von Antennenkomplex und Sensibilisator in separaten Bindungsschritten.

Unter den betrachteten Methoden erwies sich das Einbetten von LHCII (siehe 3.2.5) und Farbstoffen (siehe 3.2.8) in ein Halbleiter-Solgel als wenig geeignet zur Herstellung einer elektrochemischen Solarzelle. Da die Halbleiter nach der Einpolymerisation von organischen Molekülen nicht gesintert werden konnten, war die Stabilität und elektrische Leitfähigkeit (siehe 3.2.2.1.1, 3.2.2.2.1) der so hergestellten Elektroden, im Vergleich zu gesinterten Halbleiterelektroden, sehr gering. Hinzu kam, dass die Interaktion zwischen einpolymerisierten Farbstoffmolekülen und dem Halbleitermaterial relativ schwach war, sodass die Farbstoffe bei längerer Inkubation in Lösungsmittel vollständig aus der Halbleiterschicht dissoziierten (siehe 3.2.8).

Das Einbetten von LHCII in das Halbleitermaterial führte zu keiner erkennbaren Schädigung der Komplexe. Im Falle der LHCII-haltigen SnO₂-Elektroden war jedoch eine Beeinträchtigung der gleichmäßigen Polymerisation des Halbleiters zu sehen, die sich in einer ungleichen Verteilung der Lichtsammelkomplexe in der Halbleiterschicht niederschlug (siehe 3.2.5).

Die Adsorption eines kovalenten Konstruktes aus rekombinantem LHCII des Klons Lys6 und dem gekoppelten Farbstoff Cy5.5 an TiO₂ wurde bereits in einer früheren Arbeit von Wolf-Klein (2001) durchgeführt. Dabei war im Fluoreszenz-Emissionsspektrum der immobilisierten Komplexe nach Anregung bei 460 nm eine ausgeprägte Chl *b*-Fluoreszenz zu sehen, die auf eine Verminderung des komplexinternen Energietransfers und somit auf eine Destabilisierung der Komplexe bei der Adsorption an den Halbleiter hinwies.

Noch deutlicher fiel die Destabilisierung von LHCII durch den gekoppelten Farbstoff in einem Versuch zur Immobilisierung eines Lys6-Alexa Fluor-Konstruktes auf, der in dieser Arbeit durchgeführt wurde (siehe 3.2.11.1). Hier kam es bei der Adsorption der LHCII-Farbstoff-Konstrukte zur nahezu vollständigen Denaturierung der Komplexe, während nach der Immobilisierung der unmarkierten LHCII-Referenz nur eine leichte Verminderung des Energietransfers von Chl *b* auf Chl *a* zu sehen war.

Die Ursache für die Verringerung der Stabilität des LHCII konnte nicht geklärt werden. Wie Untersuchungen von Cammarata und Schmidt (1992) sowie Paulsen und Hobe (1992) gezeigt hatten, ist das Vorhandensein der N-terminalen Domäne für die Ausbildung von, nach spektroskopischen Gesichtspunkten, intakten LHCII-Monomeren nicht essenziell. Da der Farbstoff an ein singuläres Cystein an Position 9 in der N-terminalen Region des Proteins gekoppelt wurde, war demnach nicht von einer drastischen Beeinträchtigung der Komplexstruktur auszugehen. Aufgrund der Größe der Farbstoffmoleküle ist es jedoch auch möglich, dass der gekoppelte Farbstoff mit Bereichen des Komplexes in Wechselwirkung tritt, die nicht in der N-terminalen Domäne des Proteins liegen, oder dass es zu einer sterischen Beeinträchtigung der LHCII-Struktur durch den Farbstoff kommt, wenn die Komplexe über das, nahe der Kopplungsstelle gelegene, N-terminale Lys₆-Motiv auf der Halbleiteroberfläche immobilisiert werden.

4. Diskussion

Schonender als die Adsorption von LHCII-Farbstoff-konstrukten war für die Lichtsammler-komplexe war die Immobilisierung von Farbstoffen und LHCII in zwei Bindungsschritten (siehe 3.2.11.2). Hier war keine Beeinträchtigung des komplexinternen Energietransfers von Chl *b* auf Chl *a* erkennbar, wenn während der Adsorption des LHCII Saccharose oder Glycerin zur Stabilisierung der Komplexe eingesetzt wurden (vgl. 3.2.6.1.2). Außerdem erwiesen sich die immobilisierten LHCII als effektive Lichtantennen für die koadsorbierten Akzeptorfarbstoffe. Die Effizienz des Energietransfers von LHCII auf die Akzeptorfarbstoffe lag in den durchgeführten Experimenten zwischen 68 und über 99 % (siehe 3.2.11.2, 3.2.11.3). Die Koadsorption von LHCII und Farbstoffmolekülen an die Halbleiterelektrode erschien damit, unter den untersuchten Methoden, als vielversprechender Ansatz zur Integration der Moleküle in eine elektrochemische Solarzelle.

Das entscheidende Problem bei der Koadsorption von LHCII und Cyaninfarbstoffen, wie S0247 und S0524, an Titandioxid war, dass es anscheinend zu einer Konkurrenz der Partner um Bindungsstellen auf der Halbleiteroberfläche kam. So war eine Erhöhung der LHCII-Belegungsdichte auf der Elektrode im Allgemeinen mit einer Verringerung der Farbstoffbelegung verbunden. In der Folge konnte bei geringen LHCII-Belegungsdichten von unter $0,1 \text{ nmol/cm}^2$ zwar eine deutliche Elektroneninjektion durch den koadsorbierten Farbstoff gemessen werden, das LHCII/Farbstoff-Verhältnis war jedoch so niedrig, dass die Lichtantenne keinen erkennbaren Einfluss auf das Wirkungsspektrum des Sensibilisators hatte (siehe 3.2.13). Eine deutliche Beteiligung der Lichtantenne an der Excitation des Sensibilisators, die sich auch im Fluoreszenz-Excitationsspektrum des immobilisierten Farbstoffes niederschlug, war nach Erhöhung der LHCII-Belegung auf Werte von über $0,2 \text{ nmol/cm}^2$ zu sehen. Die Farbstoffkonzentration in der Halbleiterschicht sank dabei jedoch auf unter 10 nmol/cm^2 ab, und war damit zu niedrig, um eine sichtbare Elektroneninjektion in den Halbleiter zu erhalten.

Wie verschiedene Versuche zeigten, wurde die Belegungsdichte des Sensibilisatorfarbstoffes auf dem Halbleiter nicht nur durch die Gegenwart der Lichtsammlerkomplexe selbst, sondern auch durch andere Substanzen, wie Detergentien (siehe 3.2.9.5), Saccharose (siehe 3.2.9.2) oder Glycerin (siehe 3.2.9.3) beeinträchtigt, die in der Komplexauftragslösung enthalten waren.

Eine Optimierung der LHCII- und Farbstoffbelegung auf der Elektrodenoberfläche könnte durch eine kovalente Kopplung des Farbstoffes, oder auch beider Bindungspartner, an das Substrat erreicht werden. Versuche zur kovalenten Kopplung von Pigment-Protein-Komplexen an silanisiertes TiO_2 wurden 1984 von Cuendet und Grätzel durchgeführt. Dabei beobachteten die Autoren zwar, dass die kovalente Immobilisierung von Thylakoidfragmenten, in denen Photosystem I angereichert war, weniger effizient war, als elektrostatische Adsorption der Partikel, sie verwiesen jedoch auch auf Experimente zur Immobilisierung der Proteine Katalase, Hydrogenase und BSA, die den Autoren zufolge wesentlich erfolgreicher waren.

Bezogen auf den Farbstoff könnte, auch wenn die kovalente Immobilisierung zunächst zu einer geringeren Belegungsdichte führt als die nicht-kovalente Adsorption, die effektive Sensibilisatordichte in einer Zelle mit LHCII und Farbstoff erhöht werden, da auf diese Weise die Dissoziation großer Farbstoffmengen während der LHCII-Immobilisierung verhindert werden kann.

4. Diskussion

4.2.8 Energietransfer von LHCII auf Akzeptorfarbstoffe

In Folge der Koadsorption von Farbstoffen und LHCII an TiO_2 oder SnO_2 wurde in dieser Arbeit ein sehr effizienter Energietransfer von den Chlen der Komplexe auf die Akzeptorfarbstoffe erzielt (siehe 3.2.11.2, 3.2.11.3). Die aus der Löschung der Donorfluoreszenz berechneten Transfereffizienzen lagen in den meisten Fällen deutlich über 80 %, nach der Immobilisierung von LHCII mit S0247 auf TiO_2 sogar stets über 95 %.

In wieweit die hohen Energietransfereffizienzen dabei auf die hohen Farbstoff/LHCII-Verhältnisse von 38 – 360/1 zurückzuführen waren, ließ sich aus den durchgeführten Versuchen nicht erkennen. In Messungen mit LHCII und dem Farbstoff S0524 führte die Verminderung des molaren Farbstoffüberschusses um fast eine Größenordnung von 360/1 auf 38/1 zwar nicht zu einem Abfall, sondern zu einem leichten Anstieg des Energietransfers. Eine weitere Verminderung des Farbstoff/LHCII-Verhältnisses, wie sie für die Integration von LHCII, als effizienter Lichtantenne, in eine Solarzelle angestrebt wird, könnte jedoch durchaus zur Verminderung der Transfereffizienz führen.

Als ein Hinweis hierauf können die niedrigeren Energietransferwerte von 20 – 78 % angesehen werden, die nach der kovalenten Kopplung von Farbstoffen an rekombinanten LHCII im Verhältnis 1/1 beobachtet wurden (Wolf-Klein, 2001; Lion, 2001; Lauterbach, persönliche Mitteilung). Diese niedrigen, variablen Transfereffizienzen sind in sofern bemerkenswert, als die R_0 -Werte, die aus der Überlappung der LHCII-Fluoreszenz und der Absorption des jeweiligen Farbstoffes abgeschätzt wurden, stets deutlich größer waren, als der Abstand zwischen dem Akzeptor und den Chlen des LHCII.

Als mögliche Ursache für den geringen apparenten Energietransfer vom LHCII auf die Akzeptorfarbstoffe führte Wolf-Klein (2001) einen Rücktransfer der Energie vom Farbstoff auf die Chle des Lichtsammelkomplexes an. Ein solcher umgekehrter Energietransfer ist denkbar, da die Fluoreszenzemission der meisten IR-Farbstoffe in geringem Maße mit der langwelligen Absorption der Chle des LHCII überlappt. Gestützt wird diese These außerdem von Energietransfermessungen an Konstrukten aus rekombinantem LHCII und dem Farbstoff BTI. Die Energietransfereffizienz von LHCII auf diesen Farbstoff, der in wässriger Umgebung nur eine geringe Fluoreszenzquantenausbeute von 0,03 % aufweist, war mit bis zu 78 % deutlich höher als die Werte von 20 – 30 %, die mit anderen Farbstoffen gemessen wurden (Wolf-Klein, 2001; Wolf-Klein *et al.*, 2002).

Auf einen zu großen Abstand zwischen Donor und Akzeptor oder eine suboptimale Orientierung der Partner als Ursachen für den niedrigen Energietransfer deuten dagegen Ergebnisse aus Energietransfermessungen an Konstrukten aus LHCII und dem Farbstoff Alexa Fluor 680 hin. Hier wurde nach der Kopplung des Farbstoffes an den N-Terminus von LHCII eine Energietransfereffizienz von etwa 30 % gemessen (Lion, 2001), während die Markierung des Komplexes in der stromalen Schleifenregion zu Transfereffizienzen von 40 – 50 % führte (Lauterbach, persönliche Mitteilung).

4. Diskussion

Für die Antennenfunktion des LHCII in einer Solarzelle wäre ein umgekehrter Transfer der Anregungsenergie vom Akzeptorfarbstoff auf die Chle des LHCII nur dann von Bedeutung, wenn dieser Rücktransfer schneller von statten geht, als die Elektronenübertragung vom Farbstoff auf das Halbleitersubstrat.

Einer Limitierung des Energietransfers durch den Abstand zwischen LHCII und Farbstoff oder die Orientierung der Moleküle könnte man im Fall der Integration von kovalenten LHCII-Farbstoff-Konstrukten durch die Optimierung des Systems bezüglich des verwendeten Farbstoffes und der Bindungsstelle am Komplex entgegenwirken.

4.2.9 Integrierbarkeit von LHCII in eine elektrochemische Solarzelle

Bei der Betrachtung der einzelnen Faktoren, die bei der Integration von LHCII in eine Grätzel-Zelle eine Rolle spielen, stellt sich abschließend die Frage, ob Lichtsammler-komplexe grundsätzlich für den Einsatz in elektrochemischen Solarzellen geeignet sind.

Für die Möglichkeit einer Verwendung der Komplexe als Antenne in einer Solarzelle spricht, dass LHCII mit hoher Belegungsichte (siehe 3.2.6.1.1) und ohne Beeinträchtigung des Komplex-internen Energietransfers (Wolf-Klein, 2001; 3.2.6.1.1) an TiO_2 und SnO_2 adsorbiert werden konnte. Eine Erhöhung der strukturellen Stabilität der immobilisierten Komplexe wurde durch das Einbetten in eine feste Acrylamidmatrix erreicht (Lion, 2001). Des Weiteren wurden nach der Koadsorption von LHCII mit Akzeptorfarbstoffen hohe Energietransfereffizienzen von über 90 % gemessen (siehe 3.2.11.2). Aufgrund der Antennenfunktion des LHCII konnte die Excitation der Akzeptorfarbstoffe im kurzwelligen Bereich des sichtbaren Lichtspektrums deutlich erhöht werden (siehe 3.2.13).

Als problematisch erwies sich die Immobilisierung von LHCII und Akzeptorfarbstoffen über elektrostatische Wechselwirkungen, wenn versucht wurde, die LHCII-Belegungsichte auf den Halbleiterelektroden zu optimieren. Die Adsorption von größeren LHCII-Mengen war hier stets mit einer starken Dissoziation der Farbstoffmoleküle von der Halbleiteroberfläche verbunden, die möglicherweise durch eine Konkurrenz der Sensibilatoren mit Lichtsammlerkomplexen und Pufferkomponenten um die Elektrodenoberfläche hervorgerufen wurde (siehe 3.2.11.2). Als Alternative zur elektrostatischen Adsorption von LHCII und Farbstoffen sollte daher eine kovalente Immobilisierung in Betracht gezogen werden (siehe 4.2.7).

Weitere Probleme bei der Integration von LHCII in eine Grätzel-Zelle resultierten aus der Verwendung von TiO_2 oder SnO_2 als Substrat für die Immobilisierung der Lichtsammler-komplexe. So stellte sich bei Versuchen, in denen die maximale Belegungsichte der Komplexe auf den Elektroden bestimmt wurde, heraus, dass nicht die gesamte Halbleiterschicht für die Adsorption von LHCII zugänglich war (siehe 4.2.5.1). Eine Verbesserung der Zugänglichkeit der Elektroden für die Lichtsammlerkomplexe ließe sich hier möglicherweise durch eine Erhöhung der Partikelgröße des Halbleitermaterials erreichen. Die Verwendung sehr großer Kolloide kann dabei jedoch zu einer Verminderung des elektrischen Kontaktes zwischen Halbleiter und ITO-Substrat führen (siehe 3.2.2.2.3).

4. Diskussion

Eine schwerwiegende Einschränkung für den längerfristigen Einsatz von LHCII in einer Solarzelle ergab sich aus der geringen Photostabilität der Komplexe nach der Immobilisierung auf TiO_2 und SnO_2 (siehe 3.2.7.1). Die Ursache für das schnelle Ausbleichen der Komplexe lag vermutlich in einer Schädigung der Chl_a des LHCII durch Hydroxylradikale und Peroxide, die, nach Absorption von UV-Licht durch den Halbleiter, aus adsorbierten Wassermolekülen gebildet wurden (siehe 4.2.6.2). Da Wasser und Sauerstoff aus einer LHCII-Zelle mit TiO_2 oder SnO_2 als Elektrodenmaterialien nicht vollständig entfernt werden können (vgl. 4.2.4.1), ließe sich ein andauernder Schutz des LHCII hier nur durch eine räumliche Trennung der Komplexe von dem Halbleiter oder den Wechsel zu weniger reaktiven Halbleitermaterialien erreichen.

Ein Solarzellmodell, das eine räumliche Trennung der Sensibilatoren und Lichtsammelkomplexe von der TiO_2 -Elektrode ermöglichen würde, wurde 2003 von McFarland und Tang vorgestellt. Das von den Autoren entwickelte System besteht aus einer TiO_2 -Elektrode, die mit einer dünnen Goldschicht bedampft ist, auf der wiederum die Sensibilisatorfarbstoffmoleküle immobilisiert werden. Absorbieren diese Farbstoffe das Sonnenlicht, so geben sie je ein Elektron ab, das aufgrund seiner hohen Energie auf ballistische Weise die Goldschicht überwindet und in das Leitungsband des Titandioxids injiziert wird. Die Regeneration der Farbstoffe erfolgt im Anschluss durch Elektronen aus der Goldbeschichtung der Zelle. Im Gegensatz zur klassischen Grätzel-Zelle enthält dieses Modell keinen Elektrolyten, der bei einer Integration von LHCII die Komplexe schädigen könnte. Allerdings sind die Wirkungsgrade, die von den ersten Zellen dieses Typs erreicht wurden, noch so niedrig, dass eine Anpassung des Systems im Hinblick auf die Integration von LHCII zurzeit nicht in Frage kommt.

Als vielversprechender könnte sich dagegen die Verknüpfung des von Das *et al.* (2004) entwickelten Modells einer Photosystem I-Solarzelle mit rekombinanten Lichtsammelkomplexen erweisen (vgl. 1.1.3). Die Autoren erreichten eine effiziente Ladungstrennung, indem sie die pflanzlichen Photosysteme mit organischen Halbleitermaterialien kombinierten. Die initiale Ladungstrennung fand dabei in den Photosystemen statt, die über einen His₆-Tag auf einer Goldoberfläche immobilisiert waren. Im Anschluss an die komplexinterne Ladungstrennung wurden die Elektronen von den Photosystemen auf das Goldsubstrat übertragen. Die Regeneration der Reaktionszentren erfolgte durch Elektronen aus einem organischen Halbleiter, der die Komplexe umgab. Ein Problem für den längerfristigen Betrieb dieser Zelle stellte dabei die geringe strukturelle Stabilität der integrierten Photosysteme dar, deren Kernkomplexe aus über 10 nicht kovalent verbundenen Untereinheiten bestehen.

An dieser Stelle könnten die einfacher aufgebauten Farbstoff-markierten Lichtsammelkomplexe eine interessante Alternative zu den komplexen Photosystemen darstellen. Neben einer möglicherweise höheren Stabilität, böten die rekombinanten LHCII die Möglichkeit zur Modifizierung der Aminosäuresequenz der Komplexe auf DNA-Ebene. Damit würde sich eine Vielzahl von Möglichkeiten bezüglich der orientierten Immobilisierung der Komplexe auf der Goldoberfläche, sowie der ortsspezifischen Kopplung von Sensibilatoren ergeben.

5. Zusammenfassung

Die zentrale Funktion des Hauptlichtsammelkomplexes des Photosystems II, LHCII, besteht in der Absorption von Sonnenlicht und der Bereitstellung von Energie für die photosynthetische Ladungstrennung im Reaktionszentrum des Photosystems. Auch in der Regulation der Photosynthese spielt der LHCII eine wichtige Rolle, da die Energieverteilung zwischen Photosystem I und Photosystem II im Rahmen des sog. „State Transition“-Prozesses über die Verteilung der Lichtsammelkomplexe zwischen den beiden Photosystemen gesteuert wird.

Im Blickfeld des ersten Teils dieser Arbeit stand die konformative Dynamik der N-terminalen Domäne des LHCII, die wahrscheinlich in die Regulation der Lichtsammlung involviert ist. Gemeinsam mit Mitarbeitern des 3. Physikalischen Instituts der Universität Stuttgart sollte eine Methode zur einzelmolekülspektroskopischen Untersuchung der Dynamik des N-Terminus etabliert werden. Als Messgröße sollte der Energietransfer zwischen einem Fluoreszenzfarbstoff, der an die N-terminale Domäne gekoppelt war, und den Chlorophyllen des Komplexes dienen. Tetramethylrhodamin erwies sich als geeignet für die Messungen, da dieser Farbstoff in der Grünlücke der Chlorophylle des LHCII angeregt werden konnte, eine hohe Fluoreszenz-Quantenausbeute von 0,28 aufwies und seine Anregungsenergie auf den Komplex übertragen konnte.

Um eine Beeinflussung der LHCII-Konformation durch benachbarte Komplexe oder eine Oberfläche, so weit wie möglich, auszuschließen, wurde zunächst versucht, die Fluoreszenz der markierten Komplexe in Lösung zu messen. Unterschiedliche Konformationen sollten hierbei über die jeweiligen Anteile der Farbstoff- und der Chlorophyllfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz der Komplexe detektiert werden. Bezogen auf die vermessene LHCII-Population, sollte die Verteilung der Fluoreszenzen Aussagen über das Vorkommen der unterschiedlichen Konformationen innerhalb der Population ermöglichen.

Als problematisch bei der Vermessung einzelner LHCII in Lösung erwiesen sich die Hintergrundfluoreszenz der eingesetzten Pufferlösungen sowie die hohe Diffusionsgeschwindigkeit der Lichtsammelkomplexe. Eine Verringerung der Fluoreszenz der Pufferlösungen wurde hier durch die Aufreinigung des Puffers über Aktivkohle sowie die Solubilisierung der Komplexe in hochreinem Laurylmaltosid erreicht. Im Hinblick auf die hohe Diffusionsgeschwindigkeit der Komplexe wurde die Integration einzelner LHCII in Liposomen, sowie eine orientierte Immobilisierung der Komplexe auf einer funktionalisierten Oberfläche als Alternativen zur Vermessung der Detergens-solubilisierten Komplexe in Lösung in Betracht gezogen. Für die orientierte Immobilisierung von LHCII-Monomeren wurde eine LHCII-Mutante hergestellt, die zwei Cysteine auf der luminalen Seite des Komplexes, an den Positionen 106 und 229 der Aminosäuresequenz, enthielt. Die Versuche zur Insertion des LHCII in Liposomen und zur Immobilisierung auf einer Oberfläche wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Die Funktion des LHCII als effiziente Lichtantenne bildete die Grundlage für den zweiten Teil dieser Arbeit. Hier wurde untersucht, ob LHCII als Lichtsammler in eine elektrochemische Solarzelle integriert werden kann. In der potentiellen Solarzelle sollte die Anregungsenergie der LHCII auf Akzeptorfarbstoffe übertragen werden, die in der Folge Elektronen in das Leitungsband einer aus Titandioxid oder Zinndioxid bestehenden porösen Halbleiterelektrode injizierten, auf der Komplexe und Farbstoffe immobilisiert waren.

Wie sich in Studien zur Immobilisierung der Komplexe herausstellte, konnten LHCII-Trimere mit einer Belegungsichte von $0,9 \text{ nmol/cm}^2$ an Titandioxid und $0,07 \text{ nmol/cm}^2$ an Zinndioxid adsorbiert werden. Eine Erhöhung der Affinität der Komplexe zu den Halbleitern wurde festgestellt, wenn anstelle von nativem LHCII, Mutanten verwendet wurden, die zusätzliche basische Motive, wie eine Sequenz aus sechs Lysinen oder Histidinen, enthielten. Im Falle des nativen LHCII war in Gegenwart eines positiv geladenen Peptids aus sechs Alaninen und einem C-terminalen Lysin eine Verbesserung der Adsorption zu beobachten. Die Erhöhung der Affinität des LHCII zu den Halbleitern führte jedoch nicht zu einem Anstieg der maximalen Belegungsichte der Komplexe auf den Elektroden, da hier die Porengröße des Halbleitermaterials den limitierenden Faktor darstellte.

Unter den in Frage kommenden Akzeptoren für die LHCII-Anregungsenergie eigneten sich die Cyaninfarbstoffe S0247 und S0524 (FEW-Chemicals) am besten für eine Koadsorption mit den Lichtsammlerkomplexen. Nach der Immobilisierung der Farbstoffe zusammen mit LHCII an Titandioxid war ein effektiver Energietransfer von den Chlorophyllen der Komplexe auf die Akzeptoren zu beobachten. Die apparenten Transfereffizienzen lagen zwischen 87 und über 99 %. Außerdem waren die Farbstoffe in der Lage, Elektronen auf TiO_2 zu übertragen. Bei der Immobilisierung größerer LHCII-Mengen mit den Farbstoffen kam es jedoch zu einer verstärkten Dissoziation der Farbstoffmoleküle von der Halbleiteroberfläche, sodass die Beteiligung des LHCII an der Farbstoff-Excitation nicht elektrochemisch nachgewiesen werden konnte.

Als kritisch für den Einsatz von LHCII in einer Solarzelle auf Titandioxid- oder Zinndioxid-Basis erwies sich die geringe Photostabilität der Komplexe nach Immobilisierung an die Halbleiteroberflächen. Die Bestrahlung von TiO_2 -immobilisiertem LHCII mit Starklicht einer Intensität von $3000 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ führte innerhalb von 30 Minuten zum vollständigen Ausbleichen der Chlorophylle. Eine erfolgreiche Integration von LHCII in eine elektrochemische Solarzelle wäre daher nur möglich, wenn eine räumliche Trennung der Komplexe von den Halbleitern erfolgte, oder TiO_2 bzw. SnO_2 durch weniger photokatalytisch aktive Halbleiter ersetzt würden.

6. Literaturverzeichnis

Allen, J. F., Forsberg J. (2001). Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends in Plant Science* 6 (7), 317 – 326

Allen, J. F. (1992). Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1098, 275 – 335

Astuti Y., Topoglidis E., Briscoe P. B., Fantuzzi A., Gilardi G., Durrant J. R. (2004). Proton-Coupled Electron Transfer of Flavodoxin Immobilized on Nanostructured Tin Dioxide Elektrodes: Thermodynamics versus Kinetics Control of Protein Redox Functions. *Journal of the American Chemical Society* 126, 8001 – 8009

Bach U., Lupo D., Comte P., Moser J. E., Weissortel F., Salbeck J., Spreitzer H., Grätzel M. (1998). Solid-state dye-sensitized mesoporous TiO₂ solar cells with high photon-to-electron conversion efficiencies. *Nature* 395, 583 – 585

Bender A. (2004). Konformationsanalyse und Lipidbindung am rekombinanten Lichtsammelprotein LHCIIB höherer Pflanzen. *Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Mainz*

Benters R., Niemeyer C. M., Wöhrle D. (2001). Dendrimer-Activated Solid Supports for Nucleic Acid and Protein Microarrays. *ChemBioChem* 2, 686 – 694

Berens R. (2005). Optimierung der Adsorption von Lichtsammelkomplexen (LHCII) an TiO₂-Oberflächen. *Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Mainz*

Boekema E. J., van Roon H., van Breemen J. F. L., Dekker J. P. (1999). Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Eur. J. Biochem* 266, 444 – 452

Burfeindt B., Hannappel T., Storck W., Willig F. (1996). Measurement of Temperature-Independent Femtosecond Electron Transfer from an Anchored Molecular Electron Donor to a Semiconductor as Acceptor. *Journal of Physical Chemistry B* 100, 16463 – 16465

Butler P. J. G., Kühlbrandt W. (1988). Determination of the aggregate size in detergent solution of the light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex from chloroplast membranes. *PNAS* 85, 3797 – 3801

Cammarata K. V., Schmidt G. W. (1992). In vitro reconstitution of a light-harvesting gene product: deletion mutagenesis and analysis of pigment binding. *Biochemistry* 31, 2779 – 2789

Cervini R., Cheng Y., Simon G. (2004). Solid-state Ru-dye solar cells using polypyrrole as a hole conductor. *Journal of Physics D* 37, 13 – 20

6. Literaturverzeichnis

Chen L.-C., Hsu Y.-C., Ho K.-C. (2001). A Solid-State TiO₂/InHCF Solar Cell with an Output Voltage above 1.0 Volt. *2001 Joint International Meeting - the 200th Meeting of The Electrochemical Society, Inc. and the 52nd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry - San Francisco, California*

Cuendet P., Grätzel M. (1984). Immobilisation of photosystem I and II on semiconductor particles. *Advances in Photosynthesis Research, Proceedings of the VI International Congress on Photosynthesis, 813 – 816*

Das R., Kiley P. J., Segal M., Norville J., Yu A. A., Wang L., Trammell S. A., Reddick L. E., Kumar R., Stellacci F., Lebedev N., Schnur J., Bruce B. D., Zhang S., Baldo M. (2004). Integration of Photosynthetic Protein Molecular Complexes in Solid-State Electronic Devices. *Nano Letters 4 (6), 1079 – 1083*

Deng H., Lu Z., Mao H., Xu H. (1997). The liquid junction cell based on the nanostructured TiO₂ electrode sensitized with zinc tetrasulfonated phthalocyanine. *Chemical Physics 221, 323 – 331*

Dilly-Hartwig H., Allen J. F., Paulsen H., Race H. L. (1998). Truncated recombinant light harvesting complex II proteins are substrates for a protein kinase associated with photosystem II core complexes. *FEBS Letters 435, 101 – 104*

Erker W., Schoen A., Basché T., Decker H. (2004). Fluorescence labels as sensors for oxygen binding of arthropod hemocyanins. *Biochemical and Biophysical Research Communications 324, 893 – 900*

Fender A. (2001). Stabilisierung der Chlorophyll a/b bindenden Lichtsammelantenne LHCII. *Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Mainz*

Förster T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik 2, 55-75*

Gerken U., Wolf-Klein H., Huschenbett C., Götze B., Schuler S., Jelezko F., Tietz C., Wrachtrup J., Paulsen H. (2002). Single Molecule Spectroscopy of Oriented Recombinant Trimeric Light Harvesting Complexes of Higher Plants. *Single Molecules 4, 183 – 188*

Gradinaru C. C., Özdemir S., van Stokkum I. H. M., van Grondelle R., van Amerongen H. (1998). The flow of excitation energy in LHCII monomers: implications for the structural model of the major plant antenna. *Biophysical Journal 75, 3064 – 3077*

Grätzel M. (1999). The artificial leaf, bio-mimetic photocatalysis. *Cattech 3, 3 – 17*

Grätzel M. (2001). Photoelectrochemical cells. *Nature 414, 338 – 344*

Grober U. (2004). Solange die Sonne scheint. *Die Zeit 23, 98*

6. Literaturverzeichnis

- Hagen J., Schaffrath W., Otschik P., Fink R., Bacher A., Schmidt H.-W., Haarer D. (1997).** Novel hybrid solar cells consisting of inorganic nanoparticles and an organic hole transport material. *Synthetic Materials* 89, 215 – 220
- Hagfeldt A., Grätzel M. (2000).** Molecular Photovoltaics. *Accounts of Chemical Research* 33, 269 – 277
- Haque S. A., Palomares E., Upadhyaya H. M., Otley L., Potter R. J., Holmes A. B., Durrant J. R. (2003).** Flexible dye sensitized nanocrystalline semiconductor solar cells. *Chemical Communications*, 3008 – 3009
- Hardman P. J., Casanova R., Prabhakaran K., Muryn C. A., Wincott P. L., Thornton G. (1992).** Electronic structure effects of potassium adsorbed on TiO₂(100). *Surface Science* 269-270, 677 – 681
- Henderson M. A., (1996).** An HREELS and TPD study of water on TiO₂ (110): the extend of molecular versus dissociative adsorption. *Surface Science* 155, 151 – 166
- Hobe S., Prytulla S., Kühlbrandt W., Paulsen H. (1994).** Trimerization and crystallization of reconstituted light-harvesting chlorophyll a/b complex. *The EMBO Journal* 13, 3423 - 3429
- Hobe S., Förster R., Klinger J., Paulsen H. (1995).** N-proximal sequence motif in light harvesting chlorophyll a/b-binding protein is essential for the trimerization of light-harvesting Chlorophyll a/b Complex. *Biochemistry* 34, 10224 – 10228
- Hobe S., Fey H., Rogl H., Paulsen H. (2003).** Determination of Relative Chlorophyll Binding Affinities in th Major Light-harvesting Chlorophyll a/b Complex. *J Biol Chem* 278, 5912 – 5919
- Horikoshi S., Hidaka H., Serpone N. (2003).** Hydroxyl radicals in microwave photocatalysis. Enhanced formation of OH radicals probed by ESR techniques in microwave-assisted photocatalysis in aqueous TiO₂ dispersions. *Chemical Physics Letters* 376, 475 – 480
- Horn R., Paulsen H. (2004).** Early Steps in the Assembly of Light-harvesting Chlorophyll a/b Complex, Time-Resolved Fluorescence Measurements. *The Journal Of Biological Chemistry* 279 (43), 44400 – 44406
- Hugenschmidt M. B., Gamble L., Campbell C. T. (1994).** The interaction of H₂O with a TiO₂(110) surface. *Surface Science* 302 (3), 329 – 340
- Huschenbett C. (2001).** Zugänglichkeit einzelner Domänen des Lichtsammelkomplexes LHCII: ein Vergleich zwischen Monomeren und Trimeren. *Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Mainz*
- Jackowski G., Kacprzak K., Jansson S. (2001).** Identification of Lhcb1/Lhcb2/Lhcb3 heterotrimers of the main light-harvesting chlorophyll a/b-protein complex of photosystem II (LHCII). *Biochimica et Biophysica Acta* 1504, 340 – 345

6. Literaturverzeichnis

Jansson S. (1994). The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1184, 1 – 19

Jeschke G., Bender A., Schweikardt T., Panek G., Decker H., Paulsen H. (2005) Localization Of The N-Terminal Domain In Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein (LHCIIb) By Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Measurements. *The Journal of Biological Chemistry in Press*

JieQuan Z., BaoHong L., JiLie K. (2002). Photosensitization of nanocrystalline TiO₂ by photosynthetic protein. *201st Meeting of The Electrochemical Society, Philadelphia, Pensilvania, abstract*

Kaneko M., Mochizuki N., Suzuki K., Shiroishi H., Jshikawa K. (2002). Molecular Reactor for Solution Chemistry. *Chemistry Letters* 5, 530 – 531

Kaneko M., Hoshi T. (2003). Dye-sensitized Solar Cell with Polysaccharide Solid Electrolyte. *Chemistry Letters* 32 (9), 872 – 873

Kavan L., O'Regan B., Kay A., Grätzel M. (1993). Preparation of TiO₂ (anatase) films on electrodes by anodic oxidative hydrolysis of TiCl₃. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 346, 291 - 307

Kay A., Grätzel M. (1993). Artificial Photosynthesis. 1. Photosensitization of TiO₂ Solar Cells with Chlorophyll Derivatives and Related Natural Porphyrins. *Journal of Physical Chemistry* 97, 6272 – 6277

Kay A., Humphrey-Baker R., Grätzel M. (1994). Artificial Photosynthesis. 2. Investigations on the Mechanism of Photosensitization of Nanocrystalline TiO₂ Solar Cells by Chlorophyll Derivatives. *J. Phys. Chem* 98, 952 – 959

Kleima F. J., Gradinaru C. C., Calkoen F., van Stokkum I. H. M., van Grondelle R., van Amerongen H. (1997). Energy transfer in LHCII monomers at 77K studied by sub-picosecond transient absorption spectroscopy. *Biochemistry* 36, 15262 – 15268

Kosemund K. (1999). Die Biogenese von Chlorophyll-a/b-bindenden Lichtsammler-komplexen: Topographie des Apoproteins bei der Thylakoidinsertion. *Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Mainz*

Kruse O. (2001). Light-induced short-term adaption mechanisms under redox control in the PS II-LHCII supercomplex: LHCII state transition and PS II repair cycle. *Naturwissenschaften* 88, 284 – 292

Kubo W., Kambe S., Nakade S., Kitamura T., Hanabusa K., Wada Y., Yanagida S. (2003). Photocurrent-Determining Process in Quasi-Solid-State Dye-sensitized Solar Cells Using Ionic Gel Electrolytes. *Journal of Physical Chemistry B* 107, 4374 – 4381

6. Literaturverzeichnis

- Kühlbrandt W., Wang D. N., Fujiyoshi Y. (1994).** Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367, 614 – 621
- Laemmli U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 – 685
- Latt S. A., Cheung H. T., Bout E. R. (1965).** Energy transfer. A system with relatively fixed donor-acceptor separation. *Journal of the American Chemical Society* 87, 995 – 1003
- Lee S. K., Zu Y., Herrmann A., Geerts Y., Müllen K., Bard A. J. (1999).** Electrochemistry, Spectroscopy and Electrogenenerated Chemiluminescence of Perylene, Terrylene, and Quaterylene Diimides in Aprotic Solution. *J Am Chem Soc* 121, 3513 – 3520
- Lele B. S., Russell A. J. (2004).** Rational Protein Modification Leading to Resistance of Enzymes to TiO₂-UV Irradiation-Induced Inactivation. *Biomacromolecules* 5, 1947 – 1955
- Lele B. S., Russell A. J. (2005).** Enhancing Enzyme Stability Against TiO₂-UV Induced Inactivation. *Biomacromolecules* 6, 475 – 482
- Linkous C. A., Slatterly D. K. (2000)** Solar Photocatalytical Hydrogen Production From Water Using A Dual Bed Photosystem. *Proceedings of the 2000 Hydrogen Program Review*
- Lion M. (2001).** Fluoreszenzfarbstoff-markierter Chlorophyll-a/b-Lichtsammlerkomplex: Energietransfer und Elektroneninjektion in einen Halbleiter. *Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Mainz*
- Liu Z., Yan H., Wang K., Kuang T., Zhang J., Gul L., An X., Chang W. (2004).** Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* 428, 287 – 292
- Luther J. (2003).** Photovoltaik – Neue Horizonte. http://www.fv-sonnenenergie.de/fileadmin/fvsonne/publikationen/th03/photovoltaic-neue_horizonte.pdf
- MacBeath G., Koehler A. N., Schreiber S. L. (1999).** Printing Small Molecules as Microarrays and Detecting Protein-Ligand Interactions en Masse. *Journal of the American Chemical Society* 121, 1967 – 1968
- Matsumoto M., Wada Y., Kitamura T., Shigaki K., Inoue T., Ikeda M., Yanagida S. (2001).** Fabrication of Solid-State Dye-Sensitized TiO₂ Solar Cell Using Polymer Electrolyte. *Bull Chem Soc Jpn* 74, 387 – 393
- McFarland E. W., Tang J. (2003).** A photovoltaic device structure based on internal electron emission. *Nature* 421, 616 – 618
- Möller M., Denicola A. (2002).** Protein Tryptophan Accessibility Studied by Fluorescence Quenching. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 30 (3), 175 – 178

6. Literaturverzeichnis

- Moulton S. E., Barisci J. N., McQuillan A. J., Wallace G. G. (2003).** ATR-IR spectroscopic studies of the influence of phosphate buffer on adsorption of immunoglobulin G to TiO₂. *Colloids and Surfaces A* 220 (1-3), 159 – 167
- Nakade S., Matsuda M., Kambe S., Saito Y., Kitamura T., Sakata T., Wada Y., Mori H., Yanagida S. (2002).** Dependence of TiO₂ Nanoparticle Preparation Methods and Annealing Temperature on the Efficiency of Dye-Sensitized Solar Cells. *Journal of Physical Chemistry B* 106, 10004 – 10010
- Nazeeruddin M. K., Kay A., Rodicio I., Humphry-Baker R., Müller E., Liska P., Vlachopoulos N., Grätzel M. (1993).** Conversion of Light to Electricity by cis-X₂Bis(2,2'-bipyridyl-4,4'-dicarboxylate)ruthenium(II) Charge-Transfer Sensitizers (X = Cl⁻, Br⁻, I⁻, CN⁻ and SCN⁻) on Nanocrystalline TiO₂ Electrodes. *Journal of the American Chemical Society* 115, 6382 – 6390
- Nazeeruddin M. K., Péchy P., Thierry R., Zakeeruddin S. M., Humphry-Baker R., Comte P., Liska P., Cevey L., Costa E., Shklover V., Spiccia L., Deacon G. B., Bignozzi C. A., Grätzel M. (2001).** Engineering of Efficient Panchromatic Sensitizers for Nanocrystalline TiO₂-Based Solar Cells. *Journal of the American Chemical Society* 123, 1613 – 1624
- Nußberger S., Dörr K., Wang D. N., Kühlbrandt W. (1993).** Lipid-protein interactions in crystals of plant light harvesting complex. *J Mol Biol* 234, 347 – 356
- O'Regan B., Grätzel M. (1991).** A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films. *Nature* 353, 737 – 740
- Ohad I., Vink M., Zer M., Herrmann R. G., Andersson B. (2001).** Novel Aspects on Regulation of Thylakoid Protein Phosphorylation. *Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 11: Regulation of Photosynthesis, (Ed.: Aro E. M., Andersson B.)* 419 – 427
- Paulsen H., Rümmler U., Rüdiger W. (1990).** Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll-a/b-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* 181, 204 – 211
- Paulsen H., Hobe S. (1992).** Pigment-binding properties of mutant light-harvesting chlorophyll-a/b-binding protein. *European Journal of Biochemistry* 205, 71 – 76
- Paulsen H., Finkenzeller B., Kühlein N. (1993).** Pigments induce folding of light-harvesting chlorophyll-a/b-binding protein. *European Journal of Biochemistry* 215, 809 – 816
- Pichersky E., Jansson S. (1996).** The light-harvesting chlorophyll a/b-binding polypeptides and their genes in angiosperm and gymnosperm species. *Oxygenic photosynthesis: the light reactions (Ed.: Ort D. R., Yocum C. F.)* 507 – 521

6. Literaturverzeichnis

- Porra R. J., Thompson W. A., Kriedemann P. E. (1989).** Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975, 384 – 394
- Remelli R., Varotto C., Sandona D., Croce R., Bassi R. (1999).** Chlorophyll Binding to Monomeric Light-harvesting Complex, A Mutation Analysis of Chromophore-Binding Residues. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (47), 33510 – 33521
- Rogl H., Kosemund K., Kühlbrandt W., Collinson I. (1998).** Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Letters* 432, 21 – 26
- Rogl H., Kühlbrandt W. (1999).** Mutant Trimers of Light-Harvesting Complex II Exhibit Altered Pigment Content and Spectroscopic Features. *Biochemistry* 38, 16214 – 16222
- Root D. D. (1997).** In situ molecular association of dystrophin with actin revealed by sensitized emission immuno-resonance energy transfer. *PNAS* 95, 5685 – 5690
- Rupprecht J. (1998).** Bindung von Chlorophyll-Derivaten und rekombinanten Lichtsammler-Komplexen als Lichtfänger an einen Halbleiter: Bau einer „grünen“ Solarzelle. *Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Mainz*
- Santato C., Ulmann M., Augustynski J. (2001).** Photoelectrochemical properties of nanostructured tungsten trioxide films. *Journal of Physical Chemistry B* 105, 936 – 940
- Schmidt K. (2003).** Pigmentbindung verschiedener Mitglieder der erweiterten Chlorophyll a/b-Proteinfamilie und des wasserlöslichen Chlorophyll-Proteins WSCP. *Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Mainz*
- Shell Deutschland (2001).** Wirkungsweise von Solarzellen. <http://www.shell.com/de/de/content/0,4645,27243-54536,00.html>
- Shibata H., Ogura Y., Sawa Y., Kono Y. (1998).** Hydroxyl Radical Generation Depending on O₂ or H₂O by a Photocatalyzed Reaction in an Aqueous Suspension of Titanium Dioxide. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 62 (12), 2306 – 2311
- Sirimanne P. M., Soga T. (2003).** Fabrication of a solid-state cell using vitamin C as sensitizer. *Solar Energy Materials & Solar Cells* 80, 383 – 389
- Skerra A., Schmidt T. G. M. (2000).** Use of the *Strep*-Tag and Streptavidin for Detection and Purification of Recombinant Proteins. *Methods In Enzymology* 326, 271 – 304
- Sommerling P. M., Späth M., van Roosmalen J. A. M., Meyer T. B., Meyer A. F., Kohle O. (1998).** Dye-Sensitized Nanocrystalline TiO₂ Solar Cells on Flexible Substrates. *ECN - Energy research Centre of the Netherlands, report*

6. Literaturverzeichnis

Stevenson C. L. (2000). Characterization of Protein and Peptide Stability and Solubility in Non-Aqueous Solvents. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 1, 165 – 182

Storf S. (2001). Ortsspezifische Markierung hydrophiler Bereiche des rekombinanten Chlorophyll-a/b-Lichtsammlerkomplexes (LHCII): Unterschiede in Monomer und Trimer. *Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Mainz*

Sun L., Hammarström L., Åkermark B., Styring S. (2001). Towards artificial photosynthesis: ruthenium-manganese chemistry for energy production. *Chemical Society Reviews* 30, 36 – 49

Tachibana Y., Haque S., Mercer I. P., Durrant J. R., Klug D. R. (2000). Electron Injection and Recombination in Dye Sensitized Nanocrystalline Titanium Dioxide Films: A Comparison of Ruthenium Pipyridyl and Porphyrin Sensitizer Dyes. *Journal of Physical Chemistry B* 104, 1198 – 1205

Tennakone K., Kumara G. R. R. A., Wijayantha K. G. U., Kottegoda I. R. M., Perer V. P. S., Aponso G. M. L. P. (1997). A nanoporous solid-state photovoltaic cell sensitized with copper chlorophyllin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A* 108, 175 – 177

Tian H., Liu P.-H., Zhu W., Gao E., Wu D.-J., Cai S. (2000). Synthesis of novel multi-chromophoric soluble perylene derivatives and their photosensitizing properties with wide spectral response for SnO₂ nanoporous electrode. *Journal of Materials Chemistry* 10, 2708 – 715

Tietz C., Jelezko F., Gerken U., Schuler S., Schubert A., Rogl H., Wrachtrup J. (2001). Single Molecule Spectroscopy on the Light-Harvesting Complex II of Higher Plants. *Biophysical Journal* 81, 556 – 562

Tietz C. (2000). Untersuchungen an einzelnen Pigmenten und Pigment-Protein-Komplexen. *Dissertation an der Fakultät Physik der Universität Stuttgart*

Topoglidis E., Cass A. E. G., Gilardi G., Sadeghi S., Beaumont N., Durrant J. R. (1998). Protein Adsorption on Nanocrystalline TiO₂ Films: An Immobilisation Strategy for Bioanalytical Devices. *Analytical Chemistry* 70, 5111 – 5113

Topoglidis E., Lutz T., Willis R. L., Barnett C. J., Cass A. E. G., Durrant J. R. (2000). Protein adsorption on nanoporous TiO₂ films: a novel approach to studying photoinduced protein/electrode transfer reactions. *Faraday Discussions* 116, 35 – 46

Topoglidis E., Campbell C. J., Cass A. E. G., Durrant J. R. (2001). Factors that Affect Protein Adsorption on Nanostructured Titania Films. A Novel Spectroelectrochemical Application to Sensing. *Langmuir* 17, 7899 – 7906

Topoglidis E., Campbell C. J., Palomares E., Durrant J. R. (2002). Photoelectrochemical study of Zn cytochrome-c immobilised on a nanoporous metal oxide electrode. *Chemical Communications*, 1518 – 1519

6. Literaturverzeichnis

- Topoglidis E., Astuti Y., Duriaux F., Grätzel M., Durrant J. R. (2003a).** Direct Electrochemistry and Nitric Oxide Interaction of Heme Proteins Adsorbed on Nanocrystalline Tin Oxide Electrodes. *Langmuir* 19, 6894 – 6900
- Topoglidis E., Discher B. M., Moser C., Dutton P. L., Durrant J. R. (2003b).** Functionalizing Nanocrystalline Metal Oxide Electrodes With Robust Synthetic Redox Proteins. *ChemBioChem* 4, 1332 – 1339
- Van Amerongen H., van Grondelle R. (2001).** Understanding the Energy Transfer Function of LHCII, the Major Light-Harvesting Complex of Green Plants. *Journal of Physical Chemistry B* 105, 604 – 617
- Vauthey S., Santoso S., Gong H., Watson N., Zhang S. (2002).** Molecular self-assembly of surfactant-like peptides to form nanotubes and nanovesicles. *PNAS* 99 (8), 5355 – 5360
- Visser H. M., Kleima F. J., van Stokkum I. H. M., van Grondelle R., van Amerongen H. (1996).** Probing the many energy-transfer processes in the photosynthetic light-harvesting complex II at 77 K using energy-selective sub-picosecond transient absorption spectroscopy. *Chemical Physics*. 210, 297 – 312
- Voigt J., Renger T., Schödel R., Schrötter T., Pieper J., Redlin H. (1996).** Excitonic effects in the light-harvesting Chl a/b-Protein complex of higher plants. *Physica Status Solidi (B)* 194, 333
- von Maltzahn G., Vauthey S., Santoso S., Zhang S. (2003)** Positively Charged Surfactant-like Peptides Self-assemble into Nanostructures. *Langmuir* 19, 4332 – 4337
- Wang Z.-S., Li F.-Y., Huang C.-H., Wang L., Wei M., Jin L.-P., Li N.-Q. (2000).** Photoelectric Conversion Properties of Nanocrystalline TiO₂ Electrodes Sensitized with Hemicyanine Derivatives. *Journal of Physical Chemistry B* 104, 9676 – 9682
- Weidmann J., Dittrich Th., Konstantinova E., Lauermann I., Uhlendorf I., Koch F. (1999).** Influence of oxygen and water related surface defects on the dye sensitized TiO₂ solar cell. *Solar Energy Materials and Solar Cells* 56, 153 – 165
- Wolf-Klein H., Kohl C., Müllen K., Paulsen H. (2002).** Biomimetisches Modell eines pflanzlichen Photosystems bestehend aus einem rekombinanten Lichtsammlerkomplex und einem Terrylfarbstoff. *Angewandte Chemie* 114 (18), 3526 – 3529
- Wolf-Klein H. (2001).** Biomimetisches Modell eines Photosystems aus dem pflanzlichen Photosyntheseapparat: Energietransfermessungen und Einzelmolekülspektroskopie an Fluoreszenzfarbstoff-markiertem rekombinanten Lichtsammlerkomplex. *Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Mainz*

6. Literaturverzeichnis

Yakushevskaya A. E., Jensen P. E., Keegstra W., van Roon H., Scheller H. V., Boekema E. J., Dekker J. P. (2001). Supermolecular organization of photosystem II and its associated light-harvesting antenna in *Arabidopsis thaliana*. *The European Journal of Biochemistry* 268, 6020 – 6028

Yang C., Kosemund K., Cornet C., Paulsen H. (1999). Exchange of pigment-binding amino acids in light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Biochemistry* 38, 16205 – 16213

Zer H., Vink M., Keren N., Dilly-Hartwig H. G., Paulsen H., Herrmann R. G., Andersson B., Ohad I. (1999). Regulation of thylakoid protein phosphorylation at the substrate level: reversible light-induced conformational changes expose the phosphorylation site of the light-harvesting complex II. *PNAS* 96, 8277 – 8282

Zhang X. T., Sutano I., Taguchi T., Meng Q. B., Rao T. N., Fujishima A., Watanabe H., Nakamori T., Uragami M. (2003). Al₂O₃-coated nanoporous TiO₂ electrode for solid-state dye-sensitized solar cell. *Solar Energy Materials And Solar Cells* 80 (3), 315 - 326

Zhao J., Ma N., Liu B., Zhou Y., Xu C., Kong J. (2002). Photoelectrochemistry of photosynthetic reaction centers embedded in Al₂O₃ gel. *Journal of Photochemistry and Photobiology A* 152 (1-3), 53 – 60

Zhao Y., Wasielewski M. R. (1999). 3,4:9,10-Perylenbis(dicarboximide) chromophores that function as both electron donors and acceptors. *Tetrahedron Letters* 40, 7047 – 7050

Anhang: Sequenz der LHCII-Mutante S106C,V229C

1	CAATATAGTA	TATTGTGAGC	GGTAAACAAT	TTCACACAGA	ATTCATTAAA	
						SacI
51	GAGGAGAAAT	TAAGC ATG CG	TAAATCTGCT	ACCACCAAGA	AAGTAGC GAG	
		M R	K S A	T T K K	V A S	
101	CTC TGGAAGC	CCATGGTACG	GACCAGACCG	TGTTAAGTAC	TTAGGCCCAT	
	S G S	P W Y G	P D R	V K Y	L G P F	
151	TCTCCGGTGA	GTCTCCATCC	TACTTGACTG	GAGAGTTCCC	CGGTGACTAC	
	S G E	S P S	Y L T G	E F P	G D Y	
201	GGTTGGGACA	CTGCCGGACT	CTCTGCTGAC	CCAGAGACAT	TCTCCAAGAA	
	G W D T	A G L	S A D	P E T F	S K N	
251	CCGTGAGCTT	GAAGTCATCC	ACTCCAGATG	GGCTATGTTG	GGTGCTTTGG	
	R E L	E V I H	S R W	A M L	G A L G	
301	GATCTGTCTT	CCCAGAGCTT	TTGTCTCGCA	ACGGTGTAA	ATTCGGCGAA	
	S V F	P E L	L S R N	G V K	F G E	
351	GCTGTGTGGT	TCAAGGCAGG	ATCTCAAATC	TTTT TGT GAGG	GTGGACTTGA	
	A V W F	K A G	S Q I	F C E G	G L D	
401	TTACTTGGGC	AACCCAAGCT	TGGTCCATGC	TCAAAGCATC	CTTGCCATAT	
	Y L G	N P S L	V H A	Q S I	L A I W	
						BSTEII
451	GGGCCACTCA	GGTTATCTTG	ATGGGAGCTG	TCGAAG GTTA	CCGTATTGCC	
	A T Q	V I L	M G A V	E G Y	R I A	
501	GGTGGGCCTC	TCGGTGAGGT	GGTTGATCCA	CTTTACCCAG	GTGGAAGCTT	
	G G P L	G E V	V D P	L Y P G	G S F	
551	TGATCCATTG	GGCTTAGCTG	ATGATCCAGA	AGCATTCGCA	GAATTGAAGG	
	D P L	G L A D	D P E	A F A	E L K V	
601	TGAAGGAACT	CAAGAACGGT	AGATTAGCCA	TGTTCTCAAT	GTTTGGATTC	
	K E L	K N G	R L A M	F S M	F G F	
651	TTCGTTCAAG	CTATTGTAAC	TGGAAAGGGT	CCTTTGGAGA	ACCTTGCTGA	
	F V Q A	I V T	G K G	P L E N	L A D	
701	TCATCTTGCA	GACCCAGTCA	ACAACAATGC	ATGGTCATAT	GCCACCAACT	
	H L A	D P V N	N N A	W S Y	A T N F	
751	TT TGT CCCGG	AAAA TAA ACA	CTCTTATATT	TATATGTTTT	TGTGATAGTA	
	C P G	K Stopp				

Vollständige Sequenz des LHCII-Klons S106C,V229C (ML1)

Rot: Start- und Stoppkodon

Grün: Restriktionsstellen der Enzyme SAC1 und BSTEII

Blau: Cysteine an Position 106 und 229 der Aminosäuresequenz

Anhang: Auflistung der verwendeten Farbstoffe

Trivialname	Hersteller	Lösungsmittel	λ_{Abs} [nm]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{em} [nm]
Alexa-Fluor 680-Maleimid	Molecular Probes	MeOH	684	168700	714
Atto 680	Fluka	EtOH	675	120000	699
Bodipy-Iodacetamid	Molecular Probes	MeOH	508	69000	543
BTI	MPI	An LHCP gekoppelt	701	85000	735
BTI-O-R ₂	MPI	THF, Chloroform	-	-	-
Cy5.5	Amersham	MeOH	678	250000	695
DDI	Radiant Dyes	MeOH	710	230000	745
DOTCI	Fluka	EtOH	682	198000	718
Dy700	Dyomics	EtOH	702	96000	723
Dy701	Dyomics	EtOH	706	115000	731
Dy730	Dyomics	EtOH	734	185000	750
Dy731	Dyomics	EtOH	736	225000	759
Fluorescein 5-Maleimid		Puffer pH 7,8	490	78000	515
Kryptocyanin	Radiant Dyes	EtOH	708	225000	-
Ni-Farbstoff	Fluka	Aceton	720	-	-
NIR-797	Fluka	DMSO	795	-	835
Oxazin 750	Radiant Dyes	EtOH	667	82500	-
PDI-COOH	MPI	MeOH, EtOH, THF	-	-	-
PDI-NH ₂	MPI	MeOH, EtOH, THF	-	-	-
PMI-COOH	MPI	MeOH, EtOH, Aceton	-	-	-
QDI	MPI	THF, Chloroform	-	-	-
QDI-O-R ₄	MPI	THF, Chloroform			
Qu42	MPI	MeOH	663	34543	710
Rhodamin 700	Sonstige	EtOH	643	92500	-
Rhodamin-Red C ₂ -Maleimid	Molecular Probes	MeOH	560	119000	580

Anhang: Auflistung der verwendeten Farbstoffe

Trivialname	Hersteller	Lösungsmittel	λ_{Abs} [nm]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{em} [nm]
S0121	FEW-Chemicals	MeOH	783	300000	798
S0247	FEW-Chemicals	MeOH	681	169000	704
S0524	FEW-Chemicals	MeOH	681	230000	699
S0525	FEW-Chemicals	MeOH	645	53000	
S0584	FEW-Chemicals	MeOH	681	190000	704
TDI	MPI	THF, Aceton	-	-	-
TDI-COOH	MPI	Toluol	677	-	-
Tetramethylrhodamin 5-Maleimid	Molecular Probes	MeOH	541	100900	568

Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Dyomics (Jena)
FEW-Chemicals (Wolfen)
Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Molecular Probes/Invitrogen (Karlsruhe)
MPI für Polymerchemie, AG Müllen (Mainz)
Radiant Dyes (Wermelskirchen)

Abkürzungen

A	Alanin
A_{280} , $A_{663,6}$, $A_{646,6}$	Absorption bei den Wellenlängen 280, 663,6 und 646,6 nm
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bidest	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Zirkulardichroismus
Chl	Chlorophyll
Chlid	Chlorophyllid
CMC	Kritische Mizelläre Konzentration
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
D	Aspartat
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
dNTP	dideoxy-Nukleotid
Dest	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	deoxy-Nukleotid
DPC	1,5-Diphenyl-Carbohydrazid
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
ϵ	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
h	Stunde(n)
His	Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IB	Inclusion bodies; Einschlusskörper
IPCE	incident monochromatic photon-to-current conversion efficiency
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
ITO	Indium-Zinnoxid
K	Lysin
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria Bertani
Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3	Apoproteine des LHCII
LHCII	Light harvesting complex II; Lichtsammlerkomplex II
LM	Laurylmaltosid; n-Dodecyl- β -D-Maltosid
Lys	Lysin

Anhang: Abkürzungen

MeOH	Methanol
min	Minute
NaP	Natriumphosphat-Puffer
NHE	Standard-Wasserstoffelektrode
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NTA	Nitriotriessigsäure
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte = Absorption bei 1 cm Weglänge
OG	(n)-Octyl- β -D-Glucopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PG	Phosphatidylglycerin
RET	Resonanz-Energietransfer
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Sensibilisator
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SH	Sulfhydryl
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCEP	Tris-(-2-cyanoethyl)-phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPAI	Tetrapropylammonium-Iodid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
u	Unit
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Valin
(v/v)	Konzentrationsangabe in % (Volumen/Volumen)
vgl.	vergleiche
VIS	sichtbarer Bereich des Lichts
(w/v)	Konzentrationsangabe in % /Gewicht/Volumen)
WSCP	Water soluble chlorophyll protein; Wasserlösliches Chlorophyllprotein
Φ_D, Φ_A	Quantenausbeute des Donors und des Akzeptors